

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

katedra buněčné biologie

Mgr. Jana Ježková

**Úloha remodelace membránových fosfolipidů, oxidativního stresu
a PKC- δ v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie.**

**Role of membrane phospholipid remodeling, oxidative stress and
PKC- δ upregulation in cardioprotection induced by chronic
hypoxia**

(Rigorózní práce)

2016

Velmi ráda bych na tomto místě poděkovala svým školitelům Doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc. a Doc. RNDr. Olze Novákové, CSc., pod jejichž odborným vedením vznikaly publikace spojené v tuto rigorózní práci. Děkuji zejména za pečlivé pedagogické vedení, předané teoretické i praktické dovednosti a trpělivý přístup. Děkuji také pracovníkům Oddělení vývojové kardiologie FgÚ AV ČR, jmenovitě prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc. A RNDr. Janu Neckářovi, PhD. za pomoc s experimentální částí práce. Děkuji také RNDr. Evě Tvrzické a pracovníkům výzkumné angiologické laboratoře IV. Interní kliniky VFN za pomoc při analýze mastných kyselin.

Kardiovaskulární choroby jsou jednou z hlavních příčin mortality a morbidit v rozvinutých zemích světa. Proto se řada experimentálních a klinických studií zabývá otázkou jak zvýšit toleranci myokardu k ischemicko/reperfúznímu (I/R) poškození a najít mechanismus jak stimulovat dráhy endogenní protekce. Ukazuje se celá řada možností, jak zvýšené odolnosti myokardu dosáhnout. Jednou z nich je tzv. preconditioning a postconditioning, což jsou krátké epizody ischemie aplikované před, nebo po vlastním ischemickém ataku⁽¹⁾. Zvýšenou odolnost lze také navodit tělesným cvičením, farmakologicky a v neposlední řadě adaptací na chronickou hypoxii. Výhodou je, že protektivní účinek adaptace na chronickou hypoxii přetrvává mnohem delší dobu ve srovnání s preconditioningem⁽²⁾.

Protektivní účinek chronické hypoxie byl pozorován již v polovině 20. století u lidí žijících ve vysoké nadmořské výšce. V této populaci byl pozorován mnohem nižší výskyt infarktu myokardu (IM)⁽³⁾. V experimentu se navozují podmínky simulující vysokou nadmořskou výšku v barokomoře. Adaptovaní potkani mají po I/R menší infarktové ložisko⁽⁴⁾, nižší počet a závažnost I/R arytmií⁽⁵⁾ a lepší návrat kontraktálních funkcí⁽⁶⁾. Ve srovnání s preconditioningem, kde protekce přetrvává krátkodobě, adaptace na chronickou hypoxii má dlouhodobý účinek⁽⁷⁾. Přesto, že se zabývá protektivním účinkem adaptace na chronickou hypoxii řada studií, jeho úplný mechanismus nebyl dosud zcela objasněn. Předpokládá se, že zde hrají roli signální dráhy, ve kterých jsou zapojené mitochondriální ATP-dependentní draslíkové kanály (mitoK_{ATP})^(8,9), reaktivní formy kyslíku (ROS)⁽¹⁰⁾, proteinkináza C (PKC)^(11,12) a další proteinkinázy⁽¹³⁾.

Při adaptaci na chronickou hypoxii dochází k remodelaci jak proteinového⁽¹⁴⁾, tak lipidového profilu myokardu⁽¹⁵⁾. Tato remodelace se týká i membrán srdečních buněk a jejich organel. Vzhledem k vysoké energetické potřebě, srdeční sval má ve svých buňkách velké množství membránových struktur. Kromě proteinů jsou jejich hlavní strukturální

