

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Diplomová práce

Úloha Akt kinázy v kardioprotektivních mechanismech chronické hypoxie

The role of Akt kinase in cardioprotective mechanisms induced by chronic hypoxia

Bc. Milada Grešíková

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.

Konzultant: Mgr. Petra Wasková

Praha 2016

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, 15.08.2016

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za její podporu, nesmírnou trpělivost a čas, který mi věnovala během celého období studia i výzkumu v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Petře Waskové Ph.D. za poskytnuté rady, její chladnou hlavu a velkou podporu a pomoc v práci na grantovém projektu. Poděkování si také rozhodně zaslouží RNDr. Daniela Horníková za cenné rady při práci v laboratoři a Mgr. David Kolář za jeho nakažlivou dobrou náladu, umělecké oko a jeho připravenost vždy pomoci. Za finanční podporu současného studentského výzkumu děkuji i Grantové agentuře Univerzity Karlovy, která nám poskytla finanční prostředky na náš výzkumný projekt.

V neposlední řadě děkuji také své rodině, bez které by mi pravděpodobně nebylo toto studium umožněno.

OBSAH:

<u>Abstrakt</u>	5
<u>Abstract</u>	6
<u>Seznam použitých zkratk</u>	7
1. <u>ÚVOD</u>	10
2. <u>ISCHEMIE MYOKARDU A ISCHEMICKO-REPERFÚZNÍ POŠKOZENÍ</u>	11
2.1 Ochrana srdce vůči ischemicko-reperfúznímu poškození	13
3. <u>HYPOXIE A JEJÍ KARDIOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY</u>	15
4. <u>AKT KINÁZA</u>	17
4.1 Aktivace a regulace dráhy Akt	19
4.2 Struktura a funkce isoform Akt kinázy	21
5. <u>ÚLOHA AKT V KARDIOPROTEKTIVNÍM MECHANISMECH</u>	24
5.1 Role Akt kinázy v ochraně mitochondrií	25
6. <u>CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</u>	31
7. <u>MATERIÁL A METODY</u>	32
8. <u>VÝSLEDKY</u>	38
9. <u>DISKUZE</u>	43
10. <u>ZÁVĚR</u>	46
11. <u>LITERATURA</u>	48
12. <u>PŘÍLOHOVÁ ČÁST</u>	63

ABSTRAKT:

Kardiovaskulární choroby patří mezi nejrozšířenější onemocnění moderní civilizace. Mechanismy podílející se na ochraně srdeční tkáně jsou z tohoto důvodu centrem pozornosti kardiovaskulárního výzkumu. Adaptace na chronickou hypoxii je již po dlouhá desetiletí studována v souvislosti s příznivými účinky na funkci srdce a na jeho zvýšenou toleranci vůči ischemicko-reperfúznímu (I/R) poškození. Tato práce studující model adaptace na chronickou normobarickou hypoxii (CNH) popisuje úlohu kinázy Akt v procesech vedoucích k ochraně myokardu vůči I/R poškození. Srdce samců potkana kmene Wistar, kteří byli chováni v normoxických nebo hypoxických podmínkách (O_2 0.1) po dobu 3 týdnů, byla podrobena retrográdní perfúzi okysličeným Krebsovým-Henseleitovým pufrem, přičemž byla následně navozena 10 min ischemie a 10 min reperfúze. Na experimentálních vzorcích připravených z LV srdcí byly provedeny proteinové analýzy. Adaptace na CNH vedla ke zvýšení fosforylace Akt kinázy na Ser⁴⁷³, ale neovlivnila její fosforylaci na Thr³⁰⁸ ani její celkovou expresi. Rovněž byl pozorován signifikantní nárůst v poměru proteinů Bcl-2/Bax v srdcích adaptovaných na CNH. Tato práce blíže objasňuje působení krátkého ischemického insultu na Akt signalizaci a také ohledně její aktivace v souvislosti s adaptací na CNH.

ABSTRACT:

Cardiovascular diseases (CVDs) are the most widely spread diseases of modern civilization. Mechanisms involved in the protection of myocardial tissue are for that very reason in the focus of cardiovascular research. The adaptation to chronic hypoxia has been studied for many years in the context of its positive effects on heart function and its increased tolerance to ischemia-reperfusion (I/R) injury. This Master thesis describes the role of Akt kinase in the mechanisms leading to myocardial protection against I/R injury using the model of adaptation to chronic normobaric hypoxia (CNH). The hearts from male Wistar rats, that were kept in normoxic or hypoxic conditions (O_2 0.1) for the period of 3 weeks, were retrogradely perfused by oxygenated Krebs-Henseleit solution and then subjected to 10 min of ischemia and 10 min of reperfusion. Samples prepared from left ventricles (LV) of experimental hearts were later used for protein analyses. The adaptation to CNH leads to increased phosphorylation of Akt kinase on Ser⁴⁷³, but it did not affect the phosphorylation on Thr³⁰⁸ nor the total protein level of Akt. A significant increase in Bcl-2/Bax ratio was also observed in hearts adapted to CNH. This Master thesis further elucidates, how Akt signaling pathway and its activation are affected by short periods of ischemia in the context of adaptation to CNH.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

AIF	faktor indukující apoptózu
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	5'AMP-aktivovaná protein kináza
ANT	ADP/ATP translokáza
ATP	adenosintrifosfát
Bad	Bcl-2 asociovaný promotér buněčné smrti
Bak	antagonista smrti homologní s Bcl-2
Bax	Bcl-2 asociovaný X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	agonista smrti interagující s BH3 doménou
CAT	katalytická doména
CNH	chronická normobarická hypoxie
CK	kreatin kináza
CVDs	kardiovaskulární choroby
Cyp-D	cyclophylin D
DNA-PK	DNA-dependentní protein kináza
DTT	DL-dithiothreitol
ER	endoplasmatické retikulum
EXT	rozšířený C konec
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GF	růstový faktor
GLUT	glukózový transportér
GMP	guanosinmonofosfát
GPCR	receptory spřažené s G proteiny
GSK-3	glykogen syntáza kináza 3
H	hypoxie
HK	hexokináza
HM	hydrofóbní motif
I	ischemie
IAP	inhibitor apoptózy
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor 1

IP ₃	inositoltrifosfát
IPC	ischemický “preconditioning”
IPOC	ischemický “postconditioning”
IP ₃ R	IP ₃ receptor
IR	ischemie-reperfúze
I/R poškození	ischemicko-reperfúzní poškození
IRS-1	substrát insulinového receptoru
K	stabilizace
LDH	laktát dehydrogenáza
LV	levá komora
mTORC	komplex cílové molekuly pro rapamycin u savců
MPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti
N	normoxie
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ výměnný přenašeč
NHE	Na ⁺ /H ⁺ výměnný přenašeč
NO	oxid dusnatý
P	fosfátová skupina
PCr	fosfokreatin
PDK1	fosfoinositid dependentní kináza 1
PH doména	pleckstrin homology doména
PHLPP	PH domain leucine-rich repeat phosphatase
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIKK	PI3K-příbuzná protein kináza
PIP	fosfatidylinositol-3-monofosfát
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PKA	protein kináza A
PKB/Akt	protein kináza B
PKC	protein kináza C
PTEN	protein fosfatáza a homolog tensinu
RIPC	vzdálený ischemický “preconditioning”

ROS	reaktivní formy kyslíku
RTK	tyrosinkinázový receptor
RV	pravá komora
S	septum
SERCA	Ca ²⁺ -ATPáza sarko/endoplasmatického retikula
SH2	Src homology 2
SR	sarkoplasmatické retikulum
VDAC	napětově závislý iontový kanál

LITERÁRNÍ PŘEHLED

1. ÚVOD

Kardiovaskulární choroby (CVDs, cardiovascular diseases), mezi které se například řadí onemocnění jako je infarkt myokardu, onemocnění věnčitých tepen, hluboká žilní trombóza či vrozená srdeční vada, jsou nejčastější příčinou smrti po celém světě a podle statistických údajů Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organization, <http://www.who.int/en/>) jim každým rokem podlehne okolo 17,5 milionů lidí, přičemž 7,4 milionu lidí zemře na onemocnění věnčitých tepen a 6,7 milionu lidí podlehne infarktu myokardu. Úmrtí v důsledku CVDs tak podle statistických údajů z roku 2012 poskytnutých WHO představují 31% všech úmrtí po celém světě. Vzhledem ke stále se zhoršujícímu životnímu stylu a pravděpodobně i z důvodu stárnutí celé populace se toto číslo každým rokem zvyšuje a podle propočtů by dokonce v roce 2030 mohlo na CVDs zemřít až 23,6 milionů lidí. Z tohoto důvodu je soudobý kardiovaskulární výzkum zaměřen na mechanismy, které zvyšují odolnost srdeční tkáně a zmírňují tak následky ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození myokardu.

V současné době jsou známy různé intervence, které aktivují endogenní ochranné buněčné mechanismy a zvyšují tak toleranci srdce vůči I/R poškození. Jedním z nich je ischemický "preconditioning", při kterém je myokard vystavený krátkým periodám ischemie a reperfúze (Murry et al., 1986). Dále byl studován i efekt tzv. ischemického "postconditionu", kdy krátké periody reperfúze jsou následovány krátkými periodami reokluze, přičemž tato metoda rovněž snížila velikost infarktu v podobné míře jako "preconditioning" (Heusch, 2015). Kardioprotektivní účinky byly dále pozorovány v případě pravidelného vytrvalostního fyzického tréninku (Kavazis et al., 2009; Powers et al., 2008), kalorické restrikce o více než 15-25% (Shinmura, 2011; Speakman and Mitchell, 2011) a adaptace na chronickou hypoxii, kdy u lidí žijících ve vysokých nadmořských výškách byl zdokumentován nižší výskyt infarktu myokardu

(Hurtado, 1960) a rovněž i nižší úmrtnost na ischemickou chorobu srdeční a onemocnění věnčitých tepen (Mortimer et al., 1977; Voors and Johnson, 1979).

Ve výše zmíněných fyziologických adaptacích je pravděpodobně významným regulátorem Akt kináza, která po své aktivaci spouští molekulární mechanismy podílející se na ochraně srdce vůči různým stresovým faktorům (Aikawa et al., 2000; Armstrong, 2004; Heusch, 2015; Rohrbach et al., 2014). Zvláštní pozornost bude v této práci věnována aktivaci Akt dráhy v souvislosti s ochranou mitochondrií přes aktivaci hexokinázy 2 (HK2) a fosforylaci některých anti- a pro-apoptotických proteinů.

2. ISCHEMIE MYOKARDU A ISCHEMICKO-REPERFÚZNÍ POŠKOZENÍ

Ischemická choroba srdeční (neboli onemocnění věnčitých tepen) a její akutní forma, infarkt myokardu, mají ze všech kardiovaskulárních chorob na svědomí nejvíce obětí po celém světě. Ischemická choroba srdeční má dlouhou asymptomatickou fázi, která následně může vyústit až ve formování aterosklerotických plátů, které mají později za následek snížení průchodnosti arterie.

Ischemie myokardu nastává v případě zmenšení průměru koronární arterie o 50% a více. Srdce v tuto chvíli není dostatečně zásobeno kyslíkem a v případě, že nedojde k rychlému obnovení průtoku, může toto nedostatečné prokrvení vést až k ireversibilnímu poškození (Kloner et al., 1983; Tousoulis et al., 2008). V klinické praxi je proto rychlé obnovení průtoku krve nejčastějším způsobem, jak lékaři mohou zabránit dalšímu poškození. Nicméně dnes už je známo, že i samotná reperfúze může mít za následek další poškození srdeční tkáně, které může vést i ke komorovým arytmiím a poškození kontraktility srdce (Hausenloy and Yellon, 2015). Tento efekt se nazývá ischemicko-reperfúzní (I/R) poškození.

Během srdeční ischemie dochází ke změně metabolismu kardiomyocytů. Při nedostatku kyslíku buňky přechází z aerobního na anaerobní metabolismus (Jennings and Reimer, 1991), což vede ke zvýšené produkci laktátu a následně i ke snížení intracelulárního pH z důvodu hromadění H⁺ iontů, které nejsou při

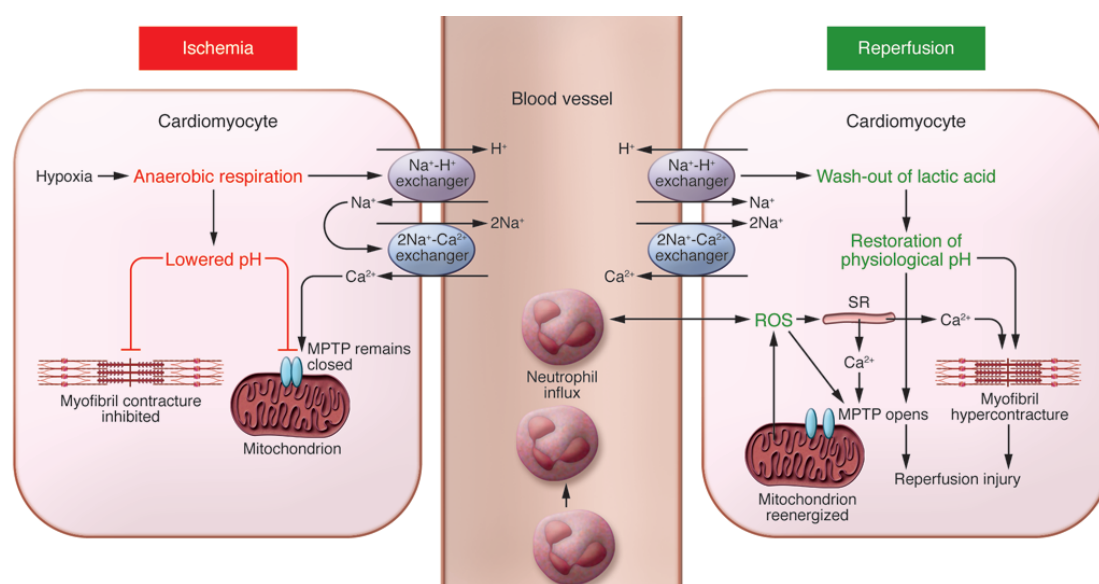
vážné ischemii dostatečně rychle odplavovány a tímto dochází k jejich akumulaci. Bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace laktátu a cytosolického NADH inhibuje glykolýzu a celkově snižuje produkci ATP (Neely and Grotyohann, 1984). Jakmile dojde k inhibici glykolýzy, tak postupně dochází i ke snížení transportu glukózy do buněk. Příjem glukózy buňkami tak může odrážet i jejich viabilitu a tedy i poškození tkáně (Bricknell et al., 1981; Opie, 1996).

Intracelulární hromadění H^+ iontů rovněž vede k aktivaci Na^+/H^+ výměnného přenašeče (NHE), který transportuje H^+ ionty z buňky výměnou za Na^+ ionty, které jsou přenášeny do intracelulárního prostoru. Koncentrace Na^+ v buňce se tedy rychle zvyšuje, čemuž napomáhá i to, že během vážné ischemie není v kardiomyocytech dostatečné množství ATP, které by pohánělo Na^+/K^+ ATPázu a dochází tak k dalšímu hromadění Na^+ iontů. Tato akumulace Na^+ iontů v cytosolu aktivuje Na^+/Ca^{2+} výměnný přenašeč (NCX), který za normálních podmínek přenáší Na^+ ionty do intracelulárního prostoru a Ca^{2+} ionty ven, nicméně během ischemie se tento transport otočí, což následně vede k Ca^{2+} -přetížení kardiomyocytů (Avkiran and Marber, 2002; Fröhlich et al., 2013; Karmazyn et al., 1999).

Jak již bylo řečeno, cytosolické pH během ischemie klesá pod hodnotu 7.0, toto kyselé prostředí brání otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti neboli MPT póru (MPTP, mitochondrial permeability transition pore). Avšak během reperfúze dojde k obnovení fyziologického pH odplavením metabolitů s následnou aktivací různých buněčných přenašečů (Lemasters et al., 1996). MPT pór již není dále inhibován a dochází tak k poškození až smrti kardiomyocytů. Tyto poznatky byly potvrzeny i pokusy na potkanech a králících, kdy reperfúze kyselým pufrem může značně snížit velikost poškození srdce (Bond et al., 1993; Cohen et al., 2007; Qian et al., 1997).

Během reperfúze je rovněž znovu aktivován elektronový transportní řetězec a dochází tak k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species). ROS přímo poškozují buněčnou a hlavně mitochondriální DNA, způsobují denaturaci proteinů a destabilizují membrány mitochondrií a sarkoplasmatického retikula, což následně umožní transport malých nescifických molekul přes membrány a může vést až k tzv. "bobtnání" mitochondrií (mitochondrial swelling) a apoptóze (Zhou et al., 2015). ROS se

rovněž podílejí na otevření MPTP a jelikož mají negativní vliv na funkci sarkoplasmatického retikula, tak dále přispívají k Ca^{2+} -přetížení buněk (Harman and Maxwell, 1995). Jak je přehledně zobrazeno i na Obrázku č. 1, ROS také aktivují stresové a pro-zánětlivé kaskády, jejichž nadměrná aktivace napomáhá dalšímu poškození postižené tkáně v okolí infarktu (Marchant et al., 2012; Meldrum MD et al., 1998).



