

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Studijní program: Fyziologie živočichů



Petra MÍČOVÁ

Úloha fosfolipáz A₂ v mechanismu kardioprotekce indukované adaptací na
chronickou hypoxii

Role of phospholipases A₂ in the mechanism of cardioprotection induced by
adaptation to chronic hypoxia

Dizertační práce

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.**

Konzultantka: **doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.**

Praha, 2017

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.

Ve Chvaleticích, 05. 05. 2017

.....
Petra Míčová

PROHLÁŠENÍ O SPOLUAUTORSTVÍ

Jménem všech spoluautorů prohlašuji, že Petra Míčová podstatně přispěla (15-90 %) ke všem čtyřem publikacím, jež jsou nedílnou součástí této dizertační práce. Zejména v publikacích, kde je první autorkou, se aktivně podílela na přípravě a provedení experimentů, interpretaci výsledků a přípravě rukopisu.

V Praze, 05. 05. 2017

.....
Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych velmi poděkovala svým školitelům, doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. a doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za dlouholeté odborné vedení, projevenou trpělivost, množství předaných zkušeností, cenných rad a připomínek, a především za čas, který mi věnovali. Chtěla bych také poděkovat kolektivu laboratoře za podporu a pomoc při řešení nejen řady pracovních úkolů a při experimentální práci, ale také za příjemné pracovní prostředí, které dotvářelo klidnou atmosféru naší skupiny, jmenovitě RNDr. Kristýně Holzerové, Ph.D., Mgr. Markétě Hlaváčkové, Ph.D., Mgr. Martině Klevstigové, Ph.D. a RNDr. Patricii Hlouškové, Ph.D. Ráda bych také velmi poděkovala prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc., RNDr. Janu Neckářovi, Ph.D. za poskytnutí množství rad a poznatků a také za pomoc při experimentální části výzkumu. Můj nezměrný dík také patří pí. Jarmile Ševčíkové za neuvěřitelnou ochotu, trpělivost, pracovitost a velké dávky optimismu a humoru. Je mou povinností poděkovat i Mgr. Kristýně Záviškové a Mgr. Evě Kyclerové, na kterých jsem testovala nejen své pedagogické schopnosti, ale především možnosti. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině zejména svým rodičům a manželovi za nezměrnou podporu, pochopení, vytvoření fantastického zázemí, díky kterému se mi podařilo zvládnout řadu věcí a situací, a především za neuvěřitelné množství času, které věnovali logistice a hlídání mého syna. Můj dík patří také mému synovi Tomáškovu za nevědomou podporu, sníženou aktivitu zlobení během psaní mé dizertační práce, nezměrným obdivem k vláčkům, vláčkodráhám a především závorám, které ho zabavily, a také, že tomu všemu dal smysl.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury ČR (305/08/H037 a 302/12/1162), Grantové agentury Univerzity Karlovy (100809, 66310, 161110 a 429611) a grantů UNCE-204013 a SVV-260313/2016.

ABSTRAKT

Kardiovaskulární onemocnění, především akutní infarkt myokardu, jsou jednou z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích světa včetně České republiky. Jednou z možností, jak zvýšit odolnost myokardu proti akutnímu ischemicko-reperfúznímu (I/R) poškození, je adaptace na chronickou hypoxii. Molekulární mechanismus tohoto jevu však není podrobně znám. Je zřejmé, že funkce srdce závisí na zachování membránové integrity a buněčné homeostáze kardiomyocytů. Z tohoto pohledu jsou životně důležitými enzymy fosfolipázy A₂ (PLA₂), které se uplatňují při remodelaci a obnově buněčných membrán. Svou činností také generují lipidové signální molekuly – volné mastné kyseliny (FA) a také 2-lyzofosfolipidy. V srdci se vyskytují zástupci tří skupin PLA₂ – cytosolické PLA₂ (cPLA₂), na kalcium nezávislé PLA₂ (iPLA₂) a sekreторické PLA₂ (sPLA₂).

Cílem práce bylo sledovat v myokardu levé komory dospělých potkanů kmene Wistar následující:

- 1) Vliv intermitentní hypobarické hypoxie (IHH; 8 hodin/den, 5 dnů/týden, 5 týdnů, ~ 7000 m) na zastoupení celkové a fosforylované cPLA₂α (p-cPLA₂α, Ser⁵⁰⁵) a dále iPLA₂ a sPLA₂IIA, jakož i signálních proteinů aktivujících cPLA₂α a rovněž cílů tohoto enzymu.
- 2) Vliv reaktivních forem kyslíku (ROS) za podmínek IHH na expresi celkové a fosforylované cPLA₂ a dále iPLA₂, sPLA₂IIA a složení FA v srdečních fosfolipidech po chronickém podávání antioxidantu tempolu.
- 3) Vliv kontinuální (CNH; 3 týdny, 10 % O₂, ~ 5500 m) a intermitentní (INH; 3 týdny, 23 hodin/den, 10 % O₂, ~ 5500 m) normobarické hypoxie na zastoupení cPLA₂α, iPLA₂, sPLA₂IIA a superoxiddismutáz (SOD) a rovněž markeru oxidačního stresu malondialdehydu (MDA).

Výsledky ukázaly, že:

- 1) Adaptace na IHH zvýšila množství cPLA₂α a p-cPLA₂α a naopak snížila zastoupení iPLA₂ a sPLA₂IIA. Současně jsme po adaptaci na IHH ukázali zvýšené množství signálních proteinů zahrnutých v aktivaci cPLA₂α (fosforylovaná proteinkináza Cα, p-PKCα; extracelulární signálem regulované kinázy 1/2, p-ERK1/2; p38 mitogenem aktivované kinázy, p-p38), a rovněž cílových molekul cPLA₂α (cyklooxygenáza 2, COX-2; prostaglandin E₂, PGE₂). Také jsme prokázali, že za podmínek IHH vede signální dráha aktivace cPLA₂α od β₂-adrenergických receptorů (β₂-AR) a G_i proteinů, které následně stimulují PKCα a/nebo ERK/p38, jež přímo aktivují signální kaskádu cPLA₂/COX-2/PGE₂.
- 2) Chronické podávání tempolu během adaptace potlačilo nárůst cPLA₂α a p-cPLA₂α vyvolaný adaptací na IHH, ale neovlivnilo zastoupení iPLA₂ a sPLA₂IIA ani remodelaci srdečních fosfolipidů.
- 3) Adaptace na CNH zvýšila zastoupení, cPLA₂α, iPLA₂ a mitochondriální manganové SOD (MnSOD), ale neovlivnila koncentraci MDA. Adaptace na INH neměla vliv na množství těchto enzymů, avšak zvýšila hladinu MDA.

Tato data naznačují roli cPLA₂α při rozvoji kardioprotektivního fenotypu během adaptace na IHH a lze předpokládat, že se na aktivaci cPLA₂α za těchto podmínek podílí ROS. Objasnění signální dráhy kardioprotektivního účinku indukované adaptací na chronickou hypoxii by mohlo v budoucnu přispět k prevenci a léčbě I/R poškození myokardu, a mít tak význam v klinické praxi.

Klíčová slova: srdce, chronická hypoxie, kardioprotekce, fosfolipázy A₂, cytosolická fosfolipáza A₂, oxidační stres

ABSTRACT

Cardiovascular diseases, particularly acute myocardial infarction, are the leading causes of death in developed countries including the Czech Republic. One of the ways to increase cardiac resistance against acute ischemia/reperfusion (I/R) injury is adaptation to chronic hypoxia. However, changes at the molecular level associated with this adaptation have still not been fully explored. It is obvious that the myocardial function depends on maintaining membrane integrity and cellular homeostasis of cardiomyocytes. From this perspective, phospholipases A₂ (PLA₂) are the key enzymes that take part in the remodeling and repairing of the cell membranes. Moreover, PLA₂ are also involved in generation of lipid signaling molecules – free long chain fatty acids (FA) and 2-lysophospholipids. In myocardium, members of three major PLA₂ classes are present: cytosolic PLA₂ (cPLA₂), calcium-independent PLA₂ (iPLA₂) and secretoric PLA₂ (sPLA₂).

This thesis aimed to determine the following in the left ventricular myocardium of adult male Wistar rats:

- 1) The effect of intermittent hypobaric hypoxia (IHH; 8 hours/day, 5 days/week, 5 weeks, ~ 7000 m) on the expression of total cPLA₂α and its phosphorylated form (p-cPLA₂α, Ser⁵⁰⁵), and further iPLA₂ and sPLA₂IIA, as well as signaling proteins activating cPLA₂α enzyme and its downstream targets.
- 2) The reactive oxygen species (ROS) involvement in IHH effect on PLA₂ expression and phospholipid FA remodeling by chronic administration of antioxidant tempol.
- 3) The effect of continuous (CNH; 3 weeks, 10 % O₂, ~ 5500 m) and intermittent (INH; 3 weeks, 23 hours/day, 10 % O₂, ~ 5500m) normobaric hypoxia on amounts of cPLA₂α, iPLA₂ and sPLA₂IIA and superoxide dismutase (SOD), and also marker of oxidative stress malondialdehyde (MDA).

The results showed that:

- 1) Adaptation to IHH increased the amount of total and phosphorylated cPLA₂α and, on the other hand, reduced the amounts of iPLA₂ and sPLA₂IIA. In parallel, under IHH conditions we detected elevated expression of signaling proteins involved in the activation of cPLA₂α (protein kinase Cα, p-PKCα; extracellular signal-regulated kinases 1/2, p-ERK1/2; p38 mitogen-activated protein kinases, p-p38) as well as downstream molecules of cPLA₂α (cyclooxygenase 2, COX-2; prostaglandin E₂, PGE₂), respectively. IHH induced activation of cPLA₂α and COX-2 *via* β₂-adrenoreceptors/G_i proteins mediated stimulation of the PKCα and/or ERK/p38 pathway which directly activates the cPLA₂α/COX-2/PGE₂ pathway.
- 2) Chronic tempol treatment prevented only IHH-induced cPLA₂α and p-cPLA₂α up-regulation. However, we did not observe participation of ROS in the IHH-induced down-regulation of iPLA₂ and sPLA₂IIA, and in phospholipid remodeling.
- 3) Adaptation to CNH increased the level of cPLA₂α, iPLA₂ and mitochondrial SOD (MnSOD) without affecting MDA concentration. Daily reoxygenation abolished cPLA₂α, iPLA₂ and MnSOD up-regulation, and increased MDA.

These data support the view that cPLA₂α participates in the development of a cardioprotective phenotype during adaptation to IHH and suggest that ROS are responsible for the activation of cPLA₂α under these conditions. Elucidation of the signaling pathways associated with cardioprotection induced by adaptation to chronic hypoxia might contribute to the development of future treatment of myocardial I/R injury, and thus have importance for clinical practice.

Keywords: heart, chronic hypoxia, cardioprotection, phospholipases A₂, cytosolic phospholipase A₂α, oxidative stress

OBSAH

1 ÚVOD	10
1.1 PROTEKCE MYOKARDU	10
1.1.1 MOŽNOSTI AKTIVACE ENDOGENNÍ KARDIOPROTEKCE	12
1.2 CHRONICKÁ HYPOXIE	14
1.2.1 EXPERIMENTÁLNÍ MODELY CHRONICKÉ HYPOXIE	15
1.2.2 KARDIOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY CHRONICKÉ HYPOXIE	16
1.2.3 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY ADAPTACE NA CHRONICKOU HYPOXII.....	17
1.2.4 VEDLEJŠÍ ÚČINKY ADAPTACE NA CHRONICKOU HYPOXII.....	22
1.3 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU, ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM BUNĚKY A PEROXIDACE LIPIDŮ	23
1.3.1 ANTIOXIDANT TEMPOL.....	25
1.3.2 PEROXIDACE LIPIDŮ	26
1.4 FOSFOLIPÁZY.....	27
1.4.1 FOSFOLIPÁZY A ₂ (PLA ₂).....	28
1.4.2 SEKRETORICKÉ FOSFOLIPÁZY A ₂ (sPLA ₂).....	28
1.4.3 NA KALCIU NEZÁVISLÉ FOSFOLIPÁZY A ₂ (iPLA ₂)	31
1.4.4 CYTOSOLICKÉ FOSFOLIPÁZY A ₂ (cPLA ₂).....	34
1.4.5 CYKLOOXYGENÁZY.....	36
1.4.6 POTENCIÁLNÍ SIGNÁLNÍ DRÁHA KARDIOPROTEKCE ZAHRNÚJÍCÍ cPLA ₂ α.....	37
2 HYPOTÉZY A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	39
3 MATERIÁL A METODIKA	41
3.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA A EXPERIMENTÁLNÍ MODELY CHRONICKÉ HYPOXIE.....	41
3.2 STANOVENÍ RELATIVNÍHO MNOŽSTVÍ PROTEINŮ METODOU WESTERN BLOT.....	42
3.2.1 HOMOGENIZACE A FRAKCIONACE SRDEČNÍ TKÁNĚ	42
3.2.2 IZOLACE NUKLEÁRNÍ FRAKCE ZE SRDEČNÍ TKÁNĚ	43
3.2.3 SDS ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOT ANALÝZA	44
3.3 IZOLACE RNA A REAL-TIME RT-PCR	46
3.4 KVANTITATIVNÍ NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE.....	47
3.5 STANOVENÍ KONCENTRACE PGE ₂ V SRDEČNÍ TKÁNI	49
3.6 STANOVENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY PO SIMULOVANÉ ISCHEMII/REPERFÚZI:	
VLIV IHH A INHIBITORU cPLA ₂ α PYROFENONU.....	49
3.7 STANOVENÍ FA.....	50
3.7.1 EXTRAKCE FOSFOLIPIDŮ ZE SRDEČNÍ TKÁNĚ.....	50

3.7.2	SEPARACE CELKOVÝCH FOSFOLIPIDŮ A STANOVENÍ METYLESTERŮ FA	50
3.8	MĚŘENÍ PEROXIDACE LIPIDŮ – STANOVENÍ KONCENTRACE MDA	51
3.9	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	51
4	VÝSLEDKY	52
4.1	CÍL 1: Vliv IHH NA ZASTOUPENÍ PLA₂ A AKTIVUJÍCÍCH ENZYMŮ A CÍLŮ CPLA₂α	
	V SRDEČNÍ TKÁNI	52
4.1.1	HMOTNOSTNÍ PARAMETRY	53
4.1.2	VLIV IHH NA RELATIVNÍ ZASTOUPENÍ PLA ₂	54
4.1.3	IMUNOFLUORESCENČNÍ ANALÝZA p-CPLA ₂ α PO ADAPTACI NA IHH.....	56
4.1.4	VLIV IHH NA SIGNÁLNÍ PROTEINY AKTIVUJÍCÍ CPLA ₂ α	59
4.1.5	VLIV IHH NA ZASTOUPENÍ CÍLOVÝCH MOLEKUL CPLA ₂ α.....	60
4.1.6	ODOLNOST IZOLOVANÝCH KARDIOMYOCYTŮ VŮČI SIMULOVANÉ ISCHEMII/REPERFÚZI: Vliv IHH A INHIBITORU CPLA ₂ α PYROFENONU	61
4.2	CÍL 2: Vliv IHH NA ZASTOUPENÍ PLA₂ A SLOŽENÍ FA V SRDEČNÍ TKÁNI:	
	VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU	62
4.2.1	HMOTNOSTNÍ PARAMETRY: Vliv ANTIOXIDANTU TEMPOLU	62
4.2.2	EFEKT IHH NA RELATIVNÍ MNOŽSTVÍ PLA ₂ : Vliv ANTIOXIDANTU TEMPOLU	63
4.2.3	EFEKT IHH NA SLOŽENÍ FA: Vliv ANTIOXIDANTU TEMPOLU	65
4.3	CÍL 3: Vliv CNH A INH NA MNOŽSTVÍ PLA₂ A SOD V SRDEČNÍ TKÁNI	67
4.3.1	STANOVENÍ RELATIVNÍHO MNOŽSTVÍ PLA ₂ PO ADAPTACI NA CNH A INH.....	68
4.3.2	VLIV CNH NA p-CPLA ₂ α A NA SIGNÁLNÍ PROTEINY AKTIVUJÍCÍ CPLA ₂ α.....	69
4.3.3	VLIV CNH NA ZASTOUPENÍ CÍLOVÝCH MOLEKUL CPLA ₂ α	70
4.3.4	VLIV CNH A INH NA RELATIVNÍ MNOŽSTVÍ SOD A KONCENTRACI MARKERU OXIDAČNÍHO STRESU MDA	71
5	DISKUZE	73
5.1	CÍL 1: Vliv IHH NA ZASTOUPENÍ PLA₂ A AKTIVUJÍCÍCH ENZYMŮ A CÍLŮ CPLA₂α	
	V SRDEČNÍ TKÁNI	73
5.1.1	VLIV IHH NA RELATIVNÍ ZASTOUPENÍ PLA ₂	73
5.1.2	IMUNOFLUORESCENČNÍ ANALÝZA p-CPLA ₂ α PO ADAPTACI NA IHH.....	76
5.1.3	VLIV IHH NA SIGNÁLNÍ PROTEINY AKTIVUJÍCÍ CPLA ₂ α	77
5.1.4	VLIV IHH NA ZASTOUPENÍ CÍLŮ CPLA ₂ α	78
5.1.5	ODOLNOST IZOLOVANÝCH KARDIOMYOCYTŮ VŮČI SIMULOVANÉ ISCHEMII/REPERFÚZI: Vliv IHH A INHIBITORU CPLA ₂ α PYROFENONU	79

5.1.6	POTENCIONÁLNÍ ZAPOJENÍ cPLA ₂ α V PROTEKTIVNÍ DRÁZE INDUKOVANÉ ADAPTACÍ NA IHH.....	80
5.2	CÍL 2: Vliv IHH NA ZASTOUPENÍ PLA₂ A SLOŽENÍ FA V SRDEČNÍ TKÁNI:	
	VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU	81
5.2.1	VLIV IHH NA RELATIVNÍ MNOŽSTVÍ PLA ₂ : Vliv ANTIOXIDANTU TEMPOLU.....	81
5.2.2	VLIV IHH NA SLOŽENÍ FA: Vliv ANTIOXIDANTU TEMPOLU	83
5.3	CÍL 3: Vliv CNH A INH NA MNOŽSTVÍ PLA₂ A ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ V SRDEČNÍ TKÁNI.....	84
5.3.1	STANOVENÍ RELATIVNÍHO MNOŽSTVÍ PLA ₂ PO ADAPTACI NA CNH A INH	84
5.3.2	VLIV CNH NA SIGNÁLNÍ PROTEINY AKTIVUJÍCÍ cPLA ₂ α A CÍLOVÉ MOLEKULY TOHOTO ENZYMU	86
5.3.3	VLIV CNH A INH NA RELATIVNÍ MNOŽSTVÍ SOD A KONCENTRACI MARKERU OXIDAČNÍHO STRESU MDA	86
6	ZÁVĚR	88
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	89
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	118
9	PŘÍLOHY.....	122

1 ÚVOD

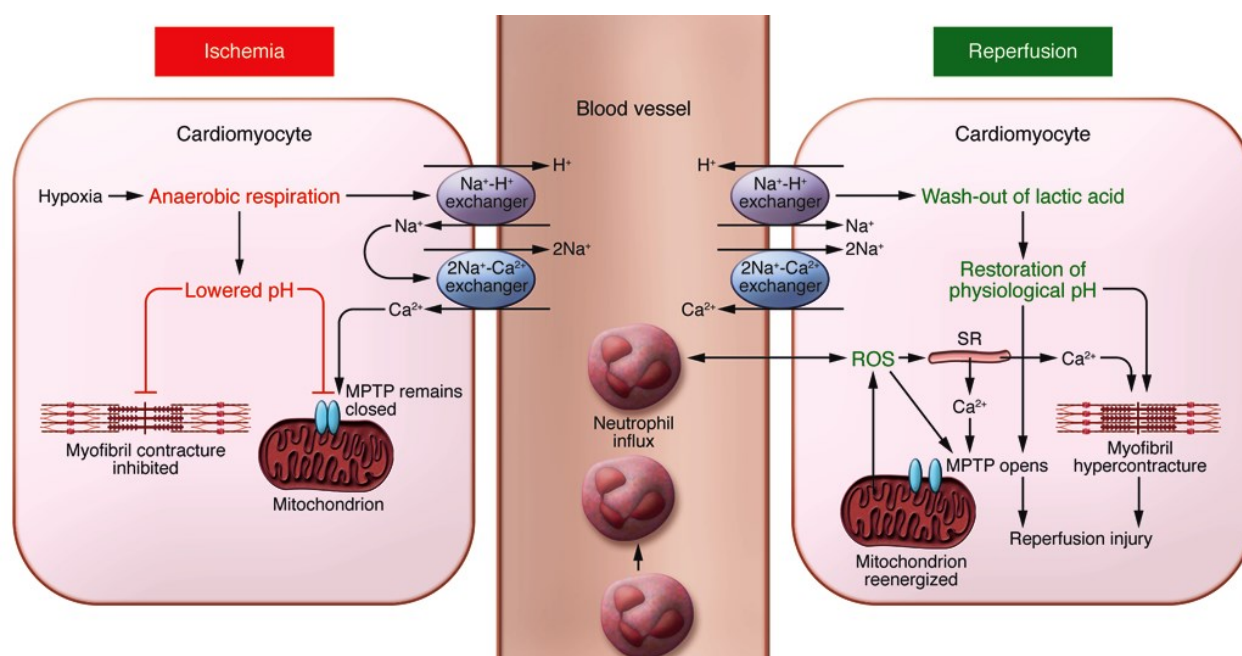
1.1 PROTEKCE MYOKARDU

Kardiovaskulární choroby, zejména ischemická choroba srdeční, jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí obyvatelstva civilizovaných zemí včetně České republiky (ÚZIS, 2016; WHO, 2017). Mezi hlavní příčiny vzniku této choroby patří nejen genetická výbava jedince, ale mj. i nadměrný kalorický přísun, nedostatek fyzické aktivity, kouření, alkohol a zvýšená stresová zátěž.

Hlavní funkcí kardiovaskulárního systému je transport kyslíku a živin do jednotlivých částí organismu. Tento proces je zajištěn kontinuálně pracující pumpou – srdce, pro jehož funkci je nezbytné zachování optimální homeostázy. V důsledku patologického ischemického stavu dochází k částečnému nebo úplnému přerušení krevního toku v orgánech nebo částech těla, který vede k jejich poškození až odumření. Srdeční sval jako vysoce aerobní tkáň získává za standardních podmínek prakticky veškerou svou energii pro pochody z aerobního metabolismu. Omezením či úplným přerušením přívodu krve do srdce dochází k poklesu oxidativní fosforylace (Opie, 1990; Solaini a Harris, 2005), což vede k akumulaci cytoplazmatického nikotinamidadeninukleotidu (NADH), aktivaci anaerobní glykolýzy, hromadění laktátu vedoucí ke snížení cytoplazmatického pH (na hodnotu 5,5-6 již 30 min po začátku ischemie) (Borges a Lessa, 2015; Vuorinen a kol., 1995; Powers a kol., 2007; Solaini a Harris, 2005; Trueblood a kol., 2000), ke zvýšení koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (FA) (Lopaschuk a kol., 1994; Neely a kol., 1973) a k intracelulárnímu přetížení Na^+ a Ca^{2+} ionty (Avkiran a Marber, 2002; Solaini a Harris, 2005). Při ischemii dochází k hromadění metabolických produktů (např. laktát, H^+) v tkáni, což má vliv na průběh buněčných pochodů (Dennis a kol., 1991). Vlivem ischemie tedy dochází k rozvoji strukturálních, metabolických a funkčních změn, které vedou k poklesu kontraktilní funkce myokardu, rozvoji arytmogeneze a v konečném důsledku k odumírání kardiomyocytů a srdečnímu selhání (viz obrázek 1) (Hausenloy a Yellon, 2013; Hearse, 1990;).

Ačkoliv je časná obnova cirkulace krve, tzv. reperfúze, pro přežití myokardu zásadní, paradoxem je, že při ní rovněž dochází k poškození (Piper a kol., 2004; Schlüter a kol., 1996; Solaini a Harris, 2005), neboť procesy aktivované během ischemie probíhají i při reperfúzi, a mohou tak vést k dalšímu poškození dosud viabilních kardiomyocytů (Piper a kol., 1998). Při reperfúzi dochází k nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v mitochondriích (Flaherty a Weisfeldt, 1988; McCord, 1988), ještě výraznějším zvýšení intracelulární

koncentrace Ca^{2+} iontů a vyplavování laktátu, což vede k obnovení fyziologického pH. Vlivem těchto procesů dochází k otevření mitochondriálních pórů odpovědných za změnu propustnosti (MPTP), ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu, odpojení oxidativní fosforylace a vyčerpání zásob adenosintrifosfátu (ATP) (viz obrázek 1) (Hausenloy a Yellon, 2003). Všechny tyto změny vedou k poškození membrán kardiomyocytů, ke vzniku reperfúzních komorových arytmí, kontraktilní dysfunkci myokardu (tzv. srdeční stunning), mikrovaskulární obstrukci a letálnímu srdečnímu reperfúznímu poškození (Hausenloy a Yellon, 2003; Piper a kol., 2004; Solaini a Harris, 2005). Předpokládá se, že poškození srdce během reperfúze může představovat až 50 % výsledné oblasti zasažené infarktem (Hausenloy a Yellon, 2003).



Obrázek 1: Schéma buněčných pochodů při ischemicko-reperfúzním poškození kardiomyocytu. Vlivem nedostatku kyslíku při ischemii dochází k přepnutí na anaerobní metabolismus, což vede k akumulaci laktátu a poklesu intracelulárního pH. Tyto procesy aktivují Na^+/H^+ výměník, čímž dochází k intracelulárnímu přetížení Na^+ ionty a extracelulárnímu přetížení H^+ ionty. Díky tomu začne $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník fungovat v opačném směru a dochází k uvolňování Na^+ iontů do extracelulárního prostoru, a naopak zvýšení koncentrace intracelulárních Ca^{2+} iontů. Tyto procesy způsobí zastavení funkce Na^+/K^+ -ATPázy a dochází k výraznému zvýšení intracelulární koncentrace Na^+ iontů. Pokles pH během ischemie brání otevření MPTP a dochází k hyperkontrakci kardiomyocytu. Při reperfúzi dochází k obnově funkce elektronového transportního řetězce v mitochondriích, a tedy produkci ROS. ROS mohou být generovány i jinými zdroji (např. xantinoxidáza v endoteliálních buňkách a NADPH oxidáza (NOX) v neutrofilech). Vlivem ROS dojde k otevření MPTP v mitochondriích, aktivaci neutrofilů a rozvoji dysfunkce SR. Rovněž vzniká intracelulární přetížení Ca^{2+} ionty a nárůst lipidových peroxidací, čímž dochází k poškození buněčných membrán kardiomyocytů a oxidačnímu poškození DNA. Reaktivace Na^+/H^+ výměníku při reperfúzi má za následek vyplavování laktátu vedoucí k rychlému obnovení fyziologického pH, díky čemuž dojde k otevření MPTP a ustavení hyperkontrakci kardiomyocytu. Snaha o obnovení mitochondriálního membránového potenciálu žene Ca^{2+} ionty do mitochondrií, kde mohou rovněž vyvolat otevření MPTP. Několik hodin po nástupu srdeční reperfúze se neutrofilové akumulují v tkáni postižené infarktem v reakci na uvolnění chemoatraktantů ROS, cytokinů a aktivovaného komplementu.

MPTP – mitochondriální pór odpovědný za změnu propustnosti; ROS – reaktivní formy kyslíku; SR – sarkoplazmatické retikulum (převzato a upraveno: Hausenloy a Yellon, 2013).

Rozsah ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození srdeční tkáně není podmíněn pouze délkou trvání ischemie a rovněž včasností a průběhem obnovení cirkulace krve při reperfúzi (Budás a kol., 2007), ale závisí i na vlastní rezistenci myokardu vůči nedostatku kyslíku (Peart a Headrick, 2008).

1.1.1 MOŽNOSTI AKTIVACE ENDOGENNÍ KARDIOPROTEKCE

Srdeční tkáň se proti I/R poškození brání aktivací endogenních protektivních mechanismů (Kolář a Ošťádal, 2004). V současnosti jsou neefektivnějšími způsoby protekce myokardu:

- **krátkodobá adaptace na stresový podnět – tzv. conditioning** – např. adaptace na sérii krátkých epizod ischemie, tzv. ischemický conditioning;
- **dlouhodobá adaptace na stresový podnět** – např. na hypoxické podmínky (Kolář a Ošťádal, 2004) či fyzickou aktivitu (Powers a kol., 2008).

Murry a kol. poprvé popsali jev označovaný jako **ischemický preconditioning** (Murry a kol., 1986). Jde o protektivní adaptační mechanismus vyvolaný sérií krátkých ischemických period oddělených epizodami reperfúze. Přestože je preconditioning intenzivně studován, přesný mechanismus působení stále není znám. Ví se, že lze do signální dráhy preconditioningu zahrnout receptory pro bradykinin, opioidy a adenosin, následnou aktivaci fosfolipázy C (PLC) a fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) a posléze proteinkinázy C (PKC). Signální dráhy dále vedou k otevření mitochondriálních draslíkových kanálů závislých na ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) a naopak brání otevření MPTP. Otevření $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ přispívá ke zvýšené tvorbě ROS, které mohou následně aktivovat PLC, PKC a tyrosinkinázy (Yellon a Downey, 2003). Výzkum protektivních signálních drah preconditioningu přinesl řadu klíčových poznatků, které lze do určité míry aplikovat i na objasnění dalších endogenních protektivních mechanismů srdce (např. chronické hypoxie).

Zhao a kol. demonstrovali, že série krátkých ischemických epizod v časně fázi reperfúze po dlouhodobé ischemické expozici, tzv. **ischemický postconditioning**, vedla k protekci myokardu snížením reperfúzního poškození (Zhao a kol., 2003). Zajímavé je, že signální dráhy vedoucí k protekci myokardu prostřednictvím ischemického postconditioningu jsou podobné signálním drahám uplatňujícím se v protekci vyvolané adaptací na ischemický preconditioning (Hausenloy a kol., 2005). Signální dráhy postconditioningu zahrnují aktivaci PI3K, proteinkinázy B (Akt), endoteliální NO syntázy (NOS) odpovědné za produkci oxidu dusnatého

(NO), proteinkinázy G, PKC ϵ , extracelulární signálem regulované kinázy (ERK) a mitoK_{ATP} (Murphy a Steenbergen, 2008). Navíc bylo prokázáno, že protekce vyvolané adaptací na ischemický preconditioning a adaptací na ischemický postconditioning nejsou aditivní (Tsang a kol., 2004).

Další možností aktivace endogenní ochrany myokardu je tzv. **ischemický conditioning na dálku**. Lze jej definovat jako aplikaci jednoho či více krátkých cyklů neletální ischemie a reperfúze na orgán nebo tkáň, které vyvolají protekci vzdáleného orgánu nebo tkáně vystavených letálnímu I/R poškození (Przyklenk a kol., 1993). Ačkoliv protektivní účinky tohoto jevu byly prokázány na srdeční tkáni při ochraně před akutním infarktem myokardu, jeho účinky byly pozorovány také na jiných orgánech (plíce, játra, ledviny, střeva a mozek) a tkáních (kosterní svalstvo) vystavených akutnímu I/R poškození (Aimo a kol., 2015). Výhodou je, že ischemický conditioning na dálku lze pro vyvolání kardioprotekce aplikovat neinvazivně, a to např. pomocí standardní manžety na měření tlaku umístěné na horní části paže nebo na dolní končetině (Heusch a kol., 2015; Oxman a kol., 1997). Do signálních komponent zprostředkujících ischemický conditioning na dálku lze zahrnout aktivaci adenosinu, bradykinu a opioidů, dále epoxyeikosatrienové kyseliny, ROS, otevření draslíkových kanálů závislých na ATP (K_{ATP}), zvýšení NO, fosforylaci Akt, dále PI3K a ERK (Heusch a kol., 2015).