komponentou lipidy, které tvoří prostředí pro funkci membránových kanálů, receptorů a na membránu vázaných enzymů. Hlavní složkou membránových lipidů jsou fosfolipidy, které mají nejen strukturální funkci, ale jsou zároveň zdrojem lipidových signálních molekul podílejících se na regulaci celé řady procesů v srdečních buňkách (metabolismus, růst, diferenciace apod.)⁽¹⁶⁾. Složení membránových lipidů výrazně ovlivňuje fluiditu membrán, a také funkci na membránu vázaných proteinů. Zvláště důležité je složení lipidů membrán, které jsou vystaveny akutní ischemii. Během akutní ischemie dochází k aktivaci fosfolipáz a akumulaci produktů hydrolýzy lipidů jako je volná kyselina arachidonová (AA) a lyzofosfolipidy. Zvýšená hladina lyzofosfolipidů je spojována s rozvojem život ohrožujících komorových arytmií^(17,18). Volné n-6 a n-3 mastné kyseliny (MK) jsou využívány jako substrát k syntéze signálních molekul jako jsou eikozanoidy a dokozanoidy. Tyto lipidové signální molekuly mají značný vliv např. na agregaci destiček a průtok koronárními arteriemi, účastní se také imunitních a zánětlivých procesů⁽¹⁶⁾.

Změny ve fosfolipidovém složení membrán pak vedou ke změnám jejich integrity membrán a k ireverzibilnímu poškození tkáně zvláště během reperfúze myokardu. Z tohoto hlediska remodelace membrán po adaptaci může přispívat k protektivnímu účinku chronické hypoxie. Adaptace na intermitentní výškovou hypoxii (IHA) hypoxii výrazně mění zastoupení MK ve fosfolipidech (PL), a to zejména zastoupení jednotlivých tříd polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Ukázali jsme, že dochází ke snížení poměru n-6/n-3 PUFA a zvýšení indexu nenasycenosti^(19,20).

Tolerance myokardu k I/R poškození se zvyšuje se zvyšujícím se podílem PUFA s dlouhým řetězcem ve PL a to zejména PUFA řady n-3. Protože kapacita myocytů pro de novo syntézu MK je velmi nízká, získávají buňky srdečního svalu většinu MK z krevního řečiště, proto lze zastoupení MK ve PL srdečního svalu výrazně ovlivnit dietou o různém zastoupení MK. Řada experimentálních a klinických studií se zabývá vlivem lipidové diety na

kardiovaskulární onemocnění. Mononesycené MK (MUFA) a PUFA v dietě mají obvykle příznivý vliv na funkci myokardu na rozdíl od nasycených mastných kyselin (SFA) ^(21, 22). Obě třídy PUFA (n-3 i n-6) chrání myokard před I/R poškozením, ale n-3 třída je považována za více účinnou ⁽²³⁾. N-3 PUFA v dietě snižují množství a závažnost komorových arytmií vyvolaných ischemií a následnou reperfúzí ^(24, 25), redukuje buněčné poškození ⁽²⁶⁾, velikost IM ⁽²⁷⁾ a zlepšují návrat kontraktálních funkcí po ischemii ⁽²⁸⁾. Na druhou stranu jsou PUFA zvláště n-3 PUFA v důsledku přítomnosti většího počtu dvojných vazeb náchylné k peroxidacím ⁽²⁹⁾. Produktem těchto reakcí jsou např. konjugované dieny ⁽³⁰⁾. K jejich vzniku v důsledku oxidativního stresu dochází dokonce i za přítomnosti účinných antioxidantů ⁽³¹⁾.

Cíl

Rigorózní práce se skládá ze souboru 4 publikací. Cílem studií bylo sledovat změny ve složení lipidů a jejich mastných kyselin v myokardu a plazmě potkanů adaptovaných na IHA hypoxii a vliv diety s různým složením MK, zároveň sledovat produkci ROS, antioxidační kapacitu a expresi PKC.