Obrázek č. 1: Schéma ukazující hlavní mechanismy působící při I/R poškození (Hausenloy and Yellon, 2013) .

MPTP: mitochondriální pór přechodné propustnosti, **ROS:** reaktivní formy kyslíku, **SR:** sarkoplasmatické retikulum

2.1 Ochrana srdce vůči ischemicko-reperfúznímu poškození

I přes veškerý pokrok v porozumění mechanismů způsobující poruchy srdce, v dnešní době je bohužel poškození myokardu u pacientů, kteří prodělali chirurgický zákrok, stále relativně běžné. Přičemž I/R poškození je hlavním rozhodujícím faktorem způsobující zhoršení funkce myokardu. Z tohoto důvodu

se stále hledají nové postupy, které by mohly snížit poškození srdce následující po I/R (Calafiore et al., 2003; Turer and Hill, 2010).

Jedním z těchto postupů je již zmíněný ischemický “preconditioning” (IPC) , který byl poprvé dokumentován již v roce 1986 na psech, kdy byly před 40-ti minutovou ischemií provedeny 4 cykly 5-ti minutové okluze, které byly pokaždé následovány 5-ti minutovou reperfúzí. Tento protokol ukázal, že velikost infarktu se snížila až o 75% (Murry et al., 1986). Později byla publikována studie, podle které je hlavním mediátorem IPC nashromážděný adenosin, který posléze aktivuje adenosinové A₁ receptory v srdci a srdce je tak odolnější vůči nadcházejícímu ischemickému insultu (Liu et al., 1991).

I přestože byl IPC studován i u lidí, jeho klinické použití je velice limitované (Yellon et al., 1993). Srdce je po IPC chráněno ve dvou fázích, kdy první fáze začíná okamžitě po provedení IPC protokolu a chrání srdce proti nekróze po dobu 2-4 hodin. Druhá fáze IPC nastává 12-24 hodin po intervenci a po dobu 2 – 3 dní chrání srdce vůči tzv. omráčení (myocardial stunning), což je reversibilní porucha kontraktility srdce a nastává při reperfúzi po akutní ischemii (Kloner et al., 1998; Marber et al., 1993). IPC rovněž není vhodné pro klinickou praxi z důvodu vysokého rizika poškození hlavních arterií a vystavuje tak srdce přílišnému stresu (Vaage and Valen, 2003).

Další metodou studovanou v souvislosti kardioprotekce vůči I/R poškození je vzdálený ischemický “preconditioning” (RIPC, remote ischemic preconditioning). RIPC byl odvozen z matematického modelu a byl nejdříve považován spíše za laboratorní kuriozitu a byl tedy vědeckou komunitou opomíjen (Whittaker and Przyklenk, 1994). Nicméně později bylo ukázáno, že RIPC poskytuje srdci ochranu vůči I/R poškození srovnatelnou s IPC i v případě použití metody “preconditioningu” na orgány, které jsou srdci velmi vzdálené (Gho et al., 1996; Takaoka et al., 1999).

Nicméně obě formy “preconditioningu” nejsou v klinické praxi možné u pacientů s akutním infarktem myokardu, kdy v době příjmu pacienta do nemocnice je věnčitá tepna již neprůchodná. Terapie, kterou by bylo možné použít během reperfúze, by byla lépe realizovatelná v klinickém prostředí a tak byl v roce 2003 popsán fenomén nazvaný ischemický “postconditioning” (IPOC, ischemic postconditioning), kdy bylo zjištěno, že pokud byla 60-ti minutová

okluze koronární tepny následována 3-mi cykly 30 s reperfúze a 30 s okluze, velikost infarktu myokardu byla signifikantně zmenšena (Zhao et al., 2003). Několik klinických studií již také potvrdilo pozitivní efekt IPOC, nicméně další výzkum je nutný pro objasnění jednotlivých mechanismů uplatňujících se při IPOC (Hahn et al., 2013; Luo et al., 2007; Sörensson et al., 2010; Staat et al., 2005).

Na základě výzkumů ischemických “conditioningů” se začínají objevovat i studie, které se snaží vyvinout látky, které by byly schopné spustit stejné protektivní mechanismy. Již byly studovány efekty agonistů A₁ a A₃ receptorů nebo i kardioprotektivní účinky δ -opioidů či atriálního natriuretického peptidu (ANP, atrial natriuretic peptide) (Dana et al., 2000; Fryer et al., 1999; Kitakaze et al., 2007; Takano et al., 2001; Yang et al., 2006).

Kromě výše zmíněných intervencí má kardioprotektivní účinky i adaptace na chronickou hypoxii, která výrazně zvyšuje toleranci myokardu k I/R poškození, což se například projevilo snížením poškození tkáně po infarktu myokardu i menším výskytem komorových arytmií po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii (Neckár et al., 2004) i na chronickou normobarickou hypoxii (Kasparova et al., 2015).

Nicméně další výzkum je nutný pro objasnění a lepší porozumění molekulární podstaty těchto ochranných mechanismů.

3. HYPOXIE A JEJÍ KARDIOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY

Hypoxie tkáně nastává v případě, kdy požadavky tkáně na dodávku kyslíku převyšují jeho skutečnou dostupnost a dochází tedy k nedostatku kyslíku v tkáni. Je důležité rozlišit termíny ischemie a hypoxie, které bývají v populárně naučné, ale i v odborné literatuře zaměňovány. Ischemie nastává při sníženém zásobení krví či úplném zastavení průtoku krve tkání, což má za následek snížené zásobování tkáně substráty a také snížené odvádění metabolitů, hlavně laktátu a protonových iontů. Během hypoxie je perfúze tkáně ve většině případů normální a dochází tak k odmyváání metabolitů, hlavně produktů glykolýzy (Essop, 2007; Ostadal et al., 1999).

Na základě příčiny můžeme hypoxii řadit do 4 hlavních podtypů (Ostadal and Kolar, 2007; Ošťádal and Kolář, 1999):

Ischemická hypoxie neboli **ischemie myokardu** je způsobena, jak již bylo řečeno, snížením nebo přerušením průtoku krve koronárních arterií, přičemž srdce tak není dostatečně zásobeno kyslíkem a živinami většinou z důvodu nashromáždění aterosklerotických plátů. Pokud dojde k úplnému zastavení průtoku krve, může ischemická hypoxie vést až k infarktu myokardu.

V případě, že je tkáň dostatečně prokrvena i zásobena kyslíkem, ale není schopná intracelulární kyslík využít, tak tento stav nazýváme **histotoxická hypoxie**. Tento typ hypoxie může nastat, pokud jsou například inhibovány enzymy oxidativní fosforylace v důsledku otravy kyanidy.

Anemická hypoxie nastává v případě, že i při normálním parciálním tlaku kyslíku (pO_2) není tkáň dostatečně zásobena z důvodu snížené transportní kapacity krve pro kyslík. Může to být tedy způsobeno nedostatkem erytrocytů nebo hemoglobinu nebo jeho neschopností přenášet kyslík.

Systémová hypoxie nastává při snížení pO_2 v arteriální krvi, přičemž prokrvení je dostatečné. Tato hypoxie nastává i za fyziologických podmínek během perinatálního vývoje a také je jí vystaveno srdce při pobytu ve vysokých nadmořských výškách.

Souvislá dodávka kyslíku je pro většinu organismů nezbytná pro život, z tohoto důvodu se vytvořili mechanismy, které umožňují překlenout období akutního nedostatku kyslíku a nebo se tomuto prostředí přizpůsobit. Mezi tyto mechanismy například patří zvýšená erythropoéza či angiogeneze pro zlepšení transportu kyslíku a substrátů, dále se zvyšuje i kapacita anaerobního metabolismu a spotřeba ATP se stává efektivnější (Ostadal et al., 1999).

Bylo prokázáno, že zmíněné mechanismy související s adaptací na hypoxii hrají významnou roli v ochraně srdce. U populací žijících ve vyšších nadmořských výškách je například nižší výskyt hypertenze, infarktu myokardu i arytmií v důsledku ischemie a reperfúze a je pozorované i rychlejší obnovení kontraktilní funkce srdce po ischemickém insultu (Asemu et al., 1999; Baker et al., 1997; Hurtado, 1960).

Studie provedené na laboratorních zvířatech rovněž ukázaly mnohé ochranné účinky hypoxie za použití hypobarické (Neckár et al., 2002; Poupa et

al., 1966; Widimský et al., 1973) nebo normobarické komory (Neckár et al., 2013).

Protektivní účinek hypoxie závisí na intenzitě a délce trvání hypoxie. Nicméně se objevují i studie, které poukazují na určité intermitentní režimy hypoxického působení, které by mohly simulovat cykly spánkové apnoe, které jsou naopak nepříznivé. Například studie skupiny Joyeux-Faure z roku 2005, studovala vliv modelu chronické intermitentní hypoxie na ochranu srdce vůči I/R poškození. Jejich protokol se skládal ze střídání repetitivních 1-min cyklů, kdy po dobu 40 s byl pO_2 udržován na 5% a po zbylých 20 s byl pO_2 udržován na 21%, přičemž byl tento protokol aplikován 8 hodin denně po dobu 35 dní. V této studii adaptace na hypoxii naopak vedla ke zvýšené citlivosti srdce k infarktu myokardu (Joyeux-Faure et al., 2005). I další studie poukazují na důležitost typu hypoxie a její doby trvání a také intenzity expozice, přičemž tyto faktory potom určují, zda má hypoxie na organismus pozitivní nebo nepříznivé účinky (Béguin et al., 2005; Park and Suzuki, 2007). Dále Neckár a kol. ukázali, že 1 hod reoxygenace denně v průběhu 3-týdenní adaptace ztrácí příznivé účinky chronické adaptace (Kasparova et al., 2015).

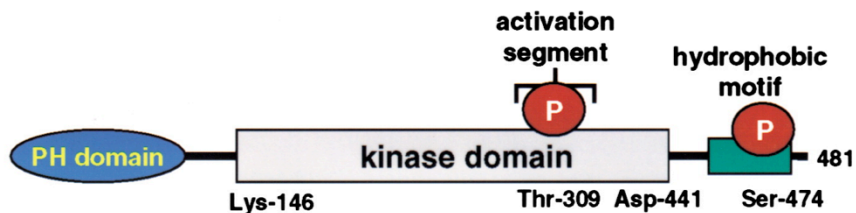
4. AKT KINÁZA

Protein kináza B (PKB) nebo-li Akt kináza se může uplatňovat v mnoha již výše zmíněných kardioprotektivních intervencích a je významným regulátorem buněčného růstu, energetického metabolismu, přežití a proliferace buněk a také lékové rezistence. Může tedy hrát důležitou roli v ochranných mechanismech myokardu vůči stresovým faktorům (Aikawa et al., 2000; Armstrong, 2004). Z tohoto důvodu jsme se na ni v této práci zaměřili ve spojení s antiapoptotickou funkcí hexokinázy (Miyamoto et al., 2007a; Roberts et al., 2013).

Akt byla poprvé objevena Stephenem Staalem v roce 1987 jako proto-onkogen v myším retroviru leukemie Akt8 (Staal, 1987). Nicméně v následujících letech výzkum *v-akt* genu nepřinesl mnoho dalších poznatků a totožnost a funkce tohoto genu zůstávala nadále skryta. Až v roce 1991 byla Akt popsána jako homolog protein kináz A a C a byla nazvána RAC-PK kinázou (Related to A and C-

protein kinase), což bylo ještě tentýž rok změněno na PKB (Coffer and Woodgett, 1991; Jones et al., 1991a) a zároveň bylo potvrzeno, že PKB je homologem v-Akt (Bellacosa et al., 1991).

V dnešní době je již dobře známo, že Akt je kinázou katalyzující fosforylaci na serinových či threoninových zbytcích proteinů a náleží do rodiny AGC kináz, které jsou příbuzné AMP/GMP kinázám a protein kináze C (Brazil and Hemmings, 2001; Kumar and Madison, 2005). V savčích buňkách byly na odlišných chromosomech identifikovány tři geny kódující 3 isoformy Akt, které byly nazvány Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) a Akt3 (PKB γ) (Brodbeck et al., 1999; Cheng et al., 1992; Jones et al., 1991b). Struktura isoform je velice homologní (Kumar and Madison, 2005) a všechny se skládají z N-terminální PH domény (pleckstrin homology domain) zajišťující vazbu Akt na fosfatidylinositoly, přičemž Akt se svou PH doménou může vázat jak na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate), tak i na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) (James et al., 1996; Lietzke et al., 2000; Milburn et al., 2003). V centrální oblasti molekuly Akt se dále nachází centrální katalytická doména (CAT, catalytic domain), která je následována rozšířeným C-koncem (EXT, C-terminal extension). Součástí CAT je také jedno z důležitých fosforylačních míst, kdy při fosforylaci na Thr³⁰⁸ (v případě Akt1) dochází k částečné aktivaci Akt. Pro plnou aktivaci je ještě nutná fosforylace na Ser⁴⁷³, který je lokalizován v oblasti regulačního hydrofóbního motivu (HM, hydrophobic motif) v EXT (Kumar and Madison, 2005; Peterson and Schreiber, 1999).



Obrázek č. 2: Schématická struktura Akt (Yang et al., 2002)

4.1 Aktivace a regulace dráhy Akt

K aktivaci signalizační dráhy Akt dochází v odpověď na mnoho různých signálních podnětů. K nejznámějším patří insulin, insulinu-podobný růstový faktor 1 (IGF-1, insulin-like growth factor 1), estrogen a kardiotropin (Aikawa et al., 2000; Kuwahara et al., 2000; Patten et al., 2004; Yamashita et al., 2001). Nicméně zvýšená aktivace Akt byla pozorována i v odpověď na kanabinoidy přes kanabinoidní receptory CB1 (Hiley and Ford, 2004) nebo na morfin v případě kardioprotekce vyvolané opioidy (Gross et al., 2006).

Vedle toho jsou dnes známé i přírodní látky přítomné v potravě, které také mohou mít pozitivní účinky na aktivaci Akt a tím i vliv na ochranu srdce. Jednou z těchto látek je například resveratrol přítomný v červeném víně (Chong et al., 2015; Das et al., 2005; Goh et al., 2007), mezi další patří polyfenoly přítomné v zeleném čaji (Baron-Menguy et al., 2007) nebo fytoestrogeny obsažené v sóji (Gardner et al., 2008). Kromě chemických látek může aktivaci Akt ovlivnit i adaptace na hypoxii a mechanický nebo osmotický stres (Chen et al., 2001a; Galvez et al., 2003; Kim et al., 2002).

V odpověď na tyto a mnoho dalších podnětů dochází k aktivaci membránových receptorů různého typu, včetně tyrosinkinázových receptorů (RTK, receptor tyrosin kinase) (Alessi et al., 1996) a receptorů spřažených s G proteiny (GPCR, G protein-coupled receptor) (Chesley et al., 2000). Na tyto aktivované receptory se dále váže fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase) SH2 (Src homology 2) doménou své regulační podjednotky p85, čímž se tak dostává do blízkosti plazmatické membrány. V této pozici může následně svou katalytickou podjednotkou p110 katalyzovat fosforylaci hlavně fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃) (Milburn et al., 2003; Watton and Downward, 1999). Tyto molekuly dále tvoří vazebná místa pro proteiny obsahující PH doménu, mezi než patří i Akt kináza, a navozují jejich translokaci k cytoplasmatické membráně.

Za klidových podmínek je u Akt kinázy PH doména asociována s katalytickou doménou, a tím je Akt udržována v inaktivním stavu (Calleja et al., 2007). V přítomnosti PIP₃ se Akt svou PH doménou naváže na membránu a tato vazba vede ke změně její konformace, což umožní její fosforylaci na Thr³⁰⁸ v

centrální katalytické doméně fosfoinositid dependentní protein kinázou 1 (PDK1, phosphoinositide-dependent kinase 1), která rovněž obsahuje PH doménu (Anderson et al., 1998; Milburn et al., 2003; Stephens et al., 1998).