Rovněž **fyzická aktivita** má příznivé účinky na kardiovaskulární systém a lze ji považovat za primární prevenci proti výskytu chorob oběhového systému (Alleman a kol., 2015; Lee a kol., 2000). Fyzická aktivita je definována jako jakýkoliv tělesný pohyb vykonávaný kosterním svalstvem, který má za následek energetický výdej. Do tělesné aktivity se řadí i cvičení, které je definováno jako plánované, strukturované, pravidelně se opakující a vykonávané za účelem zlepšení nebo udržení fyzické zdatnosti jedince. Fyzická aktivita působí na organismus prospěšně, omezuje výskyt obezity, snižuje vysoký krevní tlak a cholesterol, redukuje výskyt cukrovky, zlepšuje senzitivitu vůči inzulinu, snižuje dyslipidémii a také výskyt zánětů, podporuje fibrinolýzu a funkci endotelu (Bassuk a Manson, 2003; Ignarro a kol., 2007). Také indukuje endogenní ochranné mechanismy srdce (Golbidi a Laher, 2011; Powers a kol., 2002; Powers a kol., 2008; Powers a kol., 2014) projevující se snížením počtu I/R arytmií (Frasier a kol., 2011; Miller a kol., 2012; Frasier a kol., 2013), srdečního stunningu (Lennon a kol., 2004; Taylor a kol., 1999; Taylor et al. 2007) a také snížením velikosti infarktu myokardu (Brown a kol., 2005; Frasier a kol., 2013). Ačkoliv je míra protekce závislá na druhu a intenzitě cvičení (Esposito a kol., 2011), postačuje k jejímu vyvolání pouze několik po sobě následujících dnů cvičení (French a kol., 2008; Hamilton a kol., 2003), přičemž protektivní efekt přetrvává až několik týdnů po ukončení pravidelné fyzické aktivity (Esposito a kol.,

2011). Protekce indukovaná fyzickou aktivitou způsobuje v kardiomyocytech charakteristické změny. Sem lze zahrnout zvýšení hladiny proteinů teplotního šoku, zvýšení glykolytického toku, zvýšení počtu mitoK_{ATP} a sarkolemálních K_{ATP} (sarcK_{ATP}), zvýšení stresových proteinů v endoplazmatickém retikulu, zvýšení signalizace NO, zvýšení cytosolických antioxidantů a/nebo změny mitochondriální antioxidační kapacity a také navýšení aktivity rychlost limitujícího enzymu biosyntézy prostaglandinů – srdeční cyklooxygenázy 2 (COX-2) (Powers a kol., 2014). Mezi další aktivátory endogenní kardioprotekce vyvolané fyzickou aktivitou patří adenosin, opioidy, proteinkinázy aktivované adenosinmonofosfátem, cytokiny, ROS a adrenergní signalizace (Alleman a kol., 2015).

1.2 CHRONICKÁ HYPOXIE

Jinou možností, jak zvýšit odolnost myokardu proti I/R poškození, je dlouhodobá adaptace na hypoxii. Hypoxie je často zaměňována s pojmem ischemie. Hypoxie představuje nerovnováhou mezi dodávkou kyslíku a jeho spotřebou v cílové tkáni. Ve srovnání s ischemií je při hypoxii zachován koronární průtok a zásobení tkáně substráty a rovněž jsou eliminovány odpadní metabolické produkty. Avšak zatímco ischemie postihuje pouze část srdeční tkáně, ve které bylo přerušeno krevní zásobení, hypoxie působí na celý myokard (Moret, 1980).

Dle časového hlediska lze hypoxii dělit na **akutní hypoxii** (hypoxický stimul působí minuty, hodiny, max. několik dní) a na **chronickou hypoxii** (hypoxický podnět působí týdny, měsíce až roky). Hypoxie může být způsobena špatnou funkcí některého článku při transportu kyslíku k buňkám. Z hlediska příčin vzniku ji lze dělit na: **anemická hypoxie** (parciální tlak kyslíku je normální, ale je snížena transportní kapacita krve pro kyslík; způsobuje ji nedostatečný počet krvinek nebo špatná funkce hemoglobinu), **ischemická (cirkulační) hypoxie** (je způsobena sníženým průtokem krve kapilárami; nastává např. při selhání srdce) a **hypoxemická (systémová) hypoxie** (parciální tlak kyslíku v arteriální krvi je snížen nebo je nízká koncentrace kyslíku ve vdechovaném vzduchu, krev tedy nemůže být dostatečně okysličená; sem lze zařadit i **hypoxii vyvolanou pobytem ve vysoké nadmořské výšce**) (Ošťádal a Kolář, 2007).

Existují pouze dva případy, kdy lze hypoxický stav považovat za přirozený fyziologický jev: fetální myokard a myokard lidí žijících ve vysokých nadmořských výškách (Moret, 1980). Termín „vysoká nadmořská výška“ není přesně definován. Hurtado a kol. ukázali, že 3000 m n. m. je minimální výška pro rozvoj hypoxických změn u člověka (Hurtado a kol., 1960). Ve studii na potkanech se však ukázalo, že typické projevy chronické hypoxie jsou

patrné již ve výšce 1350 m n. m. (Kolář a kol., 1988). Je však důležité konstatovat, že pro rozvoj a přetrvání kardioprotektivních účinků je důležitý hlavně experimentální protokol chronické hypoxie.

1.2.1 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL CHRONICKÉ HYPOXIE

Experimentální modely chronické hypoxie umožňují v laboratorních podmínkách výzkum časového průběhu vývoje prospěšných a nežádoucích efektů tohoto jevu, studium možností reverzibility těchto změn při přemístění pokusných zvířat do normoxických podmínek a/nebo aplikaci farmak proti nežádoucím jevům (Ošťádal a Kolář, 2007).

Modely chronické hypoxie se liší stupněm (obsah/parciální tlak kyslíku), způsobem snížení obsahu kyslíku (**hypobarický** vs. **normobarický** model), délkou trvání hypoxických stimulů (**kontinuální** vs. **intermitentní** model), četností a délkou reoxygenačních epizod a celkovým počtem expozic. Při hypobarickém modelu chronické hypoxie je snížen atmosférický tlak, čímž dochází ke snížení parciálního tlaku kyslíku ve vzduchu. U normobarické hypoxie je zachován atmosférický tlak vzduchu, zatímco dochází ke snížení parciálního tlaku kyslíku ve vzduchu. Při kontinuálním modelu chronické hypoxie jsou experimentální zvířata vystavena hypoxickým stimulům nepřetržitě, naopak při intermitentním modelu chronické hypoxie dochází ke střídání normoxických a hypoxických epizod.

Výsledný účinek adaptace na chronickou hypoxii se odvíjí od použitého experimentálního protokolu, neboť všechny výše uvedené faktory jsou rozhodující pro celkový prospěšný nebo škodlivý efekt adaptace (Béguin a kol., 2005). V publikaci, která je součástí příloh dizertace, jsme demonstrovali, že po adaptaci na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH; 3 týdny, 10 % O₂, 5500 m) došlo ke snížení infarktu myokardu, avšak opakované přerušení adaptace 1hodinovou epizodou reoxygenace (intermitentní normobarická hypoxie – INH; 3 týdny, 23 hodin/den, 10 % O₂, ~ 5500 m) tento protektivní efekt potlačilo (Neckář a kol., 2013 – příloha C). Již dříve bylo prokázáno, že adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH; 8 hodin/den, 5 dnů/týden, celkem 5 týdnů, ~ 7000 m) rovněž snižuje infarkt myokardu (Kolář a kol., 2007). Podobný experimentální protokol byl tedy aplikován na model normobarické hypoxie a ukázalo se, že adaptace na jiný model intermitentní normobarické hypoxie (8 hodin/den, 5 dnů/týden, celkem 3 týdny, 10 % O₂) je také protektivní (Kašparová a kol., 2015). Z těchto výsledků tedy vyplývá, že délka reoxygenační periody by mohla být rozhodující pro rozvoj protekce myokardu. Navíc i výsledky ostatních laboratoří potvrdily rozdílné výsledky při expozici organismu vůči podmínkám hypobarické či normobarické chronické

hypoxie. Zatímco Sheedy a kol. zjistili, že jak adaptace na hypobarickou, tak adaptace na normobarickou hypoxii indukovala identický rozsah hypertrofie pravé komory, remodelaci plicních arteriol a zvýšení hematokritu (Sheedy a kol., 1996), Savourey a kol. ukázali, že adaptace na hypobarickou hypoxii vedla k větší hypoxemii, hypokapnii a nižší saturaci krve kyslíkem v artériích v porovnání s adaptací na normobarickou hypoxii (Savourey a kol., 2003). Rovněž použití různých adaptačních protokolů komplikuje interpretaci výsledků získaných při experimentálních studiích.

Citlivost na podmínky chronické hypoxie též závisí na druhu pokusných zvířat použitých při experimentech (Wauthy a kol., 2004), jejich pohlaví (Netuka a kol., 2006; Ošřádal a kol., 1984) a také věku (La Padula a Costa, 2005; Ošřádalová a kol., 2002). Mezi faktory ovlivňující protektivní efekt adaptace na chronickou hypoxii patří i složení diety (Balková a kol., 2009; Hlaváčková a kol., 2007).

1.2.2 KARDIOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY CHRONICKÉ HYPOXIE

Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie jsou známy již od padesátých let 20. století, kdy byl u lidí žijících ve vysoké nadmořské výšce pozorován nižší výskyt infarktu myokardu (Hurtado, 1960). Tento efekt byl potvrzen v řadě experimentálních studiích použitím simulovaného modelu hypoxie (Kopecký a Daum, 1958; Poupá a kol., 1966; Widimský a kol., 1973). Protektivní působení adaptace na chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce se projevuje snížením velikosti infarktu myokardu (Kolář a kol., 2007; Neckář a kol., 2002a; Neckář a kol., 2005; Neckář a kol., 2013), dlouhodobým snížením výskytu a závažnosti komorových arytmií (Asemu a kol., 1999; Asemu a kol., 2000) a zlepšením obnovy postischemické kontraktilní funkce myokardu (Neckář a kol., 2002b; Tajima a kol., 1994).

Adaptace na chronickou hypoxii se vyznačuje celou řadou funkčních a strukturálních změn myokardu za účelem udržení homeostáze (Ošřádal a Kolář, 2007). Avšak mechanismus endogenní protekce myokardu vyvolané adaptací organismu na vysokou nadmořskou výšku není znám. Jsou však známy faktory, které přispívají k rozvoji protekce srdce vůči I/R poškození. Patří sem plicní adaptace prostřednictvím zvětšeného aktivního povrchu plic, zvýšeného plicního objemu a difúzní kapacity pro výměnu plynů. Adaptace organismu na vysokohorské podmínky rovněž vede ke zlepšení krevního zásobení srdce zvýšením koronárního průtoku a také k růstu transportní kapacity krve pro kyslík zvýšením koncentrace hemoglobinu. V počátcích adaptace na chronickou hypoxii rovněž dochází ke zvýšení srdeční frekvence, minutového výdeje a ke změnám orgánové distribuce krve – přednostně jsou krví zásobeny orgány důležité pro přežití organismu (srdce, mozek) (Moret, 1980). Důležitou roli

při vyvolání protekce myokardu adaptovaného na výškovou hypoxii mohou hrát i eikosanoidy. Při poklesu tlaku kyslíku v srdeční tkáni dochází ke zvýšení syntézy vasodilatačních prostacyklinů, a tedy ke zvýšení koronárního průtoku (Richalet a kol., 1991).

Dochází také k významným změnám energetického metabolismu srdce. Je potlačen aerobní metabolismus včetně oxidace FA a dochází ke zvýšení kapacity anaerobního metabolismu využitím substrátů s vyšší energetickou účinností (glukózy) a zvýšení kapacity pro syntézu a degradaci laktátu za účelem snížení množství spotřebovaného kyslíku (Deindl a kol., 2003; Moret, 1980; Ošťádal a Kolář, 2007). Rovněž dochází k poklesu syntézy ATP v důsledku změn v komplexech mitochondriálního dýchacího řetězce a také ke zpomalení procesů závislých na ATP (např. iontových pump, exprese proteinů) (Hochachka a Lutz, 2001; Opie, 1978). Adaptace na chronickou hypoxii též ovlivňuje metabolismus lipidů prostřednictvím remodelace membránových fosfolipidů. Vlivem chronické hypoxie se mění složení FA v srdci, a to tak, že dochází k růstu n-3 polynenasycených FA (PUFA) na úkor n-6 PUFA (Balková a kol., 2009; Ježková a kol., 2002; Míčová a kol., 2017 – příloha B).

1.2.3 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY ADAPTACE NA CHRONICKOU HYPOXII

Ačkoliv se problematikou kardioprotektivního účinku chronické hypoxie zabývá řada laboratoří, mechanismus tohoto jevu se zatím nepodařilo objasnit. Důvodem může být jednak zapojení celé řady signálních molekul a také používání různých experimentálních modelů chronické hypoxie, živočišných druhů a metodických postupů, které neumožňují porovnat výsledky jednotlivých laboratoří (Ošťádal a Kolář, 2007). Nicméně předpokládá se, že jsou při adaptaci na chronickou hypoxii zapojeny některé stejné nebo podobné signální molekuly jako při ischemickém preconditioningu (Neckář a kol., 2002a; Neckář a kol., 2000b). Mezi nejčastěji zmiňované patří transkripční faktory, kanály a póry participující na udržení iontové homeostázy, ROS, NO a proteinkinázy. Detailní znalost molekulárního mechanismu procesu endogenní kardioprotekce by mohla vest ke zlepšení prevence a terapie kardiovaskulárních chorob.

▪ **Transkripční faktory**

Adaptace na chronickou hypoxii nejen aktivuje signální dráhy kardioprotekce, ale ovlivňuje expresi jejich komponent a dalších proteinů spojených se zachováním homeostázy jako jsou například transkripční faktory (Ošťádal a Kolář, 2007). Mezi nejčastěji uváděné patří hypoxií indukovaný faktor 1 α (HIF-1 α), dále Nrf2 (z angl. *Nuclear factor erythroid 2-related*

factor 2), TNF α (faktor nekrotizující nádory α , z angl. *Tumor necrosis factor α*) a NF κ B (jaderný faktor κ B, z angl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*).

HIF-1 α je klíčovým transkripčním faktorem regulujícím buněčnou odpověď na hypoxické podmínky (Semenza, 2004). Také se podílí na regulaci buněčného metabolismu ovlivňováním syntézy glykolytických enzymů a transportérů glukózy (Fukuda a kol., 2007). Ukázalo se, že inhibicí HIF-1 v srdci dojde k potlačení kardioprotektivních účinků hypoxie (Belaidi a kol., 2008). Cai a kol. demonstrovali, že u myši s delecí genu pro HIF-1 α se nevyvinul adaptační mechanismus ochraňující srdce před I/R poškozením (Cai a kol., 2003). Podobné závěry byly prokázány i na modelu ischemického preconditioningu (Cao a kol., 2008).

Dalším transkripčním faktorem uplatňujícím se v signální dráze kardioprotekce je **Nrf2**, který je regulován redoxním stavem buňky (Itoh a kol., 1997; Jeyapaul a Jaiswal, 2000; Venugopal a Jaiswal, 1996). Jde o hlavní transkripční faktor odpovědný za expresi antioxidantních enzymů. Bylo prokázáno, že ROS produkované prostřednictvím zvýšené aktivity NADPH oxidázy (NOX) jsou signálem pro indukci transkripčního faktoru Nrf2 (Brewer a kol., 2011). Při adaptaci na chronickou hypoxii dochází ke zvýšenému oxidačnímu stresu (Kolář a kol., 2007), který koresponduje s nárůstem exprese Nrf2 (Kašparová a kol., 2015).

Klíčový prozánětlivý cytokin **TNF α** hraje podstatnou roli nejen při zánětu, ale současně se podílí na patofyziologii mnoha kardiovaskulárních onemocnění včetně infarktu myokardu, srdečního selhání, hypertenze a aterosklerózy (Kleinbongard a kol., 2011). Bylo prokázáno, že TNF α má nejen škodlivé účinky na srdce, ale také aktivuje intracelulární signální dráhy, které zvyšují srdeční toleranci k ischemii (Nelson a kol., 1995; Skyschally a kol., 2007). Chytilová a kol. zjistili, že adaptace na CNH zvýšila množství TNF α a jeho receptoru 2 (TNFR2). Podání inhibitoru TNF α potlačilo snížení velikosti infarktu myokardu pozorované po adaptaci na chronickou hypoxii (Chytilová a kol., 2015).

NF κ B je redox-senzitivní transkripční faktor, který se podílí na regulaci přirozené a adaptivní imunity. Reguluje geny kódující zánětlivé procesy a hraje roli při rozvoji řady patologických stavů (Valen, 2004). Chytilová a kol. pozorovali, že adaptace na CNH zvýšila expresi NF κ B a že podání inhibitoru TNF α zrušilo nejen kardioprotektivní účinek, ale i nárůst NF κ B pozorovaný po hypoxii (Chytilová a kol., 2015).

▪ Iontová homeostáza

Pro funkci myokardu je také důležité udržování správné iontové homeostázy. V signálních drahách kardioprotektivního účinku chronické hypoxie se rovněž uplatňují kanály a póry – MPTP, K_{ATP} a také mitochondriální draslíkové kanály s vysokou vodivostí, řízené napětím a aktivované vápníkem (BK_{Ca} kanály).

MPTP je multiproteinový komplex, jenž je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně. Za fyziologických podmínek je vnitřní membrána mitochondrií nepropustná pro většinu látek, avšak za stresových podmínek se MPTP otevírají (Goldenthal a Marín-García, 2004; Halestrap a kol., 2004). Dlouhodobým otevřením MPTP dochází k osmotické nerovnováze mezi mitochondriálními membránami, a proto mohou molekuly vody a ve vodě rozpustné látky volně procházet do matrix, čímž dochází k bobtnání mitochondrie a v konečném důsledku k aktivaci proteolýzy (Halestrap a kol., 2004; Skulachev, 2001). Griffiths a Halestrap zjistili, že MPTP zůstává během akutní ischemie myokardu zavřený a k jeho otevření dochází až v časně fázi reperfúze (Griffiths a Halestrap, 1995). Kyselé prostředí vyvolané akumulací laktátu během srdeční ischemie totiž způsobuje inhibici MPTP (Bernardi a kol., 1992). Při reperfúzi dochází k rychlému vyplavení laktátu a reaktivaci Na^+/H^+ výměníku a Na^+/HCO_3^- symportéru za účelem rychlého obnovení fyziologického pH, čímž dochází k otevření MPTP. Otevření MPTP v časně fázi reperfúze je rozhodujícím činitelem I/R poškození přispívajícím k infarktu myokardu (Ong a kol., 2015). Bylo prokázáno, že inhibice MPTP způsobuje ochranu proti I/R poškození (Halestrap a kol., 2004) a že prevencí proti infarktu je podání inhibitoru MPTP cyklosporinu A (Ong a kol., 2015). Co se týče chronické hypoxie, ukázalo se, že během tohoto jevu je otevírání MPTP blokováno (Zhu a kol., 2006). Rovněž se potvrdilo, že MPTP hrají roli i během ischemického preconditioningu (Hausenloy a kol., 2004).

V kardiomyocytech se vyskytují dva typy K_{ATP} – na vnitřní mitochondriální membráně (**mito** K_{ATP}) a na sarkolemě (**sarc** K_{ATP}) (Kolář a Ošťádal, 2004). Tyto kanály propouští K^+ ionty do mitochondriálního matrix, resp. sarkoplazmatického retikula, a mohou být inhibovány ATP (Carreira a kol., 2004). Za fyziologických podmínek jsou uzavřené, avšak pokles koncentrace ATP v buňce způsobí jejich otevření (Noma, 1983). Studie poukázaly na zapojení K_{ATP} v mechanismu protektivního působení chronické hypoxie proti I/R poškození, avšak otázkou zůstává, který podtyp K_{ATP} je při tomto procesu významnější (Kolář a kol., 2003). Experiment se selektivním inhibitorem mito K_{ATP} ukázal, že jeho použitím došlo ke kompletnímu vyrušení protektivního efektu vyvolaného chronickou hypoxií (Neckář a kol., 2002b). Pokusy s jiným selektivním inhibitorem mito K_{ATP} a současně aktivátorem sarc K_{ATP} ukázaly, že otevření

mitoK_{ATP}, nikoliv však otevření sarcK_{ATP}, hraje klíčovou roli při kardioprotektivním účinku chronické hypoxie (Kolář a kol., 2005). Podobný pokus potvrdil, že mitoK_{ATP} jsou klíčové pro rozvoj kardioprotektivních účinků i při preconditioningu (Sasaki a kol., 2003).

Nedávno bylo zjištěno, že kromě K_{ATP} jsou na vnitřní mitochondriální membráně lokalizovány i **BK_{Ca} kanály** (Balderas a kol., 2015; Xu a kol., 2002), které se otevírají za hypoxických podmínek (Cheng a kol., 2008), a přispívají tak k protekci myokardu (Xu a kol., 2002). Ochranný účinek otevřených BK_{Ca} spočívá ve zvýšení koncentrace K⁺ iontů v matrix mitochondrií (Aon a kol., 2010), blokaci mitochondriálního přetížení Ca²⁺ ionty (Kang a kol., 2007) a zabránění otevírání MPTP (Balderas a kol., 2015; Cheng a kol., 2008). Při studiu vlivu CNH a aktivátoru nebo inhibitoru BK_{Ca} na izolovaných kardiomyocytech Borchert a kol. ukázali, že aktivátor otevírání BK_{Ca} kanálů snížil uvolňování laktátdehydrogenázy a že naopak použitím inhibitoru otevírání BK_{Ca} kanálů byl tento pokles potlačen. Ačkoliv aktivátor BK_{Ca} kanálů zvýšil viabilitu kardiomyocytů izolovaných z normoxických potkanů, nebyl pozorován žádný aditivní účinek u chronicky hypoxické skupiny. Nárůst odolnosti kardiomyocytů z chronicky hypoxických zvířat byl snížen použitím inhibitoru otevírání BK_{Ca} kanálů, zatímco inhibitor neměl vliv na normoxická zvířata (Borchert a kol., 2011). Adaptace na INH obnovila protektivní efekt aktivátoru BK_{Ca} kanálů pozorovaný u normoxických zvířat, zatímco inhibitor otevírání BK_{Ca} kanálů měl podobný efekt na INH skupinu jako u normoxie (Neckář a kol., 2013 – příloha C).

▪ ROS

Během adaptace na chronickou hypoxii dochází k oxidačnímu stresu projevujícím se zvýšenou produkcí ROS, nárůstem lipidových peroxidací (Wang a kol., 2011) a zvýšenou produkcí 3-nitrotyrosinu (Hlaváčková a kol., 2010; Chytilová a kol., 2015). Důkazem je také snížení poměru redukovaného (GSH)/oxidovaného (GSSG) glutathionu (Kolář a kol., 2007). Experimenty naznačily, že vazbou mezi mitoK_{ATP} a následnými signálními dráhami je produkce ROS (Forbes a kol., 2001; Pain a kol., 2000). Kolář a kol. zjistili, že ROS generované během hypoxické adaptace hrají klíčovou roli v aktivaci endogenních protektivních drah myokardu. Podání antioxidantu N-acetylcysteinu pokusným zvířatům snížilo oxidační stres, ale zároveň zrušilo protektivní účinek vyvolaný adaptací na IHH (Kolář a kol., 2007). Rovněž po adaptaci na IHH došlo v mitochondriích k nárůstu aktivity a množství antioxidantního enzymu první linie obrany proti ROS manganové superoxiddismutázy (MnSOD). Také se ukázalo, že aktivita MnSOD negativně koreluje s velikostí infarktu myokardu (Balková a kol., 2011). Adaptace na IHH též ovlivnila thio-redoxinový systém antioxidantní obrany buňky zvýšením

relativního zastoupení thioredoxinu 1. Po adaptaci na IHH došlo také k výraznému nárůstu hemoxygenázy 1, antioxidantu spojeného s metabolismem železa (Závišková, 2014).

Na jiném kardioprotektivním modelu CNH byl rovněž pozorován nárůst množství MnSOD (Chytilová a kol., 2015; Neckář a kol., 2013 – příloha C), avšak po adaptaci na neprotektivní model INH došlo k potlačení tohoto nárůstu (Neckář a kol., 2013 – příloha C). Na druhou stranu na množství jiného antioxidantního enzymu cytoplazmatické měď zinkové superoxiddismutázy (Cu/ZnSOD) neměla vliv ani adaptace na CNH ani na INH (Neckář a kol., 2013 – příloha C). Avšak analýza mRNA antioxidantních enzymů po adaptaci na CNH ukázala nárůst exprese jak MnSOD, tak Cu/ZnSOD a dále i glutathionperoxidázy 4, peroxiredoxinu 2 a 5 a rovněž nárůst enzymů glutaredoxinového systému (glutathionreduktázy, thiorexinu 2 a thioredoxinreduktázy 2) a také enzymů metabolismu železa (akonitázy 2 a hemoxygenázy 1) (Kašparová a kol., 2015).

▪ NO

Kromě ROS ovlivňují protekci i reaktivní formy dusíku, především NO. Bylo prokázáno, že NO hraje v kardioprotektivním mechanismu indukovaném adaptací na chronickou hypoxii pozitivní roli (Baker a kol., 1999; Ošťádalová a kol., 2002). Stále není jasné, zda je za produkci NO v chronicky hypoxickém myokardu zodpovědná spíše konstitutivní NO syntáza (eNOS) (Baker a kol., 1999) či inducibilní NO syntáza (iNOS) (Grilli a kol., 2003; Chytilová a kol., 2015; Rouet-Benzineb a kol., 1999). Mechanismus produkce NO zahrnuje aktivaci guanylátcyklázy, akumulaci cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), aktivaci proteinkináz závislých na cGMP a fosforylaci sarcK_{ATP} (Baker a kol., 1999). Akutní inhibice aktivity NOS potlačila kardioprotektivní účinky vyvolané adaptací na chronickou hypoxii, zatímco donor NO měl protektivní efekt na normoxická zvířata, ale nikoliv na hypoxická zvířata (Baker a kol., 1999). Podobně Ošťádalová a kol. pozorovali při inhibici NOS zablokování protektivního efektu vyvolaného chronickou hypoxií (Ošťádalová a kol., 2002). Akutní podání donoru NO nebo inhibitoru fosfodiesterázy 5, která v srdci degraduje cGMP, snížilo velikost infarktu myokardu jak u normoxických, tak u hypoxických zvířat (Alánová a kol., 2015).

▪ Proteinkinázy

Zvýšená produkce ROS a NO mění aktivitu a/nebo expresi řady signálních molekul. Mezi ně lze zařadit i proteinkinázy. Bylo prokázáno, že chronická hypoxie pozitivně moduluje proteinkinázy aktivované mitogeny (MAPK), konkrétně protein o velikosti 38 kDa (p38) a JNK (z angl. *c-Jun NH₂-terminal kinase*), a že inhibice těchto kináz vedla k potlačení kardioprotekce

(Rafiee a kol., 2002). Zjistili jsme, že adaptace na IHH je spojená se zvýšením fosforylace nejen p38, ale také další MAPK – extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2 (ERK1/2) (Míčová a kol., 2016 – příloha A). Podobné závěry demonstrovali i Morel a kol., kteří po adaptaci na podmínky chronické hypoxie také pozorovali nárůst množství fosforylovaných forem p38 a ERK1/2 (Morel a kol., 2006).

PKC jsou zahrnuty v signální dráze kardioprotekce (Hlaváčková a kol., 2010; Kolář a kol., 2007; Neckář a kol., 2005; Wang a kol., 2011). Již dříve bylo prokázáno, že PKC jsou klíčovými signálními molekulami při ischemickém preconditioningu (Speechly-Dick a kol., 1994). Jejich role při adaptaci na chronickou hypoxii se odvíjí od konkrétní izoformy PKC, přičemž do souvislosti s kardioprotekcí jsou dávány zejména izoformy δ , ϵ a také α . Adaptace na IHH vedla ke zvýšení množství PKC δ (Hlaváčková a kol. 2010; Kolář a kol., 2007; Neckář a kol., 2005). Chronické podávání antioxidantu N-acetylcysteinu během adaptace potlačilo zvýšení PKC δ a taktéž zrušilo protektivní efekt chronické hypoxie na velikost infarktu myokardu (Kolář a kol., 2007). Rovněž PKC α a její fosforylovaná forma se po adaptaci na IHH zvýšily (Míčová a kol., 2016 – příloha A). Naopak adaptace na IHH vedla ke snížení PKC ϵ (Hlaváčková a kol., 2010). Avšak adaptace na jiný protektivní model CNH zvýšila množství PKC ϵ na úrovni proteinu i mRNA (Holzerová a kol., 2015).

1.2.4 VEDLEJŠÍ ÚČINKY ADAPTACE NA CHRONICKOU HYPOXII

Adaptace na chronickou hypoxii může mít také negativní účinky na organismus. Dochází k poškození kardiopulmonárního systému, protože má opačný vliv na plicní a tělní krevní oběh. Zatímco v tělním oběhu dochází k vazodilataci, v plicním oběhu dochází v důsledku chronické hypoxie ke konstrikci plicních arteriol a k následné přestavbě jejich stěny (Moret, 1980). Tyto změny vedou k plicní hypertenzi, která ovlivňuje pravou komoru srdeční, přičemž dochází k jejímu přetížení a rozvoji hypertrofie (Kolář a kol., 1989). Ačkoliv zpočátku je hypertrofie považována za pozitivní adaptační proces, který umožňuje dočasnou kompenzaci zvýšené zátěže, v konečném důsledku může vést až k srdečnímu selhání (Kolář a Ošťádal, 1991).

Vlivem adaptace na chronickou hypoxii rovněž dochází k ovlivnění krevní cirkulace rozvojem polycytémie (trvale zvýšený počet erytrocytů), a tedy i koncentrace hemoglobinu, což vede k vyšší transportní kapacitě pro kyslík. Polycytémie zvyšuje krevní viskozitu, a tím i zátěž srdce (Kasalický a kol., 1977).

Při adaptaci na chronickou hypoxii dochází k oxidačnímu stresu. ROS jednak přispívají k I/R poškození a jednak se účastní signální dráhy protektivního mechanismu vyvolaného adaptací na chronickou hypoxii (Kolář a kol., 2007).

Adaptace organismu na chronickou hypoxii zvyšuje schopnost organismu udržet si odolnost vůči akutnímu nedostatku kyslíku poměrně dlouhou dobu po ukončení adaptace. Při návratu do normoxických podmínek se změny vyvolané adaptací (polycytémie, pokles tělesné hmotnosti, hypertrofie pravé komory, plicní hypertenze a metabolické změny) vrací za určitou dobu k normálním hodnotám (Bass a kol., 1989; Ošťádal a kol., 1985; Neckář a kol., 2004).

1.3 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU, ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM BUŇKY A PEROXIDACE LIPIDŮ

Aerobní buňky generují ROS jako vedlejší produkty různých metabolických procesů. Pro funkci myokardu je klíčová rovnováha mezi produkcí ROS a antioxidační obranou. Oxidační stres představuje porušení této rovnováhy, čímž dochází ke zvýšené tvorbě volných radikálů a/nebo snížení antioxidační kapacity. K nadměrné tvorbě ROS dochází např. při reoxygenaci tkáně po ischemii.

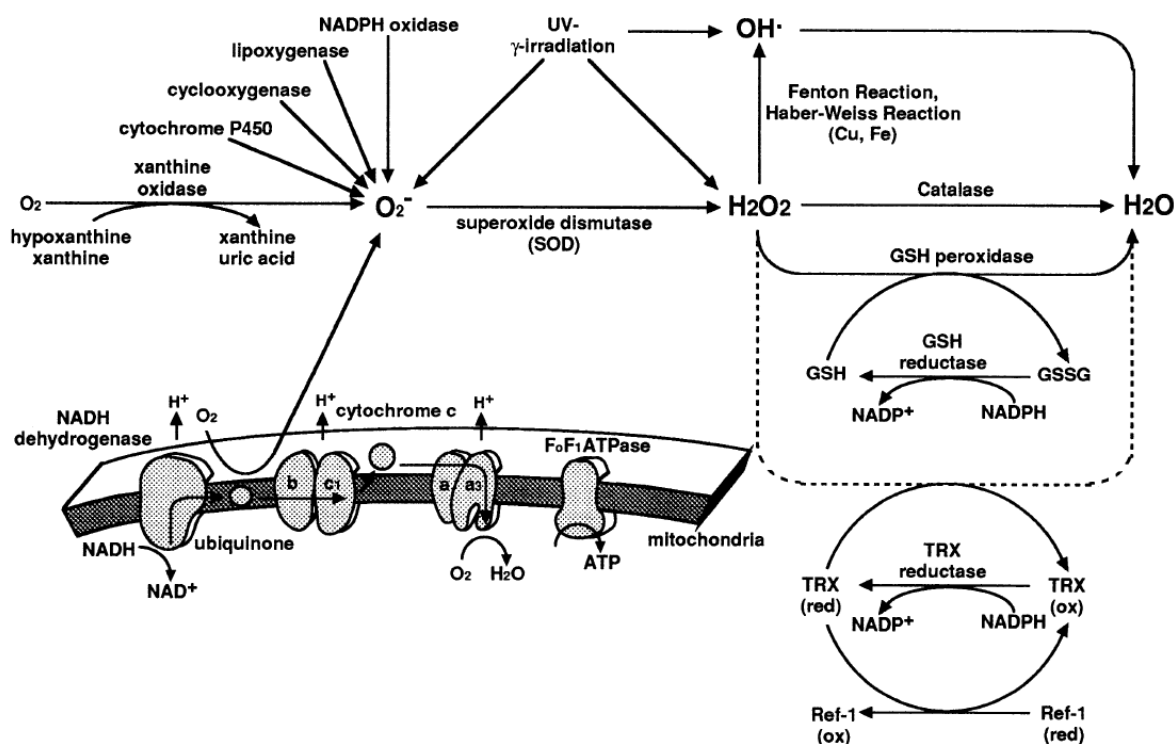
Nejvydatnějším buněčným zdrojem ROS je respirační řetězec mitochondrií. Mezi další endogenní zdroje ROS patří např. cytochrom P450, xantinoxidáza, cyklooxygenázy (COX), lipoxygenázy (LOX), NOX. Exogenními zdroji ROS jsou mj. průmyslové zplodiny a také UV a radioaktivní záření (viz obrázek 2) (Kamata a Hirata, 1999; Štípek a kol., 2000).