Experimentálních modelů k navození chronické hypoxie je celá řada. V naší studii jsme použili model IHA hypoxie. Pro experiment jsme zvolili dospělé samce potkana kmene Wistar, které jsme adaptovali v hypobarické komoře postupně až na nadmořskou výšku 7000 m po dobu 8 hodin denně, 5 dní v týdnu. Celkem byli potkani vystaveni 25 expozičním. Infarkt myokardu byl vyvolán okluzí koronární arterie na anestetizovaném ventilovaném zvířeti. Během ischemie a následné reperfúze byly zaznamenávány komorové arytmie. Velikost infarktu myokardu byla určována histochemicky pomocí tetrazoliových solí. Tkáňové lipidy byly extrahovány modifikovanou metodou podle Folche ⁽³²⁾, lipidy séra byly

izolovány směsí chloroform-methanol-voda. Jednotlivé lipidové druhy byly separovány jednorozměrnou chromatografií na tenké vrstvě (TLC), fosfolipidové druhy byly separovány dvourozměrnou TLC. Stanovení koncentrace PL druhů bylo provedeno spektrofotometricky jako množství fosforu ⁽³³⁾. Analýza metylesterů MK byla provedena plynovou chromatografií ⁽³⁴⁾. Hladina konjugovaných dienu byla stanovena spektrofotometricky ⁽³⁵⁾. Ke stanovení aktivity katalázy byla použita modifikovaná metoda podle Aebiho ⁽³⁶⁾, stanovení glutathion peroxidázy (GPX) bylo provedeno metodou podle Paglia a Valentine ⁽³⁷⁾, stanovení superoxid dismutázy (SOD) modifikovanou nitroblue tetrazoliovou metodou ⁽³⁸⁾. Stanovení koncentrace glutathionu (GSH) a glutathiondisulfidu (GSSG) bylo provedeno metodou podle Griffitha ⁽³⁹⁾. Stanovení hladiny lipofuscinových barviv (LFP), indikátoru oxidativního stresu, bylo provedeno po extrakci homogenitu z tkáně levé komory (LV) pomocí UV spektrofotometrie ⁽⁴⁰⁾.

Expres PKC δ a ϵ byla stanovena v membránové a cytosolické frakci z homogenitu LV myokardu, které byly připraveny diferenciální centrifugací. Expres byla sledována metodou Western blotting s následnou imunodetekcí a počítačovou denzitometrií.

1. Studie

Ježková J, Nováková O, Kolář F, Tvrzická E, Neckář J, Novák F. Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. Mol Cell Biochem, 2002, 232, 49-56.

Tématem této práce bylo sledování změn v koncentraci membránových fosfolipidů a zastoupení jejich MK v pravé komoře (RV) a LV myokardu potkana adaptovaného na IHA hypoxii. Zejména pravá komora vlivem adaptace na IHA hypoxii výrazně hypertrofuje. Adaptace na IHA hypoxii snížila koncentraci diphosphatidylglycerolu (DPG) o 17% v RV

myokardu a o 12% v LV v porovnání s normoxickými kontrolami. DPG (kardiolipin) je důležitou součástí vnitřní mitochondriální membrány, snížení jeho koncentrace může být způsobeno změnami na úrovni mitochondriální membrány nebo snížením koncentrace mitochondrií. Adaptace dále způsobila výrazné snížení podílu n-6 PUFA, zejména kyseliny linolové (18:2n-6, LA), které bylo kompenzováno zvýšením podílu protektivních n-3 PUFA, hlavně pak kyselinou dokosaheptaenovou (22:6n-3, DHA). Tyto změny jsme pozorovali v obou majoritních PL druzích – fosfatidylcholinu (PC), fosfatidylethanolaminu (PE), dále také v DPG a fosfatidylinositolu. Množství AA se nezměnilo v celkových PL, ale v PC se její podíl zvýšil v obou komorách o 22% a naopak v PE došlo k 20% poklesu jejího množství. Chronická hypoxie výrazně zvýšila index nenasycenosti MK (UI) v PC a PE v obou komorách. V DPG došlo vlivem hypoxie k vzestupu podílu MUFA a poklesu podílu LA. V RV myokardu, na rozdíl od LV se zvýšil podíl SFA v PC a fosfatidylinositolu. Zastoupení MK ve fosfatidylserinu nebylo hypoxií ovlivněno.