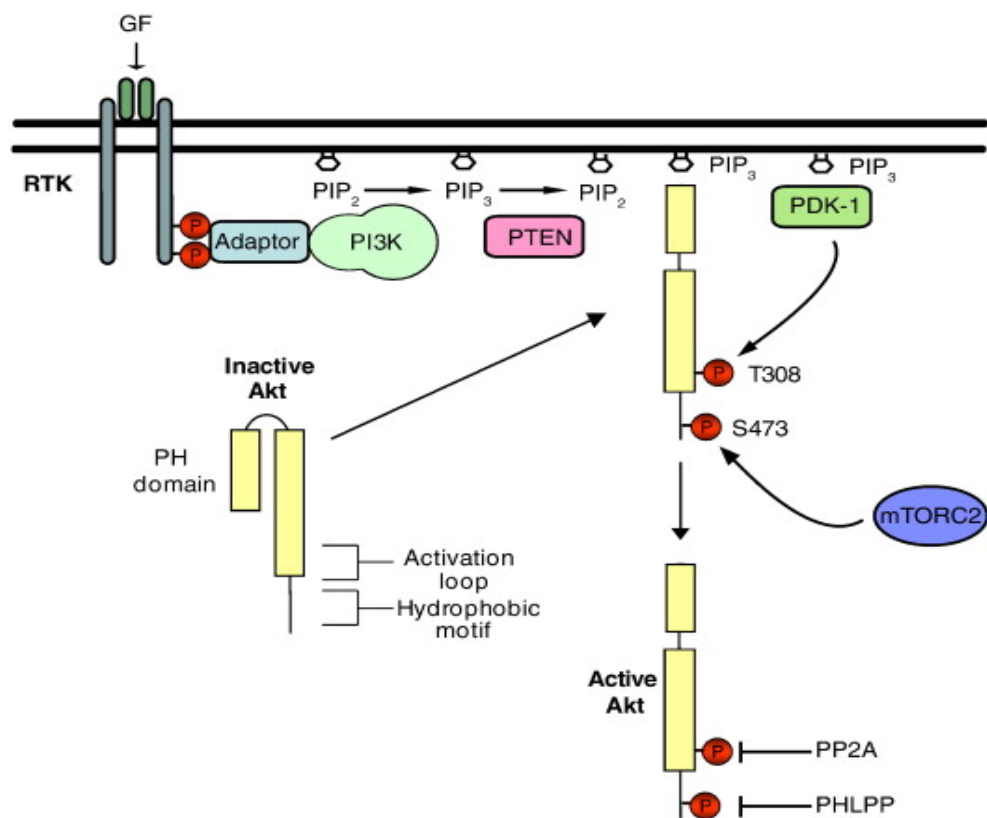
Po fosforylaci na Thr³⁰⁸ se aktivita Akt kinázy zvyšuje až 100-násobně, avšak pro dosažení maximální aktivity je nutná fosforylace i na C-terminálním Ser⁴⁷³ zbytku (Alessi et al., 1996; Sarbassov et al., 2005). Dlouho nebylo zřejmé, která kináza je zodpovědná za fosforylaci Akt na Ser⁴⁷³, nicméně dnes se předpokládá, že hlavní kinázou je komplex 2 cílové molekuly pro rapamycin u savců (mTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2) (Sarbassov et al., 2005). Jiným kandidátem je také další PI3K-příbuzná protein kináza (PIKK, Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) s názvem DNA-dependentní protein kináza (DNA-PK, DNA-dependent protein kinase), která hraje roli v aktivaci Akt hlavně v návaznosti na poškození DNA (Bozulic et al., 2008).

Obě fosforylační místa výrazně ovlivňují aktivitu Akt kinázy. I přestože doposud není plně objasněno, jaký podíl na regulaci fosforylace a aktivitě Akt má fosforylace na serinovém zbytku, nové studie poukázaly na možnost, že tato fosforylace může následně ovlivnit i fosforylaci na threoninovém zbytku (Garcia-Martinez et al., 2009) nebo může mít vliv na specifitu signalizace Akt (Guertin et al., 2006; Moore et al., 2011).

K ukončení signalizace přes PI3K/Akt může docházet několika způsoby. Jedním z nejznámějších způsobů je regulace přes protein fosfatázu a homolog tensinu (PTEN, protein phosphatase and tensin homolog), kdy PTEN defosforyluje PIP₃ a tím tak snižuje i aktivaci Akt (Cai and Semenza, 2005). Nicméně k deaktivaci Akt může docházet i přímou defosforylací přes protein fosfatázu 2 (PP2, protein phosphatase) defosforylující Akt na Thr³⁰⁸ (Hoehn et al., 2015) a PHLPP (z anglického PH domain leucine-rich repeat phosphatase), která defosforyluje Akt na Ser⁴⁷³ (Gao et al., 2005).

Jistě stojí také za zmínku, že v případě defosforylace Akt v hydrofóbním motivu, tedy na zbytku Ser⁴⁷³, se aktivita Akt může snížit až o 90%. Přes toto velké snížení aktivity byla pozorována fosforylace některých substrátů v buňkách, kde byla přítomna Akt fosforylovaná pouze na Thr³⁰⁸. Tyto pozorování mohou poukazovat na odlišnou substrátovou specifitu v závislosti na fosforylaci

Akt nebo na zapojení ještě dalších kináz, které by mohly Akt substituovat v případě její nedostatečné aktivace (Newton and Trotman, 2014).



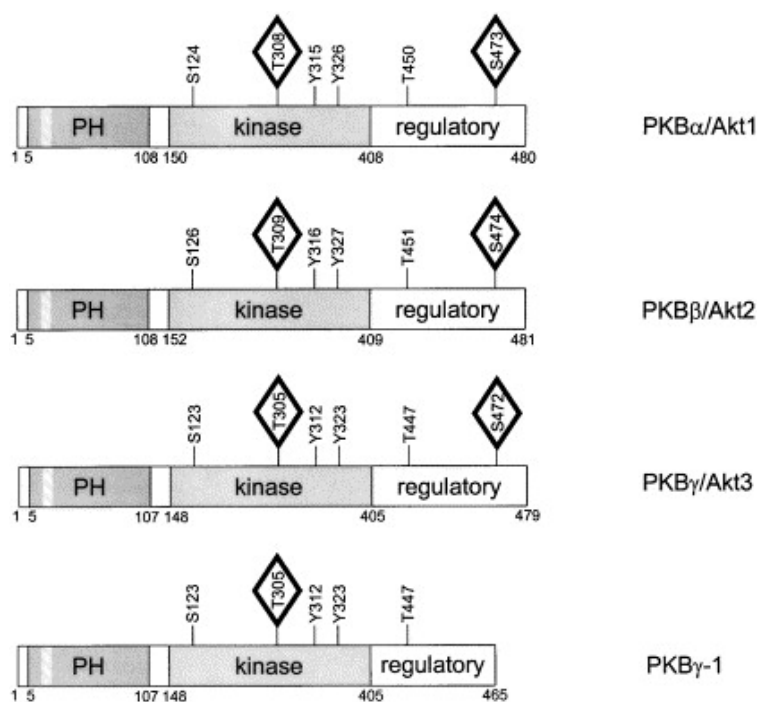
Obrázek č. 3: Schéma popisující aktivaci Akt (Hers et al., 2011)

GF: růstový faktor, **mTORC2:** komplex 2 cílové molekuly pro rapamycin u savců, **P:** fosfátová skupina, **PDK1:** fosfoinositid dependentní kináza 1, **PI3K:** fosfatidylinositol-3-kináza, **PIP₂:** fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, **PIP₃:** fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát, **PTEN:** fosfatáza a homolog tensinu, **RTK:** tyrosinkinázový receptor

4.2 Struktura a funkce isoform Akt kinázy

Jak již bylo zmíněno výše, existují 3 isoformy Akt a každá z nich je kódována odlišným genem, nicméně jejich struktura i jejich domény jsou si na aminokyselinové úrovni navzájem velice podobné (Kumar and Madison, 2005). V

srdci se vyskytují všechny 3 isoformy Akt kinázy, přičemž Akt1 a Akt2 jsou majoritní. U všech zmíněných isoform je přítomna N-terminální PH doména, která se skládá z přibližně 100 aminokyselin a zprostředkovává vazbu Akt na fosfatidylinositol (Ferguson et al., 2000; Lietzke et al., 2000). PH doména je následována centrální katalytickou doménou (CAT, catalytic domain), která sdílí vysokou podobnost s doménami PKA a PKC (Jones et al., 1991b), v rámci této domény Akt kinázy je také jedno z aktivačních fosforylačních míst na threoninu (T308 u Akt1), jehož pozice se mezi isoformami liší jen velice málo. Druhé regulační fosforylační místo se nachází na serinu (S473 u Akt1) v C-terminálním hydrofóbním konci (Alessi et al., 1996)(rovněž viz. Obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Struktura Akt isoformem (Nicholson and Anderson, 2002)

Vzhledem k vysoké homologii mezi isoformami Akt by se dalo předpokládat, že isoformy by měly být schopné fosforylovat stejné substráty, nicméně mnohé analýzy ukázaly, že se isoformy svými rolemi v buňkách velice liší.

U Akt1 je známo, že se vyskytuje ve většině tkání, přičemž nejvíce je exprimována v srdci, plicích a mozku (Coffer and Woodgett, 1991). Mezi její hlavní funkce patří regulace buněčného růstu a přežití buněk (Chen et al., 2001b; Cho et al., 2001a). Isoforma Akt2 se nejvíce vyskytuje ve svalech a hnědém tuku a je známá tím, že se podílí na metabolismu glukózy (Altomare et al., 1998; Jones et al., 1991b), přičemž její nedostatečná exprese může vést až k diabetu mellitu (Cho et al., 2001b). Akt2 se rovněž podílí na diferenciaci svalových buněk (Vandromme et al., 2001). Isoforma Akt3 byla nejvíce studována v mozku, kde se hojně vyskytuje, ale rovněž je exprimována v kosterním svalu, plicích, ledvinách a játrech (Brodbeck et al., 1999; Nakatani et al., 1999; Yang et al., 2005). U jednotlivých isoform bylo také zjištěno, že kromě odlišné tkáňové exprese se isoformy liší i lokalizací v samotných buňkách. Akt1 byla nejvíce pozorována v cytosolu, Akt2 se podle studií nejvíce vyskytuje v okolí mitochondrií a Golgiho aparátu a u Akt3 je dnes známa její translokace do jádra (Santi and Lee, 2010). Tato fakta poukazují na možnost, že jednotlivé isoformy mohou být i specificky nezávisle na sobě aktivovány nebo regulovány dalšími kinázami. Nedávná studie například ukázala, že spojovací segment neboli tzv. "*linker region*", jehož funkcí je pravděpodobně regulace katalytické domény (CAT), je mezi isoformami Akt1 a Akt2 značně odlišný, což umožňuje specifickou aktivaci Akt1 isoformy kasein kinázou 2 (CK2, casein kinase 2) a má za následek selektivitu k substrátu, v tomto případě palladinu (Girardi et al., 2014).

V srdečních buňkách jsou v určité míře exprimovány všechny isoformy Akt, nicméně isoformy Akt1 a Akt2 jsou přítomny nejvíce (Matsui and Rosenzweig, 2005). Akt1 je ze všech 3 isoform nejvíce známa svými kardioprotektivními účinky, podporuje například fyziologický růst, správnou funkci srdce a přežití buněk v případě poškození (Hers et al., 2011). U Akt1 byla rovněž zjištěna translokace do buněčného jádra, kde má následně pozitivní vliv na funkci komor a kontraktilitu myocytů (Rota et al., 2005). Isoforma Akt3 byla rovněž studována v souvislosti s růstem srdce, přičemž bylo zjištěno, že nadměrná exprese Akt3 vede k maladadaptivní hypertrofii (Taniyama et al., 2005). U isoform Akt1 a Akt3 byla dále zkoumána jejich role ve vývoji a funkci kardiovaskulárního systému, neboť u myší s delecí genů *Akt1 a Akt3* (*Akt1*^{-/-} a

Akt3+/-) bylo pozorováno náhlé srdeční selhání, které mohlo být způsobeno i špatným vývojem kardiomyocytů a celého srdce (Yang et al., 2005).

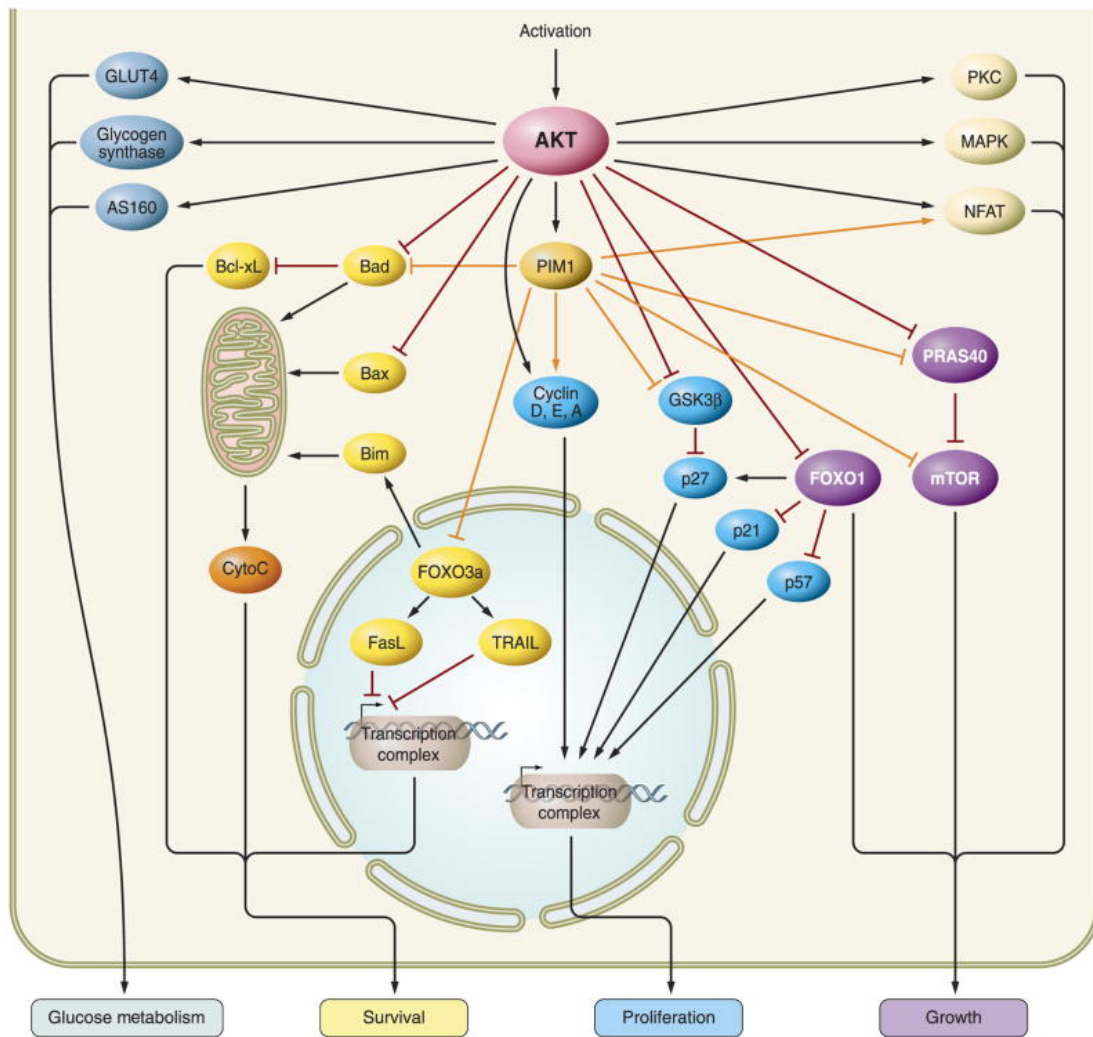
Isoforma Akt2 se primárně zapojuje do regulace insulinem řízeného příjmu glukózy buňkami a má tak vliv na udržení homeostázy metabolismu glukózy. Dále se tato isoforma pravděpodobně podílí na ochraně kardiomyocytů před apoptózou, neboť bylo zjištěno, že u myší s delecí genu *Akt2* (*Akt2*^{-/-}) dochází po infarktu myokardu k daleko většímu poškození srdce než u kontrolních myší ("wild-type") (DeBosch et al., 2006).

5. ÚLOHA AKT V KARDIOPROTEKTIVNÍCH MECHANISMECH

Akt kináza se v buňce účastní četných procesů (viz. Obrázek č. 5), které mohou hrát podstatnou roli v ochraných mechanismech. Substráty Akt ovlivňují převážnou většinu dějů odehrávající se v buňkách, včetně buněčného růstu, proliferace, přežití, transkripce genů a také komunikace (pro přehled Sussman et al., 2011).

Akt kináza se regulací těchto dějů podílí na ochraně srdce vůči I/R poškození (Fujio et al., 2000), tlakovému přetížení (Ceci et al., 2007) nebo vůči oxidativnímu stresu (Aikawa et al., 2000).

V této kapitole budou blíže popsány vybrané procesy, kterým Akt kináza chrání buňky před spuštěním apoptotické dráhy, hlavně přes mechanismy udržující správnou funkci mitochondrií.