Množství ROS v buňce musí být s ohledem na jejich reaktivnost přísně regulováno. Na udržování vhodného redoxního stavu se podílí antioxidační systém buňky, kam patří endogenní enzymové antioxidy (např. SOD, kataláza, glutathionperoxidázy, peroxiredoxiny) a exogenní neenzymové antioxidy (např. vitamin A, C a E aj.) (viz obrázek 2) (Kamata a Hirata, 1999; Štípek a kol., 2000).

Primární ochranu savčích buněk před oxidačním stresem zajišťují SOD, které katalyzují dismutaci dvou molekul superoxidu ($O_2^{\bullet-}$) za vzniku H_2O_2 a O_2 . Existují tři základní izoformy SOD lišící se druhem kovu přítomného jako kofaktor – Cu/ZnSOD, MnSOD a extracelulární měď zinková SOD (EC-SOD). Cu/ZnSOD se vyskytuje v cytosolu a mezimembránovém prostoru mitochondrií, zatímco MnSOD se vyskytuje výhradně v matrix mitochondrií (Zelko a kol., 2002).

Ačkoliv zvýšená produkce ROS vede k mnoha patologickým stavům, účastní se také celé řady buněčných funkcí – jsou např. významnými signálními molekulami při buněčných

pochodech (Burdon a Rice-Evans, 1989; Finkel, 1998; Nose, 2000). ROS (především $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2) aktivují MAPK (Kamata a Hirata, 1999), stimulují tyrozinové kinázy a zároveň inaktivují tyrozinové fosfatázy (Chiarugi a Cirri, 2003) a také podporují funkci transkripčních faktorů (např. NFκB, aktivátorový protein 1 a HIF) (Touyz a kol., 2003). Navíc ROS také zvyšují intracelulární koncentraci volných Ca^{2+} (Touyz a kol., 2003).



Obrázek 2: Zdroje ROS a intracelulární antioxidační obrana. Mezi ROS patří H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ a OH^{\bullet} . $O_2^{\bullet-}$ je produkován NADPH cytochrom P450 reduktázami, NADPH oxidázami, lipoxygenázami a cyklooxygenázami. Dismutací dvou molekul $O_2^{\bullet-}$ za katalýzy SOD vzniká H_2O_2 , který je většinou přeměněn na H_2O za katalýzy GSH peroxidázy a katalázy. TRX také redukuje H_2O_2 . V přítomnosti redoxních kovových iontů (např. Fe, resp. Cu) se H_2O_2 homolyticky štěpí za vzniku vysoce reaktivního OH^{\bullet} (tzv. Fentonova, resp. Haber-Weissova reakce). ROS mohou být také generovány UV zářením. GSH – redukovaná forma glutathionu; GSSG – oxidovaná forma glutathionu; H_2O_2 – peroxid vodíku; $NADP^+$ – nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (oxidovaná forma); NADPH – nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (redukovaná forma); $O_2^{\bullet-}$ – superoxidový radikál; OH^{\bullet} – hydroxylový radikál; ox – oxidovaná forma enzymu; red – redukovaná forma enzymu; ROS – reaktivní formy kyslíku; SOD – superoxid dismutáza; TRX – thioredoxin (převzato a upraveno: Kamata a Hirata, 1999).

1.3.1 ANTIOXIDANT TEMPOL

Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl) je heterocyklická sloučenina, která působí jako antioxidant. Principem působení tempolu je přenos jednoho či dvou elektronů na molekulu ROS, čímž dochází ke vzniku méně reaktivní molekuly (Wilcox a Pearlman, 2008). Tempol je mimetikem SOD, znamená to tedy, že se podílí na konverzi $O_2^{\bullet-}$ za vzniku H_2O_2 . Rychlost této chemické přeměny je stejná jako při katalýze reakce prostřednictvím SOD. Navíc antioxidantní účinky tempolu jsou zesíleny jeho schopností přeměnit H_2O_2 na H_2O , díky čemuž napodobuje funkci katalázy (Wilcox, 2010; Wilcox a Pearlman, 2008). Tempol také oxiduje železo nebo měď, čímž zabraňuje iniciaci Fentonovy reakce, a tedy vzniku hydroxylového radikálu ($OH\bullet$) (Monti a kol., 1996; Wilcox a Pearlman, 2008). Pro tempol je také charakteristická snadná prostupnost membránami a rozpustnost ve vodě, což usnadňuje aplikaci při experimentech (Simonsen a kol., 2009; Wilcox, 2010; Wilcox a Pearlman, 2008). Biologický význam tempolu byl prokázán při redukcí oxidačního poškození řetězců FA v lipidech (Monti a kol., 1996; Samuni a Barenholz, 1996; Samuni et al, 1997; Samuni a kol., 2000) a také snížení oxidačního poškození proteinů (Damiani a kol., 2000) a DNA (Damiani a kol., 1999; Samuni a kol., 1991).

V řadě studií bylo prokázáno, že je podávání tempolu pro srdeční tkáň účinnou prevencí proti I/R poškození. Akutní podání tempolu potkanům snížilo rozsah infarktu myokardu (McDonnald a kol., 1999; Zacharowski a kol., 2007). Na druhou stranu Neckář a kol. nepozorovali pokles velikosti infarktu myokardu při akutním ani chronickém podávání tempolu (Neckář a kol., 2008). Navíc Guo a kol. ukázali, že akutní podání tempolu zabránilo vzniku reperfúzních arytmií (Guo a kol., 2005). Avšak Neckář a kol. pozorovali po akutním podání tempolu zvýšený výskyt jak ischemických, tak reperfúzních arytmií, zatímco chronické podávání tempolu nemělo na arytmogenezi vliv (Neckář a kol., 2008). Bylo prokázáno, že podávání tempolu rovněž snížilo oxidační stres vznikající za I/R podmínek v srdeční tkáni a v endoteliálních buňkách (Hoffman a kol., 2003; McDonnald a kol., 1999; Zhang a kol., 2006) a také zabránilo postischemické aktivaci NOX a xantinoxidázy (Duda a kol., 2006).

Působení tempolu bylo studováno i za hypoxických podmínek. Na modelu spánkové apnoe navozené adaptací na intermitentní hypoxii došlo k rozvoji oxidačního stresu a hypertenze, které byly potlačeny podáváním tempolu (Troncoso Brindeiro a kol., 2007). Na druhou stranu podávání tempolu novorozelým potkanům vystaveným chronické hypoxii vedlo k retardaci růstu a poruchám buněčné proliferace, avšak zabránilo remodelaci plicních cév (Jankov a kol., 2008).

1.3.2 PEROXIDACE LIPIDŮ

Oxidační stres způsobuje poškození buněčných struktur, které vedou k nevratným změnám buněčného metabolismu. Cílovými buněčnými strukturami pro ROS jsou proteiny, DNA a také lipidy. Poškozením membránových lipidů dochází ke změně fluidity membrány, propustnosti pro ionty, změně elektrického potenciálu, produkci chemoatraktivních látek pro makrofágy a ovlivnění membránově vázaných enzymů (Štípek a kol., 2000).

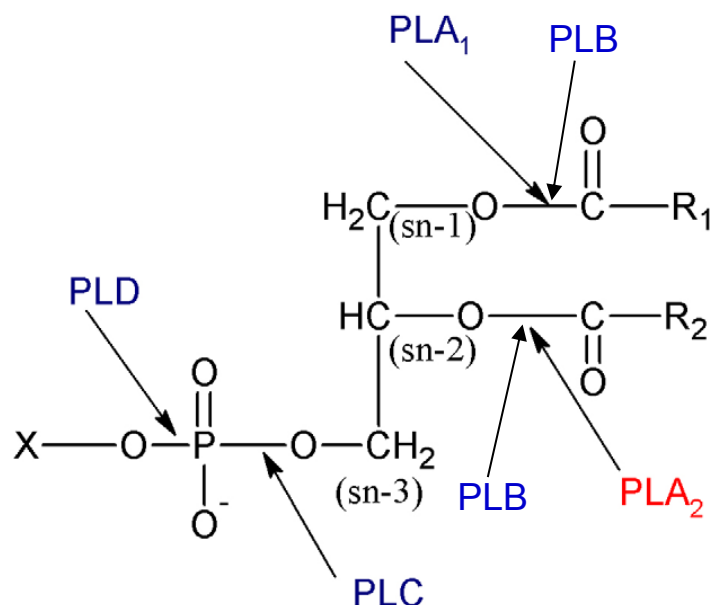
V organismu probíhají dva typy lipidových peroxidací. Jednak jde o neenzymovou peroxidaci lipidů, která je vyvolána nesespecifickým, mnohdy patologickým faktorem za vzniku směsi různých produktů, neboť řetězce modifikovaných FA se snadno štěpí na kratší produkty (např. uhlovodíky a toxické aldehydy – malondialdehyd, MDA; 4-hydroxynonenal), které se pevně vážou do struktury proteinů, čímž dochází ke změně struktury a funkce daných bílkovin. A jednak enzymová peroxidace lipidů, která probíhá na aktivních centrech enzymů hydroperoxidáz a endoperoxidáz (např. COX a LOX), přičemž vznikají stereospecifické a biologicky aktivní molekuly (např. prostaglandiny a leukotrieny), které hrají významnou roli v regulaci buněčných dějů a ochranných pochodů. Volné radikály jsou nezbytnými meziprodukty těchto reakcí (Štípek a kol., 2000).

Při peroxidaci membránových lipidů dochází k přeskupení dvojných vazeb PUFA za vzniku konjugovaných dienů (Petrosillo a kol., 2005). PUFA vázané ve struktuře membránových fosfolipidů na druhém uhlíku (*sn*-2 pozice) jsou zvláště náchylné k lipidovým peroxidacím. Nejlepší cestou opravy je jejich selektivní hydrolýza. Z tohoto pohledu hrají významnou roli enzymy fosfolipázy, které se uplatňují při remodelaci a zachování integrity buněčných membrán (Chakraborti, 2003). Z enzymů rodiny fosfolipáz jsou v tomto případě význačné fosfolipázy A₂ (PLA₂), které specificky hydrolyzují PUFA z *sn*-2 pozice molekul fosfolipidů. Navíc bylo prokázáno, že vlivem konformačních změn, které v membráně nastanou za podmínek oxidačního stresu, dochází ke zvýšené aktivitě PLA₂ na membránách (McHowat a kol., 2001a; McHowat a kol., 2001b). PLA₂ mají schopnost přednostně hydrolyzovat peroxidované FA z membránových fosfolipidů, čímž dochází ke snížení jejich oxidačního poškození (Cummings a kol., 2000; Cummings a kol., 2002; Chakraborti, 2003; McHowat a Creer, 2004).

1.4 FOSFOLIPÁZY

Funkce srdce je kriticky závislá na udržování optimální membránové integrity kardiomyocytů. Na zajištění membránové homostázy, a tedy i správné funkce membránově vázaných proteinů, participují fosfolipázy. Pro své biologické funkce jsou nepostradatelné. Při svém působení produkují signální molekuly (např. volné FA, lyzofosfolipidy, diacylglycerol). Některé fosfolipázy se účastní trávení živin, jiné poskytují ochranu před bakteriální infekcí (Wilton, 2008).

Fosfolipázy se liší místem působení na molekule substrátu, funkcí, mechanismem účinku a regulací (Wilton, 2008). Podle místa působení na molekule fosfolipidu se klasifikují do čtyř základních skupin na fosfolipázy A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) a D (PLD) (viz obrázek 3).



Obrázek 3: Místa hydrolýzy jednotlivých typů fosfolipáz na molekule fosfolipidu. Šipky označují místa hydrolýzy jednotlivých typů fosfolipáz na substrátu. Atomy uhlíku (1, 2 nebo 3) tvořící páteř fosfolipidu jsou označeny dle stereochemického číslování (z angl. *stereochemical numbering*) pojmy *sn-1*, *sn-2* nebo *sn-3*. PLA₁ – fosfolipáza A₁, hydrolyzuje acylesterovou vazbu v pozici *sn-1* na molekule fosfolipidu; PLA₂ – fosfolipáza A₂, hydrolyzuje acylesterovou vazbu v pozici *sn-2* na molekule fosfolipidu; PLB – fosfolipáza B, nespecifická, štěpí acylesterové vazby v pozici *sn-1* nebo *sn-2* na molekule substrátu; PLC – fosfolipáza C, hydrolyzuje diesterovou vazbu mezi třetím uhlíkem fosfolipidu a fosfátem; PLD – fosfolipáza D, hydrolyzuje odtržení báze v molekule fosfolipidu. R₁, R₂ – řetězec FA v pozici *sn-1*, resp. *sn-2*; X – báze (např. inositol, etanolamin, serin) (převzato a upraveno: Birts a kol., 2010).

1.4.1 FOSFOLIPÁZY A₂ (PLA₂)

PLA₂ (EC 3.1.1.4) jsou 2-acyltransferázy, které katalyzují hydrolýzu acylesterové vazby na pozici *sn*-2 na molekule fosfolipidu, čímž dochází k uvolnění FA a vzniku 2-lyzofosfolipidu. V této pozici se na molekule substrátu vyskytují většinou nenasycené FA, které snáze podléhají poškození (např. peroxidaci). Z tohoto pohledu jsou PLA₂ zvláště významné. Byly objeveny v druhé polovině 19. století, kdy Bokay upozoroval, že neznámý enzym degradoval fosfatidylcholin v pankreatické tekutině. Posléze na přelomu 19. a 20. století bylo prokázáno, že složky kobřího jedu vykazují hemolytickou aktivitu vůči membránám erytrocytů (Wilton, 2008).

PLA₂ se dělí do šesti hlavních podskupin – sekretorické (sPLA₂), cytosolické (cPLA₂), na kalcium nezávislé (iPLA₂), acetylhydrolázy faktoru aktivujícího krevní destičky, lyzozomální PLA₂ a nedávno objevené adipocytární PLA₂ (Dennis a kol., 2011). Rozdělení PLA₂ do základních skupin je založeno na katalytickém mechanismu používaném při hydrolýze fosfolipidu (His/Asp, Ser/Asp či Ser/His/Asp hydrolázy) a dále na funkčních a strukturálních vlastnostech (Schaloske a Dennis a kol., 2006). Existuje ještě jiný systém třídění PLA₂. Dle molekulárních charakteristik, resp. dle polohy disulfidických můstků se PLA₂ dělí do šestnácti tříd značených římskými číslicemi (Dennis a kol., 2011; Schaloske a Dennis a kol., 2006). Společným znakem pro všechny PLA₂ je neobvykle vysoký počet Cys zbytků v jejich struktuře (více než 10 % všech aminokyselin) (Dennis a kol., 2011).

V srdci se vyskytují zástupci tří skupin PLA₂: extracelulární sPLA₂ a intracelulární cPLA₂ a iPLA₂ (McHowat a Creer, 2004; Van Bilsen a Van der Vusse, 1995). Liší se strukturou, druhem aminokyseliny v aktivním centru, požadavkem Ca²⁺ iontů pro svou aktivitu a buněčnou lokalizací (Burke a Dennis, 2009a).

1.4.2 SEKRETORICKÉ FOSFOLIPÁZY A₂ (SPLA₂)

sPLA₂ byly prvními objevenými PLA₂. Jde o extracelulární enzymy, které mají v porovnání s ostatními zástupci rodiny enzymů PLA₂ nízkou molekulovou hmotnost (14-18 kDa) (Dennis a kol., 2011). Ačkoliv se od sebe jednotlivé sPLA₂ liší strukturou, mají velmi konzervované některé domény (Nevalainen a kol., 2011). Mezi ně patří smyčka vázající Ca²⁺ ionty a rovněž aktivní centrum s dvojicí His-Asp. Tyto dvě domény společně vytváří „klec“ pro Ca²⁺ ionty, neboť k aktivaci sPLA₂ jsou zapotřebí milimolární koncentrace Ca²⁺ iontů (Murakami a Kudo, 2002). Ve své struktuře dále obsahují obvykle 6-8 disulfidických můstků (6 konzervovaných a 1-2 variabilní) (Burke a Dennis, 2009a; Schaloske a Dennis a kol., 2006).

Vyskytují se mj. v bakteriích, rostlinách, u hmyzu a plazů a rovněž byly identifikovány v savčích tkáních (třída IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X a XII). Savčí sPLA₂ jsou do tříd rozděleny podle polohy disulfidických můstků a současně dle pořadí objevení (Dennis a kol., 2011). V srdci se vyskytují zástupci sPLA₂IIA (Cupillard a kol., 1997; De Windt a kol., 1997), sPLA₂V (Chen a kol., 1994; Cupillard a kol., 1997; Ishikawa a kol., 2005) a sPLA₂X (Fujioka a kol., 2008).

Dle obecného mínění sPLA₂ nevykazují preferenci k hydrolýze konkrétní FA v poloze *sn*-2 ve struktuře fosfolipidu (Dennis a kol., 2011) na rozdíl např. od cPLA₂, která je považována za hlavní PLA₂ zodpovědnou za štěpení kyseliny arachidonové (AA) jako prekurzoru pro zánětlivé procesy. Avšak existují studie, které potvrzují, že i sPLA₂ (konkrétně sPLA₂IIA, sPLA₂V a sPLA₂X) mohou být přímo zahrnuty v procesu hydrolýzy AA, a tedy i produkci eikosanoidů (Hanasaki a kol., 1999; Kim a kol., 2002; Muñoz a kol., 2003; Murakami a kol., 1998; Saiga a kol., 2005). Navíc sPLA₂IIA a sPLA₂V mohou nepřímo participovat na uvolnění AA z membránových fosfolipidů v přítomnosti cPLA₂α prostřednictvím aktivace MAPK nebo PKC (Han a kol., 2003; Kikawada a kol., 2007). Yano a kol. potvrdili zapojení ERK1/2, nikoliv však p38, při interakci sPLA₂V a cPLA₂α za I/R podmínek (Yano a kol., 2011). Také bylo prokázáno, že sPLA₂V a cPLA₂α mohou spolupracovat při produkci kardioprotektivních eikosanoidů. Aktivovaná cPLA₂ reguluje expresi sPLA₂V, která je následně zodpovědná za pozdější produkci prostaglandinu E₂ (PGE₂) (Shinohara a kol., 1999).

Rovněž se ukázalo, že sPLA₂ preferují pro svou funkci konkrétní druh fosfolipidu. Většina enzymů sPLA₂ upřednostňuje hydrolýzu záporně nabitých fosfolipidů (např. fosfatidylglycerol, fosfatidylserin). Savčí sPLA₂V a sPLA₂X mohou hydrolyzovat jak záporně nabité fosfolipidy, tak fosfolipidové amfiony (např. fosfatidylcholin) (Bezzine a kol., 2002; Dennis a kol., 2011; Dijkstra a kol., 1981; Lambeau a Gelb, 2008; Scott a kol., 1991; Singer a kol., 2002).

Enzymy sPLA₂ vykazují širokou škálu buněčných funkcí, přičemž konkrétní úlohy se liší dle druhu sPLA₂. Některé sPLA₂ mají antibakteriální (Grönroos a kol., 2001; Harwig a kol., 1995; Koduri a kol., 2002) a také antivirální účinky (Fenard a kol., 1999). Rovněž hrají roli při zánětlivých procesech. Zvýšené koncentrace sPLA₂ byly detekovány v krvi pacientů se zánětlivými nebo autoimunitními onemocněními (Grönroos et al, 2002; Triggiani a kol., 2006). Kupříkladu sPLA₂IIA byla poprvé identifikována v synoviální tekutině pacientů s revmatoidní artritidou (Kramer a kol., 1989; Seilhamer a kol., 1989). Enzymy sPLA₂ jsou jednak exprimovány a uvolňovány buňkami imunitního systému (Triggiani a kol., 2006) a jednak některé sPLA₂ (např. sPLA₂IIA) mají schopnost aktivovat imunitní systém mechanismy nezávislými na jejich enzymatické aktivitě (např. indukcí produkce prozánětlivých cytokinů)

(Granata a kol., 2005; Triggiani a kol., 2000; Triggiani a kol., 2003; Triggiani a kol., 2006). Na druhou stranu i zvýšená hladina prozánětlivých cytokinů může stimulovat expresi sPLA₂ (Yagami a kol., 2006). Mezi prozánětlivé cytokiny indukující expresi sPLA₂IIA patří zejména TNF α a interleukin 1 β (IL-1 β) (Couturier et al., 1999; De Windt a kol., 1997; Nakano a kol., 1990; Oka a Arita, 1991; Schwemmer a kol., 2001), jež následně aktivují transkripční faktory (např. NF κ B) (Couturier et al., 1999).

sPLA₂ rovněž přispívají k rozvoji aterosklerózy. Bylo prokázáno, že zejména sPLA₂IIA, sPLA₂V a sPLA₂X odpovídají za zvýšenou akumulaci lipidů v aterosklerotických plátech (Kimura-Matsumoto a kol., 2008; Rosenson a Gelb, 2009). sPLA₂ hydrolyzují lipoproteiny, čímž vznikají malé proaterogenní lipoproteiny, ze kterých následně společně s makrofágy vznikají pěnové buňky, jež tvoří aterosklerotické pláty (Yamamoto a kol., 2011). Bylo prokázáno, že sPLA₂ hydrolyzují oxidačně modifikované lipidy v lipoproteinech LDL a HDL, čímž rovněž přispívají k ateroskleróze (Sartipy a kol., 2002). sPLA₂ se také podílejí na rozvoji aterosklerózy produkcí silných chemoatraktantů – volných FA a lyzofosfolipidů, které mohou aktivovat makrofágy a buňky hladkého svalstva, a podpořit tak ukládání kolagenu v aterosklerotických plátech (Yamamoto a kol., 2011). Také specifickou hydrolyzou AA z fosfolipidů přispívají k produkci prozánětlivých prostaglandinů a tromboxanů (Hanasaki a kol., 1999; Kim a kol., 2002; Murakami a kol., 1998; Muñoz a kol., 2003; Saiga a kol., 2005). Navíc sPLA₂V a sPLA₂X preferenčně hydrolyzují fosfatidylcholin, které jsou nejhojnějšími fosfolipidy v lipoproteinových částicích (Rosenson a Gelb, 2009). Znamená to tedy, že svou činností podporují vznik proaterogenních lyzofosfolipidů (Hsieh a kol., 2000).

sPLA₂IIA, V a X hrají důležitou roli při patogenezi I/R poškození v srdeční tkáni. Zvýšené koncentrace prozánětlivých cytokinů a ROS generovaných za I/R podmínek stimulují expresi a následnou sekreci sPLA₂ (Yagami a kol., 2006). Bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace sPLA₂IIA v plazmě pacientů může být indikátorem rozvoje I/R poškození srdeční tkáně (Dutour a kol., 2009; Kugiyama a kol., 1999; Nijmeijer a kol., 2002). Řada studií zabývajících se úlohou sPLA₂IIA při akutním I/R poškození prokázala, že inhibicí tohoto enzymu došlo k menšímu rozsahu poškození a také lepší viabilitě kardiomyocytů (Krijnen a kol., 2006; Nijmeijer a kol., 2003; Van Dijk a kol., 2009). Co se týče ostatních sPLA₂ přítomných v srdci, vlivem syntézy zánětlivých molekul za ischemických podmínek během akutní fáze infarktu myokardu dochází v kardiomyocytech k výraznému nárůstu exprese sPLA₂V, která ale v pozdějších fázích klesá. Zde může hrát sPLA₂V dvojí roli. Jednak svou funkcí pomáhá k membránové remodelaci nekrotické oblasti zasažené infarktem a jednak atakuje reverzibilně poškozené kardiomyocyty v ischemické oblasti okolo oblasti akutního ohrožení (Ishikawa

a kol., 2005). Tyto závěry jsou v souladu s pozorováním, kdy myši s delecí genu pro sPLA₂V měly výrazně nižší velikost infarktu myokardu doprovázený poklesem koncentrace eikosanoidů v srdci (Yano a kol., 2011). Taktéž myši s delecí genu pro sPLA₂X byly odolnější vůči I/R poškození (Fujioka a kol., 2008).

1.4.3 NA KALCIU NEZÁVISLÉ FOSFOLIPÁZY A₂ (iPLA₂)

Dle systému klasifikace enzymů rodiny PLA₂ se iPLA₂ řadí do třídy VI. Sem patří šest zástupců: iPLA₂VIA (iPLA₂β), iPLA₂VIB (iPLA₂γ), iPLA₂VIC (iPLA₂δ), iPLA₂VID (iPLA₂ε), iPLA₂VIE (iPLA₂ζ), iPLA₂VIF (iPLA₂η) (Schaloske a Dennis, 2006). Ve srovnání se sPLA₂ jde většinou o vysokomolekulární enzymy, pro něž je charakteristické, že nevyžadují Ca²⁺ ionty pro svou aktivaci. Rovněž se od sPLA₂ liší druhem aminokyseliny v aktivním centru. iPLA₂ mají v aktivním centru Ser, který je součástí katalytické domény (Dennis a kol., 2011), jež se kvůli homologii s patatinem také nazývá tzv. patatinu podobná lipázová doména. Díky tomu se zástupci iPLA₂ řadí i do rodiny patatin-like proteinů (Kienesberger a kol., 2009). Za normálních podmínek iPLA₂ nevykazují specifitu pro hydrolýzu konkrétní FA (Balsinde, 2002; Murakami a Kudo, 2002).

iPLA₂ se v myokardu vyskytují ze všech PLA₂ nejhojněji (McHowat a Creer, 2004). Jde především o izoformy iPLA₂β, která se nachází v cytosolu (Cedars a kol., 2009) a rovněž v mitochondriích (Williams and Gottlieb, 2002), a iPLA₂γ, jež je lokalizována v mitochondriích nebo v peroxizómech (Mancuso a kol., 2004).

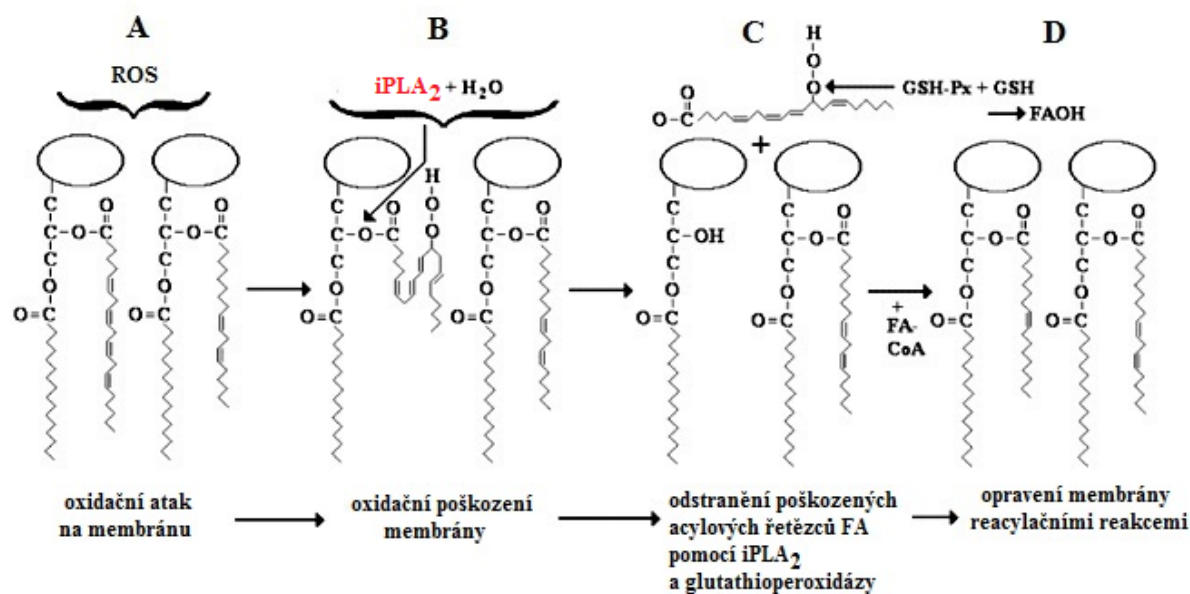
iPLA₂β se vyskytuje v několika sestřihových variantách (Larsson a kol., 1998). Nejznámější jsou iPLA₂VIA-1 a iPLA₂VIA-2, které mají podobnou molekulovou hmotnost (85, resp. 88 kDa) a vzájemně se liší celkovým počtem aminokyselin ve struktuře proteinu (Dennis a kol., 2011) a počtem ankyrinových opakování zodpovědných za protein-proteinové interakce (oligomerizace enzymu nebo interakce s ostatními proteiny) (Ackermann a kol., 1994; Tang a kol., 1997). iPLA₂β je jedinou PLA₂, jejíž aktivita je modulována ATP. Vazba ATP tento enzym stabilizuje a chrání ho před oxidací Cys zbytků, jichž je ve struktuře iPLA₂ nezvykle mnoho, čímž zabraňuje ztrátě aktivity enzymu (Dennis a kol., 2011; Lio a Dennis, 1998; Song a kol., 2006). Ačkoliv iPLA₂ nevyžaduje pro svou aktivitu ani pro translokaci do místa působení Ca²⁺ ionty, může být nepřímo regulována jejich množstvím v buňce. Děje se tak prostřednictvím Ca²⁺-dependentního kalmodulinu, který navázáním na iPLA₂β způsobí její inhibici. Zvýšením intracelulární koncentrace Ca²⁺ iontů dojde k uvolnění vazby mezi kalmodulinem a iPLA₂β, a tedy reaktivaci tohoto enzymu (Jenkins a kol., 2001).

iPLA₂γ má molekulovou hmotnost 90 kDa a na rozdíl od iPLA₂β tento enzym neobsahuje ve své struktuře žádná ankyrinová opakování (Dennis a kol., 2011). Některé studie poukázaly na protektivní působení iPLA₂γ prostřednictvím zachování homeostázy fosfolipidových membrán a funkce mitochondrií v srdci (Mancuso a kol., 2007a; Mancuso a kol., 2007b). Jiné naopak poukázaly na její negativní vliv (Kinsey a kol., 2007b; Moon a kol., 2016).

Katalytická aktivita iPLA₂ může být rovněž regulována štěpením kaspázami (Atsumi a kol., 2000; Zhao a kol., 2006). Atsumi a kol. prokázali, že odštěpením první z ankyrinových repetitivních ze struktury iPLA₂ působením kaspáz došlo k zesílení aktivity iPLA₂. A i během apoptózy je účinnost hydrolýzy FA z membránových fosfolipidů apoptotických buněk prostřednictvím iPLA₂ mnohem větší (Atsumi a kol., 2000). Aktivita iPLA₂ je rovněž modulována prozánětlivými cytokiny TNFα a IL-1β (Liu a McHowat, 1998). Také PKC může být zahrnuta v regulaci aktivity iPLA₂ (Akiba a kol., 1999; Meyer a kol., 2005).

Hlavní význam iPLA₂ spočívá v remodelaci membránových fosfolipidů v buňce, při níž dochází k výměně FA – tzv. deacylačně/reacylační cyklus (Landův cyklus), jenž zajišťuje obnovu fosfolipidové molekuly po poškození membrány (viz obrázek 4). Principem je deacylace, resp. hydrolýza FA z pozice *sn*-2 v molekule fosfolipidu působením iPLA₂, přičemž vzniká 2-lyzofosfolipid, který může být následně reacylován novou FA prostřednictvím acyltransferázy a za účasti koenzymu A a spotřeby ATP (Balsinde a kol., 1995; Balsinde a kol., 1997; Lands, 1958; Land, 2000).