Na závěr této studie lze říct, že adaptace na IHA vyvolala pouze malé změny v koncentraci jednotlivých PL druhů, ale výrazně ovlivnila zastoupení mastných kyselin v jednotlivých PL druzích. Obdobné změny jsme pozorovali jak v RV, tak hypertrofií méně ovlivněné LV myokardu. Tyto změny, zvláště pak výrazné snížení poměru n-6/n-3 PUFA a zvýšení UI mohou přispívat k protekci myokardu k I/R poškození.

2. studie

Kolář F, Ježková J, Balková P, Břeh J, Neckář J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ošťádal B, Wilhelm J, Herget J. Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292, H224-H230.

Studie byla koncipována tak, aby ověřila předpoklad, že zvýšený oxidační stres během adaptace na chronickou hypoxii hraje roli ve zlepšení tolerance myokardu k akutnímu I/R poškození. Jak bylo již zmíněno, mechanismus dlouhodobé kardioprotekce není dosud zcela objasněn, zdá se ale, že klíčovou roli zde hrají mitoK-ATP kanály a PKC. Ze studií na jiném modelu kardioprotekce - preconditioningu lze usuzovat, že spojení mezi aktivací PKC a otevřením mitoKATP zprostředkovávají právě ROS, které se vytvářejí během aktivační fáze různých forem protekce^(41, 42). V experimentu byl použit antioxidant N-acetylcystein (NAC), který působí dvojitým způsobem, sám interaguje s volnými kyslíkovými radikály a zároveň je prekurzorem L-cysteinu a glutathionu.

Potkani kmene Wistar byly adaptovány na IHA hypoxii podle protokolu popsaného výše. Polovině zvířat byl dlouhodobě vždy před hypoxickou expozicí aplikován antioxidant NAC.

Adaptace na IHA hypoxii obdobně jako v předchozích studiích vedla ke zmenšení velikosti nekrotického ložiska po ischemii na 28% ohrožené oblasti ve srovnání s 57% u kontroly. Podávání NAC u zvířat adaptovaných na IHA hypoxii zvýšilo velikost infarktu na 41% a signifikantně tak eliminovalo protektivní účinek vyvolaný adaptací. NAC také u skupiny adaptovaných zvířat ovlivnil oba sledované markery oxidativního stresu ve tkáni: zvýšil poměr redukovaného/oxidovanému glutationu (GSH/GSSG) a snížil deposita lipofuscinu. Chronická hypoxie zvýšila expresi PKC δ v partikulární frakci, NAC toto zvýšení eliminoval. Tyto výsledky ukázaly na význam ROS v indukcii kardioprotekce a na účast PKC δ v tomto mechanismu.

Aktivity antioxidantních enzymů SOD, katalázy a glutathionperoxidázy neovlivnila ani hypoxie ani NAC.

V této studii jsme ukázali, že oxidativní stres vznikající při adaptaci na IHA hypoxii hraje významnou roli v rozvoji jejího kardioprotektivního účinku. Podávání antioxidantu NAC zabránilo vzniku protektivního fenotypu.

V dalších dvou studiích jsme se zabývali sledováním změn vyvolaných podáváním diety s různým zastoupením MK na kardioprotektivní účinek adaptace myokardu na IHA hypoxii. Dospělí samci potkana kmene Wistar byli po dobu 10 týdnů krmeni standardní dietou obohacenou o 10% sádla (SFA dieta), rybího tuku (n-3 dieta) nebo kukuřičného oleje (n-6 dieta). Po 4 týdnech podávání diety byla polovina zvířat z každé skupiny adaptována na IHA hypoxii podle modelu popsaného výše. Druhá polovina byla chována v normoxických podmínkách.

3. studie

Hlaváčková M, Neckář J, Ježková J, Balková P, Staňková B, Nováková O, Kolář F, Novák F. Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. Exp Biol Med, 2007,232, 823-832.

V této práci jsme si položili otázku, zda složení MK v dietě ovlivní projevy kardioprotektivního účinku IHA hypoxie, zejména expresi PKC δ a ϵ .