Obrázek č. 5: Signalizace Akt kinázy v kardiomyocytech (Sussman et al., 2011). Toto schéma shrnuje některé buněčné procesy v myokardu, na jejichž regulaci se Akt podílí. Akt kináza reguluje růst buněk, translaci proteinů, metabolismus i přežití buněk.

5.1 Role Akt kinázy v ochraně mitochondrií

Mitochondrie jsou nepostradatelné buněčné organely, jejichž primární funkce ve zdravých buňkách je zajistit dostatek adenosintrifosfátu (ATP, adenosine triphosphate) přes oxidativní fosforylaci (Dyall et al., 2004). Srdeční buňky jsou na mitochondrie zvláště bohaté a jsou lokalizovány pod sarkolemou, mezi myofibrilami a v okolí jádra, přičemž představují přibližně 30% objemu

kardiomyocytů a jsou schopné pokrýt většinu energetických požadavků svalu (Andrienko et al., 2003; Javadov et al., 2009).

Mitochondrie jsou rovněž velice důležitými regulátory buněčné smrti (Kroemer et al., 2007) odpovídající na celou řadu stresových podnětů, mezi které patří oxidativní stres, poškození DNA či I/R insult spuštěním tzv. programované buněčné smrti.

Dnes jsou známy 3 hlavní apoptotické dráhy vedoucí přes membránové receptory, endoplasmatické retikulum nebo tzv. vnitřní apoptotickou dráhu, která je spuštěna samotnou buňkou v odpověď na narušení celistvosti mitochondriální membrány, což způsobí vyjití aktivátorů této apoptotické dráhy do cytosolu, například cytochromu c (Gorman et al., 2012; Miyamoto et al., 2009; Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003; Weiss et al., 2003).

Na udržení stability mitochondriální membrány se významně podílí rodina proteinů Bcl-2, do které patří anti-apoptotické i pro-apoptotické proteiny (Chen et al., 2002). Akt kináza různými způsoby (genovou expresí či posttranslačně) reguluje tyto proteiny a udržuje tím správnou funkci mitochondrií a brání apoptóze. Pro ilustraci zapojení Akt kinázy do řady signálních drah regulujících přežití buněk je použit Obrázek 6.

Prvním známým proteinem regulovaným Akt kinázou je pro-apoptotický protein Bad. Pokud Akt tento protein fosforyluje na Ser¹³⁶, Bad není schopen tvořit heterodimery s anti-apoptotickými proteiny Bcl-2 a Bcl-xL, které se následně naopak mohou účastnit protektivních signálních drah (Datta et al., 1997; Julian, 2004).

Akt kináza reguluje i další pro-apoptotický protein Bax, čímž zabraňuje tvoření oligomerů nebo heterodimerů s proteinem Bak. Molekulární komplex Bax/Bak následně způsobuje tvoření pórů v mitochondriální membráně vedoucí k vyjití již zmíněných pro-apoptotických faktorů (Li et al., 1997; Reed, 2006; Wei et al., 2001). Akt kináza fosforyluje Bax na Ser¹⁸⁴, čímž způsobí změnu jeho konformace a tím zabraňuje jeho interakci s mitochondriální membránou (Yamaguchi and Wang, 2001) a zároveň podporuje jeho vazbu s některými anti-apoptotickými proteiny, jako je například Bid (Sussman, 2009).

Kromě fosforylace pro- i anti-apoptotických proteinů reguluje Akt kináza přežití buněk i přes potlačení funkce faktorů, které jsou v případě spuštění

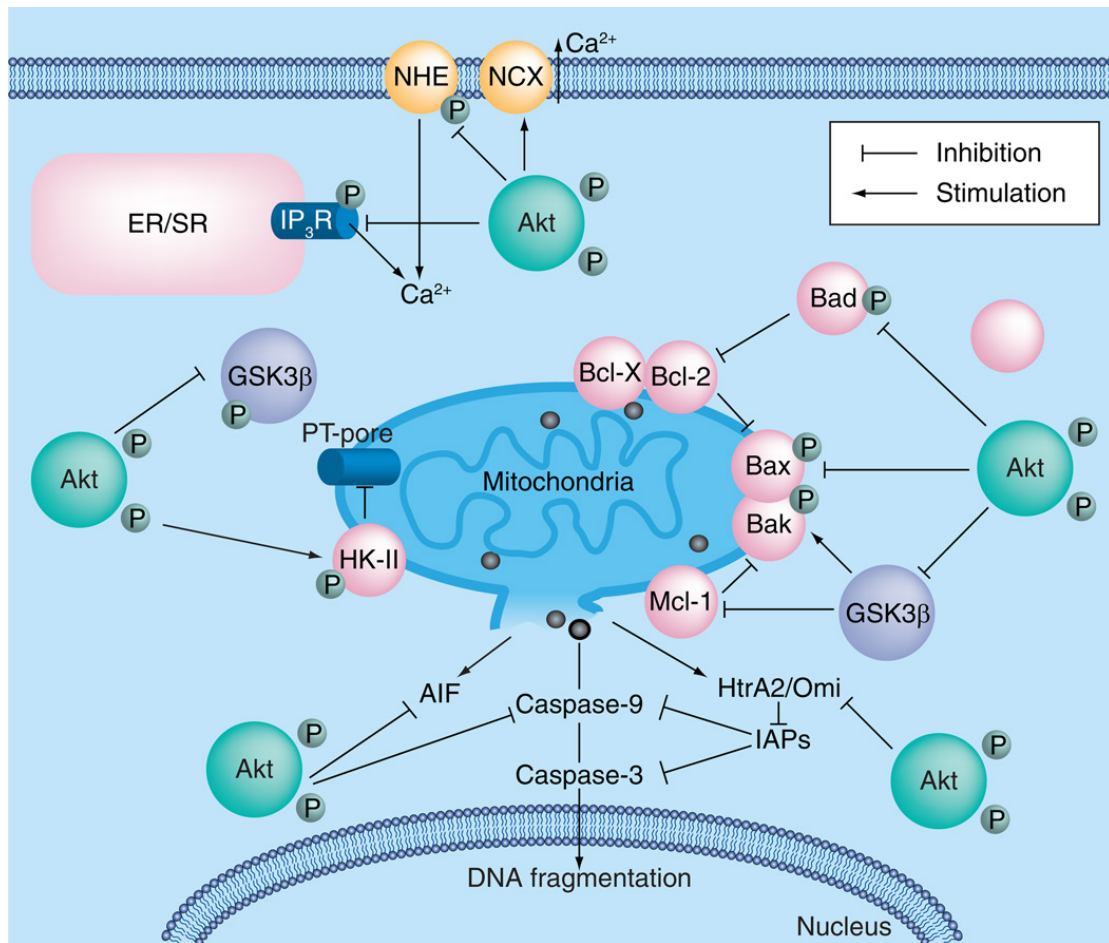
apoptotické dráhy uvolněny z intermembránového prostoru mitochondrií, mimo jiné i faktor indukující apoptózu (AIF, apoptosis inducing factor) a proteiny degradující inhibitory kaspáz HtrA2/Omi (Chen et al., 2001c; Yang et al., 2007).

Další regulační signální dráhou, která se podílí na zachování správné funkce mitochondrií, je dráha vedoucí přes stabilizaci mitochondriální hexokinázy na vnější mitochondriální membráně. Hexokináza (HK) je enzym katalyzující první krok glykolýzy, kdy je glukóza fosforylována na glukózu-6-fosfát (Fueger, 2005). Nicméně vedle její funkce v glukózovém metabolismu hraje hexokináza důležitou roli i v kardioprotektivních mechanismech (viz. Obrázek č. 6 i 7). Její asociace s vnější mitochondriální membránou stimuluje oxidativní fosforylaci, snižuje produkci ROS a oxidativní stres. Dále také soutěží o vazebná místa na mitochondriální membráně, na která by se jinak mohly vázat pro-apoptotické proteiny a je prokázáno, že porucha v její funkci vede k větší citlivosti srdce k I/R poškození (Wu et al., 2011, 2012).

U hexokinázy jsou známy 4 isoformy (1-4), nicméně v srdci jsou převážně exprimovány HK1 a HK2, přičemž u obou isoform byla pozorována vazba na vnější mitochondriální membránu (Southworth et al., 2007). Obě isoformy se mohou navázat na tuto membránu přes svůj N-konec a asociují zde s napěťově závislým iontovým kanálem (VDAC, voltage-dependent anion channel) (Shoshan-Barmatz et al., 2009). Předpokládá se, že tento kanál je rovněž součástí tzv. mitochondriálního póru přechodné propustnosti (MPTP, mitochondrial permeability transition pore), který při otevření propouští do cytosolu různé apoptotické faktory. Součástí tohoto póru je také pravděpodobně i ADP/ATP translokáza (ANT, adenine nucleotide translocase) a cyclophilin D (Cyp-D), nicméně na jeho otevření se mohou podílet i mnohé další proteiny, přičemž i role stávajících předpokládaných částí komplexu není stále dostatečně prostudována (Rasola and Bernardi, 2007).

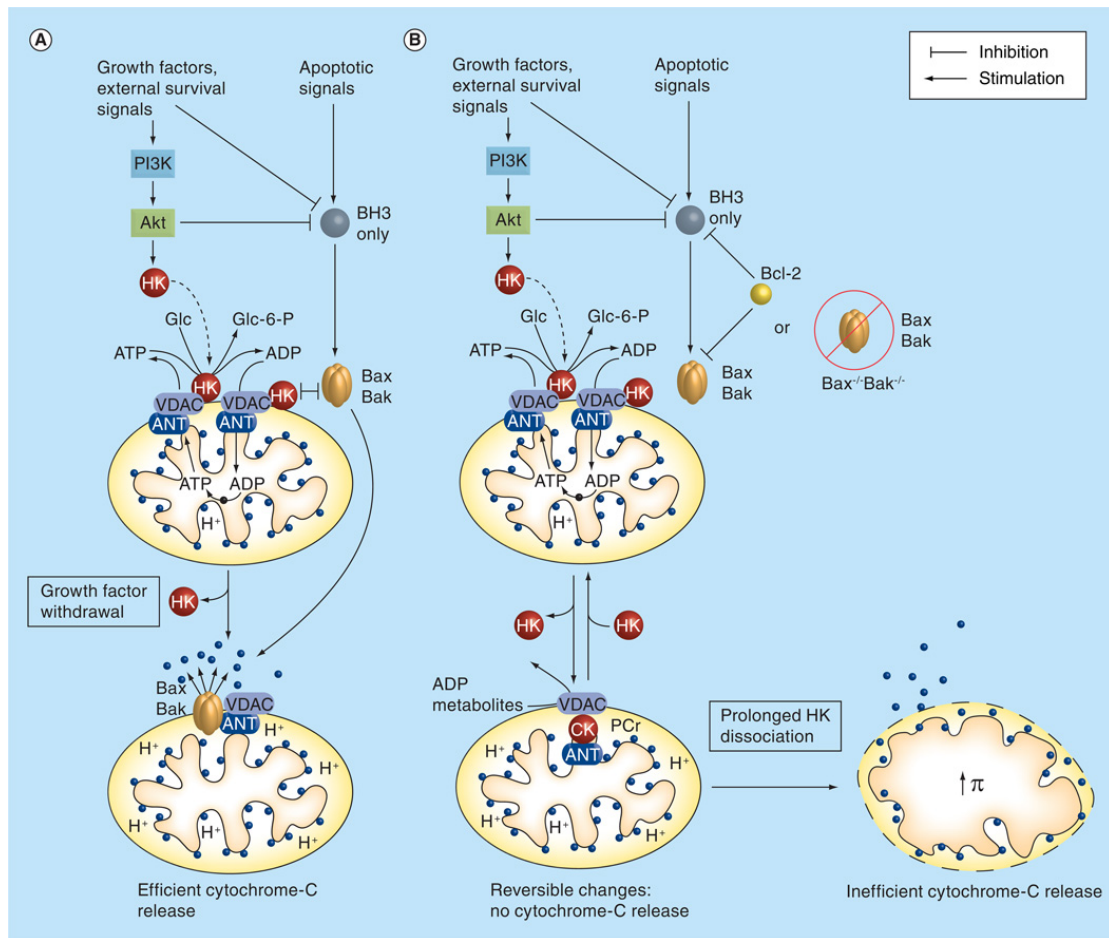
Asociace HK2 s vazebnými místy na mitochondriální membráně zapříčiňuje zvýšení tolerance srdeční tkáně vůči I/R poškození a je nezbytná pro kardioprotektivní mechanismy spuštěné ischemickým "preconditioningem" (IPC) (Smeele et al., 2011). Bylo prokázáno, že Akt kináza přímo fosforyluje HK2 na Thr⁴⁷³, čímž tuto její asociaci s mitochondriální membránou zvyšuje (Roberts et al., 2013).

Jak již bylo řečeno, Akt kináza zastává v buňkách četné funkce a podílí se na ochraně buněk přes řadu signálních drah, jejichž výzkum je v dnešní době stále centrem pozornosti. Přesné molekulární mechanismy a proteinové interakce v rámci kardioprotektivních procesů stále ještě nebyly dokonale objasněny a je zapotřebí podrobnějšího výzkumu.



Obrázek č. 6: Akt kináza se zapojuje v četných signálních drahách, které chrání funkci mitochondrií a brání tak kardiomyocyty vůči apoptóze (Sussman, 2009). Na tomto schématu je vidět, že Akt může mít jak inhibiční tak stimulační efekt. Nicméně všechny tyto signální dráhy slouží k zachování integrity a funkčnosti mitochondrií a zabraňují spuštění apoptotické dráhy.

***ER:* endoplasmatické retikulum, *GSK3:* glykogen syntáza kináza 3, *HK:* hexokináza, *IAP:* inhibitor apoptózy, *NCX:* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměnný přenašeč, *NHE:* Na^+/H^+ výměnný přenašeč, *P:* fosfátová skupina, *MPT-pore:* mitochondriální pór přechodné propustnosti, *mtPTP,* *SR:* sarkoplasmatické retikulum**



Obrázek č. 7: Signální kaskáda Akt/HK regulující vyplavení cytochromu c a integritu mitochondrií v odpověď na pro- i anti-apoptické signály (Sussman, 2009). A) V případě navázání růstových faktorů na receptory dochází k aktivaci PI3K, což vede k aktivaci Akt, která následně fosforyluje i HK, která pak více asociuje s mitochondriemi, kde zabraňuje vylití cytochromu c z mezimembránového prostoru. Na membráně mitochondrií soutěží HK s proapoptickým komplexem proteinů Bax/Bak. B) V případě dlouhodobé disociace HK s mitochondriální membránou dochází k “natékání” mitochondrií, protržení mitochondriální membrány a vylití cytochromu c.

ANT: ADP/ATP translokáza, **CK:** kreatin kináza, **HK:** hexokináza, **PCr:** fosfokreatin, **VDAC:** napěťově závislý iontový kanál

6. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE:

- Stanovit vliv adaptace na chronickou normobarickou hypoxii na expresi a aktivaci Akt kinázy v levé komoře potkana
- Posoudit vliv ischemie a reperfúze na expresi a aktivaci Akt kinázy a na expresi Bcl-2 a Bax v levé komoře potkana

7. MATERIÁL A METODY

I. Experimentální zvířata

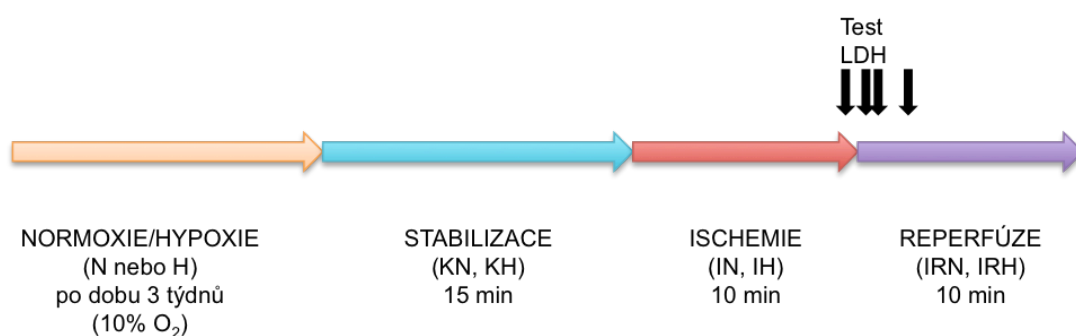
Pro tuto diplomovou práci byli použiti dospělí samci potkana inbredního kmene Wistar, kteří byli získáni z chovu Charles River (USA) Fyziologickým ústavem Akademie věd ČR (FGÚ AV ČR). Zvířata byla ustájena a adaptována na hypoxii na odd. Vývojové kardiologie FGÚ AV ČR. Byla krmena standardní dietou ST1 s dostupností vody *ad libitum* a chována na světelném režimu 12 tma / 12 světlo. Chování a veškeré zacházení s experimentálními zvířaty bylo v souladu se směrnicí Evropské Unie – EU Council Directive (86/609EEC) a experimenty byly schváleny etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i.. Práce byla podpořena Grantovou agenturou akademie věd ČR grantem číslo IAAX 01110901 a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy grantem číslo 542113.