Aktivita iPLA₂ je rovněž regulována ROS (Kinsey a kol., 2007a). iPLA₂ se uplatňují při udržování membránové homeostázy prostřednictvím remodelace membránových fosfolipidů poškozených peroxidací. iPLA₂ totiž vykazují 4krát vyšší afinitu k peroxidovaným FA než k nepoškozeným FA (Cummings a kol., 2000; Cummings a kol., 2002). Je známo, že zatímco v klidových buňkách převládají reacylační reakce, ve stimulovaných buňkách dominují deacylační reakce (Balsinde, 2002). Znamená to tedy, že za patologických stavů (např. oxidační stres, ischemie) může jejich nadměrná aktivita poškozovat buňky. iPLA₂ totiž FA z fosfolipidů pouze deacylují, protože buňka nemá dostatečné zásoby ATP na zpětnou reacylaci fosfolipidu. Tyto procesy mohou vést k iniciaci zánětlivých procesů a apoptóze (Balboa a Balsinde, 2002; Balsinde a kol., 1995; Jenkins a kol., 2009; Pérez a kol., 2004; Pérez a kol., 2006). Navíc za ischemických podmínek rostoucí aktivita iPLA₂ zvyšuje koncentrace volných FA (např. AA), čímž přispívají ke vzniku eikosanoidů (Jenkins a kol., 2009).



Obrázek 4: Model remodelace nenasycených acylových řetězců FA v membránových fosfolipidech při oxidačním stresu a jejich oprava pomocí iPLA₂, glutathionperoxidázy a GSH a následná reacylace. Dva nenasycené acylové řetězce FA představují jednu stranu lipidové dvojvrstvy ve struktuře membrány. Oblasti označené oválem na obrázku A-D reprezentují polární hlavy fosfolipidů. ROS mohou atakovat fosfolipid, a peroxidovat tak acylové řetězce FA v membránových fosfolipidech (A), čímž naruší strukturu fosfolipidové dvojvrstvy (B). Za účelem zachování homeostázy následně iPLA₂ selektivně hydrolyzuje peroxidované acylové řetězce FA z polohy sn-2 ve struktuře fosfolipidu. Poté glutathionperoxidázy s využitím GSH redukují uvolněnou peroxidovanou FA (C). Posledním krokem je reacylace 2-lyzofosfolipidu acylkoenzymem A příslušné FA za katalýzy acyltransferázou (D). CoA – koenzym A; FA – mastná kyselina; GSH – glutathion; GSH-PX – glutathionperoxidáza; iPLA₂ – na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂; ROS – reaktivní formy kyslíku (převzato a upraveno: Chakraborti, 2003).

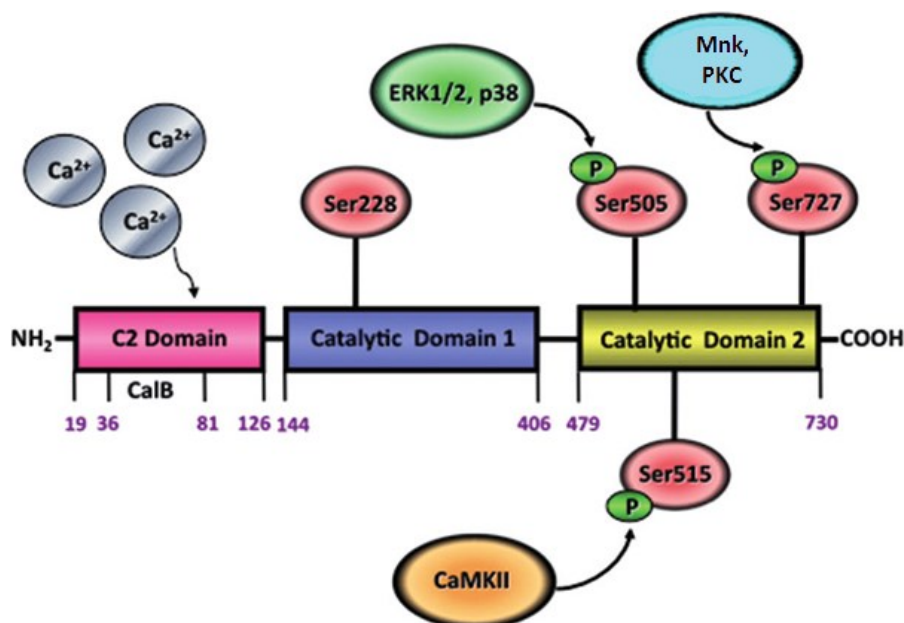
iPLA₂ rovněž hrají roli při patologických stavech v srdci. V řadě studií bylo prokázáno, že je za ischemických podmínek tento enzym aktivován (Ford a kol., 1991; Hazen a kol., 1991; Mancuso a kol., 2003; Poulsen a kol., 2007; Williams and Gottlieb, 2002). Zvýšení aktivity a také exprese tohoto enzymu přetrvává i v průběhu reperfúze (Williams a Gottlieb, 2002). Na druhou stranu Ford a kol. zjistili, že aktivita iPLA₂ zůstává zvýšená jen během celé ischemické epizody a k normálním hodnotám se vrací již v průběhu reperfúze (Ford a kol., 1991). Co se týče izoform iPLA₂, za klidových podmínek se iPLA₂β vyskytuje v srdeční tkáni v cytosolu, avšak během srdeční ischemie tento enzym translokuje z cytosolu na mikrosomální frakci membrán (Cedars a kol., 2009). Studie na srdeční tkáni prokázaly, že podáním inhibitoru iPLA₂ bromenollaktonu (BEL) došlo ke zmenšení velikosti infarktu myokardu (Williams a Gottlieb, 2002) a rovněž k nižšímu výskytu komorových arytmií (Mancuso a kol., 2003). Naopak bylo prokázáno, že iPLA₂γ je nezbytná pro udržování struktury membránových fosfolipidů a rovněž funkce mitochondrií (Mancuso a kol., 2007a; Mancuso a kol., 2007b)

1.4.4 CYTOSOLICKÉ FOSFOLIPÁZY A₂ (cPLA₂)

cPLA₂ jsou intracelulární převážně vysokomolekulární enzymy spadající dle systému klasifikace PLA₂ do třídy IV. Patří sem šest zástupců: cPLA₂IVA (cPLA₂α), cPLA₂IVB (cPLA₂β), cPLA₂IVC (cPLA₂γ), cPLA₂IVD (cPLA₂δ), cPLA₂IVE (cPLA₂ε) a cPLA₂IVF (cPLA₂ζ) (Schaloske a Dennis, 2006). Nejznámějším a nejvíce studovaným zástupcem je cPLA₂α, která specificky odštěpuje AA z molekul fosfolipidů (Clark et al, 1991; Grandits and Oostenbrink, 2015). AA je sama o sobě signální molekulou a zároveň je substrátem pro produkci bioaktivních eikosanoidů působením COX, LOX a epoxygenáz (Kim a kol., 2008; Linkous a Yazlovitskaya, 2010).

V zásadě je katalytická aktivita cPLA₂α nezávislá na Ca²⁺ iontech. Avšak k její translokaci z cytosolu na fosfolipidové membrány (Clark a kol., 1991) jsou v buňce zapotřebí mikromolární koncentrace Ca²⁺ iontů (Channon and Leslie, 1990), které se váží do C2 domény ve struktuře enzymu (Nalefski a kol., 1994). Posléze dojde ke vzniku vazby mezi C2 doménou enzymu cPLA₂α a membránovými fosfolipidy, která je ještě zesílena elektrostatickými a hydrofobními interakcemi mezi katalytickou doménou enzymu a fosfolipidy v membránách (Burke a kol., 2008). Stejně jako iPLA₂, mají i cPLA₂ v aktivním centru katalytický Ser. V případě cPLA₂α jde o katalytickou dvojici Ser²²⁸-Asp⁵⁴⁹ (Dessen a kol., 1999). Katalytický Ser ve struktuře enzymu je chráněn „víčkem“. Po vazbě enzymu na substrát dochází ke konformační změně aminokyselin v oblasti „víčka“, což umožní vazbu fosfolipidu do aktivního místa cPLA₂α (Burke a kol., 2008; Burke a Dennis, 2009b; Ghosh a kol., 2006). Navíc pro plnou aktivaci tohoto enzymu jsou ve struktuře cPLA₂α tři Ser zbytky (Ser⁵⁰⁵, Ser⁵¹⁵ a Ser⁷²⁷), jejichž fosforylace je zprostředkována členy rodiny MAPK (např. ERK1/2, p38) na Ser⁵⁰⁵ (Lin a kol., 1993; Nemenoff a kol., 1993), Ca²⁺/kalmmodulin-dependentními proteinkinázami II (CaMKII) na Ser⁵¹⁵ (Muthalif a kol., 1996), MAPK-interagujícími kinázami (MnK) (Hefner a kol., 2000) a PKC na Ser⁷²⁷ (Nemenoff a kol., 1993; Anfuso a kol., 2007) (viz obrázek 5). Navíc bylo prokázáno, že aktivita cPLA₂α je ještě zesílena duální fosforylací jednak prostřednictvím MAPK a jednak PKC (Nemenoff a kol., 1993).

Katalytická aktivita cPLA₂α je také regulována vazbou lipidových poslů. Jde např. o ceramid-1-fosfát, který může cPLA₂α aktivovat přímo a rovněž prostřednictvím PKCα a PKCδ (Nakamura a kol., 2006). Dalším lipidem, který zvyšuje aktivitu cPLA₂α, je fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (Balsinde a kol., 2000; Mosior a kol., 1998).



Obrázek 5: Struktura a aktivační místa enzymu cPLA₂α. Vazba dvou Ca²⁺ iontů do CaLB motivu na C2 doméně iniciuje translokaci cPLA₂α na membránu. V důsledku změny subcelulární lokalizace tohoto enzymu dochází k fosforylaci klíčových Ser zbytků ve struktuře cPLA₂α. Jde o fosforylace zprostředkované MAPK (ERK1/2, p38) na Ser⁵⁰⁵, CaMKII na Ser⁵¹⁵, Mnk a PKC na Ser⁷²⁷. Pro enzymatickou aktivitu je rozhodující Ser²²⁸ nacházející se v aktivním centru enzymu v katalytické doméně. CaLB – oblast enzymu odpovědná za vazbu Ca²⁺ iontů v C2 doméně; CaMKII – Ca²⁺/kaldmodulin-dependentní proteinkináza II; cPLA₂α – cytosolická fosfolipáza A₂α; ERK1/2 – MAPK, extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2; MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy; Mnk – MAPK-interagující kináza; P – fosfát; p38 – MAPK, protein o molekulové hmotnosti 38 kDa; PKC – proteinkináza C; Ser – serin (převzato a upraveno: Linkous a Yazlovitskaya, 2010).

cPLA₂α rovněž ovlivňuje produkci ROS. Jak již bylo řečeno, cPLA₂α preferenčně hydrolyzuje AA z membránových fosfolipidů (Clark et al, 1991; Grandits and Oostenbrink, 2015). ROS mohou vznikat jako vedlejší produkty při přeměně AA na eikosanoidy (Kim a kol., 2008). Kromě toho cPLA₂α také moduluje aktivitu NOX, která produkuje O₂^{•-} a která patří mezi hlavní zdroje ROS v srdci (Burgoyne a kol., 2012; Khan a kol., 2015). Navíc sama AA produkovaná působením cPLA₂α může přímo indukovat aktivitu NOX (Shiose a Sumimoto, 2000). Na druhou stranu i hladina ROS moduluje aktivitu cPLA₂α (Van Rossum a kol., 2004; Winstead a kol., 2005). cPLA₂α může být rovněž zapojena v iniciaci apoptotického procesu prostřednictvím uvolňování AA a jejich prozánětlivých metabolitů (Cao a kol., 2000).

Co se týče působení cPLA₂α za I/R podmínek, řada studií poukázala na její škodlivé účinky, jiné naznačily její protektivní úlohu. Studie na mozkové tkáni prokázaly, že snížením hladiny cPLA₂α došlo k menšímu rozsahu I/R poškození (Bonventre a kol., 1997; Kishimoto a kol., 2010; Tabuchi a kol., 2003; Zhang a kol., 2012). K podobným závěrům došel i Saito a kol. při experimentech na srdeční tkáni myši s delecí genu pro cPLA₂α (Saito a kol., 2012). Na druhou stranu Kerkelä a kol. prokázali na tomto myším modelu protektivní úlohu cPLA₂α. Myši

s delecí genu pro cPLA₂ α totiž vykazovaly výrazně větší rozsah I/R poškození v porovnání s myši s funkčním genem pro cPLA₂ α . Zároveň navrhli, že protektivní úloha cPLA₂ α spočívá v indukci produkce kardioprotektivních prostaglandinů (PGE₂) (Kerkelä a kol., 2011).

Ke studiu funkce a biologických účinků cPLA₂ α jsou často využívány inhibitory. Jedním z nich je i sloučenina na bázi pyrolidinu – pyrofenon. Výhoda tohoto inhibitoru spočívá ve specifickém účinku vůči cPLA₂ α a současně pyrofenon účinně inhibuje cPLA₂ α již při velmi nízkých koncentracích (Ono a kol., 2002). Díky svým vlastnostem je velmi často používán jako účinný inhibitor uvolňování AA v savčích buňkách včetně kardiomyocytů (Ghomashchi a kol., 2001; Winstead a kol., 2005). Na druhou stranu možnosti terapeutického využití pyrofenonu značně limitují jeho chemické vlastnosti (McKew a kol., 2008).

1.4.5 CYKLOOXYGENÁZY

Eikosanoidy jsou signální molekuly syntetizované z 20ti-uhlíkatých PUFA. Majoritním prekurzorem pro syntézu eikosanoidů je AA, z níž vznikají COX-, LOX- a rovněž epoxygenázovou biosyntetickou cestou prostanoidy (prostaglandiny a tromboxany), leukotrieny a lipoxiny a také epoxykyseliny (Smith a kol., 2000). COX jsou rychlost limitující enzymy biosyntézy prostanoidů katalyzující přeměnu AA na prostaglandiny. Hlavními zástupci jsou konstitutivní enzym COX-1, který se vyskytuje v řadě buněk, a indukibilní enzym COX-2, jenž je aktivován prozánětlivými stimuly (Félétou a kol., 2011; Smith a kol., 2000).

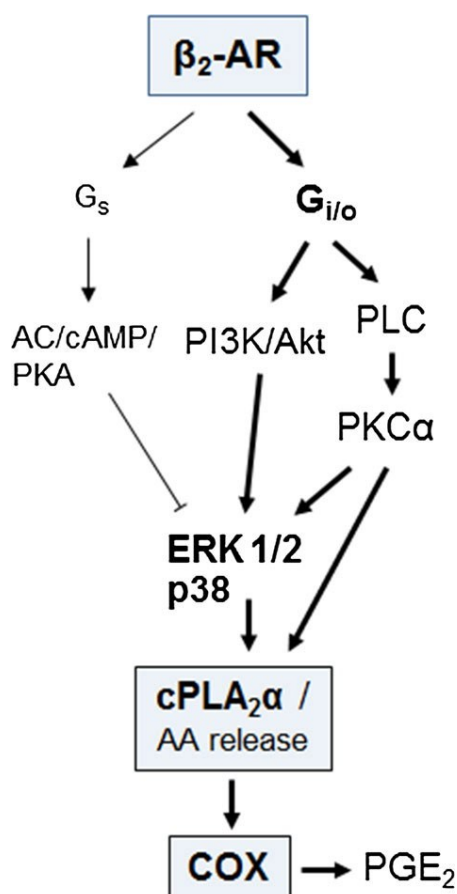
Z řady studií vyplývá negativní vliv COX-2 na kardiovaskulární systém (Oshima a kol., 2006; Saito a kol., 2004; Yang a kol., 2000). Na druhou stranu existují studie, které prokázaly, že zvýšená aktivita COX-2 v srdci je nezbytná pro indukci protekce proti infarktu myokardu a srdečnímu stunningu v pozdní fázi preconditioningu (Bolli a kol., 2002; Bolli, 2007; Shinmura a kol., 2000). Zvýšené množství COX-2 bylo také detekováno na kardioprotektivních modelech chronické hypoxie (CNH a IHH) (Chytilová a kol., 2015; Míčová a kol., 2016 – příloha A).

1.4.6 POTENCIÁLNÍ SIGNÁLNÍ DRÁHA KARDIOPROTEKCE ZAHRNUJÍCÍ cPLA₂α

Během adaptace na chronickou hypoxii dochází ke zvýšenému oxidačnímu stresu, který může mít škodlivé účinky při oxidaci buněčných membrán a současně ROS generované během hypoxické adaptace hrají klíčovou roli v aktivaci endogenních protektivních drah myokardu (Kolář a kol., 2007). PLA₂ jako enzymy zodpovědné za remodelaci buněčných membrán se významně podílí na udržení homeostáze srdečních buněk. Tyto enzymy by tedy mohly hrát roli v signální dráze indukující kardioprotektivní účinek chronické hypoxie. Ze všech PLA₂ přítomných v srdci se cPLA₂α zdá být nejvhodnějším kandidátem pro potencionální zapojení do signálních drah indukovaných adaptací na chronickou hypoxii s ohledem na její funkce při iniciaci produkce eikosanoidů. Zároveň postupně dochází k odhalování signálních molekul ovlivňujících cPLA₂α, které by mohly přispět k objasnění signální dráhy kardioprotekce.

Vyjma ROS se v signální dráze kardioprotektivního účinku chronické hypoxie uplatňují PKC (Hlaváčková a kol., 2010; Kolář a kol., 2007; Neckář a kol., 2005; Wang a kol., 2011) a také PI3K/Akt (Ravingerová a kol., 2007). Důležitými receptory pro šíření signálu v srdci jsou β-adrenergní receptory (β-AR). V srdci existují dva podtypy β-AR – β₁-AR a β₂-AR (Novotný a kol., 1999). Na rozdíl od β₁-AR jsou β₂-AR spřaženy jak s G_s, tak s G_i-heterotrimerními proteiny (Kilts a kol., 2000). Bylo prokázáno, že signální dráha vedoucí přes β₂-AR a následně přes G_{i/0} proteiny indukuje PI3K/Akt buněčnou dráhu, která zabraňuje rozvoji apoptotického procesu v kardiomyocytech (Chesley a kol., 2000). Chesley a kol. pozorovali, že stimulací β₂-AR byl potlačen rozvoj apoptózy indukovaný hypoxií nebo ROS. Stimulací těchto receptorů došlo ke zvýšení aktivity MAPK/ERK a PI3K a současně fosforylace Akt. Inhibice β₂-AR potlačila kardioprotekci a také zvýšení aktivit MAPK/ERK, PI3K a Akt vyvolané stimulací β₂-AR. Selektivní inhibitor PI3K rovněž potlačil protekci zprostředkovanou β₂-AR (Chesley a kol., 2000). Co se týče modelu chronické hypoxie používaného v naší laboratoři, Strnisková a kol. pozorovali v myokardu potkana po adaptaci na IHH zvýšenou hladinu fosforylovaného enzymu Akt (Strnisková a kol., 2006). Rovněž bylo prokázáno, že aktivace cPLA₂α za stresových podmínek vedla k potlačení signální dráhy vedoucí přes β₁-AR a současně odpřažení signální dráhy vedoucí přes β₂-AR/G_s proteiny/adenylátcyklázu. Naopak došlo k dominanci signální dráhy vedoucí přes β₂-AR/G_{i/0} proteiny, což mělo za následek indukci signální dráhy PLC/cPLA₂α/COX-2 (Pavoine a kol., 2003; Kozlovski a kol., 2015). Je známo, že PI3K/Akt a PKCα mohou aktivovat ERK1/2 a p38 a že tyto signální molekuly dále modulují aktivitu cPLA₂α (Hammarberg a kol., 2004; Kramer a kol., 1996; Lin a kol., 1993). Kromě toho aktivita cPLA₂α je indukována fosforylací prostřednictvím PKCα (Anfuso a kol.,

2007). Navíc bylo zjištěno, že signální dráha prostřednictvím cyklického AMP (cAMP)/protein kinázy A (PKA) zabraňuje aktivaci MAPK v mnoha typech buněk (Graves a Lawrence, 1996). Oslabení signální dráhy vedoucí přes cAMP/PKA by mohlo usnadňovat aktivaci ERK1/2 a p38, které následně mohou stimulovat funkci cPLA₂α, čímž dojde k hydrolýze AA a produkci eikosanoidů (např. PGE₂). Schématické znázornění ilustrující předpokládané interakce mezi β₂-AR signální dráhou a mezi signální dráhou cPLA₂α/COX/PGE₂ je zobrazeno na obrázku 6.



Obrázek 6: Zjednodušené schéma ilustrující předpokládané interakce mezi β₂-AR a signální dráhou zahrnující cPLA₂α/COX/PGE₂ za podmínek chronické hypoxie.

Signalizace prostřednictvím β₂-AR je spojena jak s aktivací G_s proteinů, tak s aktivací G_{i/o} proteinů. Za určitých podmínek dojde k přepnutí signální dráhy vedoucí prostřednictvím G_s-proteinů na signální dráhu vedoucí prostřednictvím G_{i/o}-proteinů. Následuje aktivace PI3K a/nebo PLC a rozštěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trifosfát, jež následně stimulují aktivitu PKCα. Jak PI3K, tak PKCα mohou fosforylovat ERK1/2 a p38, a tím je aktivovat. Naopak aktivace signálních drah prostřednictvím cAMP/PKA může potlačit aktivaci těchto MAPK. ERK1/2 a p38, stejně jako PKCα stimulují aktivitu cPLA₂α, čímž dochází k hydrolýze AA. Volná AA je substrátem pro COX, přičemž poté dochází k produkci PGE₂.

AA – kyselina arachidonová, AC – adenylátcykláza, Akt – proteinkináza B; β₂ – adrenergní receptor β₂; cAMP – cyklické AMP; cPLA₂α – cytosolická fosfolipáza A₂α; COX – cyklooxygenáza; ERK1/2 – MAPK, extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2; MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy; p38 – MAPK, protein o molekulové hmotnosti 38 kDa; PGE₂ – prostaglandin E₂; PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza; PKA – proteinkináza A; PKCα – proteinkináza Cα; PLC – fosfolipáza C (Míčová a kol., 2016 – příloha A).

Doposud nebyla studována signální dráha regulující cPLA₂α-dependentní syntézu prostaglandinů v chronicky hypoxickém myokardu. Rovněž není jasné, zda je aktivace této signální dráhy za podmínek chronické hypoxie závislá na ROS. Objasnění úlohy cPLA₂α a rovněž iPLA₂ a sPLA₂IIA přítomných v srdci a vliv podmínek různých typů chronické hypoxie na jejich zastoupení a funkci by mohly přispět k objasnění signální dráhy indukující endogenní protektivní mechanismy.

2 HYPOTÉZY A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Funkce srdce je závislá na zachování integrity membrán pro udržování buněčné homeostázy. Z tohoto pohledu jsou důležitými enzymy PLA₂, které se uplatňují při remodelaci a obnově poškozených buněčných membrán. Svou činností také generují lipidové signální molekuly (volné FA a 2-lyzofosfolipidy) (Chakraborti, 2003). Adaptace na chronickou hypoxii je spojena s oxidačním stresem, jehož vlivem může docházet k peroxidaci buněčných membrán, a zároveň ROS produkované během hypoxie hrají významnou roli při aktivaci endogenních kardioprotektivních signálních drah (Kolář a kol., 2007). PLA₂ mohou působit jak protektivně prostřednictvím remodelace membránových fosfolipidů, kdy přednostně hydrolyzují oxidačně modifikované FA (Cummings a kol., 2000; Cummings a kol., 2002), stejně tak mohou mít negativní účinek, kdy za podmínek ischemie fosfolipidy pouze deacylují, protože buňka nemá dostatek energie na obnovu struktury membrány pomocí reacylace (Balboa a Balsinde, 2002; Balsinde a kol., 1995; Pérez a kol., 2004; Pérez a kol., 2006). Doposud nebyla studována případná úloha a možnosti zapojení PLA₂ v mechanismu kardioprotektivního účinku chronické hypoxie. Je známo, že jsou v signální dráze endogenní kardioprotekce zapojeny signální molekuly (např. MAPK), které mají přímý vliv na zvýšení aktivity PLA₂ (Anfuso a kol., 2007; Nemenoff a kol., 1993; Lin a kol., 1993). Rovněž úloha ROS v regulaci aktivace PLA₂ nebyla dosud studována v chronicky hypoxickém myokardu. Je však známo, že PLA₂ obsahují ve své struktuře nezvykle vysoký počet Cys zbytků, které jsou častým cílem ROS (Dennis a kol., 2011).

Na základě výše uvedených skutečností lze předpokládat, že:

- adaptace na chronickou hypoxii ovlivní expresi jednotlivých isoform PLA₂ přítomných v srdci, která se může lišit v závislosti na použitém modelu chronické hypoxie
- působení PLA₂ za hypoxických podmínek závisí na aktivaci a také na translokaci enzymu z cytosolu na membrány
- ROS budou zapojeny v regulaci aktivace PLA₂ během adaptace na chronickou hypoxii
- vliv chronické hypoxie na signální molekuly modulující aktivitu cPLA₂ α naznačuje, že by tento enzym mohl hrát roli v kardioprotekci indukované adaptací na chronickou hypoxii.

Proto byly stanoveny následující cíle dizertační práce:

Cíl 1: Vliv IHH na zastoupení PLA₂ a aktivujících enzymů a cílů cPLA₂α v myokardu LV potkana

- na úrovni proteinu stanovit zastoupení celkové a fosforylované cPLA₂α a dále iPLA₂ a sPLA₂IIA
- sledovat zastoupení celkové cPLA₂α, iPLA₂ a sPLA₂IIA na úrovni mRNA
- detekovat imunofluorescenční kolokalizaci cPLA₂α s intracelulárními membránami v kardiomyocytech
- analyzovat změny signálních proteinů podílejících se na aktivaci cPLA₂α (PKCα, ERK1/2, p38 a jejich fosforylovaných forem)
- stanovit množství signálních molekul, na jejichž produkci má vliv cPLA₂α (COX-1, COX-2, PGE₂)
- zjistit vliv specifického inhibitoru cPLA₂α pyrofenonu na viabilitu izolovaných kardiomyocytů

Cíl 2: Vliv IHH na zastoupení PLA₂ a složení FA v myokardu LV potkana: vliv antioxidantu tempolu

- na úrovni proteinu zanalyzovat vliv tempolu na množství cPLA₂α, iPLA₂, sPLA₂IIA
- stanovit vliv tempolu na zastoupení FA v srdečních fosfolipidech

Cíl 3: Vliv CNH a INH na množství PLA₂ a SOD v myokardu LV potkana

- sledovat zastoupení celkové cPLA₂α, iPLA₂ a sPLA₂IIA na úrovni proteinu
- na úrovni proteinu analyzovat změny signálních proteinů podílejících se na aktivaci cPLA₂α (ERK1/2, p38 a jejich fosforylovaných forem)
- stanovit množství signálních molekul, jejichž produkce je ovlivněna cPLA₂α (COX-1, COX-2)
- zanalyzovat množství MnSOD a Cu/ZnSOD na úrovni proteinu
- stanovit změny v koncentraci markeru oxidačního stresu MDA

3 MATERIÁL A METODIKA

Není-li uvedeno jinak, byla společnost Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) dodavatelem všech použitých chemikálií.

3.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA A EXPERIMENTÁLNÍ MODEL Y CHRONICKÉ HYPOXIE

K experimentům byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar (Velaz a Charles River). Potkani měli neomezený přístup k pitné vodě, krmeni byli standardní laboratorní stravou a chováni byli v režimu 12 hodin světlo/12 hodin tma. Všechny experimenty probíhaly v souladu s „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ publikovaným *US National Institutes of Health* (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) a rovněž ve shodě s Vyhláškou č. 311/1997 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat. Experimentální protokoly byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR.

K pokusům byly využity tři modely chronické hypoxie – intermitentní hypobarická hypoxie (IHH) a kontinuální normobarická (CNH) a intermitentní normobarická (INH) hypoxie. Během adaptace na všechny modely chronické hypoxie byla zajištěna nepřetržitá cirkulace vzduchu a teplota byla regulována vnější ventilací v rozmezí 21-23 °C.

Laboratorní zvířata byla usmrcena cervikální dislokací vždy 24 hod po poslední hypoxické expozici. V případě stanovení buněčné viability po simulované I/R na izolovaných kardiomyocytech bylo pokusné zvíře navíc 24 hodin po poslední hypoxické adaptaci heparizováno a posléze usmrceno cervikální dislokací.

Intermitentní hypobarická hypoxie (IHH)

Potkani byli adaptováni na podmínky IHH simulující vysokohorské prostředí ve výšce 7000 m n. m. ($P_B = 40,9$ kPa, $PO_2 = 8,5$ kPa) nebo chováni v normoxických podmínkách (kontrola) odpovídající výšce 200 m n. m ($P_B = 99$ kPa, $PO_2 = 20,7$ kPa). Adaptace na IHH probíhala v hypobarické komoře 8 hodin denně, 5 dní v týdnu po dobu 5 týdnů v celkovém počtu 25 expozic. Barometrický tlak byl snižován postupně, přičemž finální nadmořské výšky 7000 m n. m. bylo dosaženo po 13 expozicích (Kolář a kol., 2007).

Při studiu působení antioxidantu tempolu během adaptace na IHH byli potkani rozděleni do čtyř experimentálních skupin, z nichž dvě byly adaptovány na podmínky IHH a dvě byly chovány v normoxických podmínkách (viz výše). Jedné skupině normoxických potkanů a jedné

skupině potkanů adaptovaných na IHH byl denně podáván tempol rozpuštěný v pitné vodě (1 mM). Druhé skupině normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na IHH byla denně podávána pitná voda bez tempolu.

Kontinuální normobarická (CNH) a intermitentní normobarická (INH) hypoxie

V případě CNH byli potkani vystaveni nepřetržitému působení hypoxie za normobarických podmínek po dobu 3 týdnů. Obsah kyslíku v normobarické komoře byl snížen pomocí generátorů hypoxie (Everese Summit Hypoxico Inc., NY, USA) na hodnotu 10 %, což přibližně odpovídalo nadmořské výšce 5500 m n. m., zatímco hodnota barometrického tlaku zůstala nezměněna. Skupina potkanů adaptovaných na model INH byla vystavena po dobu 23 hod normobarické hypoxii, a navíc denně 1hodinové epizodě reoxygenace. Kontrolní potkani byli po dobu 3 týdnů chováni v normoxických podmínkách (21 % O₂, 200 m n. m.).

3.2 STANOVENÍ RELATIVNÍHO MNOŽSTVÍ PROTEINŮ METODOU WESTERN BLOT

Po usmrcení pokusného zvířete byla srdce rychle vyjmuta a promyta ve vychlazeném fyziologickém roztoku ($t = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Následovalo odstranění síní a velkých cév a rozdělení srdce na pravou (RV) a levou (LV) komoru a septum (S). Jednotlivé části srdcí byly zváženy.

Myokard LV určený pro frakcionaci a stanovení množství PLA₂ metodou Western blot byl následně ihned zpracován. Myokardy LV určené k homogenizaci metodou Western blot byly ihned po zvážení zamrazeny v kapalném dusíku, kde byly uchovány do dalšího zpracování.

3.2.1 HOMOGENIZACE A FRAKCIONACE SRDEČNÍ TKÁNĚ

Ke všem provedeným homogenizacím a frakcionaci byl použit homogenizační pufr obsahující 12,5 mM Tris (pH 7,4), 250 mM sacharózu, 2,5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 0,3 mM fenylmetylsulfonylfluorid, 6mM β -merkaptóetanol, 10 mM glycerol-3-fosfát, 0,2 mM leupeptin, 0,02 mM aprotinin a 0,1 mM ortovanadát sodný. Množství použitého homogenizačního pufru bylo v poměru 8 ml homogenizačního pufru na 1 g srdeční tkáně. Veškeré úkony při homogenizacích a frakcionaci probíhaly při teplotě 4 °C.

V případě frakcionace pro stanovení množství PLA₂ byly LV v prostředí homogenizačního pufru pečlivě rozstříhány chirurgickými nůžkami na velmi drobné kousky a následně homogenizovány (Ultra-Turax T8.01, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo) a centrifugovány (200 x g, 10 min). Výsledný pelet, obsahující nerozbité buňky a debris, byl

vyhozen. Část výsledného supernatantu byla odebrána a představovala vzorek homogenátu. Zbytek supernatantu byl centrifugován (105 000 x g, 90 min; Beckman L7, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Výsledný supernatant představoval cytosolickou frakci a pelet resuspendovaný v homogenizačním pufru reprezentoval membránovou frakci.