IHA hypoxie snížila poměr n-6/n-3 PUFA o 23% ve všech skupinách nezávisle na podávané dietě. Nejsilnější antiarytmický efekt vykazovala n-3 dieta. Kombinace n-3 diety a adaptace na IHA hypoxii vedla k téměř úplnému vymizení arytmií během 3h reperfúze. Menší antiarytmický vliv jsme pozorovali také u zvířat krmených n-6 dietou. U normoxických LV jsme pozorovali výrazné zmenšení infarktu myokardu pouze u n-6 diety, n-3 dieta rozsah

nekrotického ložiska zvětšila ve srovnání s n-6 dietou. Chronická hypoxie vedla ke zmenšení velikosti IM u n-3 diety (o 20%) a po SFA dietě (o 23%). Naopak u skupiny s n-6 dietou již po adaptaci na IHA hypoxii ke zmenšení infarktového ložiska nedošlo. IHA hypoxie vedla ke zvýšení exprese PKC δ v membránové frakci u SFA a n-3 dietní skupiny, ale neovlivnila její expresi u n-6 skupiny zvířat. Z regresní analýzy exprese PKC v membránové frakci a velikostí IM je patrná těsná negativní korelace mezi těmito dvěma veličinami.

Výsledky ukazují, že složení MK v membránových fosfolipidech výrazně ovlivňuje endogenní protekci vedoucí ke zmenšení nekrotického ložiska a počet a závažnost arytmií po adaptaci na IHA hypoxii zahrnující také změny v expresi a buněčné distribuci PKC δ .

4. studie

Balková P, Ježková J, Hlaváčková M, Neckář J, Staňková B, Kolář F, Novák F, Nováková O. Dietary polyunsaturated fatty acids and adaptation to chronic hypoxia alter acyl composition of serum and heart lipids. Br J Nutr, 2009, 102, 1297-1307.

Tato studie byla zaměřena na sledování vlivu lipidové diety o různém zastoupení MK a IHA hypoxie na změny v zastoupení MK v lipidech séra a srdce potkana. Zároveň jsme sledovali hladinu konjugovaných dienu a aktivitu antioxidantních enzymů.

K nejvýznamnějším změnám v závislosti na dietě dochází v zastoupení jednotlivých tříd PUFA. Poměr n-6/n-3 PUFA se v sérových triacylglycerolech (TAG), PL, cholesterolsterech (CE) a srdečních TAG, PL a diacylglycerolech snižuje v závislosti na podávané dietě v pořadí n-6 dieta > SFA dieta > n-3 dieta. V lipidech LV srdečního svalu u zvířat krmených n-3 dietou byly kyselina arachidonová (20:4n-6) a LA (18:2n-6) nahrazeny kys. eikosapentaenovou (22:5n-3, EPA) a DHA (22:6n-3). Majoritní kyselinou sérových CE u

SFA a n-6 skupiny zvířat je AA, u zvířat n-3 skupiny byla polovina jejího množství nahrazena EPA. U skupiny zvířat s n-3 dietou se v LV objevila zvýšená hladina konjugovaných dienů, zřejmě způsobená přítomností PUFA s dlouhým řetězcem, které jsou náchylné k peroxidacím. IHA hypoxie ještě zvýšila podíl n-3 PUFA v sérových i srdečních lipidech. IHA hypoxie také zvýšila aktivitu katalázy u zvířat s SFA a n-3 dietou.

Ukazuje se, že oba kardioprotektivní zásahy, jak podávání diety s PUFA tak i adaptace na IHA hypoxii významně modulují zastoupení MK v lipidech séra a srdečního svalu, tyto změny se odráží také v hladině konjugovaných dienů a aktivitě katalázy.