II. Adaptace zvířat na hypoxii

Pro experiment bylo použito 48 zvířat, která byla rozdělena do 8 experimentálních skupin. Polovina zvířat (24) byla chována v normoxických podmínkách kontinuálně (24h/denně) po dobu 3 týdnů. Druhá polovina zvířat byla kontinuálně po dobu 3 týdnů chována v normobarické hypoxické komoře při snížené koncentraci kyslíku (pO_2 0.1) odpovídající nadmořské výšce 5500 m. Zvířata měla k dispozici potravu a vodu po celou dobu experimentu.

III. Protokol Ischemicko-reperfúzní

Po adaptaci byla zvířata v normoxii usmrcena cervikální dislokací. Experimentální srdce byla následně vyjmuta, zavěšena na Langendorfovův aparát, kde byl proveden ischemicko-reperfúzní protokol dle následujícího schématu (Obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: Schéma ischemicko-reperfúzního protokolu (upraveno dle disertační práce P. Waskové, 2014)

***N** – potkani chovaní za normoxických podmínek, **H** – potkani adaptovaní na chronickou normobarickou hypoxii, **KN** – stabilizace u normoxických srdcí, **KH** – stabilizace u hypoxických srdcí, **IN** – ischemie u normoxických srdcí, **IH** – ischemie u hypoxických srdcí, **IRN** – ischemie-reperfúze u normoxických srdcí, **IRH** – ischemie-reperfúze u hypoxických srdcí*

Srdce byla perfundována okysličeným Krebsovým-Henseleitovým pufrem (složení viz. Příloha 1) o průtoku 10 ml / g tkáně srdce * min. Hmotnost srdce byla odvozena od hmotnosti potkanů s použitím tabulky vypracované na odd. Vývojové kardiologie, kdy se dlouhodobě sledoval poměr hmotnosti srdce a tělesné hmotnosti potkana. Srdce podrobená ischemicko-reperfúznímu protokolu byla rozdělena do 3 experimentálních skupin:

- i. stabilizace – srdce zavěšená na Langendorfovův přístroj a perfundovaná po dobu 15 min (**KN, KH**)
- ii. ischemie – srdce stabilizovaná po dobu 15 min a následně vystavené 10 min globální ischemii (**IN, IH**)
- iii. ischemie-reperfúze – srdce stabilizovaná po dobu 15 min vystavené 10 min globální ischemii a poté 10 min reperfúzi (**IRN, IRH**)

Tento model byl experimentálně stanoven tak, aby nedošlo k buněčnému poškození srdce a mohla být sledována pouze odpověď buněčného metabolismu na krátkodobou ischemii a reperfúzi. Pro ustanovení velikosti poškození buněk

byly po začátku reperfúze odebrány vzorky efluentu (po 0,5ml) pro analýzu aktivity LDH v intervalech 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 3 min a 10 min (dle Obrázku č. 8). LDH aktivita byla stanovena s využitím komerční soupravy (LDH LIQUI-UV, Stanbio Laboratory). K obnovení kontraktilní funkce po ischemii došlo do 3 min.

Srdce byla po ukončení experimentu na ledu rozdělena na levou (LV) a pravou komoru (RV) a septum (S), jednotlivé části byly osušeny, zmrazeny v tekutém dusíku a následně zváženy a uchovány v tekutém dusíku pro následné zpracování.

IV. Homogenizace levé komory myokardu

LV experimentálních a kontrolních skupin byly umístěny do tekutým dusíkem vychlazených třecích mističek, kde byly rozdrceny na jemný prášek. Tento prášek byl následně přenesen kovovou špachtlí do předvážených 2 ml mikrozkušavek s 0,5 ml homogenizačního média 1 (HM1) (složení viz. Příloha 1) a s několika skleněnými kuličkami. Mikrozkušavka byla následně protřepána a dále rychle promíchána, aby došlo k řádnému smíchání prášku s homogenizačním médiem ještě před rozmrznutím. Zkušavky byly poté krátce zcentrifugovány a zváženy, čímž se stanovila hmotnost čisté tkáně svalu. Do zkušavky se nadále doplnilo HM1 tak, aby poměr hmotnosti tkáně a hmotnosti homogenizačního média byl 1:8 (tedy na 1 mg tkáně připadlo 8 μ l HM1). Vzorky byly zhomogenizovány ve vychlazených kyvetách homogenizátoru (MIXER MM200, Retsch) po dobu 10 minut při frekvenci 30 Hz.

Po zhomogenizování vzorků byla koncentrace proteinů stanovena metodou podle Bradforda (komerční set od společnosti Bio-Rad), dle instrukcí výrobce. Všechny vzorky byly následně naředěny homogenizačním médiem HM1 na koncentraci nejméně koncentrovaného vzorku a jejich koncentrace byla znovu přeměřena. Po zjištění finální koncentrace homogenátu byla část vzorku odebrána na stanovení enzymatické aktivity a další část homogenátu byla určena na stanovení exprese proteinů. Tato část homogenátu byla pak dále ředěna pomocí homogenizačního média s vysokým obsahem močoviny - HM2 (viz Příloha 1), v poměru 1:1, tak aby došlo k dokonalé solubilizaci kontraktilních

proteinů. Následně byla znovu změřena koncentrace proteinů ve vzorcích. Ze vzorků byly dále odebrány aliquoty o objemu odpovídajícím objemu potřebnému na 4 gely. Aliquoty i originální vzorky byly uschovány pro další analýzu při teplotě -80°C v mrazícím boxu.

V. SDS-PAGE a Western Blotting (WB)

Separace proteinů z jednotlivých homogenizovaných vzorků proběhla za denaturujících podmínek pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) na 12% dělicím a 5% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu (složení viz. Příloha 1) za pokojové teploty a napětí 200 mV (Mini-PROTEAN TetraCell, Bio-Rad). Pro přípravu všech roztoků byla použita filtrovaná voda Milipore (mQH2O; filtr: 0,22 μ m). K jednotlivým vzorkům v mikrozkušnicích bylo před nanesením přidáno 11,3 μ l Laemliho vzorkového pufru (složení viz. Příloha 1) a 2,3 μ l 1M DTT (DL-dithiothreitol; SIGMA), čímž byl vzorek naředěn na finální koncentraci 2,1 μ g/ μ l. Následně byly vzorky inkubovány při teplotě 100°C po dobu 5 min.

Gely byly zality vnitřním elektrodoým puftrem (složení viz. Příloha 1) a vzorky byly v náhodném pořadí naneseny na gel v koncentraci 21 μ g proteinu na jamku (10 μ l vzorku). K naneseným vzorkům byl přidán hmotnostní marker Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standard od společnosti Bio-Rad pro identifikaci hmotnosti jednotlivých sledovaných proteinů. Jako kontroly k experimentálním vzorkům sloužily homogenáty ze stabilizace (KN, KH) ischemicko-reperfúzního protokolu a pro kontrolu nanášky byla použita exprese glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH, Santa Cruz Biotechnology).

Po nanesení vzorků byl do vnější nádoby aparatury pro elektroforézu nalit vnější elektrodový pufr a elektroforéza probíhala za konstantního napětí 200 mV při pokojové teplotě do té doby, než odjelo čelo gelů.

Po skončení elektroforézy byly gely vyjmuty z aparatury a opláchnuty v mQH₂O. Pomocí Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad) byly proteiny následně přeneseny na nitrocelulósovou (v případě pSer-Akt, Akt, Bcl-2, Bax) či PVDF membrány (v případě pThr-Akt), které byly několik minut předtím

inkubovány v přenosovém pufru (viz. Příloha 1) společně s filtračními papíry. Přenos proteinů probíhal při napětí 25 V a proudu 1 A po dobu 30 min.

Po skončení elektrického přenosu byly gely barveny v Coomassie Brilliant Blue R250 a Bismark brown R po dobu přibližně 30 min a pozadí bylo odbarveno odbarvovacím roztokem (složení viz. Příloha 1). Gely byly pro případnou kontrolu vyfoceny a obrázky zálohovány.

Membrány byly následně opláchnuty v mQH₂O a v případě nitrocelulóзовých membrán barveny pomocí Ponceau (viz. Příloha 1) po dobu 5 minut. Následně byly naskenovány a zcela odbarveny v pufru TBS (viz. Příloha 1). Poté byly membrány inkubovány po dobu 15 min v pufru TTBS (TBS s 0,05% TWEEN®20 od společnosti Sigma-Aldrich) a v případě uskladnění v mrazícím boxu (-20°C) pro další použití byly rovněž osušeny a uzavřeny do fólie.

VI. Imunodetekce

Po WB a promytí v TTBS byly membrány inkubovány v blokačním pufru (5% sušené nízkotučné mléko a TTBS) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly 3-krát promyty v TTBS pokaždé po dobu 15 min a následně byly membrány inkubovány v primárních protilátkách ředěných v 2% mléce v TTBS o různých koncentracích protilátek (viz Tabulka 1) přes noc při 4°C.

Další den byly membrány znovu 3-krát promyty v TTBS po 15 min a dále inkubovány v sekundární protilátce konjugované s peroxidázou (Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate, Sigma-Aldrich) při ředění 1:40 000 v 3% mléce v TTBS po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Následně byly membrány 3-krát promyty 15 min v TBS a po osušení byla na membrány na 5 min nanesena chemiluminiscenční detekční směs, založená na principu oxidace luminalu pomocí křenové peroxidázy (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific Pierce). Proteiny na membránách byly následně detekovány na přístroji LAS-4000 (Genetica, FujiFilm) nebo pomocí detekce na filmu za použití přístroje OPTIMAX X-Ray Film Processor (PROTEC Medizintechnik GmbH). Po vyvolání byly všechny membrány denzitometricky vyhodnoceny pomocí kvantifikačního programu Quantity One (BioRad). Každý

vzorek byl nezávisle analyzován na dvou až čtyřech membránách pro všechny protilátky. Průměr z těchto hodnot byl použit do statistického hodnocení.

Detekovaný protein	Kat. číslo primární		Ředění
	protilátky	Společnost	
Akt	4691	Cell Signaling Technology, Inc.	1:2000
pAkt (Thr ³⁰⁸)	4056	Cell Signaling Technology, Inc.	1:1000
pAkt (Ser ⁴⁷³)	A00272	GenScript, Antibodies-online GmbH	1:4000
Bcl-2	SAB4500003	Sigma-Aldrich	1:1000
Bax	ab7977	Abcam	1:1000

Tabulka č. 1: Použité protilátky pro experimenty

VII. Statistické vyhodnocení

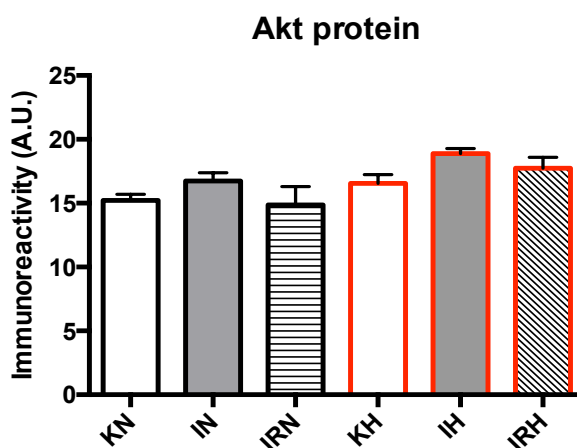
Ke statistickému vyhodnocení byla použita ANOVA (post hoc test: Tukey's multiple comparisons test). Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5.

8. VÝSLEDKY

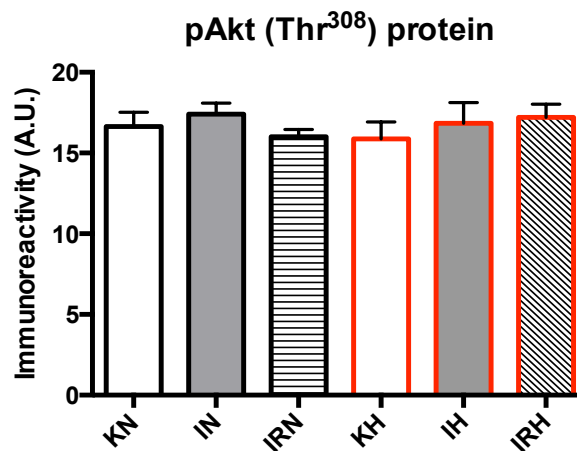
I. Efekt krátkodobé ischemie a reperfuze na expresi a fosforylaci Akt kinázy

Cílem této práce bylo porovnat proteinové hladiny Akt kinázy a její fosforylaci v jednotlivých fázích ischemicko-reperfučního (I/R) protokolu u normoxických (N) a hypoxických zvířat (H) (Graf 1-4). Hodnoty jsou vyjádřeny jako arbitrární jednotky a.u., kdy součet všech hodnot na jedné membráně (KN, IN, IRN, KH, IH a IRH) je roven 100. Jako kontroly k I/R protokolu sloužili srdce podrobené stabilizaci (KN, KH).

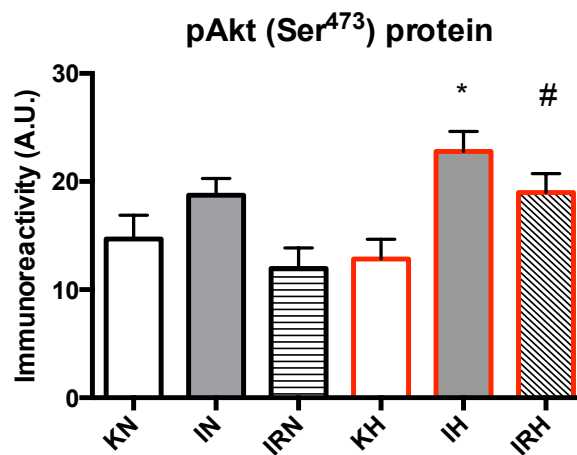
Mezi hladinami proteinu Akt kinázy nebyl pozorován v jednotlivých fázích I/R protokolu signifikantní rozdíl (Graf 1). V případě fosforylace Akt kinázy na Thr³⁰⁸, bylo zjištěno, že rovněž není významně ovlivněna I/R protokolem (Graf 2). Následně jsme se zaměřili na fosforylaci Akt kinázy na Ser⁴⁷³. Ischemie (IH) výrazně zvýšila fosforylaci Akt na Ser⁴⁷³ oproti stabilizaci (KH) u hypoxických zvířat. I/R inzult (IRH) rovněž zvýšil fosforylaci Akt na Ser⁴⁷³ u hypoxických zvířat oproti potkanům chovaným v normoxických podmínkách (IRN) (Graf 3).



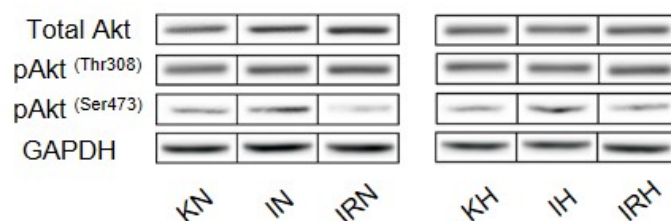
Graf 1: Exprese Akt kinázy v LV z normoxických (N) a hypoxických (H) potkanů, které byly podrobené stabilizaci (KN, KH), ischemii (IN, IH) a I/R (IRN, IRH). Chybové úsečky představují \pm SEM, $n=5$.



Graf 2: Fosforylace Akt kinázy na Thr³⁰⁸ v LV z normoxických (N) a hypoxických (H) potkanů, které byly podrobené stabilizaci (KN, KH), ischemii (IN, IH) a I/R (IRN, IRH). Chybové úsečky představují \pm SEM, n=6.



Graf 3: Fosforylace Akt kinázy na Ser⁴⁷³ v LV z normoxických (N) a hypoxických (H) potkanů, které byly podrobené stabilizaci (KN, KH), ischemii (IN, IH) a I/R (IRN, IRH). * $p < 0,05$ vs KH, # $p < 0,05$ vs IRN. Chybové úsečky představují \pm SEM, n=6.



Graf 4: Reprezentativní pruhy na imunodetekční membráně ukazující expresi celkové Akt, pAkt (Thr³⁰⁸), pAkt (Ser⁴⁷³) a GAPDH v LV z normoxických (N) a hypoxických (H) potkanů, které byly podrobené stabilizaci (KN, KH), ischemii (IN, IH) a I/R (IRN, IRH).