V případě experimentů stanovení vlivu IHH na signální proteiny aktivující cPLA₂α (PKCα, p-PKCα, ERK1/2, p-ERK1/2, p38 a p-p38), stanovení vlivu IHH na cílové molekuly cPLA₂α (COX-1, COX-2 a PGE₂) a také stanovení vlivu IHH a efektu antioxidantu tempolu byly LV v třecí misce rozdrobeny na prášek v atmosféře kapalného dusíku, který byl následně rozpuštěn v homogenizačním pufru. Tyto suspenze byly poté homogenizovány pomocí kuličkového homogenizátoru (frekvence 30 Hz, 10 min; Retsch MM200, Haan, Německo).

Stanovení vlivu CNH a INH na zastoupení PLA₂ a SOD bylo provedeno na homogenátech extrahovaných Tritonem X-100. LV byly nejprve rozdrobeny na prášek v atmosféře kapalného dusíku, resuspendovány v homogenizačním pufru a následně za současného chlazení v ledové tříšti zhomogenizovány pomocí Potter-Elvehjemova homogenizátoru (15 tahů). K jednotlivým suspenzím homogenátů byl přidán Triton X-100 tak, aby výsledná koncentrace Tritonu X-100 v suspenzi byla 1%. Suspenze homogenátů byly poté ponechány na ledu po dobu 1 hod a následně centrifugovány (105 000 x g, 1 hod; Beckman L7). Vzniklé supernatanty z jednotlivých vzorků reprezentovaly extrakty homogenátu.

Alikvoty vzorků byly následně uloženy při teplotě -80 °C. Koncentrace celkových proteinů v jednotlivých experimentálních skupinách byla analyzována metodou dle Bradfordové (Bradford, 1976). Nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi koncentracemi v jednotlivých analyzovaných experimentálních skupinách.

3.2.2 IZOLACE NUKLEÁRNÍ FRAKCE ZE SRDEČNÍ TKÁNĚ

Nukleární frakce byla vyizolována z myokardu LV podle protokolu dle Dignam a kol. (Dignam a kol., 1993). Tkáň (přibližně 50 mg) byla homogenizována ve vychlazeném homogenizačním pufru (10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,005% nonidet P-40 (v/v), směs inhibičních proteáz, pH 7,9) a následně centrifugována (3 000 x g, 10 min). Pelet, představující nukleární frakci, byl posléze rozpuštěn ve směsi pufru (5 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 26% glycerol (v/v), pH 7,9) a 4,6 M NaCl (Jirkovský a kol., 2012).

3.2.3 SDS ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOT ANALÝZA

Dělení analyzovaných proteinů v jednotlivých vzorcích probíhalo na bisakrylamidových gelech v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) v elektroforetické soustavě Mini-Protean III apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) při parametrech 20-30 mA/gel a čase 1,5-2,5 hod v závislosti na sledovaném proteinu. Množství analyzovaného proteinu naneseného na gel záviselo na buněčné frakci za účelem dosažení co nejvyšší míry linearity mezi intezitou vizualizovaného bendu sledovaného proteinu a výsledným denzitometrickým objemem. Typ použitého gelu a nanášky analyzovaných proteinů jsou uvedeny v tabulce 1.

Po skončení elektroforézy následoval elektropřenos proteinů z gelů na nitrocelulóзовé membrány (Amersham Biosciences, Freiburg, Německo) a barvení pomocí Ponceau S posloužilo ke kontrole kvalitativního přenosu. Poté byly membrány blokovány v roztoku 5% nízkotučného mléka v TTBS (solný roztok pufovaný Tris s Tween: 0,1 M Tris, 2,5 M NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20, pH 7,5) po dobu 1 hod při pokojové teplotě. Následovala inkubace membrán s odpovídajícími primárními a sekundárními protilátkami. Podrobný přehled použitých primárních a sekundárních protilátek a podmínky jejich použití (ředění, inkubace) jsou uvedeny v tabulce 1. Po důkladném promytí membrán roztokem TTBS byly bendy na gelu vizualizovány na autoradiografický film (Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgie) pomocí metody zesílené chemiluminiscence. Kvantifikace relativního množství stanovovaných proteinů byla vyhodnocena programem ImageQuant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). K ověření správné identifikace analyzovaných proteinů byly použity standardy molekulových hmotností a pozitivní kontroly (viz tabulka 1). Vzorky z každé experimentální skupiny byly analyzovány na stejném gelu a následně kvantifikovány na stejné membráně. Analýza každého vzorku byla provedena v duplikátu v minimálně pěti nezávislých stanoveních. Výsledky byly vztaženy na celkové množství proteinu a na housekeeping protein. Proteiny hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza 1 (HPRT1) v případě modelu IHH a glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (GAPDH) v případě modelu CNH a INH byly využity jako housekeeping proteiny. K přepočítání výsledků při použití odpovídajících housekeeping proteinů byl nanesen na daný gel směsný vzorek, na nějž byly vztaženy výsledné hodnoty jednotlivých denzitometrických objemů analyzovaných proteinů za účelem nezávislého porovnání.

MATERIÁL A METODIKA

Protein	Velikost [kDa]	Podmínky SDS elektroforézy			Primární protilátka						Sekundární protilátka						
		Gel	Nanáška [µg]		Výrobce	Katalogové číslo	Druh protilátky	Ředění	Inkubace		Pozitivní kontrola	Typ	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění	Inkubace	
			Čas	Podm.					Čas	Podm.							
cPLA ₂ α	95	10%	H	40	Cell Signaling	2832	Polyklonální	1:2000	přes noc	4 °C	x	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
			C	30													
			M	20													
p-cPLA ₂ α (Ser ⁵⁰⁵)	95	10%	H	70	Cell Signaling	2831	Polyklonální	1:2000	přes noc	4 °C	x	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
			C	70													
			M	60													
iPLA ₂	85-90	10%	H	15	Cayman	160507	Polyklonální	1:2000	1,5 hod	RT	x	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
			C	15													
			M	10													
sPLA ₂ IIA	14	15%	H	40	Cayman	160502	Polyklonální	1:2000	1,5 hod	RT	sPLA ₂ IIA Western Ready Control	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
			C	30													
			M	20													
ERK1/2	42, 44	12%	H	20	Cell Signaling	4695	Monoklonální	1:2000	přes noc	4 °C	mozek, ledviny	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
p-ERK1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	42, 44	12%	H	20	Cell Signaling	4377	Monoklonální	1:2000	přes noc	4 °C	mozek, ledviny	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
p38	38	12%	H	20	Cell Signaling	9212	Polyklonální	1:2000	přes noc	4 °C	mozek, ledviny	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
p-p38 (Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸²)	38	12%	H	20	Cell Signaling	9215	Monoklonální	1:2000	přes noc	4 °C	mozek, ledviny	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
PKCα	80	8%	H	10	Sigma	P4334	Polyklonální	1:5000	1,5 hod	RT	mozek	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
p-PKCα (Ser ⁶⁵⁷)	80	8%	H	15	Santa Cruz	sc-12356	Polyklonální	1:5000	1,5 hod	RT	mozek	Anti-kozí	Sigma	A5420	1:80000	1 hod	RT
COX-1	72	10%	H	50	Santa Cruz	sc-1752	Polyklonální	1:500	přes noc	4 °C	x	Anti-kozí	Sigma	A5420	1:80000	1 hod	RT
COX-2	72	10%	H	50	Santa Cruz	sc-1747	Polyklonální	1:500	přes noc	4 °C	x	Anti-kozí	Sigma	A5420	1:80000	1 hod	RT
MnSOD	25	15%	H	1	Cayman	10011390	Polyklonální	1:2000	1,5 hod	RT	x	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
Cu/ZnSOD	16	15%	H	4	Cayman	10011387	Polyklonální	1:2000	1,5 hod	RT	x	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
HPRT1	26	15%	H	5	Abcam	ab10479	Polyklonální	1:1333	přes noc	RT	x	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT
GAPDH	37	12%	H	5	Santa Cruz	sc-25778	Polyklonální	1:5000	1,5 hod	RT	x	Anti-králičí	Sigma	A9169	1:6000	1 hod	RT

Tabulka 1: Stručné shrnutí podmínek SDS elektroforézy a seznam použitých primárních a sekundárních protilátek pro Western blot analýzu. C – cytosol; COX-1 – cyklooxygenáza 1; COX-2 – cyklooxygenáza 2; cPLA₂α – cytosolická fosfolipáza A₂; Cu/ZnSOD – měď-zinková superoxiddismutáza; ERK1/2 – MAPK, extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2; GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza; H – homogenát; HPRT1 – hypoxantinguanin-fosforibosyltransferáza 1; iPLA₂α – na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂; M – membránová frakce; MnSOD – manganová superoxiddismutáza; p38 – MAPK, protein o molekulové hmotnosti 38 kDa; p-cPLA₂α – fosforylovaná cytosolická PLA₂α; p-ERK1/2 – fosforylovaná MAPK, fosforylované extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2; p-p38 – fosforylovaná MAPK, fosforylovaný protein o molekulové hmotnosti 38 kDa; PKCα – proteinkináza Cα; p-PKCα – fosforylovaná proteinkináza Cα; sPLA₂IIA – sekretorická fosfolipáza A₂; RT – pokojová teplota. Všechny použité protilátky byly naředěny v TTBS pufru.

3.3 IZOLACE RNA A REAL-TIME RT-PCR

Izolace RNA a stanovení exprese PLA₂ na úrovni mRNA metodou RT-PCR bylo provedeno Mgr. Markétou Hlaváčkovou, Ph.D., FgÚ AV ČR.

Myokardy LV pro analýzu exprese PLA₂ na úrovni mRNA byly po odběru zamrazeny v kapalném dusíku. Celková buněčná RNA byla extrahována z myokardů LV pomocí Trizolu (Invitrogen, CA, USA). Použitím NanoDropu byla spektroskopicky kvantifikována čistota a koncentrace vyizolované RNA. Následně byla RNA před vlastní syntézou cDNA přečištěna DNA-free DNázou (Ambion, CA, USA). Poté byl prostřednictvím RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Sythesis Kitu (Fermentas UAB, Vilnius, Litva) reverzně transkribován 1 µg celkové RNA do cDNA pomocí oligo(dT) primerů dle instrukcí výrobce. Real-Time PCR analýza mRNA byla provedena dle pokynů výrobce na přístroji Light Cycler 480 (Roche Applied Science, Mannheim, Německo) na vzorcích cDNA použitím metody dual hydrolysis probe (Universal Probe Library, Roche Applied Science) s příslušnými Probe Master Kit (Roche Applied Science). Specifické proby a primery byly designovány pomocí softwaru Universal Probe Library Assay Design Center (UPL, Roche Applied Science) a PCR bylo analyzováno v teplotním profilu popsáném v publikaci Frolíkové a kol. (Frolíková a kol., 2012).

Sekvence navržených primerů byly:

cPLA₂α_F: *tctggctcacagaataaaggttc*; cPLA₂α_R: *ctcacaatgtgctttgctgtaa* and #25;
 iPLA₂_F: *ggagtgtgagaagtgtga*; iPLA₂_R: *cgtccaaagaactgcatecta* and #123;
 sPLA₂IIA_F: *gtgacctacaagttctctaccg*; sPLA₂IIA_R: *ttatcgactggcacagc* and #15;
 HPRT1_F: *gaccggttctgtcatgtcg*; HPRT1_R: *acctggttcatecactaatcacc* and #95.

Údaje použité pro výpočet byly průměry hodnot z tripletu CT (z angl. *threshold cycle*) získaných z analýzy qPCR. Bylo potvrzeno, že odchylky hodnot v analýzách v tripletu nepřesáhly hodnotu 0,5 CT. Standardní křivky byly vytvořeny pro každou dvojici primerů za použití 3násobku sériového ředění cDNA. Rovněž byla provedena analýza křivek tání s cílem zjistit přítomnost jednoho amplikonu na konci standardního běhu křivky. Hodnota účinnosti amplifikace PCR byla následně vypočtena ze standardních křivek za účelem přesného stanovení relativní exprese každého páru primerů. Non-templátové a non-RT reakce byly analyzovány jako kontroly.

Hladina analyzovaných transkriptů byla vztažena na hodnotu referenčního genu HPRT1 (Bohuslavová a kol., 2010) se zřetelem na specifickou efektivitu (E) PCR pro každý gen (Pfaffl, 2001) dle rovnice:

$$\text{Normalizované množství} = \frac{(1+E)^{CT \text{ referenční transkript}}}{(1+E)^{CT \text{ cílový transkript}}}$$

3.4 KVANTITATIVNÍ NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE

Srdce určená k imunofluorescenční analýze p-cPLA₂α byla ihned po vyjmutí z těla pokusného zvířete zavěšena na Langendorffův aparát, krátce promyta roztokem tyrodu bez Ca²⁺ iontů (140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂.6 H₂O, 10 mM glukóza, 5 mM HEPES, pH 7,4) a fixována v 4% roztoku formaldehydu bez metanolu (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) po dobu 3 min. Posléze byla srdce sejmuta z Langendorffova aparátu a odstřiženy síně. Srdce byla ponořena do 4% roztoku formaldehydu (1 hod) a inkubována v roztoku 20% sacharózy (přes noc, 4 °C). Následovalo příčné odříznutí spodní třetiny myokardu a její krátké zamražení v kapalném dusíku. Takto zpracovaná tkáň byla uložena při teplotě -80 °C k následné imunofluorescenční analýze. Není-li uvedeno jinak, byly všechny chemikálie připraveny ředěním v PBS pufru (fosfátový pufr: 136,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM NaHPO₄ a 1,8 mM KH₂PO₄).

K analýze byly připraveny kryorezy (5-7 μm) na kryomikrotomu (Leica CM3050, Leica-microsystems, Wetzlar, Německo). Kryorezy byly posléze fixovány 4% roztokem formaldehydu bez metanolu (5 min) a permeabilizovány v roztoku 1% SDS (5 min). Následně byla blokována nespecifická fluorescence odpovídajícím sérem (10% oslí sérum, 10% kozí sérum, 1% BSA, 0,3% Triton X-100 a 0,3 M glycin) po dobu 1 hod při pokojové teplotě. Poté byly kryorezy inkubovány s primární protilátkou proti p-cPLA₂α (viz tabulka 1; přes noc, 4 °C) a posléze se sekundární protilátkou anti-králíčí IgG Alexa Fluor 488 (45 min, pokojová teplota). Mitochondrie byly obarveny pomocí protilátky MitoProfile Total OXPHOS Blue Native a vizualizovány sekundární protilátkou anti-myší IgG Alexa Fluor 647. Pro detekci sarkolemálních membrán byly kryorezy inkubovány s aglutininem z pšeničných klíčků konjugovaným s tetrametylrodaminem (WGA). Nakonec bylo na kryorezy nanášeno malé množství ProLong® Gold Antifade Reagent s 4',6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI) za účelem fluorescenční vizualizace buněčných jader prostřednictvím vazby DAPI na DNA. Souhrn použitých primárních a sekundárních protilátek a značení a také podmínky jejich použití (ředění, inkubace) jsou uvedeny v tabulce 2.

Název	Protilátka/značení					
	Typ	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění	Inkubace	
					Čas	Podm.
p-cPLA₂α	Primární	Cell Signaling	2831	1:50	přes noc	4 °C
MitoProfile Total OXPPOS Blue Native protilátka	Primární	Abcam	ab110412	1:200	1 hod	RT
WGA konjugovaná s tetrametylrodaminem	Značení	Life Technologies	W840	1:200	20 min	RT
Anti-králičí IgG konjugovaná s Alexa Fluor® 488	Sekundární	Life Technologies	A21206	1:200	45 min	RT
Anti-myší IgG konjugovaná s Alexa Fluor® 647	Sekundární	Life Technologies	A21235	1:200	45 min	RT

Tabulka 2: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek a značení pro imunofluorescenční analýzu. p-cPLA₂α – fosforylovaná cytosolická fosfolipáza A₂α; RT – pokojová teplota; WGA – aglutinin z pšeničných klíčků konjugovaný s tetrametylrodaminem. Všechny použité chemikálie byly připraveny ředěním v PBS pufru.

Preparáty po imunofluorescenčním značení byly snímány wide-field epifluorescenčním mikroskopem (Olympus IX2-UCB, Olympus Optical Co. GmbH, Hanburg, Německo) využívajícím bílé světlo ze rtuťové výbojky a vybaveným objektivem 1,4NA Plan-Apochromat, odpovídajícími fluorescenčními kostkami a CCD kamerou (Orca C4742-80-12AG, Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Německo), která byla použita k nasnímání nejméně pěti digitálních snímků každého vzorku. NoN (No Neighbour) algoritmus softwaru Olympus Soft Imaging Solutions byl použit k dekonvoluci nasnímaných obrázků. Úprava snímků a kvantitativní analýza fluorescence byla provedena v programu Fiji ImageJ open source software (Schindelin a kol., 2012). Pro výpočet kvantifikace kolokalizace mezi barevnými kanály byl použit Mandersův korelační koeficient (Manders a kol., 1993) vyjadřující podíl z celkového signálu v zeleném kanálu (p-cPLA₂α) přítomném v analyzované oblasti mikroskopického snímku, který kolokalizuje se signálem v červeném (WGA nebo OXPPOS), resp. modrém (DAPI) kanálu.

3.5 STANOVENÍ KONCENTRACE PGE₂ V SRDEČNÍ TKÁNI

Ke stanovení koncentrace PGE₂ v myokardu LV byly použity homogenáty vzorků určených pro Western blot analýzu z normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na IHH. Koncentrace PGE₂ byla stanovena komerčním kitem využívající metodu nekompetitivní analýzy ELISA dle instrukcí výrobce (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Principem metody je konverze všech hlavních metabolitů PGE₂ na stabilní, snadno měřitelný derivát (bicykloPGE₂). Výsledná koncentrace PGE₂ byla normalizována na množství celkového proteinu.

3.6 STANOVENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY PO SIMULOVANÉ ISCHEMII/REPERFÚZI: VLIV IHH A INHIBITORU CPLA₂ α PYROFENONU

Izolace kardiomyocytů ze srdeční tkáně a stanovení buněčné viability po simulované I/R při studiu působení pyrofenonu po adaptaci na IHH byly provedeny Mgr. Markétou Hlaváčkovou, Ph.D., FgÚ AV ČR.

Kardiomyocyty vyizolované z myokardu LV byly inkubovány po dobu 20 min s 0,01% DMSO nebo 1 μ M pyrofenonem rozpuštěném v 0,01% DMSO nebo byly ponechány bez přídavku chemikálií (kontrola). Poté byly kardiomyocyty vystaveny metabolické inhibici představující 25min epizodu anoxie (MI) a následné re-energizaci představující 30min epizodu reoxygenace (MI/R). MI byla indukována inkubací s modifikovaným Krebsovým pufrem (navíc obsahuje 1,5 mM NaCN a 20 mM 2-deoxyglukózu namísto glukózy). Kontrolní buňky byly inkubovány ve standardním buněčném médiu – Krebsově pufru (118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 11 mM glukóza, pH 7,38-7,41). Během re-energizace byl ke kardiomyocytům přidán Krebsův pufr reprezentující epizodu reoxygenace. Ke kardiomyocytům byl následně přidán roztok tyrodu a roztok trypanové modři (0,4%). Posléze byly vzorky směsi nanесeny do Bürkerovy počítací komůrky a kardiomyocyty byly spočítány použitím mikroskopu (Nikon ECLIPSE TE2000-S, Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam, Nizozemsko). Počítány byly modré kulaté buňky (mrtvé), neobarvené kulaté buňky (živé buňky, ale již v procesu umírání) a neobarvené podlouhlé buňky (živé). Za živé (viabilní) buňky byly považovány pouze neobarvené buňky, které měly poměr délky a šířky stran 3:1. Viabilita kardiomyocytů po MI/R byla vyjádřena jako procento přeživších buněk po

MI/R ku procentu kardiomyocytů z odpovídající kontrolní skupiny, která nebyla vystavena MI/R. Podrobný popis metodiky je uveden v příloze A (Míčová a kol. 2016).

3.7 STANOVENÍ FA

3.7.1 EXTRAKCE FOSFOLIPIDŮ ZE SRDEČNÍ TKÁNĚ

Vzorky myokardu LV určené pro stanovení FA byly v třecí misce rozdrobeny na prášek v atmosféře tekutého dusíku. Fosfolipidy byly extrahovány ze vzorků srdeční tkáně modifikovanou metodou dle Folch a kol. ve třech po sobě jdoucích krocích (Folch a kol., 1957). První extrakce byla provedena přidavkem směsi rozpouštědel chloroform:metanol (vždy 0,25 ml) k rozdrobené tkáni nejprve v poměru 1:3, následně v poměru 2:1 a nakonec v poměru 2:1 (v/v). K extraktu byl přidán fyziologický roztok (20 % celkového objemu extraktu) a směs byla intenzivně rozmíchána. Po ustavení rovnováhy byla odebrána spodní lipidová vrstva, která byla posléze odpařena při teplotě 40 °C v atmosféře plynného dusíku.

3.7.2 SEPARACE CELKOVÝCH FOSFOLIPIDŮ A STANOVENÍ METYLESTERŮ FA

Pro separaci celkových fosfolipidů z extraktu byla použita jednorozměrná chromatografie na tenké vrstvě TLC (0,5 mm Silica Gel H, Merck, Německo). Desky se vzorky se nechaly vyvíjet ve směsi rozpouštědel hexan:eter:kyselina octová v poměru 80:20:3 (v/v/v). Po skončení separace celkových fosfolipidů byly skvrny na TLC deskách detekovány 2,7-dichlorofluoresceinem (0,005% v metanolu) a vizualizovány pod UV světlem. Posléze byly detekované skvrny s jednotlivými FA vyškrábány, kvantitativně převedeny do zkumavek a uloženy v atmosféře plynného dusíku při teplotě -20 °C pro následné stanovení metylesterů FA.

Analýza metylesterů FA byla provedena plynovou chromatografií (Tvrzická a kol., 2002). Vzorky s vyškrábaným silikagelem obsahujícím FA byly inkubovány s 1 ml metanolátu sodného ve tmě (1 hod, pokojová teplota) a extrahovány hexanem (2 ml). Po oddělení fází byla odebrána horní fáze, která byla pod proudem plynného dusíku odpařena při teplotě 45 °C. Po odpaření byly vzorky uloženy při teplotě -20 °C do chromatografického stanovení. Vzorky byly následně analyzovány pomocí plynové chromatografie (FOCUS GC, AI 1310, Thermo Fisher Scientific, MA, USA; detekce ionizací plamenem; kolona CP WAX 52CB 25 m x 0,25 mm; nosný plyn: vodík; objem nástřiku: 100 µl). Stanovení metylesterů FA metodou plynové chromatografie bylo provedeno RNDr. Markem Veckou, Ph.D., 1. LF UK.

3.8 MĚŘENÍ PEROXIDACE LIPIDŮ – STANOVENÍ KONCENTRACE MDA

Peroxidace lipidů byla kvantifikována měřením produkce MDA. Hluboko zamražený myokard LV (přibližně 100 mg) byl rozdrcen na jemný prášek v třecí misce v atmosféře kapalného dusíku. Prášek byl následně rozpuštěn v 500 μ l vychlazeného homogenizačního pufru (25 mM Tris, pH 7,6, 0,1 % Triton X-100). Suspenze s homogenátem byla homogenizována pomocí UV homogenizátoru za intenzivního chlazení na ledu a poté centrifugována (1 000 x g, 10 min, 4 °C). Výsledný supernatant byl určen ke stanovení koncentrace MDA (Pilz a kol., 2000).

K odečtení koncentrace MDA ve vzorcích byla vytvořena kalibrační řada koncentrací zhotovená rozpuštěním standardu 1 mM tetrabutylamoniumMDA v 1% H_2SO_4 (v/v). Kalibrační řada a vzorky byly nejprve hydrolyzovány v alkalickém prostředí přidáním 20 μ l 6 M NaOH (30 min, 60 °C) a poté ponechány v chladu (5 min, -20 °C). Následně byly hydrolyzované vzorky kalibrační řady a vzorky k analýze deproteinovány přidáním 50 μ l 35% $HClO_4$ (v/v) a centrifugovány (10 000 x g, 5 min). Ke vzniklým supernatantům (vždy 100 μ l) byl přidán roztok 5 mM 2,4-dinitrofenylhydrazinu rozpuštěný v 2 M HCl (10 μ l). Vzorky byly následně uloženy ve tmě (30 min) za účelem proběhnutí reakce. Vzorky kalibrační řady i samotné vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC (Shimadzu/Agilent, Japonsko; kolona EC Nucleosil 100-5 C18, 4,6 x 125 mm; průtok 1,0 ml/min; objem nástřiku 30-100 μ l) s UV detekcí při $\lambda = 310$ nm. Stanovení koncentrace MDA metodou HPLC provedl prof. ing. Ivan Mikšík, DrSc., FgÚ AV ČR. Výsledná koncentrace MDA byla normalizována na celkový protein.

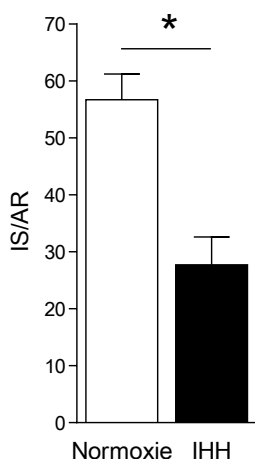
3.9 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr a rozptyl dat jako střední chyba průměru (SEM). Výsledky byly statisticky zpracovány programem SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) nebo GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Významnost rozdílů mezi experimentálními skupinami byla hodnocena pomocí statistických testů One-Way nebo Two-Way ANOVA a následného Student-Newman-Keulsova testu, resp. Bonferroni post testu. Za statisticky významný byl považován rozdíl s hladinou významnosti $P < 0,05$.

4 VÝSLEDKY

4.1 CÍL 1: VLIV IHH NA ZASTOUPENÍ PLA₂ A AKTIVUJÍCÍCH ENZYMŮ A CÍLŮ CPLA₂α V SRDEČNÍ TKÁNI

Již dříve bylo prokázáno, že je model adaptace na IHH kardioprotektivní v důsledku snížení velikosti infarktu myokardu (obrázek 7) (Kolář a kol., 2007). Vyšli jsme z předpokladu, že v mechanismu kardioprotekce mohou hrát roli také PLA₂. Stanovili jsme proto na tomto modelu chronické hypoxie relativní zastoupení cPLA₂α, iPLA₂ a sPLA₂IIA a zanalyzovali lokalizaci aktivované cPLA₂α, zastoupení jejich aktivujících proteinů a cílových molekul a také vliv inhibitoru cPLA₂α na přežívání kardiomyocytů.



Obrázek 7: Vliv IHH na velikost infarktového ložiska. AR – velikost oblasti infarktem ohrožené; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; IS – velikost oblasti zasažené infarktem. Vyjádřeno jako procentuální poměr infarktové oblasti ku oblasti infarktem ohrožené (IS/AR). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 7.
* – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$) (Kolář a kol., 2007).

4.1.1 HMOTNOSTNÍ PARAMETRY

Po IHH dochází k retardaci růstu a zvýšení hmotnosti srdce pokusných zvířat.

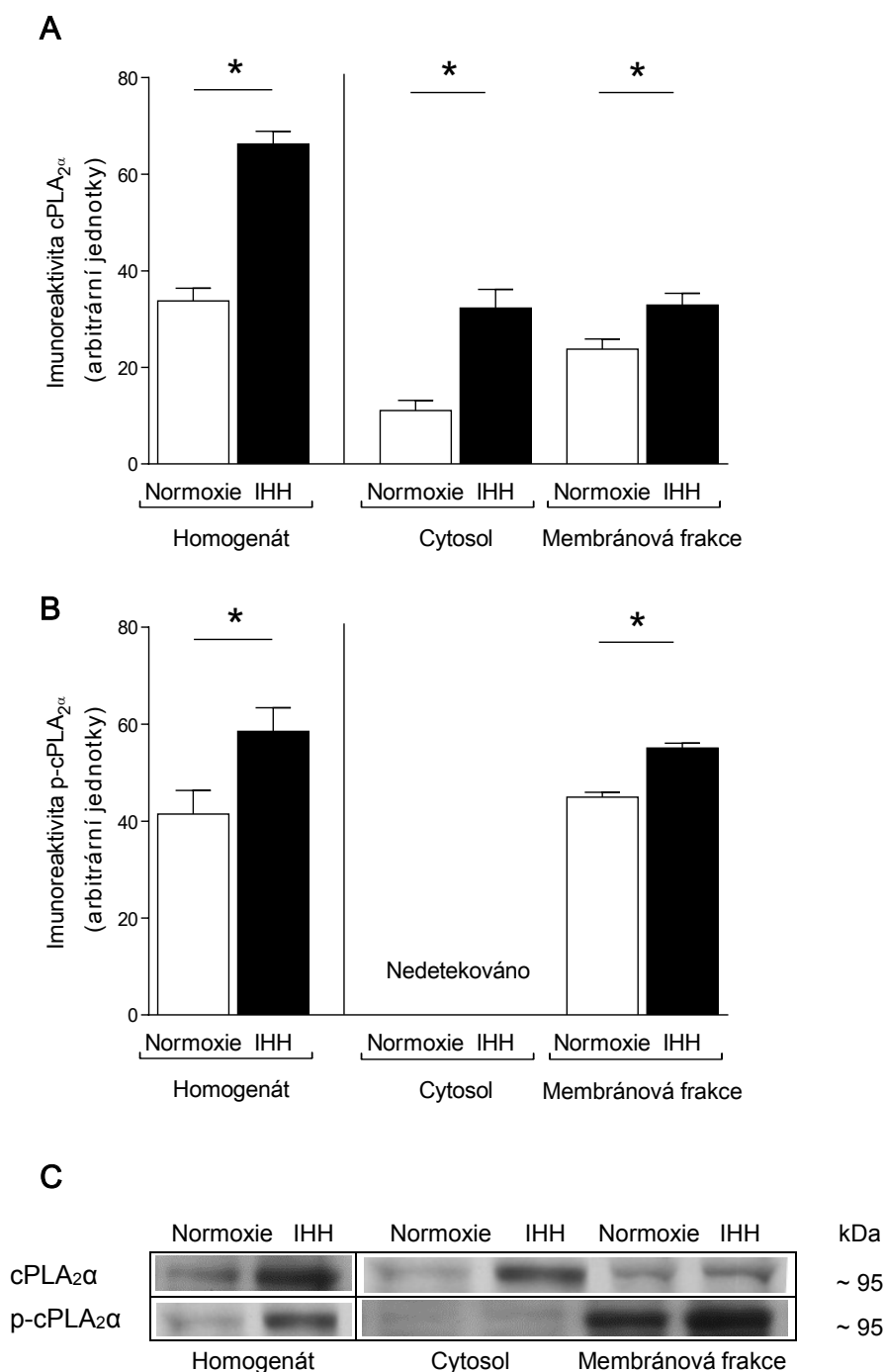
Po adaptaci na IHH došlo ve srovnání s normoxickými zvířaty k retardaci růstu pokusných zvířat (o 10 %). Došlo však ke zvýšení relativní hmotnosti srdce (HW/BW) v důsledku hypertrofie obou srdečních komor, kdy se relativní hmotnost pravé (RVW/BW) i levé (LVW/BW) komory zvýšila o 61 %, resp. o 22 % (tabulka 3).