Shrnutí

- **Adaptace** na IHA hypoxii snižuje koncentraci DPG (kardiolipin) v LV i RV myokardu.
- Adaptace na IHA hypoxii mění zastoupení PUFA v lipidech myokardu ve prospěch kardioprotektivní n-3 PUFA.
- V mechanismu endogenní protekce indukované IHA hypoxií hrají jako signální molekuly významnou roli ROS a PKC δ .
- Zvýšení podílu n-3 PUFA dietou má výrazný antiarytmický efekt.
- V závislosti na podávané dietě jsme pozorovali negativní korelaci mezi velikostí IM a množstvím PKC δ jak u normoxické, tak u hypoxické levé komory myokardu.

Závěr

Naše výsledky naznačují, že k protektivnímu účinku adaptace na IHA hypoxii může přispívat snížení podílu aerobního ve prospěch anaerobního metabolismu a zvýšení podílu protektivních n-3 PUFA v sérových a membránových fosfolipidech. Potvrdili jsme, že

v protektivním mechanismu se jako důležité signální molekuly uplatňují ROS a PKC δ . Dieta s různým zastoupením MK ovlivňuje velikost IM mechanismem, ve kterém hraje významnou roli také PKC δ . Dieta obohacená rybím olejem má jednoznačně největší antiarytmický efekt.

Podíl autorky na prezentovaných studiích

Mým hlavním úkolem v předkládaných studiích byla analýza koncentrace fosfolipidových druhů v levé a pravé komoře myokardu potkana a stanovení zastoupení MK v jednotlivých lipidových třídách v séru a myokardu potkana. Dále jsem se podílela na zavedení metodiky měření aktivity antioxidantních enzymů v srdeční tkáni a prováděla jejich jednotlivá měření. Podílela jsem se na měření exprese PKC v homogenátu a v buněčných frakcích z myokardu potkana. Zaváděla jsem na pracovišti experimentální model podávání diet s různým zastoupením MK a připravovala jsem jednotlivé diety.

Citovaná literatura

1. **Murry CE, Jennings RB, Reimer KA.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74, 1124-1136.
2. **Ostadal B.** Myocardial ischemic injury and protection. *Exp Clin Cardiol*, 2004, 9, 213–217.
3. **Hurtado A.** Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med.* 1960, 53, 247-258.
4. **Neckár J, Papousek F, Nováková O, Ostádal B, Kolár F.** Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol*, 97, 2002, 161-167.
5. **Meerson FZ, Ustinova EE, Orlova EH.** Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Clin Cardiol*, 1987, 31, 783-789.
6. **Widimský J, Urbanová D, Ressler J, Ostádal B, Pelouch V, Procházka J.** Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res*, 1973, 7, 798-808.
7. **Neckár J, Ostádal B, Kolár F.** Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res*, 2004, 53, 621-628.
8. **Asemu G, Papousek F, Ostádal B, Kolár F.** Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J Mol Cell Cardiol*, 10, 1999, 1821-1831.