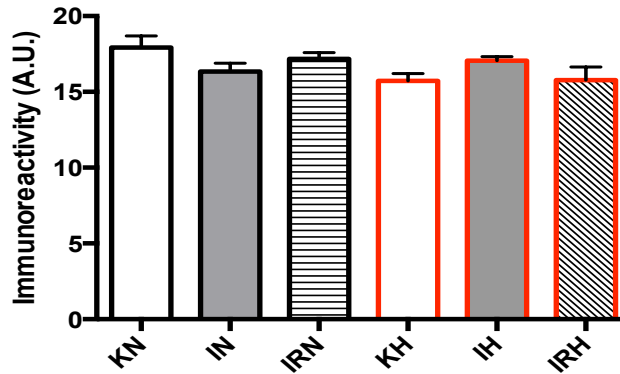
II. Efekt krátkodobé ischemie a reperfúze na expresi Bcl-2 a Bax

Následně jsme se zaměřili na analýzu a porovnání exprese 2 proteinů patřící do rodiny Bcl-2, jmenovitě anti-apoptického proteinu Bcl-2 a pro-apoptického proteinu Bax (viz. Grafy 5-8). Hodnoty jsou znovu vyjádřeny jako a.u., kdy součet všech hodnot (KN, IN, IRN, KH, IH a IRH) je roven 100. Jako kontroly k I/R protokolu jsme použili vzorky srdcí podrobených stabilizaci (KN, KH).

V rámci I/R protokolu nedošlo k významným změnám hladin anti-apoptického proteinu Bcl-2 ani v kontrolách ani po chronické normobarické hypoxii (CNH) (viz. Graf 5). U pro-apoptického proteinu Bax nebyly u normoxických srdcí v rámci I/R protokolu pozorovány žádné rozdíly hladin proteinu. Avšak, signifikantní snížení hladiny proteinu Bax bylo pozorováno u hypoxických srdcí podrobených I/R (IRH) ve srovnání s hypoxickou stabilizací (KH) i normoxickou skupinou podrobenou I/R (IRN) (viz. Graf 6).

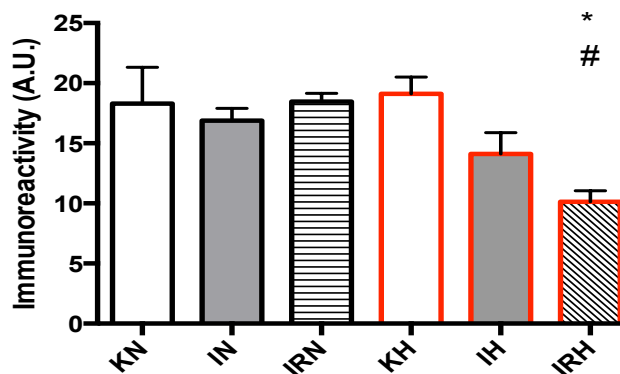
Poměr Bcl-2/Bax, kterým se v literatuře vyjadřuje míra apoptózy v buňkách, byl významně zvýšen v I/R skupině po hypoxii (IRH) oproti normoxické I/R skupině (IRN) i vzhledem k hypoxickým kontrolám (KH) (viz. Graf 7).

Bcl-2 protein

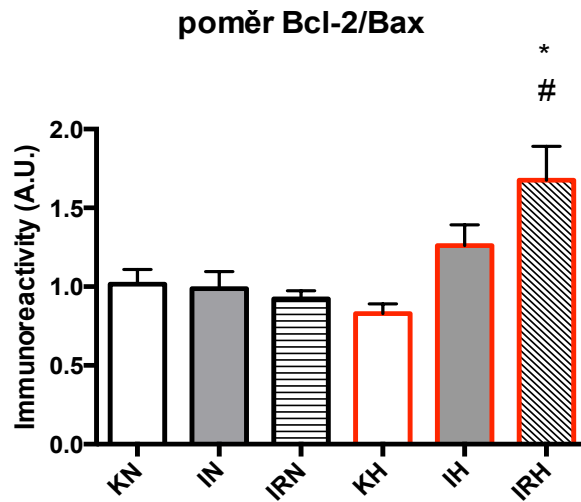


Graf 5: Hladiny proteinu Bcl-2 v LV z normoxických (N) a hypoxických (H) potkanů, které byly podrobené stabilizaci (KN, KH), ischemii (IN, IH) a I/R (IRN, IRH). Chybové úsečky představují \pm SEM, n=6

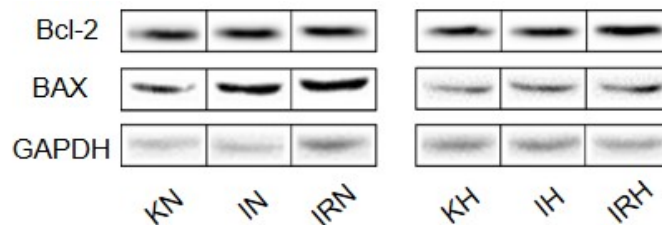
Bax protein



Graf 6: Hladiny proteinu Bax v LV z normoxických (N) a hypoxických (H) potkanů, které byly podrobené stabilizaci (KN, KH), ischemii (IN, IH) a I/R (IRN, IRH). * $p < 0,05$ vs KN, # $p < 0,05$ vs IRN. Chybové úsečky představují \pm SEM, n=6



Graf 7: Poměr hladin proteinů Bcl-2/Bax v LV z normoxických (N) a hypoxických (H) potkanů, které byly podrobené stabilizaci (KN, KH), ischemii (IN, IH) a I/R (IRN, IRH). * $p < 0,05$ vs KN, # $p < 0,05$ vs IRN. Chybové úsečky představují \pm SEM, $n=6$



Graf 8: Hladiny proteinů Bcl-2, Bax a GAPDH v LV z normoxických (N) a hypoxických (H) potkanů, které byly podrobené stabilizaci (KN, KH), ischemii (IN, IH) a I/R (IRN, IRH) zobrazené na reprezentativních membránách.

9. DISKUZE

Protein kináza B neboli Akt kináza je důležitým efektozem PI3 kinázy a je zapojená v regulaci četných esenciálních biologických procesů. Porucha v její funkci může vést k řadě onemocnění (Dummler and Hemmings, 2007). Akt významně ovlivňuje například energetický metabolismus, proliferaci, růst i přežití buněk v závislosti na modelu a její isoformě (pro přehled Sussman et al., 2011). Její aktivita v buňce je převážně regulována na posttranslační úrovni, a to fosforylací převážně na Thr³⁰⁸ pomocí kinázy PDK1 (Anderson et al., 1998; Milburn et al., 2003; Stephens et al., 1998) a fosforylací na Ser⁴⁷³, která je zprostředkována komplexem mTORC2 (Sarbasov et al., 2005).

Obě fosforylační místa byla považována za nezbytná pro plnou aktivaci Akt kinázy (Alessi et al., 1996; Bellacosa et al., 1998), než Moore a kol. (2011) ukázali, že fosforylace Akt na Ser⁴⁷³ probíhá v adipocytech a krevních destičkách nezávisle na Thr³⁰⁸. Fosforylace Akt na Ser⁴⁷³ nebyla rovněž v krevních destičkách pro aktivaci Akt podstatná, ale byla důležitá pro aktivaci Akt v adipocytech (Moore et al., 2011). Tyto výsledky poukazují na rozdílné mechanismy aktivace Akt i v závislosti na typu tkáně. Aktivace Akt tedy pravděpodobně podléhá další regulaci, kterou je nutné blíže prozkoumat.

Ukazuje se, že u experimentů, které používají model izolovaného perfundovaného srdce by bylo zapotřebí zohlednit i efekt samotného modelu na míru fosforylace a možná i exprese různých proteinů. Teprve v nedávné době byla publikována studie zabývající se vlivem perfúze srdce na fosforylaci kináz, které hrají roli v ochraně buněk. Hlavním zjištěním této publikace bylo, že u některých kináz byl pozorován nárůst fosforylace po 20 min perfúzi srdce a výrazný pokles fosforylace po 50 min perfúzi na aparátu. Vedle toho u Akt kinázy byl sledován pokles fosforylace po 20 min perfúzi a signifikantní pokles po 50 min perfúzi (Stensløkken et al., 2009).

I přesto, že existují teorie, proč dochází k tomuto efektu (Aliiev et al., 2011), mechanismus zodpovědný za tento fenomén není doposud znám a je nutné dalších experimentů k vysvětlení těchto nálezů.

V naší laboratoři jsme rovněž sledovali rozdíl mezi fosforylací v intaktních srdcích zvířat chovaných v normoxických a hypoxických podmínkách a v izolovaných perfundovaných srdcích. Předběžné výsledky ukázaly, že k poklesu fosforylace u Akt opravdu dochází. Na druhé straně je zřejmé, že tento pokles je konstantní a nesnižuje vypovídací hodnotu dat. Získané výsledky ukazovaly konzistentní změny, které byly reprodukovatelné a byly i v souladu s již publikovanými studiemi.

Naše experimenty zatím ukázaly, že adaptace na chronickou normobarickou hypoxii (CNH) neměla žádné účinky na expresi celkové Akt kinázy v různých fázích ischemicko-reperfúzního (I/R) protokolu. Fosforylace Akt na Thr³⁰⁸ rovněž není ovlivněna I/R protokolem. Nicméně významná změna nastává ve fosforylaci Akt kinázy na jejím druhém fosforylačním místě na Ser⁴⁷³. U hypoxických potkanů se po navozené ischemii tato fosforylace významně zvýšila v porovnání s hypoxickou stabilizací a zvýšená fosforylace nadále přetrvávala i ve skupině podrobené I/R insultu. Oproti tomu, byl u potkanů chovaných v normoxických podmínkách pozorován viditelný pokles fosforylace Akt na Ser⁴⁷³ po I/R insultu.

Tyto výsledky jsou v souladu se studiemi, které poukazují na nezávislou fosforylaci obou aminokyselinových zbytků (Alessi et al., 1996; Guertin et al., 2006; Mora et al., 2005). Adaptace na chronickou normobarickou hypoxii pravděpodobně zvyšuje aktivitu Akt v odpověď na ischemický insult přes fosforylaci na Ser⁴⁷³, přičemž fosforylace na Thr³⁰⁸ není ovlivněna.

Kardioprotektivní mechanismy regulované Akt kinázou v odpovědi na ischemii i reperfúzi byly již studovány v souvislosti s dalšími signálními drahami (Hausenloy et al., 2004). Zvýšená aktivita Akt kinázy vedoucí ke snížení poškození srdečních buněk je pravděpodobně přímo propojená s ochranou mitochondrií a se zabráněním spuštění apoptózy (Halestrap et al., 2007).

Již dříve bylo ukázáno, že Akt fosforyluje HK2 na Thr⁴⁷³, čímž zvyšuje interakci HK2 s vnější mitochondriální membránou (Pastorino and Hoek, 2008; Roberts et al., 2013). Výzkum z naší laboratoře (Wasková 2014 – Disertační práce) ukázal zvýšenou expresi obou isoform hexokinázy, HK1 a HK2, a i zvýšenou celkovou aktivitu HK po ischemii, což koreluje se zvýšenou fosforylací Akt kinázy na Ser⁴⁷³. Toto zjištění by mohlo poukazovat na jejich vzájemnou

interakci. Zvýšená aktivita HK by mohla rovněž souviset s její zvýšenou asociací s mitochondriemi (Miyamoto et al., 2007b; Roberts et al., 2013), což chrání HK vůči zpětné inhibici jejím vlastním produktem, glukóza-6-fosfátem (Depré et al., 1998; Roberts et al., 2013) a zabraňuje tak její časnou degradaci (Pedersen et al., 2002). Interakce HK2 s vnější mitochondriální membránou také zvyšuje její vazebnou afinitu k ATP (Bustamante and Pedersen, 1980), čímž HK získá lepší přístup k ATP vytvořeném mitochondriemi (Arora and Pedersen, 1988).

Asociace HK2 s mitochondriální membránou nemá vliv pouze na metabolismus glukózy, ale významně se podílí na ochraně buněk vůči apoptóze: zabraňuje navázání pro-apoptotického proteinu Bax a rovněž snižuje i oxidativní stres (Robey and Hay, 2006; Santiago et al., 2008).

Ukázali jsme také vliv adaptace na CNH na expresi proteinu Bax převážně v odpověď na I/R insult, kdy hladina proteinu Bax signifikantně klesla v porovnání s normoxickou I/R skupinou a také v porovnání s normoxickou stabilizací. Bax je pro-apoptotický protein patřící do rodiny Bcl-2 proteinů. V případě apoptotického stimulu se Bax často společně s proteinem Bak translokuje do membrány mitochondrií, kde mohou tvořit póry propouštějící molekuly z intermembránového prostoru mitochondrií, jako například cytochrom c, což může vést až k buněčné smrti (Li et al., 1997; Reed, 2008).

Následně jsme změřili i expresi anti-apoptotického proteinu Bcl-2, který se podílí na udržení celistvosti mitochondriální membrány a tedy i zabraňuje spuštění apoptózy (Reed, 2008). Hladina proteinu Bcl-2 nepodléhala v rámci I/R protokolu žádným změnám. Nicméně zajímavým zjištěním je, že poměr Bcl-2/Bax byl významně zvýšen v hypoxické skupině vystavené I/R insultu oproti normoxickým srdcím po I/R insultu. Tento poměr je v literatuře používán jako ukazatel míry apoptózy v buňkách a naše výsledky tedy ukazují, že adaptace na CNH významně snižuje pravděpodobnost spuštění apoptotické dráhy v případě vystavení tkáně I/R insultu.

Naše práce ukázala, že adaptace na chronickou normobarickou hypoxii může vést k ochraně myokardu před ischemicko-reperfúzním poškozením pravděpodobně přes aktivaci Akt signální dráhy.

10. ZÁVĚR

Adaptaci organismů na podmínky chronické hypoxie se ve vědeckých kruzích věnuje velké pozornosti již celá desetiletí, převážně z toho důvodu, že zvyšuje toleranci myokardu vůči ischemicko-reperfúznímu (I/R) poškození. Molekulární mechanismy stojící za kardioprotektivními účinky však stále ještě nejsou zcela objasněny, a proto jsou studovány i v dnešní době.

Úloha Akt kinázy v kardioprotekci a její navození adaptací na hypoxii byla již studována. Milano a kol. (2013) například potvrdili, že režim intermitentní hypoxie zvýšil fosforylaci Akt kinázy, což následně vedlo k menšímu poškození srdce a k jeho lepší funkci (Milano et al., 2013). Inhibice PI3K/Akt signální dráhy nadto vedla k zvětšení poškození tkáně po navození infarktu myokardu (Ravingerová et al., 2007).

Nicméně její úloha stále není dokonale objasněna. Například není k dispozici dostatek informací a studií ohledně specifických úloh jednotlivých isoformů i ohledně signální specifity, která je zapříčiněná fosforylací jednotlivých aktivačních aminokyselinových zbytků.

V této práci jsme se věnovali vlivu chronické normobarické hypoxie (CNH) na expresi a aktivitu Akt kinázy po ischemii nebo I/R insultu a také jejímu vlivu na poměr proteinů Bcl-2/Bax kardiomyocytech. Přestože exprese Akt nebyla adaptací ovlivněna, tak jsme pozorovali signifikantní nárůst fosforylace Akt na jejím druhém aktivačním fosforylačním místě na Ser⁴⁷³ po ischemickém insultu, přičemž tato aktivace Akt přetrvávala i během reperfúze. Akt kináza se tak po své aktivaci může účastnit různých protektivních mechanismů v srdečních buňkách.

Signálních drah, ve kterých se Akt podílí na regulaci procesů v buňkách, je celá řada a vyznačují se velkou komplexitou. Určitě by bylo zajímavé blíže prostudovat interakce Akt kinázy s dalšími důležitými regulátory ochrany procesů v buňkách, jako je například 5'AMP-aktivovaná protein kináza (AMPK) nebo PIM-1 kináza a jejich vzájemné propojení.

Předkládaná práce přinesla originální výsledky o působení krátkého ischemického insultu na Akt signalizaci. Tyto výsledky v kombinaci s nálezy týkající se exprese a lokalizace hexokinázy 2, smysluplně doplňují již publikované práce a dokreslují tak průběh těchto dějů.

11. LITERATURA

Aikawa, R., Nawano, M., Gu, Y., Katagiri, H., Asano, T., Zhu, W., Nagai, R., and Komuro, I. (2000). Insulin Prevents Cardiomyocytes From Oxidative Stress-Induced Apoptosis Through Activation of PI3 Kinase/Akt. *Circulation* *102*, 2873–2879.

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* *15*, 6541.

Aliev, M., Guzun, R., Karu-Varikmaa, M., Kaambre, T., Wallimann, T., and Saks, V. (2011). Molecular System Bioenergetics of the Heart: Experimental Studies of Metabolic Compartmentation and Energy Fluxes versus Computer Modeling. *Int. J. Mol. Sci.* *12*, 9296–9331.

Altomare, D.A., Lyons, G.E., Mitsuuchi, Y., Cheng, J.Q., and Testa, J.R. (1998). Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* *16*, 2407–2411.

Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* *8*, 684–691.