Parametr	Normoxie	IHH
BW, g	388 ± 4	351 ± 9*
HW, mg	909 ± 20	1048 ± 43
HW/BW, mg/g	2,368 ± 0,056	2,987 ± 0,120*
LVW/BW, mg/g	1,289 ± 0,031	1,576 ± 0,076*
RVW/BW, mg/g	0,488 ± 0,014	0,788 ± 0,028*
SW/BW, mg/g	0,591 ± 0,015	0,624 ± 0,029

Tabulka 3: Hmotnostní parametry normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na IHH. BW – hmotnost těla; HW – hmotnost srdce; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; LVW – hmotnost levé komory; LVW/BW – relativní hmotnost levé komory; RVW – hmotnost pravé komory; RVW/BW – relativní hmotnost pravé komory; SW/BW – relativní hmotnost septa. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

4.1.2 VLIV IHH NA RELATIVNÍ ZASTOUPENÍ PLA₂**IHH aktivuje celkovou i fosforylovanou cPLA₂α.**

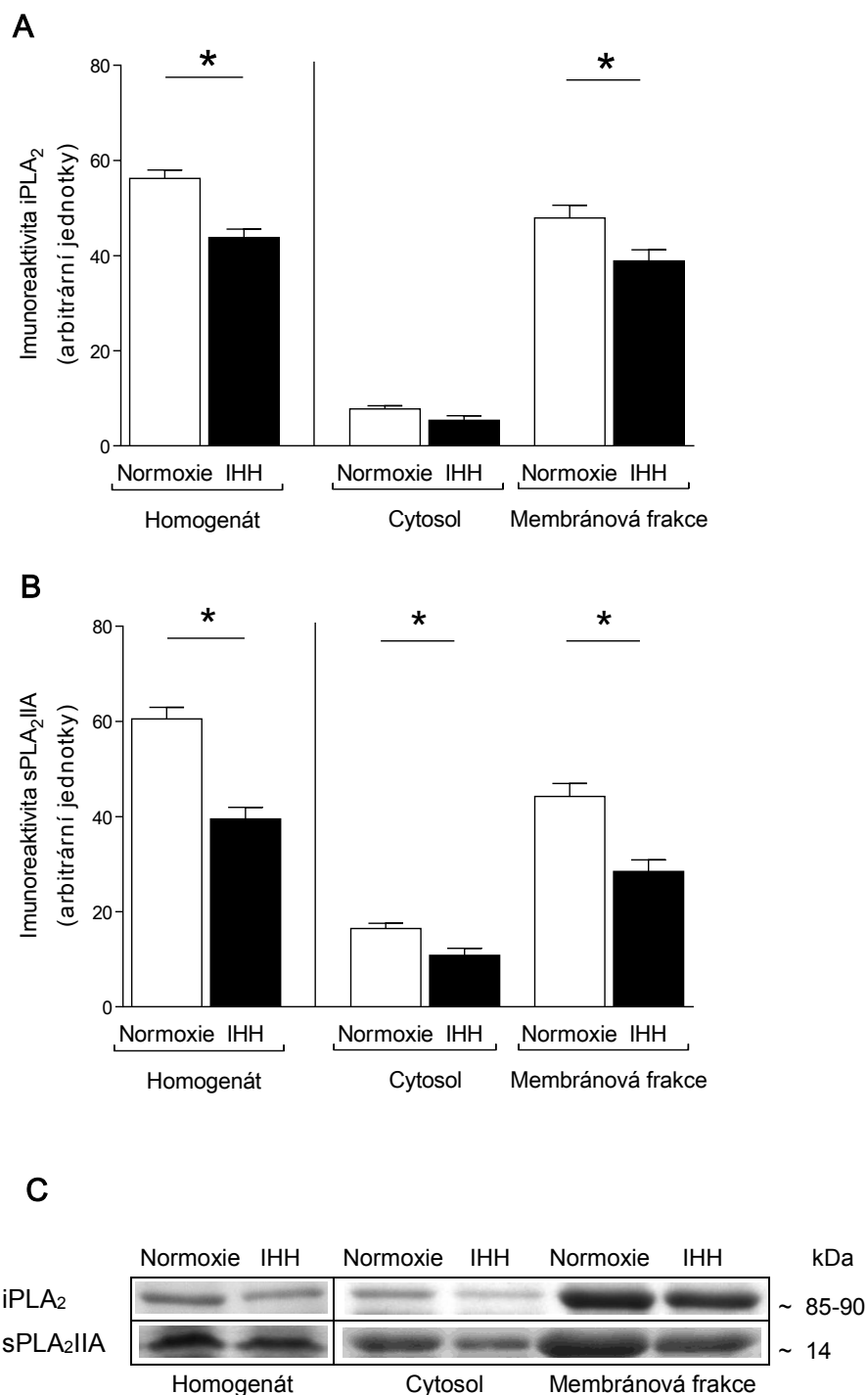
Adaptace na IHH zvýšila relativní množství celkové i fosforylované cPLA₂α v homogenátu (o 96 %, resp. 41 %) i membránové frakci (o 38 %, resp. 23 %) ve srovnání s normoxickými zvířaty. Stejně tak po adaptaci na IHH došlo k výraznému navýšení celkové cPLA₂α v cytosolu (o 191 %), zatímco aktivovaná p-cPLA₂α nebyla v cytosolu detekována (obrázek 8).



Obrázek 8: Vliv IHH na relativní zastoupení celkové (A) a fosforylované (B) cPLA₂α v homogenátu, cytosolu a membránové frakci včetně reprezentativních obrázků blotů (C). cPLA₂α – cytosolická fosfolipáza A₂α; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; p-cPLA₂α – fosforylovaná cytosolická fosfolipáza A₂α. Nanášky pro cPLA₂α: homogenát – 40 μg, cytosol – 30 μg, membránová frakce – 20 μg. Nanáška pro p-cPLA₂α: homogenát – 70 μg, cytosol – 70 μg, membránová frakce – 60 μg. Arbitrární jednotky: součet densitometrických objemů/1 μg celkového proteinu všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

IHH snižuje relativní množství iPLA₂ a sPLA₂IIA.

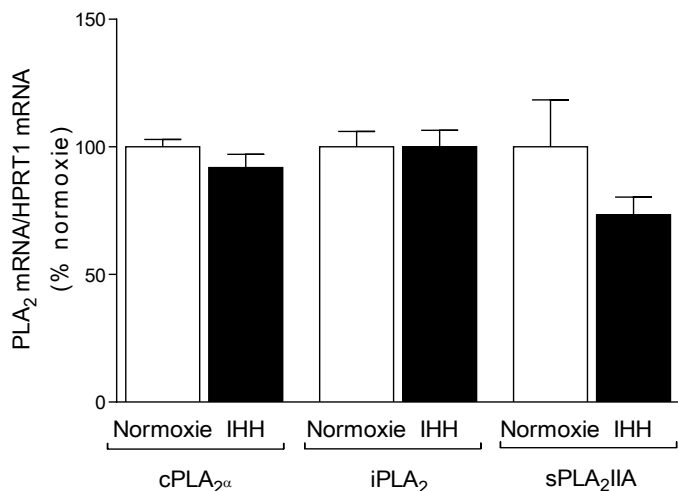
Adaptace na IHH snížila relativní množství iPLA₂ a sPLA₂IIA v homogenátu (o 23 %, resp. 35 %) a v membránové frakci (o 19 %, resp. 36 %) v porovnání s normoxií. Po adaptaci na IHH rovněž došlo k poklesu sPLA₂IIA v cytosolu (o 34 %) (obrázek 9).



Obrázek 9: Vliv IHH na relativní zastoupení iPLA₂ (A) a sPLA₂IIA (B) v homogenátu, cytosolu a membránové frakci včetně reprezentativních obrázků blotů (C). IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; iPLA₂ – na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂; sPLA₂IIA – sekreторická fosfolipáza A₂ IIA. Nanášky pro iPLA₂: homogenát – 15 µg, cytosol – 15 µg, membránová frakce – 10 µg. Nanášky pro sPLA₂IIA: homogenát – 40 µg, cytosol – 30 µg, membránová frakce – 20 µg. Arbitrární jednotky: součet denzitometrických objemů/1 µg celkového proteinu všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 5. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

IHH neovlivnila množství PLA₂ na úrovni mRNA.

Adaptace na IHH neměla vliv na expresi cPLA₂ α , iPLA₂ a sPLA₂IIA na úrovni mRNA v homogenátu (obrázek 10).



Obrázek 10: Vliv IHH na množství cPLA₂ α , iPLA₂ a sPLA₂IIA na úrovni mRNA v homogenátu.

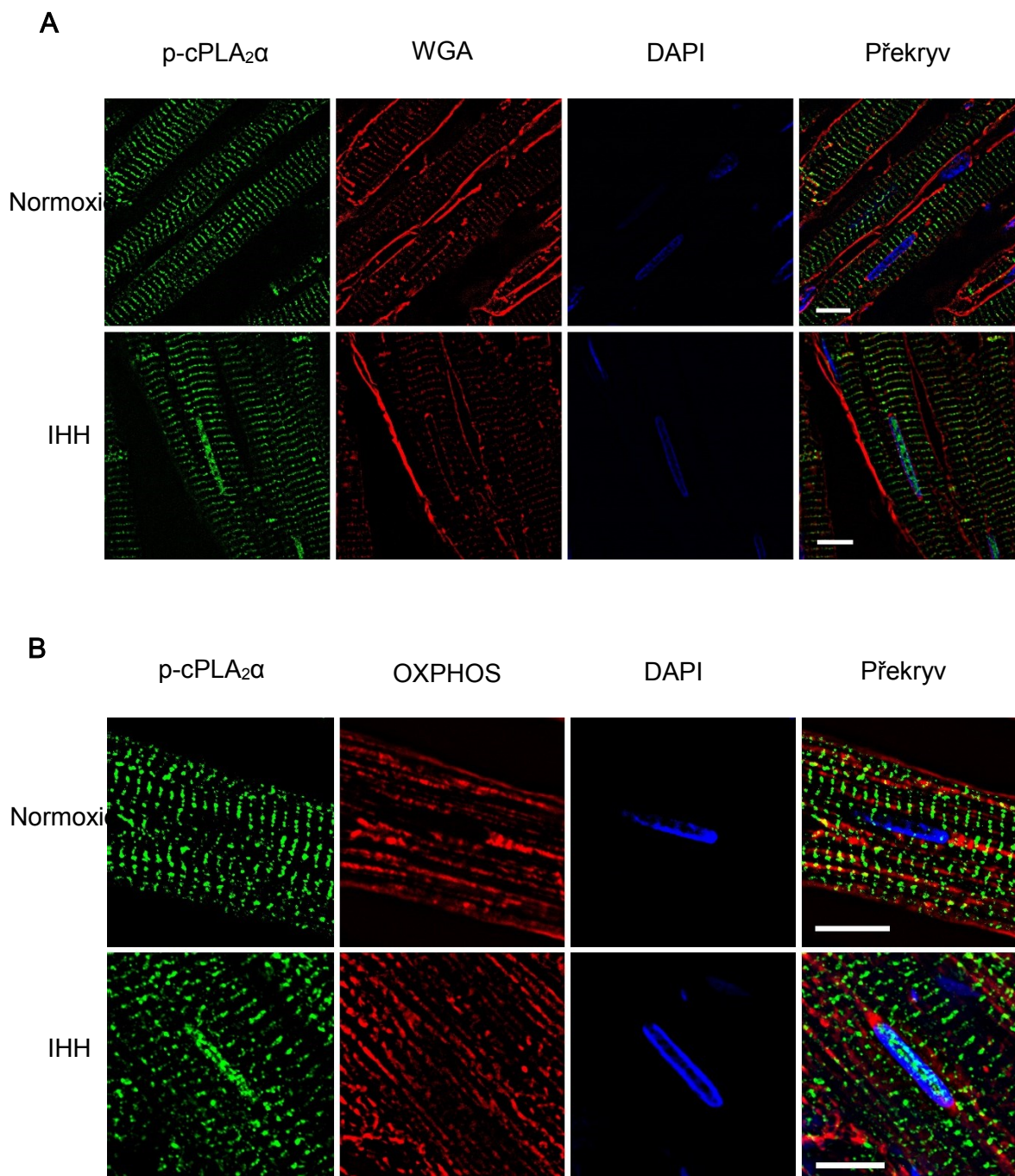
HPRT1 – hypoxantinguanin-fosforibosyltransferáza 1; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; iPLA₂ – na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂; sPLA₂IIA – sekretorická fosfolipáza A₂ IIA; Množství PLA₂ mRNA je normalizováno na referenční gen HPRT1. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny (~ 100 %) \pm SEM.

Počet zvířat v experimentální skupině – 5.

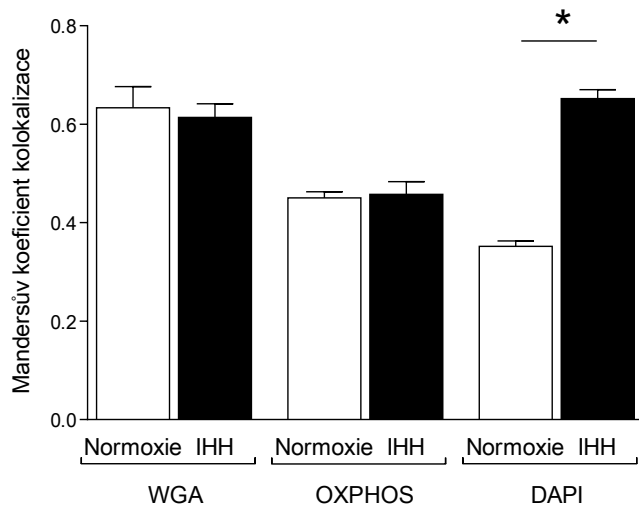
4.1.3 IMUNOFLUORESCENČNÍ ANALÝZA p-cPLA₂ α PO ADAPTACI NA IHH

p-cPLA₂ α translokuje do jádra po adaptaci na IHH.

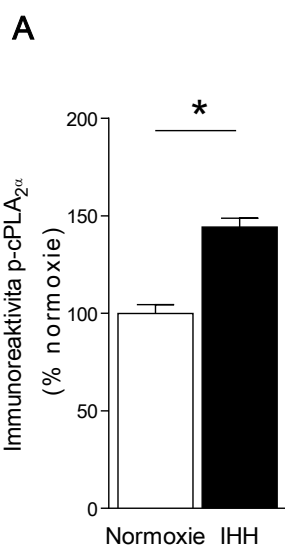
Po adaptaci na IHH došlo ve srovnání s normoxií k výrazné kolokalizaci p-cPLA₂ α s jádrem (navýšení o 85 %), naproti tomu nebyla detekována kolokalizace p-cPLA₂ α se sarkolemálními (obrázek 11A) a mitochondriálními (obrázek 11B) membránami v kardiomyocytech izolovaných z myokardu LV. Pro kvantifikaci míry kolokalizace p-cPLA₂ α s jádrem v kardiomyocytech byl vypočten Mandersův koeficient mezi zeleným barvením představujícím p-cPLA₂ α a modrým barvením buněčných jader (DAPI). Průměrná hodnota Mandersova koeficientu pro normoxii činila $0,35 \pm 0,01$, zatímco pro experimentální skupinu adaptovanou na IHH hodnota činila $0,65 \pm 0,02$ (obrázek 12). Následná analýza imunoreaktivity p-cPLA₂ α v jaderné frakci v myokardu LV metodou Western blot potvrdila zvýšení o 44 % u experimentální skupiny adaptované na IHH v porovnání s normoxickou kontrolou (obrázek 13).



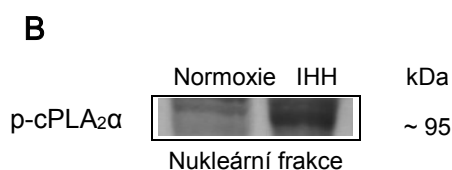
Obrázek 11: Efekt IHH na subcelulární distribuci p-cPLA₂α v kardiomyocytech. Reprezentativní obrázky ukazují distribuci a kolokalizaci p-cPLA₂α se sarkolemou (A) a mitochondriemi (B) na kryořezech z myokardu LV. Zelená barva představuje barvení p-cPLA₂α a modrá barva představuje barvení jader pomocí DAPI. Na obrázku 11A červená barva reprezentuje barvení sarkolemálních membrán pomocí WGA. Na obrázku 11B červená barva představuje barvení komplexů OXPPOS. Měřítko je 10 μm. DAPI – barvení jader prostřednictvím 4',6-diamidino-2-fenylindolu; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; OXPPOS – barvení mitochondrií pomocí Total Oxphos MitoProfile Blue Native Antibody Coctail; p-cPLA₂α – fosforylovaná cytosolická fosfolipáza A₂α; WGA – barvení sarkolemálních membrán pomocí aglutininu z pšeničných klíčků konjugovaným s tetrametylrodaminem.



Obrázek 12: Kvantifikace intenzity imunofluorescence p-cPLA₂ α v kardiomyocytech z normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na IHH. Pomocí Mandersova koeficientu byla vypočtena kvantifikace intenzity imunofluorescence p-cPLA₂ α na sarkolemálních membránách (barvení WGA), na mitochondriích (barvení OXPPOS komplexů) a v jádře (barvení DAPI). DAPI – barvení jader prostřednictvím 4',6-diamidino-2-fenylindolu; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; OXPPOS – barvení mitochondrií pomocí Total Oxphos MitoProfile Blue Native Antibody Coctail; p-cPLA₂ α – fosforylovaná cytosolická fosfolipáza A₂ α ; WGA – barvení sarkolemálních membrán pomocí aglutininu z pšeničných klíčků. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 5. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

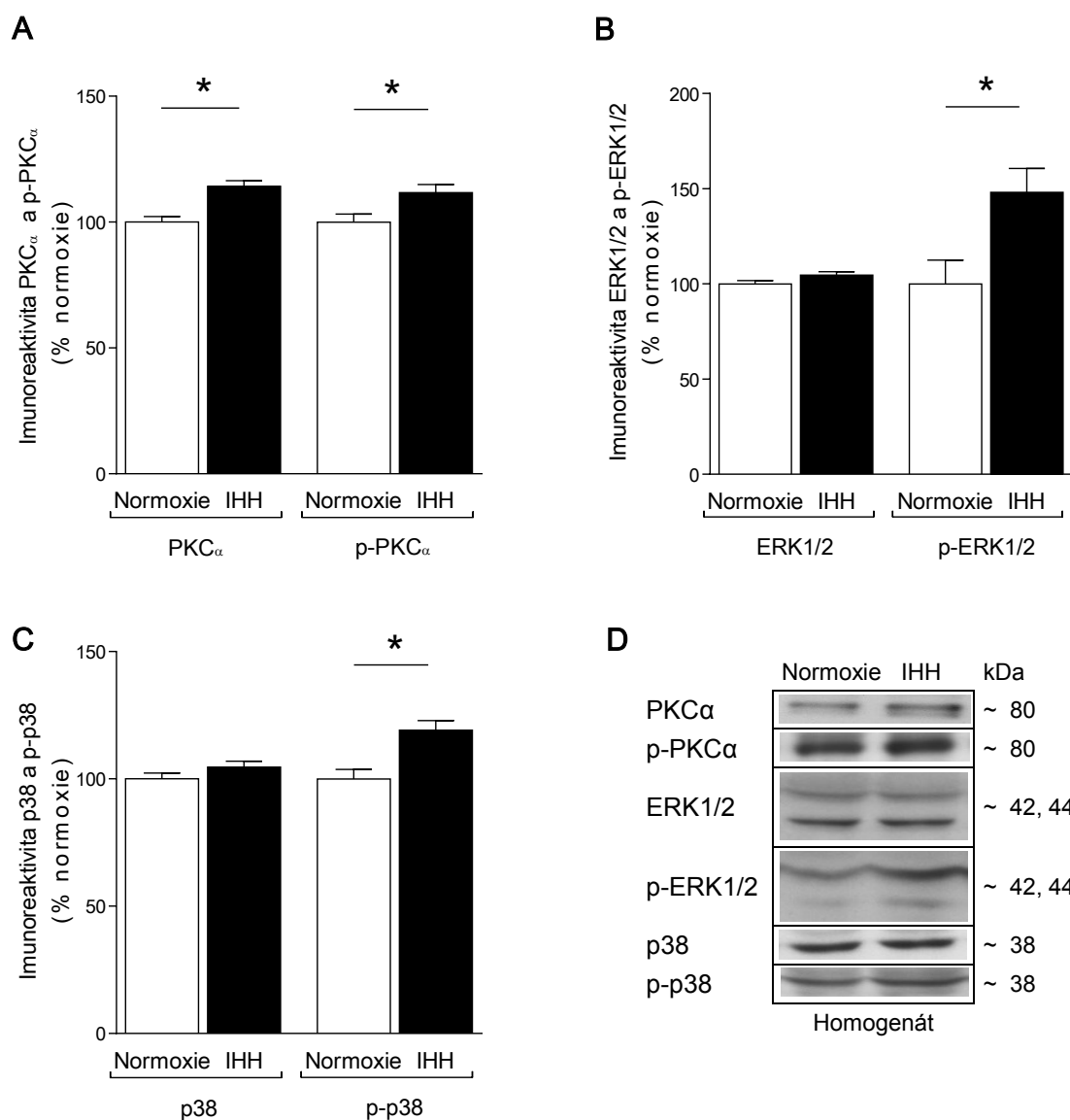


Obrázek 13: Vliv IHH na relativní zastoupení p-PLA₂ α v nukleární frakci (A) včetně reprezentativního obrázku blotu (B). IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; p-cPLA₂ α – fosforylovaná cytosolická fosfolipáza A₂ α . Nanáška pro p-cPLA₂ α : 70 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny (~ 100 %) \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 5. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).



4.1.4 VLIV IHH NA SIGNÁLNÍ PROTEINY AKTIVUJÍCÍ CPLA₂ α **IHH zvyšuje množství p-PKC α , p-ERK1/2 a p-p38 aktivujících cPLA₂ α .**

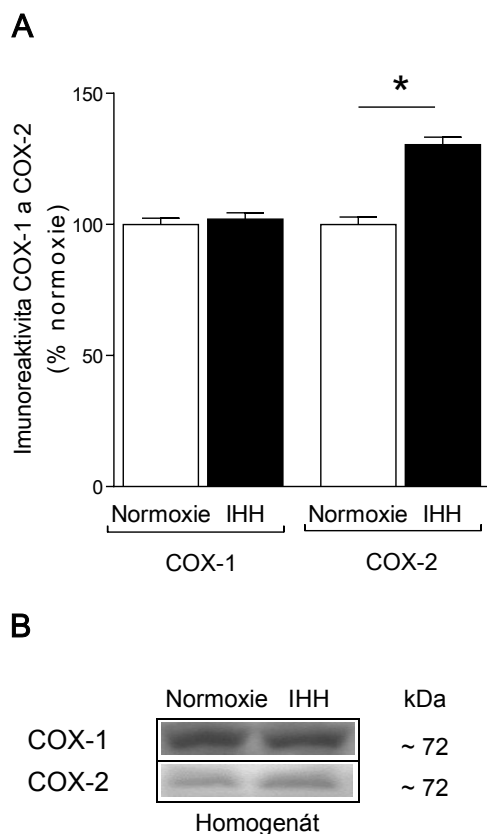
Po adaptaci na IHH došlo v porovnání s normoxickými kontrolami k navýšení relativního zastoupení celkové a fosforylované PKC α (o 14 %, resp. 12 %). Adaptace na IHH také zvýšila relativní zastoupení fosforylovaných forem ERK1/2 a p38 (o 48 %, resp. 19 %), ačkoliv se jejich celkové množství nezměnilo (obrázek 14).



Obrázek 14: Vliv IHH na relativní zastoupení celkových a fosforylovaných proteinů PKC α (A), ERK1/2 (B) a p38 (C) v homogenátu včetně reprezentativních obrázků blotů (D). ERK1/2 – MAPK, extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; p38 – MAPK, protein o molekulové hmotnosti 38 kDa; p-ERK1/2 – fosforylovaná MAPK, fosforylovaná extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2; PKC α – proteinkináza Ca; p-p38 – fosforylovaná MAPK, fosforylovaný protein o molekulové hmotnosti 38 kDa; p-PKC α – fosforylovaná proteinkináza Ca. Nanášky pro všechny detekované proteiny: 20 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny ($\sim 100\%$) \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 5. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

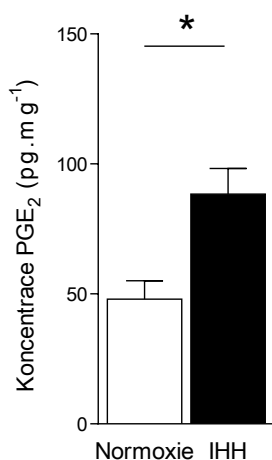
4.1.5 VLIV IHH NA ZASTOUPENÍ CÍLOVÝCH MOLEKUL CPLA₂ α **IHH zvyšuje množství COX-2 a PGE₂.**

Po adaptaci na IHH došlo ve srovnání s normoxickou kontrolou k navýšení relativního zastoupení COX-2 o 30 %, zatímco zastoupení COX-1 se nezměnilo (obrázek 15). Adaptace na IHH také zvýšila koncentraci PGE₂ o 84 % (obrázek 16).



Obrázek 15: Vliv IHH na relativní zastoupení COX-1 a COX-2 (A) v homogenátu včetně reprezentativního obrázku blotu (B). COX-1 – cyklooxygenáza 1; COX-2 – cyklooxygenáza 2; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; PGE₂ – prostaglandin E₂. Nanášky pro COX-1 a COX-2: 50 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny ($\sim 100\%$) \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 5.

* – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).



Obrázek 16: Vliv IHH na koncentraci PGE₂ v homogenátu. IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; PGE₂ – prostaglandin E₂. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 6.

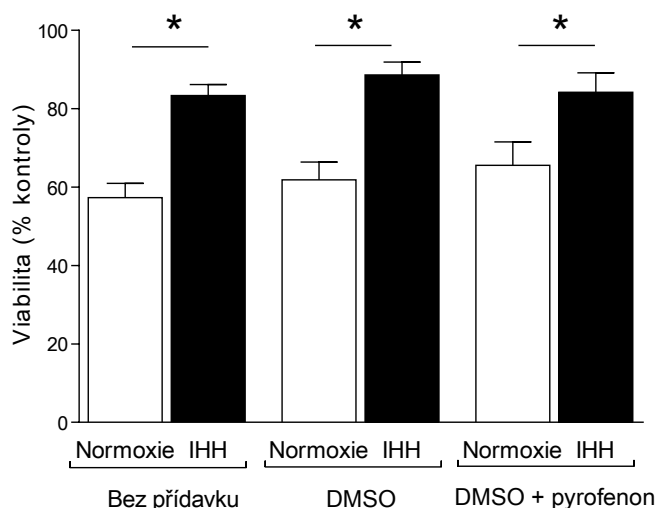
* – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

4.1.6 ODOLNOST IZOLOVANÝCH KARDIOMYOCYTŮ VŮČI SIMULOVANÉ ISCHEMII/REPERFÚZI: VLIV IHH A INHIBITORU $cPLA_2\alpha$ PYROFENONU

Pyrofen nezablokoval protektivní efekt vyvolaný IHH.

Na izolovaných kardiomyocytech z LV byla u normoxické experimentální skupiny a u experimentální skupiny adaptované na IHH měřena buněčná viabilita. Kardiomyocyty v experimentálních skupinách byly rozděleny do dalších podskupin podle přidavku zkoumaných farmak (bez přidavku; rozpouštědlo DMSO; specifický inhibitor $cPLA_2\alpha$ – pyrofenon).

U všech skupin byl pozorován kardioprotektivní vliv adaptace na IHH, tedy vyšší buněčná viabilita kardiomyocytů izolovaných z myokardu LV potkanů adaptovaných na IHH a vystavených metabolické inhibici a re-energizaci ve srovnání s normoxickými kontrolami. Inhibitor $cPLA_2\alpha$, pyrofenon, ani rozpouštědlo DMSO, ve kterém byl pyrofenon rozpuštěn, neovlivnily protektivní vliv vyvolaný IHH na viabilitu kardiomyocytů (obrázek 17).



Obrázek 17: Vliv inhibitoru $cPLA_2\alpha$ pyrofenonu na přežívání kardiomyocytů izolovaných z myokardu LV normoxických a na IHH adaptovaných potkanů po akutní metabolické inhibici a re-energizaci. DMSO – dimethylsulfoxid; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; Kontrolní buňky nebyly vystaveny metabolické inhibici a re-energizaci. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procenta kontrol \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 8. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($p < 0,05$).

4.2 CÍL 2: VLIV IHH NA ZASTOUPENÍ PLA₂ A SLOŽENÍ FA V SRDEČNÍ TKÁNI: VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU

4.2.1 HMOTNOSTNÍ PARAMETRY: VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU

Tempol neovlivnil hmotnostní parametry pokusných zvířat.

Podobně jako v předchozím experimentu došlo po adaptaci na IHH k retardaci růstu (BW) pokusných zvířat (o 16 %) v porovnání s normoxickými kontrolami. Zároveň došlo k navýšení relativní hmotnosti srdce (HW/BW; o 41 %) a také pravé (RVW/BW) i levé (LVW/BW) komory (o 75 %, resp. 34 %). Podávání tempolu nemělo vliv na hmotnost těla ani na ostatní srdeční parametry pokusných zvířat (tabulka 4).

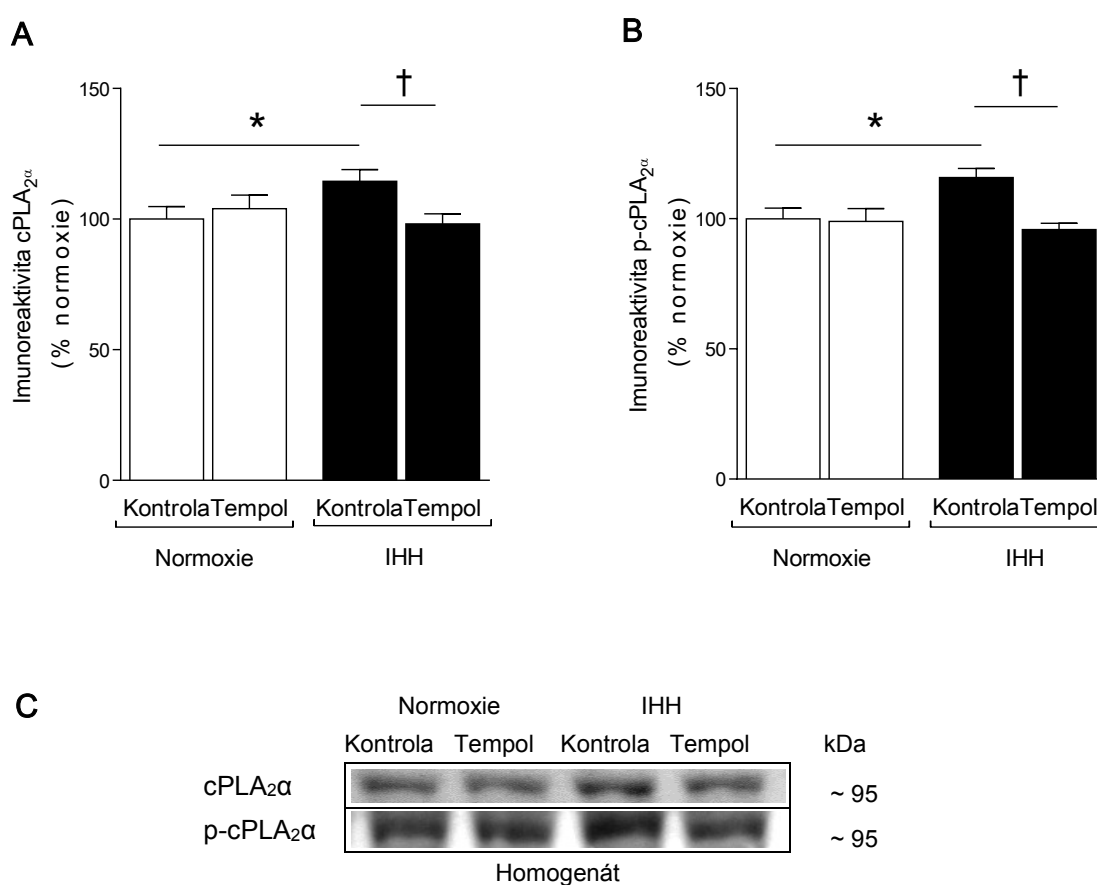
Parametr	Normoxie		IHH	
	Kontrola	Tempol	Kontrola	Tempol
BW, g	412 ± 7	437 ± 19	345 ± 15*	346 ± 9*
HW, mg	914 ± 28	1008 ± 62	1080 ± 78	1026 ± 51
HW/BW, mg/g	2,219 ± 0,060	2,294 ± 0,053	3,131 ± 0,164*	2,965 ± 0,118*
LVW/BW, mg/g	1,277 ± 0,037	1,281 ± 0,030	1,711 ± 0,102*	1,554 ± 0,080*
RVW/BW, mg/g	0,442 ± 0,016	0,464 ± 0,018	0,775 ± 0,038*	0,794 ± 0,027*

Tabulka 4: Hmotnostní parametry normoxických potkanů a na IHH adaptovaných potkanů a rovněž normoxických a na IHH adaptovaných potkanů, kterým byl podáván tempol. BW – hmotnost těla; HW – hmotnost srdce; HW/BW – relativní hmotnost srdce; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; LVW – hmotnost levé komory; LVW/BW – relativní hmotnost levé komory; RVW – hmotnost pravé komory; RVW/BW – relativní hmotnost pravé komory. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 8. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

4.2.2 EFEKT IHH NA RELATIVNÍ MNOŽSTVÍ PLA₂: VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU

Podávání antioxidantu tempolu zabránilo navýšení cPLA₂ a p-cPLA₂ po IHH.