9. **Neckář J, Szárszoi O, Kóten L, Papousek F, Ost'ádal B, Grover GJ, Kolár F.** Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res*, 2002, 55, 567-575.
10. **Kolár F, Jezková J, Balková P, Breh J, Neckář J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ost'ádal B, Wilhelm J, Herget J.** Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292, H224-H230.
11. **Neckář J., Marková I, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ost'ádal B, Kolár F.** Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288, H1566-H1572.
12. **Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F, Nováková O.** Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem*, 2010, 345, 271-282.
13. **Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Litwin SB, Mussatto K, Jaquiss RD, Su J, Baker JE.** Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation*, 2002, 106, 239-245.
14. **Pelouch V, Ostádal B, Urbanová D, Procházka J, Ressler J, Widimský J.** Effect of intermittent high altitude hypoxia on the structure and enzymatic activity of cardiac myosin. *Physiol Bohemoslov*, 1980, 29, 313-322.
15. **Jezková J, Nováková O, Kolár F, Tvrzická E, Neckář J, Novák F.** Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem*, 2002, 232, 49-56.
16. **DE Vance, JE Vance.** *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5. edition. Amsterdam : ELSEVIER, 2008, 978-0-444-53219-0.
17. **Sobel BE, Corr PB, Robison AK, Goldstein RA, Witkowski FX, Klein MS.** Accumulation of lysophosphoglycerides with arrhythmogenic properties in ischemic myocardium. *J Clin Invest*, 1978, 62, 546-553.
18. **RY, Man.** Lysophosphatidylcholine-induced arrhythmias and its accumulation in the rat perfused heart. *Br J Pharmacol*, 1988, 93, 412-416.
19. **Ježková J.** Diplomová práce. *Vliv chronické hypoxie na profil membránových fosfolipidů v ischemickém myokardu*. Katedra biochemie PŘF UK Praha, 2000.
20. **Jezková J, Nováková O, Kolár F, Tvrzická E, Neckář J, Novák F.** Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem*, 2002, 232, 49-56.
21. **Nair SS, Leitch JW, Falconer J, Garg ML.** Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *J Nutr*, 1997, 127, 383-393.
22. **Demaison L1, Moreau D.** Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality: a possible mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59, 463-477.
23. **Isensee H, Jacob R.** Differential effects of various oil diets on the risk of cardiac arrhythmias in rats. *J Cardiovasc Risk*, 1994, 1, 353-359.
24. **McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS.** Dietary fish oil prevents ventricular fibrillation following coronary artery occlusion and reperfusion. *Am Heart J*, 1988, 116, 709-717.
25. **Hock CE, Beck LD, Bodine RC, Reibel DK.** Influence of dietary n-3 fatty acids on myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol*, 1990, 259, H1518-1526.

26. **Yang B, Saldeen TG, Nichols WW, Mehta JL.** Dietary fish oil supplementation attenuates myocardial dysfunction and injury caused by global ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *J Nutr*, 1993, 123, 2067-2074.
27. **Culp BR, Lands WE, Lucches BR, Pitt B, Romson J.** The effect of dietary supplementation of fish oil on experimental myocardial infarction. *Prostaglandins*, 1980, 20, 1021-1031.
28. **Yang BC, Saldeen TG, Bryant JL, Nichols WW, Mehta JL.** Long-term dietary fish oil supplementation protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction in isolated rat hearts. *Am Heart J*, 1993, 126, 1287-1292.
29. **Scislowski V, Bauchart D, Gruffat D, Laplaud PM, Durand D.** Effects of dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids protected or not against ruminal hydrogenation on plasma lipids and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. *J Anim Sci*, 2005, 83, 2162-2174.
30. **Corongiu FP, Banni S.** Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods Enzymol*, 1994, 233, 303-310.
31. **Gonzalez MJ, Gray JI, Schemmel RA, Dugan L Jr, Welsch CW.** Lipid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidants. *J Nutr*, 1992, 122, 2190-2195.
32. **Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Biol Chem*, 1957, 226, 497-509.
33. **Rouser G, Fleischer SF, Yamamoto A.** Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 1970, 5: 494-496.
34. **Tvrzická E, Vecka M, Stankova B, Žák A.** Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: Quantitative aspects. *Anal Chim Acta*, 2002, 465, 337-350.
35. **Ahotupa M, Ruutu M, Mäntylä E.** Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem*, 1996, 29, 139-44.
36. **H., Aebi.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 1984, 105, 121-126.
37. **Paglia DE, Valentine WN.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967, 226, 159-169.
38. **Elstner EF, Youngman RJ, Oswald WF.** Superoxide dismutase. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, 1983, 3, 293-302.
39. **Griffith OW.** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*, 1980, 106, 207-212.
40. **Wilhelm J, Herget J.** Hypoxia induces free radical damage to rat erythrocytes and spleen: analysis of the fluorescent end-products of lipid peroxidation. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31, 671-681.
41. **Bouwman RA, Musters RJ, van Beek-Harmsen BJ, de Lange JJ, Boer C.** Reactive oxygen species precede protein kinase C-delta activation independent of adenosine triphosphate-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology*, 2004, 61, 461-470.
42. **Ludwig LM, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC.** Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species. *Anesthesiology*, 2004, 100, 532-539.