Andrienko, T., Kuznetsov, A.V., Kaambre, T., Usson, Y., Orosco, A., Appaix, F., Tiivel, T., Sikk, P., Vendelin, M., Margreiter, R., et al. (2003). Metabolic consequences of functional complexes of mitochondria, myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *J. Exp. Biol.* *206*, 2059–2072.

Armstrong, S.C. (2004). Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* *61*, 427–436.

Arora, K.K., and Pedersen, P.L. (1988). Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J. Biol. Chem.* *263*, 17422–17428.

Asemu, G., Papousek, F., Ostádal, B., and Kolár, F. (1999). Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *31*, 1821–1831.

Avkiran, M., and Marber, M.S. (2002). Na⁺/H⁺ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J. Am. Coll. Cardiol.* *39*, 747–753.

Baker, J.E., Curry, B.D., Olinger, G.N., and Gross, G.J. (1997). Increased tolerance of the chronically hypoxic immature heart to ischemia. Contribution of the KATP channel. *Circulation* 95, 1278–1285.

Baron-Menguy, C., Bocquet, A., Guihot, A.-L., Chappard, D., Amiot, M.-J., Andriantsitohaina, R., Loufrani, L., and Henrion, D. (2007). Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic. *FASEB J.* 21, 3511–3521.

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

Bellacosa, A., Testa, J., Staal, S., and Tsichlis, P. (1991). A Retroviral Oncogene, Akt, Encoding a Serine-Threonine Kinase Containing an Sh2-Like Region. *Science* 254, 274–277.

Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17, 313–325.

Bond, J.M., Chacon, E., Herman, B., and Lemasters, J.J. (1993). Intracellular pH and Ca²⁺ homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 265, C129–C137.

Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2008). PKB α /Akt1 Acts Downstream of DNA-PK in the DNA Double-Strand Break Response and Promotes Survival. *Mol. Cell* 30, 203–213.

Brazil, D.P., and Hemmings, B.A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* 26, 657–664.

Bricknell, O.L., Daries, P.S., and Opie, L.H. (1981). A relationship between adenosine triphosphate, glycolysis and ischaemic contracture in the isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13, 941–945.

Brodbeck, D., Cron, P., and Hemmings, B.A. (1999). A Human Protein Kinase By with Regulatory Phosphorylation Sites in the Activation Loop and in the C-terminal Hydrophobic Domain. *J. Biol. Chem.* 274, 9133–9136.

Bustamante, E., and Pedersen, P.L. (1980). Mitochondrial hexokinase of rat hepatoma cells in culture: solubilization and kinetic properties. *Biochemistry (Mosc.)* 19, 4972–4977.

Cai, Z., and Semenza, G.L. (2005). PTEN Activity Is Modulated During Ischemia and Reperfusion Involvement in the Induction and Decay of Preconditioning. *Circ. Res.* 97, 1351–1359.

Calafiore, A.M., Di Mauro, M., Canosa, C., Di Giammarco, G., Iacò, A.L., and Contini, M. (2003). Myocardial revascularization with and without cardiopulmonary

bypass: advantages, disadvantages and similarities. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* 24, 953–960.

Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B.A., Downward, J., Parker, P.J., and Larijani, B. (2007). Intramolecular and Intermolecular Interactions of Protein Kinase B Define Its Activation In Vivo. *PLoS Biol.* 5.

Ceci, M., Gallo, P., Santonastasi, M., Grimaldi, S., Latronico, M.V.G., Pitisci, A., Missol-Kolka, E., Scimia, M.C., Catalucci, D., Hilfiker-Kleiner, D., et al. (2007). Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing angiogenesis and reducing apoptosis. *Cell Death Differ* 14, 1060–1062.

Chen, H., Li, D., Saldeen, T., and Mehta, J.L. (2001a). TGF- β 1 modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 281, H1035–H1039.

Chen, M., Won, D.-J., Krajewski, S., and Gottlieb, R.A. (2002). Calpain and Mitochondria in Ischemia/Reperfusion Injury. *J. Biol. Chem.* 277, 29181–29186.

Chen, W.S., Xu, P.-Z., Gottlob, K., Chen, M.-L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., et al. (2001b). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes Dev.* 15, 2203–2208.

Chen, X., Thakkar, H., Tyan, F., Gim, S., Robinson, H., Lee, C., Pandey, S.K., Nwokorie, C., Onwudiwe, N., and Srivastava, R.K. (2001c). Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene* 20, 6073–6083.

Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N., and Testa, J.R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9267–9271.

Chesley, A., Lundberg, M.S., Asai, T., Xiao, R.-P., Ohtani, S., Lakatta, E.G., and Crow, M.T. (2000). The β 2-Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal to Cardiac Myocytes Through Gi-Dependent Coupling to Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Circ. Res.* 87, 1172–1179.

Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M.J. (2001a). Akt1/PKB α Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *J. Biol. Chem.* 276, 38349–38352.

Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J. (2001b). Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB β). *Science* 292, 1728–1731.

- Chong, E., Chang, S.-L., Hsiao, Y.-W., Singhal, R., Liu, S.-H., Leha, T., Lin, W.-Y., Hsu, C.-P., Chen, Y.-C., Chen, Y.-J., et al. (2015). Resveratrol, a red wine antioxidant, reduces atrial fibrillation susceptibility in the failing heart by PI3K/AKT/eNOS signaling pathway activation. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* *12*, 1046–1056.
- Coffer, P.J., and Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.* *201*, 475–481.
- Cohen, M.V., Yang, X.-M., and Downey, J.M. (2007). The pH Hypothesis of Postconditioning. *Circulation* *115*, 1895–1903.
- Dana, A., Skarli, M., Papakrivopoulou, J., and Yellon, D.M. (2000). Adenosine A(1) receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 mitogen-activated protein kinase activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and protein kinase C-dependent mechanism. *Circ. Res.* *86*, 989–997.
- Das, S., Cordis, G.A., Maulik, N., and Das, D.K. (2005). Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *288*, H328–H335.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* *91*, 231–241.
- DeBosch, B., Sambandam, N., Weinheimer, C., Courtois, M., and Muslin, A.J. (2006). Akt2 Regulates Cardiac Metabolism and Cardiomyocyte Survival. *J. Biol. Chem.* *281*, 32841–32851.
- Depré, C., Rider, M.H., and Hue, L. (1998). Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem. FEBS* *258*, 277–290.
- Dummler, B., and Hemmings, B.A. (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 231–235.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., and Johnson, P.J. (2004). Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science* *304*, 253–257.
- Essop, M.F. (2007). Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J. Physiol.* *584*, 715–726.
- Ferguson, K.M., Kavran, J.M., Sankaran, V.G., Fournier, E., Isakoff, S.J., Skolnik, E.Y., and Lemmon, M.A. (2000). Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* *6*, 373–384.
- Fröhlich, G.M., Meier, P., White, S.K., Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2013). Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur. Heart J.* *34*, 1714–1722.

Fryer, R.M., Hsu, A.K., Eells, J.T., Nagase, H., and Gross, G.J. (1999). Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels. *Circ. Res.* *84*, 846–851.

Fueger, P.T. (2005). Glucose Phosphorylation As a Barrier to Muscle Glucose Uptake. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *32*, 314–318.

Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R.N., and Walsh, K. (2000). Akt Promotes Survival of Cardiomyocytes In Vitro and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse Heart. *Circulation* *101*, 660–667.

Galvez, A.S., Ulloa, J.A., Chiong, M., Criollo, A., Eisner, V., Barros, L.F., and Lavandero, S. (2003). Aldose Reductase Induced by Hyperosmotic Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis DIFFERENTIAL EFFECTS OF SORBITOL AND MANNITOL. *J. Biol. Chem.* *278*, 38484–38494.

Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: A Phosphatase that Directly Dephosphorylates Akt, Promotes Apoptosis, and Suppresses Tumor Growth. *Mol. Cell* *18*, 13–24.

Garcia-Martinez, J.M., Moran, J., Clarke, R.G., Gray, A., Cosulich, S.C., Chresta, C.M., and Alessi, D.R. (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem. J.* *421*, 29–42.

Gardner, J.D., Brower, G.L., Voloshenyuk, T.G., and Janicki, J.S. (2008). Cardioprotection in female rats subjected to chronic volume overload: synergistic interaction of estrogen and phytoestrogens. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *294*, H198–H204.

Gho, B.C., Schoemaker, R.G., van den Doel, M.A., Duncker, D.J., and Verdouw, P.D. (1996). Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* *94*, 2193–2200.

Girardi, C., James, P., Zanin, S., Pinna, L.A., and Ruzzene, M. (2014). Differential phosphorylation of Akt1 and Akt2 by protein kinase CK2 may account for isoform specific functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1843*, 1865–1874.

Goh, S.S.C., Woodman, O.L., Pepe, S., Cao, A.H., Qin, C., and Ritchie, R.H. (2007). The red wine antioxidant resveratrol prevents cardiomyocyte injury following ischemia-reperfusion via multiple sites and mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 101–113.

Gorman, A.M., Healy, S.J.M., Jäger, R., and Samali, A. (2012). Stress management at the ER: Regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol. Ther.* *134*, 306–316.

Gross, E.R., Hsu, A.K., and Gross, G.J. (2006). The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 β . *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *291*, H827–H834.

- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev. Cell* *11*, 859–871.
- Hahn, J.-Y., Song, Y.B., Kim, E.K., Yu, C.W., Bae, J.-W., Chung, W.-Y., Choi, S.-H., Choi, J.-H., Bae, J.-H., An, K.J., et al. (2013). Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation* *128*, 1889–1896.
- Halestrap, A.P., Clarke, S.J., and Khaliulin, I. (2007). The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* *1767*, 1007–1031.
- Harman, A.W., and Maxwell, M.J. (1995). An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *35*, 129–144.
- Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* *123*, 92–100.
- Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2015). Targeting Myocardial Reperfusion Injury--The Search Continues. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1073–1075.
- Hausenloy, D.J., Mocanu, M.M., and Yellon, D.M. (2004). Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* *63*, 305–312.
- Hers, I., Vincent, E.E., and Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* *23*, 1515–1527.
- Heusch, G. (2015). Molecular Basis of Cardioprotection Signal Transduction in Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning. *Circ. Res.* *116*, 674–699.
- Hiley, C.R., and Ford, W.R. (2004). Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biol. Rev.* *79*, 187–205.
- Hoehn, M., Zhang, Y., Xu, J., Gergs, U., Boknik, P., Werdan, K., Neumann, J., and Ebelt, H. (2015). Overexpression of protein phosphatase 2A in a murine model of chronic myocardial infarction leads to increased adverse remodeling but restores the regulation of β -catenin by glycogen synthase kinase 3 β . *Int. J. Cardiol.* *183*, 39–46.
- Hurtado, A. (1960). Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann. Intern. Med.* *53*, 247–258.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B., and Alessi, D.R. (1996). Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem. J.* *315*, 709–713.

Javadov, S., Karmazyn, M., and Escobales, N. (2009). Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as a Promising Therapeutic Target in Cardiac Diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *330*, 670–678.

Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu. Rev. Med.* *42*, 225–246.

Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., and Hemmings, B.A. (1991a). Molecular Cloning and Identification of a Serine/Threonine Protein Kinase of the Second-Messenger Subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 4171–4175.

Jones, P.F., Jakubowicz, T., and Hemmings, B.A. (1991b). Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul.* *2*, 1001–1009.

Joyeux-Faure, M., Stanke-Labesque, F., Lefebvre, B., Béguin, P., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., Launois, S.H., Bessard, G., and Lévy, P. (2005). Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J. Appl. Physiol.* *98*, 1691–1696.

Julian, D. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* *15*, 177–182.

Karmazyn, M., Gan, X.T., Humphreys, R.A., Yoshida, H., and Kusumoto, K. (1999). The Myocardial Na⁺-H⁺ Exchange Structure, Regulation, and Its Role in Heart Disease. *Circ. Res.* *85*, 777–786.

Kasparova, D., Neckar, J., Dabrowska, L., Novotny, J., Mraz, J., Kolar, F., and Zurmanova, J. (2015). Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol. Genomics* *47*, 612–620.

Kavazis, A.N., Alvarez, S., Talbert, E., Lee, Y., and Powers, S.K. (2009). Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *297*, H144–H152.

Kim, C.-H., Cho, Y.-S., Chun, Y.-S., Park, J.-W., and Kim, M.-S. (2002). Early Expression of Myocardial HIF-1 α in Response to Mechanical Stresses Regulation by Stretch-Activated Channels and the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Circ. Res.* *90*, e25–e33.

Kitakaze, M., Asakura, M., Kim, J., Shintani, Y., Asanuma, H., Hamasaki, T., Seguchi, O., Myoishi, M., Minamino, T., Ohara, T., et al. (2007). Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* *370*, 1483–1493.

Kloner, R.A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., and Braunwald, E. (1998). Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* *97*, 1848–1867.

- Kloner, R.A.M.D., Ellis, S.G.M.D., Lange, R.M.D., and Braunwald, E.M.D. (1983). Studies of experimental coronary artery reperfusion: Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation*.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. Rev.* *87*, 99–163.
- Kumar, C.C., and Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* *24*, 7493–7501.
- Kuwahara, K., Saito, Y., Kishimoto, I., Miyamoto, Y., Harada, M., Ogawa, E., Hamanaka, I., Kajiyama, N., Takahashi, N., Izumi, T., et al. (2000). Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *32*, 1385–1394.
- Lemasters, J.J., Bond, J.M., Chacon, E., Harper, I.S., Kaplan, S.H., Ohata, H., Trollinger, D.R., Herman, B., and Cascio, W.E. (1996). The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. In *Myocardial Ischemia: Mechanisms, Reperfusion, Protection*, M. Karmazyn, ed. (Birkhäuser Basel), pp. 99–114.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* *91*, 479–489.
- Lietzke, S.E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M.P., and Lambright, D.G. (2000). Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* *6*, 385–394.
- Liu, G.S., Thornton, J., Winkle, D.M.V., Stanley, A.W., Olsson, R.A., and Downey, J.M. (1991). Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* *84*, 350–356.
- Luo, W., Li, B., Lin, G., and Huang, R. (2007). Postconditioning in cardiac surgery for tetralogy of Fallot. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *133*, 1373–1374.
- Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M., and Yellon, D.M. (1993). Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* *88*, 1264–1272.
- Marchant, D.J., Boyd, J.H., Lin, D.C., Granville, D.J., Garmaroudi, F.S., and McManus, B.M. (2012). Inflammation in Myocardial Diseases. *Circ. Res.* *110*, 126–144.
- Matsui, T., and Rosenzweig, A. (2005). Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *38*, 63–71.
- Meldrum MD, D.R., Cleveland Jr, M., Joseph C., Cain MD, B.S., Meng MD, P., Xianzhong, and Harken MD, A.H. (1998). Increased Myocardial Tumor Necrosis

Factor- α in a Crystalloid-Perfused Model of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann. Thorac. Surg.* 65, 439–443.

Milano, G., Abruzzo, P.M., Bolotta, A., Marini, M., Terraneo, L., Ravara, B., Gorza, L., Vitadello, M., Burattini, S., Curzi, D., et al. (2013). Impact of the Phosphatidylinositide 3-Kinase Signaling Pathway on the Cardioprotection Induced by Intermittent Hypoxia. *PLoS ONE* 8.

Milburn, C.C., Deak, M., Kelly, S.M., Price, N.C., Alessi, D.R., and Van Aalten, D.M.F. (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem. J.* 375, 531–538.

Miyamoto, S., Murphy, A.N., and Brown, J.H. (2007a). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* 15, 521–529.

Miyamoto, S., Murphy, A.N., and Brown, J.H. (2007b). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* 15, 521–529.

Miyamoto, S., Murphy, A.N., and Brown, J.H. (2009). Akt mediated mitochondrial protection in the heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 169–180.

Moore, S.F., Hunter, R.W., and Hers, I. (2011). mTORC2 Protein-mediated Protein Kinase B (Akt) Serine 473 Phosphorylation Is Not Required for Akt1 Activity in Human Platelets. *J. Biol. Chem.* 286, 24553–24560.

Mora, A., Lipina, C., Tronche, F., Sutherland, C., and Alessi, D.R. (2005). Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure. *Biochem. J.* 385, 639–648.

Mortimer, E.A., Monson, R.R., and MacMahon, B. (1977). Reduction in mortality from coronary heart disease in men residing at high altitude. *N. Engl. J. Med.* 296, 581–585.

Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136.

Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D.A., Weigel, R.J., and Roth, R.A. (1999). Identification of a Human Akt3 (Protein Kinase B γ) Which Contains the Regulatory Serine Phosphorylation Site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 906–910.

Neckár, J., Papousek, F., Nováková, O., Ostádal, B., and Kolár, F. (2002). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res. Cardiol.* 97, 161–167.