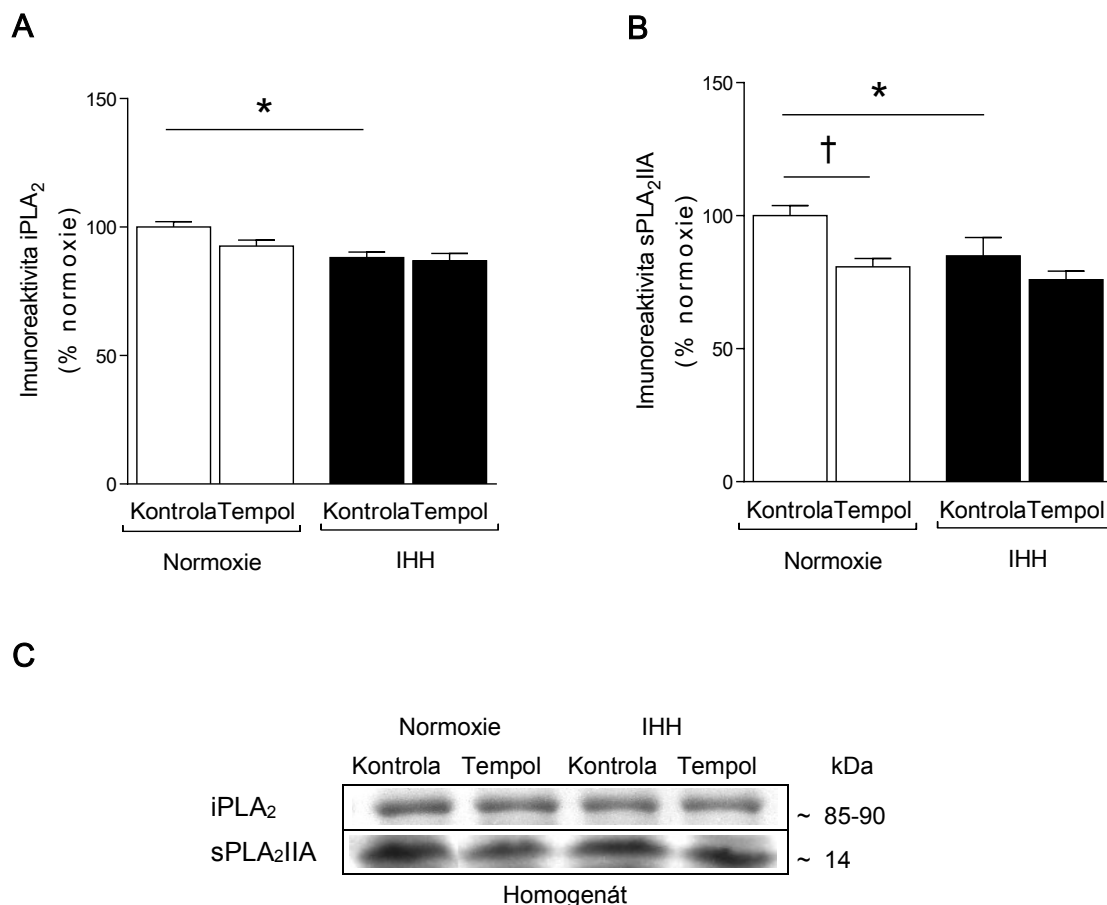
Stejně jako při studiu vlivu IHH na množství PLA₂ v předchozím frakcionačním pokusu (viz kapitola 4.1.2) i v tomto pokusu došlo vlivem IHH k nárůstu relativního množství cPLA₂ a p-cPLA₂ v homogenátu (o 14 %, resp. 16 %) v porovnání s normoxií. Tempol neovlivnil relativní zastoupení cPLA₂ a p-cPLA₂ u normoxické skupiny, avšak odstranil protektivní efekt IHH u hypoxické skupiny (obrázek 18).



Obrázek 18: Vliv IHH a antioxidantu tempolu na relativní zastoupení celkové (A) a fosforylované (B) cPLA₂ v homogenátu včetně reprezentativních obrázků blotů (C). cPLA₂ – cytosolická fosfolipáza A₂; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; p-cPLA₂ – fosforylovaná cytosolická fosfolipáza A₂. Nanášky pro cPLA₂: homogenát – 40 µg. Nanáška pro p-cPLA₂: homogenát – 70 µg. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny (~ 100 %) ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$). † – statisticky významný rozdíl tempol vs. odpovídající kontrola ($P < 0,05$).

Podávání tempolu snížilo množství sPLA₂IIA u normoxické skupiny.

Po adaptaci na IHH došlo stejně jako při stanovení množství PLA₂ ve frakcionačním pokusu (viz kapitola 4.1.2) k poklesu relativního zastoupení iPLA₂ a sPLA₂IIA v homogenátu (o 12 %, resp. 15 %) ve srovnání s normoxickými kontrolami. Tempol snížil množství sPLA₂IIA u normoxické skupiny (o 19 %), ale neměl vliv na zastoupení iPLA₂ a sPLA₂IIA u hypoxické skupiny (obrázek 19).

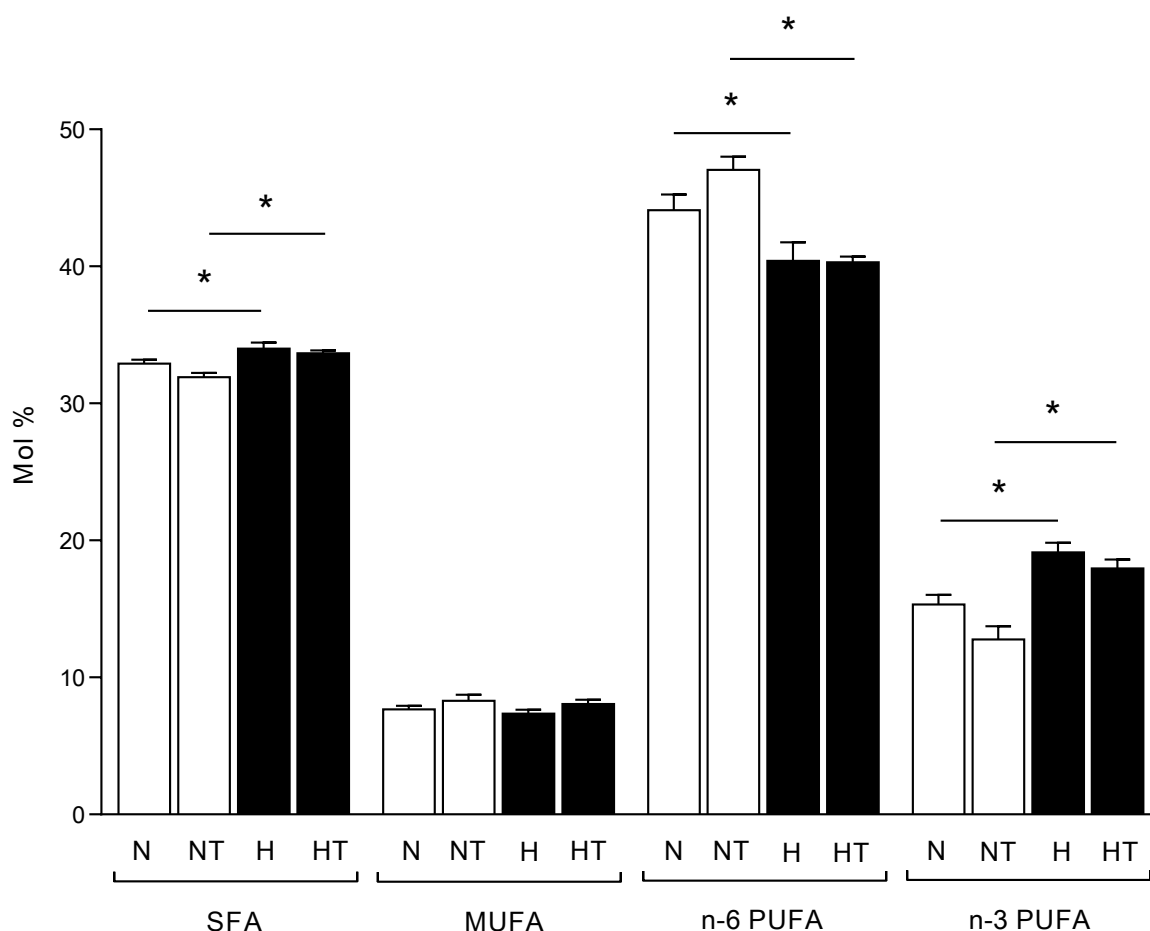


Obrázek 19: Vliv IHH a antioxidantu tempolu na relativní zastoupení iPLA₂ (A) a sPLA₂IIA (B) v homogenátu včetně reprezentativních obrázků blotů (C). IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; iPLA₂ – na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂; sPLA₂IIA – sekretorická fosfolipáza A₂. Nanášky pro iPLA₂: homogenát – 15 µg. Nanáška pro sPLA₂IIA: homogenát – 40 µg. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny (~ 100 %) ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$). † – statisticky významný rozdíl tempol vs. odpovídající kontrola ($P < 0,05$).

4.2.3 EFEKT IHH NA SLOŽENÍ FA: VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU

IHH zvyšuje podíl n-3 PUFA a snižuje podíl n-6 PUFA v srdečních fosfolipidech.

Adaptace na IHH zvýšila množství nasycených FA (SFA) v srdečních fosfolipidech zejména v důsledku navýšení obsahu kyseliny palmitové (16:0). Naopak se po adaptaci na IHH nezměnilo množství mononenasycených FA (MUFA). Ke snížení celkového množství n-6 PUFA vlivem adaptace na IHH došlo v důsledku poklesu množství kyseliny linolové (18:2n-6). Snížení celkového množství n-6 PUFA bylo vykompenzováno navýšením celkového podílu n-3 PUFA vyvolaného adaptací na IHH, a to zejména navýšením podílu kyseliny dokosa-hexaenové (DHA, 22:6n-3). Podávání tempolu neovlivnilo složení FA v srdečních fosfolipidech jak u normoxických, tak u zvířat adaptovaných na IHH (obrázek 20 a tabulka 5).

**Obrázek 20: Vliv IHH a podávání antioxidantu tempolu na distribuci tříd FA v myokardu**

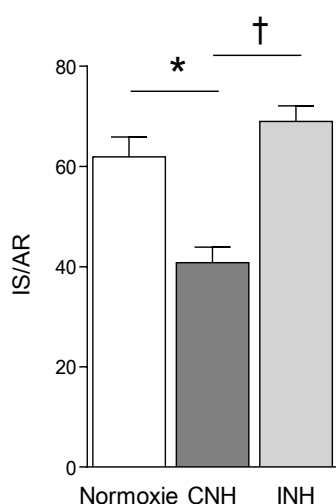
LV. H – intermitentní hypobarická hypoxie; HT – intermitentní hypobarická hypoxie s tempolem; MUFA – mononenasycené FA; N – normoxie; NT – normoxie s tempolem; PUFA – polynenasycené FA; SFA – nasycené FA; Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl H vs. N ($P < 0,05$). † – statisticky významný rozdíl skupiny s tempolem vs. odpovídající kontrola ($P < 0,05$).

FA	Normoxie				IHH			
	Kontrola		Tempol		Kontrola		Tempol	
	Hodnota	SEM	Hodnota	SEM	Hodnota	SEM	Hodnota	SEM
16:0	12.25	0.29	11.94	0.27	13.16 *	0.09	13.39 *	0.12
16:1n-7	0.39	0.03	0.43	0.03	0.37	0.02	0.41	0.03
17:0	0.53	0.02	0.52	0.02	0.46	0.01	0.50	0.03
18:0	19.82	0.16	19.16	0.44	20.28	0.25	19.44	0.24
18:1n-9	2.46	0.17	2.70	0.17	2.58	0.14	2.88	0.17
18:1n-7	4.66	0.08	4.95	0.28	4.22	0.17	4.56	0.12
18:2n-6	28.72	0.81	32.18	1.76	23.42 *	0.71	25.56 *	0.83
18:3n-3	0.11	0.01	0.12	0.01	0.10	0.01	0.10 *	0.01
20:2n-6	0.15	0.01	0.16	0.01	0.15	0.02	0.18	0.02
20:3n-6	0.38	0.01	0.39	0.02	0.40	0.02	0.40	0.01
20:4n-6	14.39	0.45	13.89	0.81	14.54	0.37	13.64	0.56
20:5n-3	0.63	0.06	0.74	0.02	0.59	0.05	0.50 *	0.02
22:4n-6	0.24	0.02	0.22	0.01	0.29	0.02	0.28	0.02
22:5n-6	0.19	0.02	0.17	0.01	0.24	0.01	0.24 *	0.01
22:5n-3	2.73	0.03	2.57	0.05	2.79	0.13	2.99	0.10
22:6n-3	11.81	0.74	9.28	0.93	15.58 *	0.65	14.31 *	0.64

Tabulka 5: Vliv IHH a podávání antioxidantu tempolu na zastoupení FA (mol %) z celkových fosfolipidů v myokardu LV. V tabulce jsou uvedeny pouze FA, které dosáhly hodnoty alespoň 0,1 % z celkového množství FA. 16:0 – kyselina palmitová; 16:1n-7 – kyselina palmitolejová; 17:0 – kyselina heptadekanová; 18:0 – kyselina stearová; 18:1n-9 – kyselina olejová; 18:1n-7 – kyselina 9-oktadecenová; 18:2n-6 – kyselina linolová; 18:3n-3 – kyselina α -linolenová; 20:2n-6 – kyselina eikosadienová; 20:3n-6 – kyselina dihomo- γ -linolenová; 20:4n-6 – kyselina arachidonová; 20:5n-3 – kyselina timnodová; 22:4n-6 – kyselina adrenová; 22:5n-6 – kyselina osbondová; 22:5n-3 – kyselina klupanodonová; 22:6n-3 – kyselina dokosaheptaenová; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

4.3 CÍL 3: VLIV CNH A INH NA MNOŽSTVÍ PLA₂ A SOD V SRDEČNÍ TKÁNI

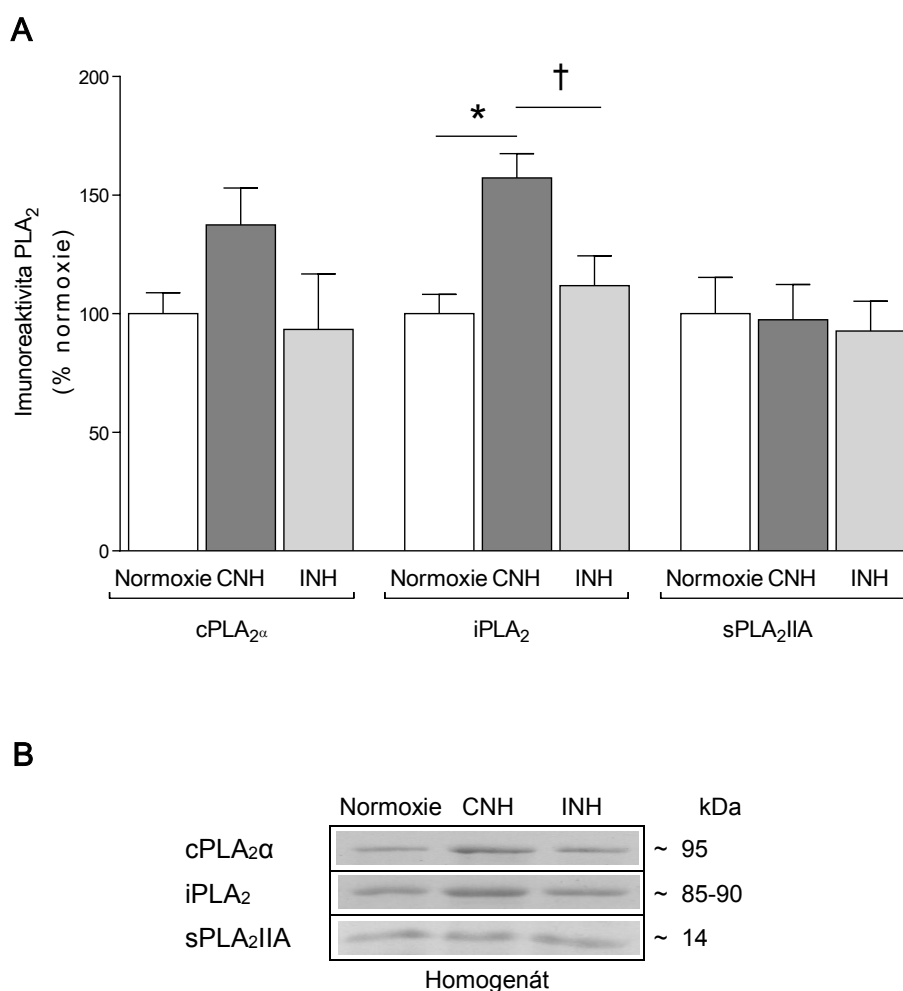
V předchozím pokusu jsme stanovili relativní zastoupení PLA₂ na modelu protektivní IHH (8 hodin/den, 5 dní/týden, 5 týdnů, ~ 7000 m). V další etapě jsme stanovili množství PLA₂ na dalších modelech chronické hypoxie – protektivní normobarické kontinuální hypoxii (CNH, 7 dnů/týden, 3 týdny, 10 % O₂), při níž podobně jako u modelu IHH dochází k poklesu velikosti infarktu myokardu, a také na modelu neprotektivní intermitentní normobarické hypoxie (INH, 7 dnů/týden, 3 týdny, 1hodinová reoxygenace/den, 10 % O₂) (obrázek 21) (Neckář a kol., 2013 – příloha C).



Obrázek 21: Vliv CNH a INH na velikost infarktového ložiska. AR – velikost oblastí infarktem ohrožené; CNH – kontinuální normobarická hypoxie; INH – intermitentní normobarická hypoxie s denní 1hodinovou reoxygenací; IS – velikost oblastí zasažené infarktem. Vyjádřeno jako procentuální poměr infarktové oblasti ku oblasti infarktem ohrožené. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 8. * – statisticky významný rozdíl CNH vs. normoxie ($P < 0,05$); † – statisticky významný rozdíl INH vs. CNH ($P < 0,05$).

4.3.1 STANOVENÍ RELATIVNÍHO MNOŽSTVÍ PLA₂ PO ADAPTACI NA CNH A INH CNH zvýšila množství cPLA₂ α a iPLA₂, zatímco adaptace na INH neměla vliv.

Adaptace na CNH zvýšila relativní zastoupení iPLA₂ o 57 % v homogenátu ve srovnání s normoxií, zatímco denní 1hodinová epizoda reoxygenace během adaptace na INH zcela potlačila toto navýšení. Podobný trend lze pozorovat i u cPLA₂ α , kde došlo vlivem velkého rozptylu dat k nesignifikantnímu nárůstu množství cPLA₂ α v homogenátu po adaptaci na CNH (o 37 %), zatímco adaptace na INH neměla vliv na její množství. Adaptace na CNH ani INH neovlivnily množství sPLA₂IIA v homogenátu (obrázek 22).

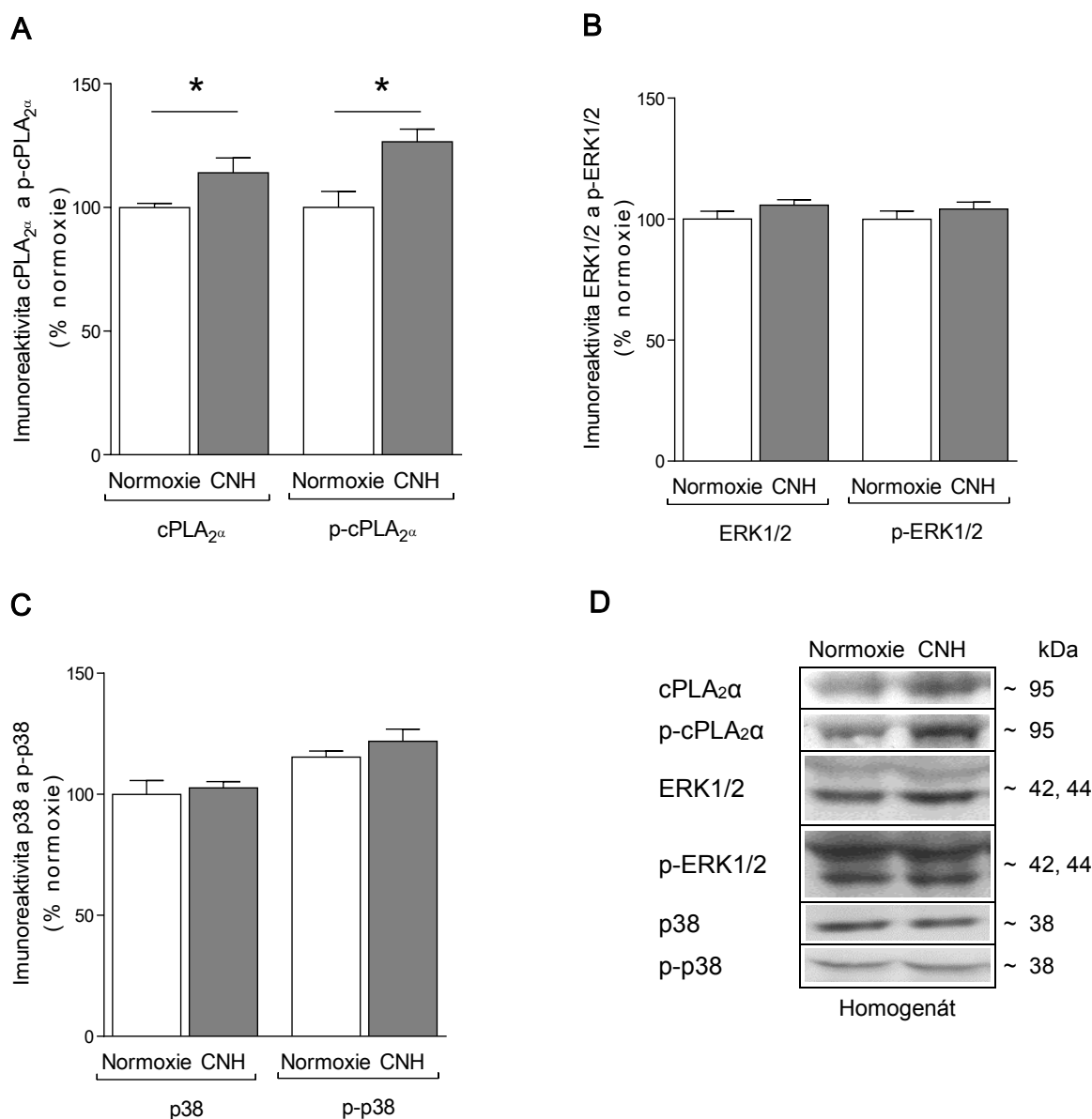


Obrázek 22: Vliv CNH a INH na relativní zastoupení cPLA₂ α (A), iPLA₂ (B) a sPLA₂IIA (C) v homogenátu včetně reprezentativních obrázků blotů (D). CNH – kontinuální normobarická hypoxie; INH – intermitentní normobarická hypoxie s denní 1hodinovou reoxygenací; cPLA₂ α – cytosolická fosfolipáza A₂ α ; iPLA₂ – na kalcium nezávislá fosfolipáza A₂; sPLA₂IIA – sekretorická fosfolipáza A₂ IIA. Nanášky pro cPLA₂ α a sPLA₂IIA: homogenát – 40 μ g. Nanášky pro iPLA₂: homogenát – 15 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny (~ 100 %) \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 5. * – statisticky významný rozdíl CNH vs. normoxie ($P < 0,05$); † – statisticky významný rozdíl INH vs. CNH ($P < 0,05$).

4.3.2 VLIV CNH NA p-CPLA₂ α A NA SIGNÁLNÍ PROTEINY AKTIVUJÍCÍ CPLA₂ α

CNH zvýšila cPLA₂ α a p-cPLA₂ α , ale neměla vliv na množství celkových ani fosforylovaných MAPK (ERK1/2 a p38).

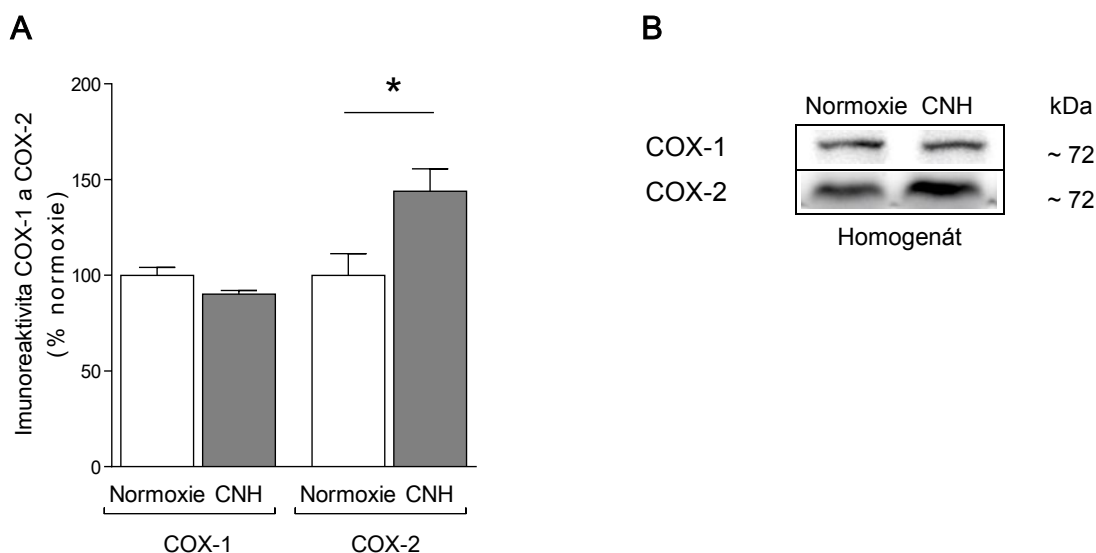
Po adaptaci na CNH došlo ke zvýšení zastoupení cPLA₂ α a p-cPLA₂ α (o 14 %, resp. 27 %), ačkoliv se relativní množství celkových ani fosforylovaných proteinů ERK1/2 nezměnilo (obrázek 23).



Obrázek 23: Vliv CNH na relativní zastoupení cPLA₂ α a p-cPLA₂ α (A) a celkových a fosforylovaných proteinů ERK1/2 (B) a p38 (C) v homogenátu včetně reprezentativních obrázků blotů (D). CNH – kontinuální normobarická hypoxie; cPLA₂ α – cytosolická fosfolipáza A₂ α ; ERK1/2 – MAPK, extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2; p38 – MAPK, protein o molekulové hmotnosti 38 kDa; p-cPLA₂ α – fosforylovaná cytosolická fosfolipáza A₂ α ; p-ERK1/2 – fosforylovaná MAPK, fosforylované extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2; p-p38 – fosforylovaná MAPK, fosforylovaný protein o molekulové hmotnosti 38 kDa. Nanášky pro cPLA₂ α a p-cPLA₂ α : 70 μ g; pro ostatní detekované proteiny: 20 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny (~ 100 %) \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 8. * – statisticky významný rozdíl CNH vs. normoxie ($P < 0,05$).

4.3.3 VLIV CNH NA ZASTOUPENÍ CÍLOVÝCH MOLEKUL CPLA₂α**CNH zvýšila množství COX-2.**

Adaptace na CNH zvýšila relativní zastoupení COX-2 o 44 % v porovnání s normoxií, zatímco množství COX-1 se nezměnilo (obrázek 24).

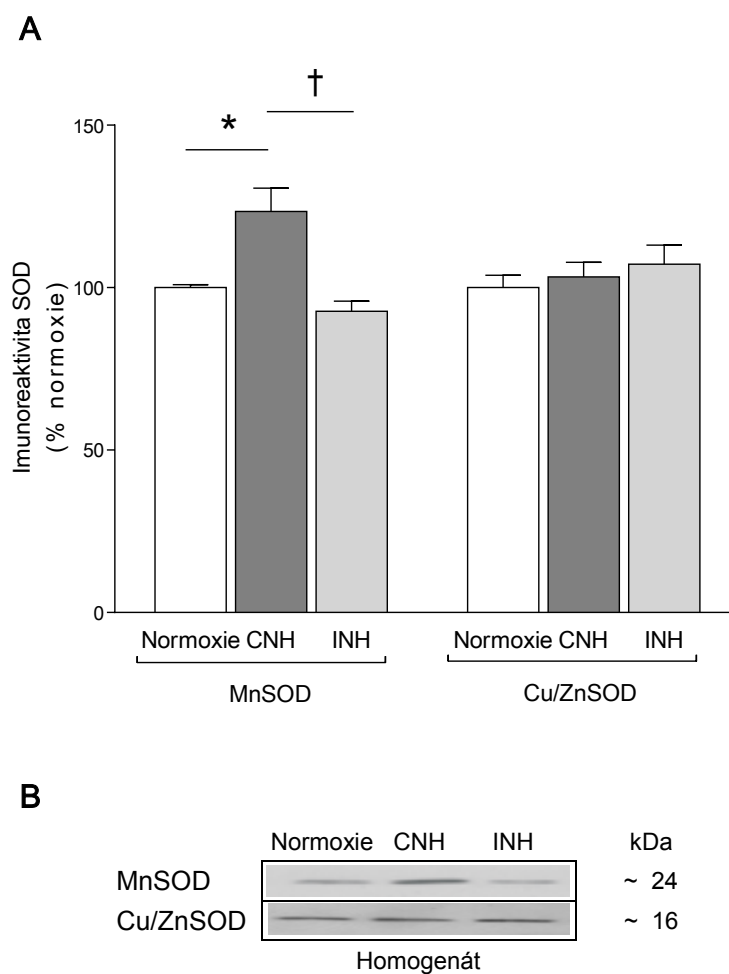


Obrázek 24: Vliv CNH na relativní zastoupení COX-1 a COX-2 (A) v homogenátu včetně reprezentativních obrázků blotů (B). CNH – kontinuální normobarická hypoxie; COX-1 – cyklooxygenáza 1; COX-2 – cyklooxygenáza 2. Nanášky pro COX-1 a COX-2: 50 µg. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny (~ 100 %) ± SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 8. * – statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($P < 0,05$).

4.3.4 VLIV CNH A INH NA RELATIVNÍ MNOŽSTVÍ SOD A KONCENTRACI MARKERU OXIDAČNÍHO STRESU MDA

CNH zvýšila množství MnSOD, zatímco adaptace na INH neměla vliv na tento enzym.

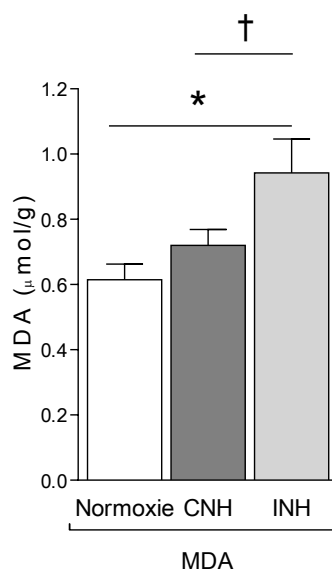
Adaptace na CNH zvýšila množství MnSOD v homogenátu (o 23 %) v porovnání s normoxickou kontrolou, ale denní 1hodinová epizoda reoxygenace během adaptace na INH tento nárůst potlačila. Adaptace na CNH stejně jako adaptace na INH neměly vliv na zastoupení Cu/ZnSOD (obrázek 25).



Obrázek 25: Vliv CNH a INH na relativní zastoupení MnSOD (A) a Cu/ZnSOD (B) v homogenátu včetně reprezentativních obrázků blotů (C). CNH – kontinuální normobarická hypoxie; Cu/ZnSOD – měď zinková superoxididmutáza; INH – intermitentní normobarická hypoxie s denní 1hodinovou reoxygenací; MnSOD – manganová superoxididmutáza. Nanášky pro MnSOD: homogenát – 1 μ g. Nanášky pro Cu/ZnSOD: homogenát – 4 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procentuálního zastoupení hodnot normoxické skupiny ($\sim 100\%$) \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 4. * – statisticky významný rozdíl CNH vs. normoxie ($P < 0,05$); † – statisticky významný rozdíl INH vs. CNH ($P < 0,05$).

INH zvýšila koncentraci MDA.

Po adaptaci na CNH byl patrný vzrůst koncentrace markeru oxidačního stresu MDA u skupiny adaptované na CNH o 18 % ve srovnání s normoxickou skupinou (z hodnoty 0,61 $\mu\text{mol/g}$ u normoxie na hodnotu 0,72 $\mu\text{mol/g}$ u CNH). Avšak k výraznému zvýšení koncentrace MDA došlo zejména po denní 1hodinové epizodě reoxygenace (INH), a to o 54 % ve srovnání s normoxickou skupinou a o 31 % ve srovnání se skupinou CNH (na hodnotu 0,94 $\mu\text{mol/g}$) (obrázek 26).