- Neckár, J., Ostádal, B., and 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., Borchert, G.H., Hlousková, P., Mícová, P., Nováková, O., Novák, F., Hroch, M., Papousek, F., Ostádal, B., and Kolár, F. (2013). Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels. *Curr. Pharm. Des.* *19*, 6880–6889.
- Neely, J.R., and Grotyohann, L.W. (1984). Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ. Res.* *55*, 816–824.
- Newmeyer, D.D., and Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death. *Cell* *112*, 481–490.
- Newton, A.C., and Trotman, L.C. (2014). Turning Off AKT: PHLPP as a Drug Target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *54*, 537–558.
- Nicholson, K.M., and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* *14*, 381–395.
- Opie, L.H. (1996). Myocardial ischemia, reperfusion and cytoprotection. *Rev. Port. Cardiol. Orgão Of. Soc. Port. Cardiol. Port. J. Cardiol. Off. J. Port. Soc. Cardiol.* *15*, 703–708.
- Ošťádal, B., and Kolář, F. (1999). Myocardial Hypoxia and Ischemia. In *Cardiac Ischemia: From Injury to Protection*, (Springer US), pp. 1–44.
- Ostadal, B., and Kolar, F. (2007). Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *158*, 224–236.
- Ostadal, B., Ostadalova, I., and Dhalla, N.S. (1999). Development of Cardiac Sensitivity to Oxygen Deficiency: Comparative and Ontogenetic Aspects. *Physiol. Rev.* *79*, 635–659.
- Park, A.-M., and Suzuki, Y.J. (2007). Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J. Appl. Physiol.* *102*, 1806–1814.
- Pastorino, J.G., and Hoek, J.B. (2008). Regulation of Hexokinase Binding to VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* *40*, 171–182.
- Patten, R.D., Pourati, I., Aronovitz, M.J., Baur, J., Celestin, F., Chen, X., Michael, A., Haq, S., Nuedling, S., Grohe, C., et al. (2004). 17 β -Estradiol Reduces Cardiomyocyte Apoptosis In Vivo and In Vitro via Activation of Phospho-Inositide-3 Kinase/Akt Signaling. *Circ. Res.* *95*, 692–699.
- Pedersen, P.L., Mathupala, S., Rempel, A., Geschwind, J.F., and Ko, Y.H. (2002). Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1555*, 14–20.

- Peterson, R.T., and Schreiber, S.L. (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol.* 9, R521–R524.
- Poupa, O., Krofta, K., Prochazka, J., and Turek, Z. (1966). Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed. Proc.* 25, 1243–1246.
- Powers, S.K., Quindry, J.C., and Kavazis, A.N. (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 193–201.
- Qian, T., Nieminen, A.-L., Herman, B., and Lemasters, J.J. (1997). Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 273, C1783–C1792.
- Rasola, A., and Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 12, 815–833.
- Ravingerová, T., Matejíková, J., Neckár, J., Andelová, E., and Kolár, F. (2007). Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 297, 111–120.
- Reed, J.C. (2006). Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* 13, 1378–1386.
- Reed, J.C. (2008). Bcl-2–family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111, 3322–3330.
- Roberts, D.J., Tan-Sah, V.P., Smith, J.M., and Miyamoto, S. (2013). Akt Phosphorylates HK-II at Thr-473 and Increases Mitochondrial HK-II Association to Protect Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 288, 23798–23806.
- Robey, R.B., and Hay, N. (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* 25, 4683–4696.
- Rohrbach, S., Aslam, M., Niemann, B., and Schulz, R. (2014). Impact of caloric restriction on myocardial ischaemia/reperfusion injury and new therapeutic options to mimic its effects. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2964–2992.
- Rota, M., Boni, A., Urbanek, K., Padin-Iruegas, M.E., Kajstura, T.J., Fiore, G., Kubo, H., Sonnenblick, E.H., Musso, E., Houser, S.R., et al. (2005). Nuclear Targeting of Akt Enhances Ventricular Function and Myocyte Contractility. *Circ. Res.* 97, 1332–1341.
- Santi, S.A., and Lee, H. (2010). The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C580–C591.
- Santiago, A.P.S.A., Chaves, E.A., Oliveira, M.F., and Galina, A. (2008). Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation

with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie* 90, 1566–1577.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.

Shinmura, K. (2011). Cardiovascular protection afforded by caloric restriction: essential role of nitric oxide synthase. *Geriatr. Gerontol. Int.* 11, 143–156.

Shoshan-Barmatz, V., Zakar, M., Rosenthal, K., and Abu-Hamad, S. (2009). Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 421–430.

Smeele, K.M.A., Southworth, R., Wu, R., Xie, C., Nederlof, R., Warley, A., Nelson, J.K., Horsen, P. van, Wijngaard, J.P. van den, Heikkinen, S., et al. (2011). Disruption of Hexokinase II–Mitochondrial Binding Blocks Ischemic Preconditioning and Causes Rapid Cardiac Necrosis. *Circ. Res.* 108, 1165–1169.

Sörensson, P., Saleh, N., Bouvier, F., Böhm, F., Settergren, M., Caidahl, K., Tornvall, P., Arheden, H., Rydén, L., and Pernow, J. (2010). Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction. *Heart Br. Card. Soc.* 96, 1710–1715.

Southworth, R., Davey, K.A.B., Warley, A., and Garlick, P.B. (2007). A reevaluation of the roles of hexokinase I and II in the heart. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 292, H378–H386.

Speakman, J.R., and Mitchell, S.E. (2011). Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* 32, 159–221.

Staal, S.P. (1987). Molecular Cloning of the Akt Oncogene and Its Human Homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a Primary Human Gastric Adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 5034–5037.

Staat, P., Rioufol, G., Piot, C., Cottin, Y., Cung, T.T., L'Huillier, I., Aupetit, J.-F., Bonnefoy, E., Finet, G., André-Fouët, X., et al. (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation* 112, 2143–2148.

Stensløkken, K.-O., Rutkovskiy, A., Kaljusto, M.-L., Hafstad, A.D., Larsen, T.S., and Vaage, J. (2009). Inadvertent phosphorylation of survival kinases in isolated perfused hearts: a word of caution. *Basic Res. Cardiol.* 104, 412–423.

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., and al, et (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710–714.

Sussman, M.A. (2009). Mitochondrial integrity: preservation through Akt/Pim-1 kinase signaling in the cardiomyocyte. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 7, 929–938.

- Sussman, M.A., Völkers, M., Fischer, K., Bailey, B., Cottage, C.T., Din, S., Gude, N., Avitabile, D., Alvarez, R., Sundararaman, B., et al. (2011). Myocardial AKT: The Omnipresent Nexus. *Physiol. Rev.* *91*, 1023–1070.
- Takano, H., Bolli, R., Black, R.G., Kodani, E., Tang, X.-L., Yang, Z., Bhattacharya, S., and Auchampach, J.A. (2001). A1 or A3 Adenosine Receptors Induce Late Preconditioning Against Infarction in Conscious Rabbits by Different Mechanisms. *Circ. Res.* *88*, 520–528.
- Takaoka, A., Nakae, I., Mitsunami, K., Yabe, T., Morikawa, S., Inubushi, T., and Kinoshita, M. (1999). Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of “remote preconditioning.” *J. Am. Coll. Cardiol.* *33*, 556–564.
- Taniyama, Y., Ito, M., Sato, K., Kuester, C., Veit, K., Tremp, G., Liao, R., Colucci, W.S., Ivashchenko, Y., Walsh, K., et al. (2005). Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *38*, 375–385.
- Tousoulis, D., Charakida, M., and Stefanadis, C. (2008). Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Postgrad. Med. J.* *84*, 368–371.
- Turer, A.T., and Hill, J.A. (2010). Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. *Am. J. Cardiol.* *106*, 360–368.
- Vaage, J., and Valen, G. (2003). Preconditioning and cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.* *75*, S709–S714.
- Vandromme, M., Rochat, A., Meier, R., Carnac, G., Besser, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., and Lamb, N.J.C. (2001). Protein Kinase B β /Akt2 Plays a Specific Role in Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* *276*, 8173–8179.
- Voors, A.W., and Johnson, W.D. (1979). Altitude and arteriosclerotic heart disease mortality in white residents of 99 of the 100 largest cities in the United States. *J. Chronic Dis.* *32*, 157–162.
- Watton, S.J., and Downward, J. (1999). Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. *Curr. Biol.* *9*, 433–436.
- Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* *292*, 727–730.
- Weiss, J.N., Korge, P., Honda, H.M., and Ping, P. (2003). Role of the Mitochondrial Permeability Transition in Myocardial Disease. *Circ. Res.* *93*, 292–301.
- Whittaker, P., and Przyklenk, K. (1994). Reduction of infarct size in vivo with ischemic preconditioning: mathematical evidence for protection via non-ischemic tissue. *Basic Res. Cardiol.* *89*, 6–15.

- Widimský, J., Urbanová, D., Ressler, J., Ostádal, B., Pelouch, V., and Procházka, J. (1973). Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc. Res.* *7*, 798–808.
- Wu, R., Smeele, K.M., Wyatt, E., Ichikawa, Y., Eerbeek, O., Sun, L., Chawla, K., Hollmann, M.W., Nagpal, V., Heikkinen, S., et al. (2011). Reduction in hexokinase II levels results in decreased cardiac function and altered remodeling after ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* *108*, 60–69.
- Wu, R., Wyatt, E., Chawla, K., Tran, M., Ghanefar, M., Laakso, M., Epting, C.L., and Ardehali, H. (2012). Hexokinase II knockdown results in exaggerated cardiac hypertrophy via increased ROS production. *EMBO Mol. Med.* *4*, 633–646.
- Yamaguchi, H., and Wang, H.G. (2001). The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* *20*, 7779–7786.
- Yamashita, K., Kajstura, J., Discher, D.J., Wasserlauf, B.J., Bishopric, N.H., Anversa, P., and Webster, K.A. (2001). Reperfusion-Activated Akt Kinase Prevents Apoptosis in Transgenic Mouse Hearts Overexpressing Insulin-Like Growth Factor-1. *Circ. Res.* *88*, 609–614.
- Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2002). Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation. *Mol. Cell* *9*, 1227–1240.
- Yang, L., Sun, M., Sun, X., Cheng, G.Z., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2007). Akt attenuation of the serine protease activity of HtrA2/Omi through phosphorylation of serine 212. *J. Biol. Chem.* *282*, 10981–10987.
- Yang, X.-M., Philipp, S., Downey, J.M., and Cohen, M.V. (2006). Atrial natriuretic peptide administered just prior to reperfusion limits infarction in rabbit hearts. *Basic Res. Cardiol.* *101*, 311–318.
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dümmler, B., Wahli, W., and Hemmings, B.A. (2005). Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10407–10418.
- Yellon, D.M., Alkhulaifi, A.M., and Pugsley, W.B. (1993). Preconditioning the human myocardium. *Lancet Lond. Engl.* *342*, 276–277.
- Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A., and 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–H588.
- Zhou, T., Chuang, C.-C., and Zuo, L. (2015). Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *BioMed Res. Int.* *2015*.

Další zdroje informací:

World Health Organization <http://www.who.int/en>

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

12. PŘÍLOHOVÁ ČÁST

Příloha 1 – složení jednotlivých roztoků / pufrů:

Složení Krebsova-Henseleitova pufru:

1. 118 mM NaCl (dodáno společností PENTA)
2. 4,7 mM KCl (dodáno společností PENTA)
3. 1,2 mM MgSO₄ (dodáno společností PENTA)
4. 1,25 mM CaCl₂ (dodáno společností PENTA)
5. 1,2 mM KH₂PO₄ (dodáno společností PENTA)
6. 25 mM NaHCO₃ (dodáno společností PENTA)
7. 11 mM glukóza (dodáno společností SIGMA)

Zásobní roztok byl předpřipraven bez glukózy, která byla přidána vždy čerstvě do roztoku. Roztok se dále sytil pomocí kyslíku (95% O₂ / 5% CO₂) do doby než se pH dostalo na hodnotu 7,4.

Složení Laemmliho pufru:

1. 2 ml SDS ($c_m = 0,1\text{g/ml}$, SDS dodané společností SIGMA)
2. 1 ml glycerolu (dodáno společností SIGMA)
3. 0,6 ml Bis-Tris roztoku (viz. dále)
4. 1,4 ml mQH₂O
5. Bromfenolová modř (Bromphenol Blue ACS reagent, dodané společností SIGMA)

Složení homogenizačního média 1:

1. 16,04 mg TRIS ($c = 12,5\text{mM}$; TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 9,52 mg EGTA ($c = 2,5\text{mM}$; ethylenediaminetetraacetic acid, dodané společností SIGMA)

3. 2,92 mg EDTA ($c = 1\text{mM}$; ethylene glykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, dodané společností SIGMA)
4. 0,86 g sacharóza ($c = 250\text{mM}$; dodáno společností PENTA)

Takto zvážené množství se rozpustilo v 20 ml mQH₂O a pH na 7,4. Posléze bylo přidáno 7,71 mg DTT (DL-dithiothreitol; SIGMA). Následně byly přidány inhibitory proteáz (Complete, Roche Diagnostics) a inhibitory fosfatáz (PhosSTOP, Roche Diagnostics).

Složení homogenizačního média 2:

1. Močovina 3,0 g
2. Thiomočovina 1,55 g
3. Tetrasodium pyrofosfát dekahydrát 45 mg
4. 2-merkaptóetanol 13 μl

Naměřené množství chemikálií vložíme do kádinky a doplníme objem na výsledných 10 ml pomocí mQH₂O.

12%-ní dělicí gel (množství potřebné na dva gely):

1. 3,4 ml mQH₂O
2. 4,0 ml 30% akrylamidového roztoku (dodané společností SIGMA)
3. 2,5 ml pufru TRIS ($\text{pH} = 8,8$) (viz dále)
4. 100 μl SDS ($c_m = 0,1\text{g} / \text{ml}$; SDS dodané společností SIGMA)
5. 50 μl APS ($c_m = 0,1\text{g} / \text{ml}$; APS dodané společností)
6. 10 μl TEMED (dodané společností SERVA)

5%-ní zaostřovací gel (množství potřebné na dva gely):

1. 2,85 ml mQH₂O
2. 0,85 ml 30% akrylamidového roztoku (dodané společností SIGMA)
3. 1,25 ml pufru BIS-TRIS ($\text{pH} = 6,8$) (viz dále)
4. 50 μl SDS ($c_m = 0,1\text{g} / \text{ml}$; SDS dodané společností SIGMA)
5. 25 μl APS ($c_m = 0,1\text{g} / \text{ml}$; APS dodané společností)
6. 5 μl TEMED (dodané společností SERVA)

Složení pufru TRIS (pH = 8,8):

9,1 g TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA) rozpuštěno ve 100 ml mQH₂O a pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 8,8.

Složení pufru BIS-TRIS (pH=6,8):

10,462 g BIS-TRIS (dodané společností SIGMA) rozpuštěno ve 100 ml mQH₂O a pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 6,8.

Složení elektrodového pufru koncentrovaného:

1. 30,3 g TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 144 g Glycin (dodané společností SIGMA)
3. 10 g SDS (dodané společností SIGMA)

Navážené množství bylo v kádince rozmícháno ve finálním objemu 1 litr. Takto koncentrovaný elektrodový pufr byl ředěn v poměru 1 : 9 (PUFR: mQH₂O).

Vnitřní elektrodový pufr (v přímém kontaktu s gely) byl po každé elektroforéze vylit do odpadu. Vnější elektrodový pufr (vyplňující prostor aparatury) maximálně 5x recyklován.

Složení Ponceau roztoku:

0,1% Ponceau (dodané společností SIGMA) v 5% kyselině octové (dodané společností PENTA)

Složení přenosového pufru:

1. 40 ml methanolu (dodané společností Lach:NER s.r.o.)
2. 140 ml mQH₂O
3. 20 ml 10x koncentrovaný Tris/Glycin pufr (dodané společností Bio-Rad)

Naměřené objemy byly smíchány v kádince a membrány byly v pufru inkubovány několik minut před použitím.

Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB) a Bismark Brown R (BBR) (na 0,5 l roztoku):

1. 1g CBB
2. 250 mg BBR
3. 200 ml methanolu (dodané společností Lach:Ner s.r.o.)
4. 35 ml 99% kyseliny octové (dodané společností PENTA)
5. 256 ml mQH₂O

Připravený roztok byl uchováván při pokojové teplotě.

Odbarvovací roztok (na 0,5 l roztoku):

1. 200 ml methanolu (dodané společností Lach:Ner s.r.o.)
2. 35 ml 99% kyseliny octové (dodané společností PENTA)
3. 256 ml mQH₂O

Připravený roztok byl uchováván při pokojové teplotě a recyklován filtrací za použití práškového aktivního uhlí.

Složení TBS:

1. 12,1 g TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 146,2 g NaCl (dodáno společností PENTA)

Navážené množství bylo rozpuštěno ve 4 litrech mQH₂O. Pomocí HCl bylo upraveno pH na hodnotu 7,5 a objem byl doplněn na celkový objem 5 litrů.

Složení TTBS:

Do 1 litru TBS bylo přidáno 0,5 ml Tween 20 (dodáno společností SIGMA)