Obrázek 26: Vliv CNH a INH na koncentraci MDA v myokardu LV. CNH – kontinuální normobarická hypoxie; INH – intermitentní normobarická hypoxie s denní 1hodinovou reoxygenací; MDA – malondialdehyd. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat v experimentální skupině – 7.

* – statisticky významný rozdíl CNH vs. normoxie ($P < 0,05$); † – statisticky významný rozdíl INH vs. CNH ($P < 0,05$).

5 DISKUZE

5.1 CÍL 1: VLIV IHH NA ZASTOUPENÍ PLA₂ A AKTIVUJÍCÍCH ENZYMŮ A CÍLŮ cPLA₂α V SRDEČNÍ TKÁNI

5.1.1 VLIV IHH NA RELATIVNÍ ZASTOUPENÍ PLA₂

IHH aktivuje celkovou i fosforylovanou cPLA₂α na úrovni proteinu.

Adaptace na IHH zvýšila množství celkové i fosforylované cPLA₂α v homogenátu a membránové frakci. Za podmínek IHH došlo rovněž k výraznému navýšení celkové cPLA₂α v cytosolu, zatímco aktivovaná p-cPLA₂α nebyla v cytosolu detekována. Na úrovni mRNA nebyly pozorovány po adaptaci na IHH žádné změny v expresi cPLA₂α.

Úloha cPLA₂α v protektivním účinku indukovaném adaptací na chronickou hypoxii nebyla dosud studována. Ačkoliv řada studií poukázala na škodlivé účinky tohoto enzymu za I/R podmínek (Bonventre a kol., 1997; Kishimoto a kol., 2010; Saito a kol., 2012; Tabuchi a kol., 2003), jiné naopak naznačují její protektivní úlohu (Kerkelä a kol., 2011). Ve studiích na mozkové tkáni myši s delecí genu pro cPLA₂α vykazovaly nižší rozsah I/R poškození (Bonventre a kol., 1997; Kishimoto a kol., 2010; Tabuchi a kol., 2003) a podobný výsledek demonstrovali i Zhang a kol. při použití inhibitoru cPLA₂α na mozkové tkáni (Zhang a kol., 2012). Co se týče experimentů na srdeční tkáni, Saito a kol. ukázali, že myši s delecí genu pro cPLA₂α vykazovaly menší rozsah infarktu myokardu doprovázený sníženou koncentrací prostaglandinů. Současně navrhli, že tento proces probíhá prostřednictvím signální dráhy TNFα (Saito a kol., 2012). Na druhou stranu Kerkelä a kol. prokázali na tomto myším modelu protektivní účinky cPLA₂α, neboť rozsah I/R poškození myokardu u myši s delecí genu pro cPLA₂α byl výrazně horší v porovnání s kontrolami s funkčním genem pro cPLA₂α. Současně v srdcích myši s delecí genu pro cPLA₂α došlo k poklesu hladiny PGE₂, přičemž podání analogu PGE₂ misoprostolu těmto myším vedlo ke zmenšení velikosti infarktu myokardu. Studie navrhla, že protektivní účinek cPLA₂α *in vivo* spočívá v indukci produkce kardioprotektivních prostaglandinů (PGE₂). Současně se však nepodařilo prokázat protektivní úlohu cPLA₂α při ischemii *in vitro* (Kerkelä a kol., 2011). Z tohoto pohledu se zdá, že by zvýšené množství celkové a aktivované cPLA₂α v myokardu mohlo mít význam pro indukci kardioprotektivního mechanismu vyvolaného adaptací na IHH.

IHH snižuje iPLA₂ a sPLA₂IIA na úrovni proteinu.

Adaptace na IHH snížila zastoupení iPLA₂ a sPLA₂IIA v homogenátu a v membránové frakci a rovněž došlo k poklesu sPLA₂IIA v cytosolu. Po adaptaci na IHH nebyly na úrovni mRNA pozorovány žádné změny v expresi iPLA₂ ani sPLA₂IIA.

Ačkoliv byl pokles iPLA₂ pozorovaný po adaptaci na IHH relativně malý, může tento enzym hrát významnou roli v mechanismu adaptace na chronickou hypoxii, protože iPLA₂ jsou nejhojněji zastoupenými PLA₂ v myokardu (McHowat a Creer, 2004). Bylo prokázáno, že iPLA₂ preferenčně hydrolyzují peroxidované FA ve srovnání s nepoškozenými FA (Cummings a kol., 2000; Cummings a kol., 2002). V srdci jsou přítomny zejména izoformy iPLA₂β a iPLA₂γ (Cedars a kol., 2009). Za klidových podmínek se izoforma iPLA₂β vyskytuje v cytosolu (Cedars a kol., 2009) a také v mitochondriích (Williams and Gottlieb, 2002). Avšak během srdeční ischemie tento enzym translokuje z cytosolu na mikrosomální frakci membrán (Cedars a kol., 2009). Williams a Gottlieb (2002) také prokázali souvislost mezi působením iPLA₂β v srdečních mitochondriích a I/R poškozením. Podání inhibitoru iPLA₂ (BEL) vedlo ke snížení infarktu myokardu, což mohlo být způsobeno sníženou degradací membránových fosfolipidů a/nebo prostřednictvím mitoK_{ATP} kanálů (Williams a Gottlieb, 2002). AA uvolněná z fosfolipidů působením iPLA₂β tyto kanály totiž uzavírá (Kim a Duff, 1990; Williams a Gottlieb, 2002). iPLA₂β se podílí i na rozvoji arytmogeneze. Zvýšená incidence letálních komorových arytmií ve spojení s nárůstem exprese iPLA₂β byla prokázána na modelu transgenních myší, u nichž byla v srdci exprimována lidská srdeční iPLA₂β. Srdce těchto myší vystavená I/R podmínkám vykazovala významně vyšší výskyt letálních komorových arytmií v porovnání se srdci kontrolními. Inhibitor BEL podaný těsně před ischemií těmto arytmiím zabránil (Mancuso a kol., 2003). Tyto výsledky naznačují, že pokles množství iPLA₂ pozorovaný po adaptaci na IHH by mohl být prospěšný.

Na druhou stranu některé studie prokázaly protektivní roli iPLA₂. Konkrétně jde o izoformu iPLA₂γ, která je lokalizována v mitochondriích a/nebo v peroxizómech (Mancuso a kol., 2004). Experimenty na transgenních myších a myších s delecí genu pro iPLA₂γ demonstrovaly, že tento enzym je nezbytný pro zachování homeostázy fosfolipidů a funkce mitochondrií v srdci (Mancuso a kol., 2007a; Mancuso a kol., 2007b). Lipidová analýza odhalila výrazný pokles množství srdečních fosfolipidů u těchto zvířat doprovázený zvýšením hladiny lyzofosfolipidů (Mancuso a kol., 2007a). Navíc se u těchto zvířat projevilo nedostatečné zásobení srdce kyslíkem. Dysregulací exprese a/nebo aktivity iPLA₂γ došlo ke špatné funkci komplexu IV elektrontransportního řetězce v mitochondriích v důsledku poklesu obsahu kardiolipinu ve vnitřní mitochondriální membráně (Mancuso a kol., 2007b). Navíc

Kinsey a kol. prokázali, že izoforma iPLA₂ γ je enzymem odpovědným za odstraňování oxidačně modifikovaných fosfolipidů a za prevenci před důsledky lipidové peroxidace v mitochondriích, čímž se uplatňuje při ochraně buňky před oxidačním stresem. Podáním inhibitoru iPLA₂ γ totiž došlo k rychlejší peroxidaci lipidů provázené bobtnáním mitochondrií (Kinsey a kol., 2007a). Na druhou stranu u myši s delecí genu pro iPLA₂ γ vystavených I/R podmínkám došlo k výraznému poklesu množství peroxidovaných FA okolo ischemické oblasti v srdeční tkáni (Moon a kol., 2016). Rovněž bylo prokázáno, že iPLA₂ γ hraje úlohu v regulaci propustnosti mitochondriální membrány, jež je klíčová pro iniciaci apoptotického procesu (Kinsey a kol., 2007b). Kinsey a kol. demonstrovali uvolnění apoptotických mediátorů a buněčné smrti zprostředkované působením iPLA₂ γ . I z tohoto pohledu by mohla být snížená hladina iPLA₂ pozorovaná po adaptaci na IHH rovněž prospěšná (Kinsey a kol., 2007b).

Co se týče hypoxie, detekovali jsme sníženou expresi iPLA₂ na úrovni proteinu v myokardu po dlouhodobé adaptaci na IHH. Naopak McHowat a kol. pozorovali na kardiomyocytech králíka vystavených krátké hypoxické epizodě zvýšení aktivity na membránu vázaných iPLA₂ doprovázené zvýšením hladiny AA a lyzoplasmenylcholinu (McHowat a kol., 1998). Stejně hypoxické podmínky zvýšily aktivitu tohoto enzymu i v lidských endoteliálních buňkách vedoucí k akumulaci lyzoplasmenylcholinu (Meyer a McHowat, 2007). Na stejném hypoxickém modelu byla také prokázána souvislost mezi zvýšením aktivity iPLA₂ v kardiomyocytech a rozvojem elektrofyziologických změn vedoucím k arytmogenezi, neboť podáním inhibitoru BEL došlo k potlačení arytmogeneze (McHowat a kol., 1998).

Po adaptaci na IHH jsme v myokardu LV pozorovali trend k poklesu sPLA₂IIA na úrovni mRNA a signifikantní snížení na úrovni proteinu. Jak bylo zmíněno dříve, zánětlivé procesy stimuluje expresi a sekreci sPLA₂IIA (Schwemmer a kol., 2001; Yagami a kol., 2006). Bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace prozánětlivých cytokinů (zejména TNF α a IL-1 β) indukují expresi sPLA₂IIA v kardiomyocytech (De Windt a kol., 1997) stejně jako v buňkách hladkého svalstva potkana (Nakano a kol., 1990; Schwemmer a kol., 2001). Vysvětlení snížené hladiny sPLA₂IIA na úrovni proteinu po adaptaci na IHH není jednoduché. Kuwata a kol. předpokládají, že aktivace a pokles množství tohoto proteinu závisí na čase. Ukázali, že stimulace fibroblastů prozánětlivými cytokiny aktivuje cPLA₂ α , což vede k produkci eikosanoidů prostřednictvím biosyntetické dráhy 12-, 15-LOX a následně také k regulaci exprese sPLA₂IIA mRNA. Aktivací sPLA₂IIA došlo ke zvýšení produkce PGE₂ vedoucí k indukci receptorů pro protizánětlivé cytokiny, což následně způsobilo iniciaci signální dráhy vedoucí přes tyto receptory za účelem poklesu exprese sPLA₂IIA mRNA (Kuwata a kol., 2005). V souladu s těmito zjištěními jsme i my v myokardu potkana adaptovaného na IHH pozorovali zvýšenou

hladinu PGE₂ (Míčová a kol., 2016 – příloha A) a rovněž nárůst protizánětlivého cytokinu interleukinu 10 (nepublikovaná data). Navíc studie zabývající se úlohou sPLA₂IIA za podmínek akutní I/R ukázaly, že inhibice tohoto proteinu je spojena s menším rozsahem poranění srdeční tkáně a lepším přežíváním kardiomyocytů (Krijnen a kol., 2006; Nijmeijer a kol., 2003; Van Dijk a kol., 2009). Všechna tato zjištění jsou v souladu s námi pozorovanou sníženou hladinou sPLA₂IIA v myokardu potkanů adaptovaných na IHH.

5.1.2 IMUNOFLUORESCENČNÍ ANALÝZA p-CPLA₂α PO ADAPTACI NA IHH

p-cPLA₂α translokuje do jádra po adaptaci na IHH.

Po adaptaci na IHH došlo k významné kolokalizaci p-cPLA₂α s jádrem, a naopak nebyla detekována kolokalizace p-cPLA₂α se sarkolemálními ani mitochondriálními membránami. Analýza imunoreaktivity rovněž potvrdila zvýšené množství p-cPLA₂α v jaderné frakci. Ke stejným závěrům došli i Grewal a kol., kteří po stimulaci lidských endoteliálních buněk selektivním ionoforem pro Ca²⁺ ionty pozorovali přesun cPLA₂α na jaderné struktury, a nikoliv na membrány endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu (Grewal a kol., 2005). Tato data naznačují, že jaderná obálka může být primárním místem produkce AA v myokardu pokusných zvířat adaptovaných na IHH. To je v souladu se studií Spencer a kol., kteří prokázali v jaderné obálce lokalizaci jak COX-1, tak COX-2, enzymů katalyzujících konverzi AA za vzniku oxidačních metabolitů (Spencer a kol., 1998).

Navíc řada dalších studií na různých buňkách hlodavců potvrdila po stimulaci translokaci cPLA₂α na jaderné struktury (Glover a kol., 1995; Hirabayashi a kol., 1999; Kan a kol., 1996; Peters-Golden a kol., 1996; Peters-Golden a kol., 1996; Schievella a kol., 1995; Sierra-Honigmann a kol., 1996). Rovněž bylo prokázáno, že cPLA₂α interaguje s proteinem vimentinem, který je obsažen v intermediárních filamentech v jádře. Ukázalo se, že interakce mezi cPLA₂α a vimentinem je nezbytná k hydrolýze AA. Zdá se tedy, že vimentin by mohl fungovat jako adaptorový protein pro cPLA₂α v jádře (Nakatani a kol., 2000).

5.1.3 VLIV IHH NA SIGNÁLNÍ PROTEINY AKTIVUJÍCÍ cPLA₂α

IHH zvyšuje množství fosforylovaných MAPK (p-PKCα, p-ERK1/2 a p-p38) aktivujících cPLA₂α.

Jak již bylo uvedeno, na úrovni mRNA nebyly po adaptaci na IHH pozorovány žádné změny v expresi cPLA₂α. Znamená to tedy, že je cPLA₂α za těchto podmínek aktivována posttranslačně. Pro objasnění molekulárního mechanismu, kterým IHH reguluje aktivitu cPLA₂α, jsme se zaměřili na intracelulární signální kaskádu odpovědnou za aktivaci tohoto enzymu. Již dříve bylo prokázáno, že za fosforylaci, a tedy aktivaci cPLA₂α, jsou zodpovědné MAPK, zejména ERK1/2 a p38 (Lin a kol., 1993; Kramer a kol., 1996). Ukázali jsme, že adaptace na IHH zvýšila zastoupení fosforylovaných forem ERK1/2 a p38 v homogenátu myokardu LV potkana, ačkoliv se jejich celkové množství nezměnilo. Naše výsledky jsou v souladu se studií Morel a kol., kteří po adaptaci na chronickou hypoxii rovněž pozorovali v myokardu zvýšené množství p-ERK1/2 a p-p38 (Morel a kol., 2006). Na druhou stranu Rafiee a kol. prokázali, že za podmínek chronické hypoxie dochází v myokardu k aktivaci kináz p38 a Jun kináz, nikoliv však ERK1/2, a že inhibice těchto aktivovaných kináz vedla k potlačení kardioprotektivního účinku (Rafiee a kol., 2002). Zajímavé je, že Seko a kol. pozorovali za hypoxických podmínek a rovněž za podmínek hypoxie/reoxygenace v kardiomyocytech rychlou aktivaci těchto stresových kináz (Seko a kol., 1996; Seko a kol., 1997). Navíc MAPK jsou v buňce také významně aktivovány při odpovědi na zvýšený oxidační stres (Clerk a kol., 1998), který byl taktéž pozorován za podmínek IHH (Kolář a kol., 2007).

PKC se rovněž podílejí na regulaci aktivace cPLA₂α, a tedy i produkce AA. Již dříve bylo prokázáno, že PKC jsou zahrnuty v signální dráze kardioprotekce. Adaptace na IHH vedla ke zvýšení zastoupení PKCδ (Hlaváčková a kol., 2010; Kolář a kol., 2007; Neckář a kol., 2005) a naopak k poklesu PKCε (Hlaváčková a kol., 2010). Co se týče souvislosti s cPLA₂α, You a kol. naznačili, že signální dráha PKCδ-ROS-NFκB hraje klíčovou roli v indukci exprese cPLA₂α v buňkách epitelu dýchacích cest (You a kol., 2004). Rafiee a kol. ukázali, že během adaptace na chronickou hypoxii dochází k aktivaci PKCε, která následně stimuluje p38. Navíc následnou inhibicí PKCε a p38 došlo k potlačení kardioprotektivního efektu vyvolaného chronickou hypoxií (Rafiee a kol., 2002). V naší studii jsme ukázali, že adaptace na IHH je spojena s indukcí PKCα. Již dříve bylo prokázáno, že PKCα je klíčovým enzymem participujícím na aktivaci cPLA₂α (Anfuso a kol., 2007). Aktivace PKCα je zprostředkována diacylglycerolem a inositol-1,4,5-trifosfátem/Ca²⁺ ionty, tedy druhými posly v signální dráze vedoucí od receptorů spřažených s heterotrimerními G proteiny a enzymu PLC (Svoboda a kol.,

2004). Chakraborti a kol. ukázali, že vystavení endoteliálních buněk působení peroxynitritu zvýšilo aktivitu proteáz, což mělo za následek aktivaci PKC α . PKC α posléze aktivovala cPLA $_2\alpha$, a tedy i uvolňování AA. Inhibitor G proteinů pertussis toxin potlačil peroxynitritem vyvolaný nárůst aktivity cPLA $_2\alpha$ a hydrolýzu AA v těchto buňkách, ačkoliv nedošlo ke změnám intracelulární koncentrace Ca $^{2+}$ iontů, aktivity proteáz ani aktivity PKC α . Navíc působením tohoto inhibitoru došlo k fosforylaci G α proteinů v buněčných membránách, a naopak použitím inhibitoru PKC α došlo k potlačení této fosforylace. Je tedy zřejmé, že existuje přímá souvislost mezi inhibicí G α proteinů a potlačením aktivace cPLA $_2\alpha$ a rovněž mezi produkcí ROS regulujících aktivaci PKC α , a tedy i cPLA $_2\alpha$ (Chakraborti a kol., 2005).

5.1.4 VLIV IHH NA ZASTOUPENÍ CÍLŮ cPLA $_2\alpha$

IHH zvyšuje COX-2 a PGE $_2$.

Vzhledem k tomu, že IHH zvýšila množství celkové a fosforylované cPLA $_2\alpha$, rovněž jsme stanovili relativní zastoupení konstitutivní COX-1 a indukibilní COX-2 jako rychlost limitujících enzymů při syntéze eikosanoidů. Po adaptaci na IHH došlo v myokardu LV ke zvýšení množství COX-2, zatímco se zastoupení COX-1 nezměnilo. Podobně došlo za hypoxických podmínek ke zvýšené expresi genu pro COX-2 prostřednictvím vazby NF κ B p65 proteinu do oblasti promotoru tohoto genu (Schmedtje a kol., 1997). Enzym COX-2 je většinou spojován s negativním vlivem na myokard (Oshima a kol., 2006; Saito a kol., 2004; Yang a kol., 2000). Na druhou stranu bylo prokázáno, že jeho zvýšená aktivita je v myokardu nezbytná pro vyvolání protekce proti infarktu a srdečnímu stunningu v pozdní fázi preconditioningu (Bolli, 2007; Bolli a kol., 2002; Shinmura a kol., 2000).

Co se týče produkce eikosanoidů, ukázali jsme, že adaptace na IHH zvýšila koncentraci PGE $_2$. Tento výsledek je v souladu s prací Kerkelä a kol., kteří demonstrovali pokles koncentrace PGE $_2$ u myší s delecí genu pro cPLA $_2\alpha$. Podání analogu PGE $_2$ misoprostolu myším s delecí genu pro cPLA $_2\alpha$ došlo k poklesu velikosti infarktu myokardu za I/R podmínek. To znamená, že protektivní účinek cPLA $_2\alpha$ by mohl spočívat v indukcii produkce kardioprotektivního PGE $_2$ (Kerkelä a kol., 2011). Podobně Bolli a kol. prokázali, že stimulací COX-2 v pozdní fázi preconditioningu došlo k navýšení produkce PGE $_2$ a také prostaglandinu I $_2$, které snižují velikost infarktu myokardu aktivací mitoK $_{ATP}$, snížením uvolňování Ca $^{2+}$ iontů a potlačením funkce prozánětlivých neutrofilů (Bolli a kol., 2002).

5.1.5 ODOLNOST IZOLOVANÝCH KARDIOMYOCYTŮ VŮČI SIMULOVANÉ ISCHEMII/REPERFÚZI: VLIV IHH A INHIBITORU cPLA₂α PYROFENONU

Pyrofen nezablokoval protektivní efekt vyvolaný IHH.

Borchert a kol. zjistili, že protektivní účinek indukovaný adaptací na chronickou hypoxii přetrvává v kardiomyocytech i po jejich izolaci (Borchert a kol., 2011). Abychom potvrdili úlohu cPLA₂α v kardioprotektivním účinku IHH, aplikovali jsme specifický inhibitor cPLA₂α pyrofenon. Kardiomyocyty vyizolované z experimentálních zvířat z normoxické skupiny a skupiny adaptované na IHH byly rozděleny do podskupin dle přidávaných farmak – 1) bez přídavku; 2) přídavek specifického inhibitoru cPLA₂α pyrofenonu; 3) přídavek rozpouštědla DMSO, neboť pyrofenon je standardně dodáván rozpuštěný v DMSO. Všechny podskupiny byly vystaveny akutní metabolické inhibici a re-energizaci. Měřením buněčné viability byl prokázán kardioprotektivní účinek u všech experimentálních podskupin adaptovaných na IHH ve srovnání s kontrolami, které nebyly vystaveny metabolické inhibici a re-energizaci, a rovněž ve srovnání s odpovídajícími normoxickými podskupinami. Nicméně v této studii přídavek žádného z farmak výrazněji neovlivnil viabilitu kardiomyocytů jak u normoxických, tak u hypoxických podskupin. Překvapivé ale je, že DMSO sám o sobě vykazoval protektivní účinky. Nedávno Man a kol. demonstrovali, že v kardiomyocytech DMSO snížil míru poškození způsobenou ROS. Děje se tak prostřednictvím regulace aktivity hemoxygenázy 1, antioxidantu spojeného s metabolismem železa (Man a kol., 2014).

Ačkoliv se použitím inhibitoru pyrofenonu na izolovaných kardiomyocytech nepodařilo prokázat účast cPLA₂α v kardioprotektivním účinku IHH, nelze vyloučit její zapojení. Např. Kerkelä a kol. demonstrovali větší rozsah I/R poškození srdeční tkáně u myší s delecí genu pro cPLA₂α v experimentu *in vivo*, ale nepodařilo se jim za podmínek simulované ischemie prokázat protektivní roli cPLA₂α *in vitro* (Kerkelä a kol., 2011). Podobně i výsledky dalších studií na izolovaných kardiomyocytech nepotvrdily protektivní roli cPLA₂α použitím různých inhibitorů (Engelbrecht a Ellis, 2007; Winstead a kol., 2005). Všechna tato pozorování jsou v souladu s výsledky naší studie, kdy akutní podání pyrofenonu před simulovanou I/R nezrušilo kardioprotektivní efekt vyvolaný adaptací na IHH. Je možné, že aktivace cPLA₂α může být významná pouze během dlouhodobé adaptace na chronickou hypoxii, zatímco její inhibice při akutní fázi ischemie nemá žádný vliv.

5.1.6 POTENCIONÁLNÍ ZAPOJENÍ cPLA₂α V PROTEKTIVNÍ DRÁZE INDUKOVANÉ ADAPTACÍ NA IHH

IHH zvyšuje podíl množství β₂-AR spřažených s G_i proteiny, což vede ke stimulaci ERK1/2 a p38, které následně aktivují signální dráhu cPLA₂α/COX-2/PGE₂.

Existuje několik studií zabývajících se β-adrenergní signalizací v srdeční tkáni za hypoxických podmínek. Avšak jejich výsledky jsou kontroverzní. V závislosti na experimentálních podmínkách nebyla pozorována změna, anebo bylo detekováno snížení celkového množství β-AR (Hahnová a kol., 2016; Hrabasová a kol., 2003; León-Velarde a kol., 2001). Současně však bylo zjištěno, že se za podmínek chronické hypoxie nemění nebo se snižuje množství G_sα proteinů, nemění se nebo se zvyšuje zastoupení G_iα proteinů a že dochází k poklesu aktivity adenylátcyklázy (Kacimi a kol., 1995; Pei a kol., 2000). Dle našeho adaptačního protokolu se po IHH nezměnilo celkové množství β-AR ani jejich disociační konstanta. Avšak došlo ke zvýšení podílu množství β₂-AR na úkor množství β₁-AR. Tento posun v podílu β-AR je doprovázený výrazným poklesem množství adenylátcyklázy 5 (majoritní izoforma adenylátcyklázy v srdeční tkáni) a zvýšením inhibičních G_iα proteinů. To je v souladu s výsledky studie Hrabasová a kol., 2003, kteří po adaptaci na IHH pozorovali snížení aktivity srdeční adenylátcyklázy. Navíc Okumura a kol. demonstrovali, že snížení exprese adenylátcyklázy 5 u myši vedlo ke kardioprotekci (Okumura a kol., 2003). Kromě toho Tong a kol. poukázali na význam β₂-AR při indukci protekce při preconditioningu (Tong a kol., 2005). Přepnutí signalizace β₂-AR spřažených s G_s proteiny na šíření signálu prostřednictvím G_i proteinů podle všeho souvisí s PKA. Již dříve bylo prokázáno, že fosforylace prostřednictvím PKA nejen že snižuje interakci β₂-AR s G_s proteiny, ale současně zvyšuje interakci β₂-AR s G_i proteiny. Vlivem těchto změn dochází k inhibici aktivity adenylátcyklázy prostřednictvím G_i proteinů a současně poklesu koncentrace cAMP (Daaka a kol., 1997).

Pokud jde o cPLA₂α, Magne a kol. prokázali, že stimulací β₂-AR dochází k hydrolýze AA v embryonálních kardiomyocytech kuřete. Děje se tak prostřednictvím aktivace ERK1/2 a p38, které následně stimulují cPLA₂α (Magne a kol., 2001). Navíc Mackay a Mochly-Rosen (2001) demonstrovali, že AA jako hydrolytický produkt působení cPLA₂α přímo pozitivně moduluje aktivitu PKCδ a PKCε v srdci. Pavoine a kol. uvedli, že regulace cPLA₂α prostřednictvím β₂-AR v lidském srdci závisí na míře spřaženosti tohoto receptoru s adenylátcyklázou, čímž prokázali propojení β₂-AR a cPLA₂α v srdeční tkáni (Pavoine a kol., 2003). Navíc Ait-Mamar a kol. demonstrovali, že cPLA₂α má v kardiomyocytech potkana negativní vliv na šíření signálu prostřednictvím dráhy β₂-AR/adenylátcykláza/PKA indukované Ca²⁺ ionty. Děje se tak

prostřednictvím poklesu aktivace eNOS a také snížením fosforylace fosfolambanu (Ait-Mamar a kol., 2005). Naše výsledky naznačují, že během adaptace na IHH dochází v myokardu potkana ke zvýšení podílu signální kaskády vedoucí od β_2 -AR/ G_i proteinů, která následně může regulovat cPLA₂ α /COX-2 prostřednictvím aktivace ERK/p38. Tyto závěry ještě podpořily studie, kde za různých experimentálních podmínek pozorovaly zapojení β_2 -AR v regulaci a aktivaci ERK/p38 (Dang a kol., 2008; Sato a kol., 2013).

5.2 CÍL 2: VLIV IHH NA ZASTOUPENÍ PLA₂ A SLOŽENÍ FA V SRDEČNÍ TKÁNI: VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU

5.2.1 VLIV IHH NA RELATIVNÍ MNOŽSTVÍ PLA₂: VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU

Podávání antioxidantu tempolu zabránilo navýšení cPLA₂ α a p-cPLA₂ α po IHH.

V další fázi projektu jsme sledovali v myokardu LV potkana vliv IHH a podávání antioxidantu tempolu na množství cPLA₂ α , iPLA₂ a sPLA₂IIA s cílem zjistit, zda se ROS produkované při IHH podílejí na změnách v množství těchto enzymů za hypoxických podmínek. Ví se, že se PLA₂ účastní zprostředkování buněčné odpovědi na redoxní a zánětlivé stavy (Jenkins a kol., 2009; Niessen a kol., 2003; Swift a kol., 2007), jež současně hrají roli při adaptaci na chronickou hypoxii (Chytilová a kol., 2015; Kolář a kol., 2007). Prokázali jsme, že je adaptace na IHH spojena se zvýšenou produkcí ROS, která se podílí na aktivaci endogenních protektivních drah v myokardu. Podání antioxidantu N-acetylcysteinu experimentálním zvířatům během adaptace snížilo oxidační stres a zároveň zrušilo protektivní efekt vyvolaný IHH (Kolář a kol., 2007). V této studii jsme ukázali, že chronické podávání tempolu kompletně zrušilo navýšení hladin cPLA₂ α a p-cPLA₂ α vyvolaných adaptací na IHH, což naznačuje, že jsou tyto enzymy regulovány ROS. V souladu s našimi výsledky bylo prokázáno, že v závislosti na koncentraci H₂O₂ se zvýšila aktivita cPLA₂ α ve fibroblastech (Van Rossum a kol., 2004) a že za podmínek oxidačního stresu způsobeného H₂O₂ došlo ke zvýšené hydrolyze AA z membránových fosfolipidů kardiomyocytů, která byla potlačena inkubací se specifickým inhibitorem cPLA₂ α pyrofenonem (Winstead a kol., 2005). Zvýšené množství cPLA₂ α za podmínek IHH může rovněž přispívat k produkci ROS. Jednak cPLA₂ α preferenčně hydrolyzuje AA z membránových fosfolipidů (Clark a kol., 1991; Grandits and Oostenbrink, 2015), kdy mohou ROS vznikat jako vedlejší produkty při konverzi AA na eikosanoidy (Kim a kol., 2008), a jednak působením cPLA₂ α dochází ke zvýšení aktivity NOX, a tedy produkci ROS v srdečních buňkách (Khan a kol., 2015) i v dalších typech buněk (Colston et al, 2005;

Chakraborti a kol., 2015; Dana a kol., 1998). Z výše uvedeného vyplývá, že regulace cPLA₂α za podmínek IHH může stimulovat produkci ROS, a tedy souviset se signální kaskádou indukovanou v chronicky hypoxickém myokardu.

Tato studie poukazuje na významný vliv ROS při regulaci aktivace cPLA₂α v srdci potkana adaptovaného na IHH. Lze říci, že cPLA₂α stejně jako její hydrolytický produkt AA se významně podílí na patologických i protektivních mechanismech a že účinky tohoto enzymu na srdeční tkáň jsou závislé na redoxním a metabolickém stavu kardiomyocytů.

Podávání tempolu snížilo množství sPLA₂IIA u normoxické skupiny.

Jak již bylo řečeno, ROS se účastní signální dráhy kardioprotektivního účinku indukovaného adaptací na IHH, ačkoliv za podmínek akutní I/R mají škodlivé účinky (Kolář a kol., 2007). Položili jsme si proto otázku, zda se by se na změnách v zastoupení iPLA₂ a sPLA₂IIA v chronicky hypoxickém myokardu mohly podílet ROS podobně jako v případě cPLA₂α.

Předpokladem bylo, že pokles iPLA₂ pozorovaný po adaptaci na IHH může být způsoben zvýšeným oxidačním stresem. ROS totiž inhibují aktivitu iPLA₂ oxidací jejich Cys zbytků (Song a kol., 2006), které jsou v její struktuře hojně zastoupeny (Dennis a kol., 2011). Tato pozorování jsou v souladu se studii, ve kterých inhibice iPLA₂ inhibitorem BEL vyvolala kardioprotekci (Mancuso a kol., 2003; Sargent a kol., 1996; Williams a Gottlieb, 2002). BEL totiž modifikuje Cys zbytky ve struktuře tohoto proteinu (Song a kol., 2006). Výsledky našeho experimentu ukázaly, že podávání tempolu nezvrátilo efekt IHH na množství iPLA₂ u chronicky hypoxické skupiny.

Z dosavadních studií vyplývá, že iPLA₂ mohou působit protektivně prostřednictvím remodelace oxidačně poškozených membránových fosfolipidů (Cummings a kol., 2000; Cummings a kol., 2002; Kinsey a kol., 2005). iPLA₂ totiž přednostně hydrolyzují peroxidované FA ve srovnání s nepoškozenými FA (Cummings a kol., 2000; Cummings a kol., 2002). Vlivem konformačních změn, které v membráně nastanou za podmínek oxidačního stresu, dochází k nárůstu hydrolytické aktivity iPLA₂ na membránách, a tím i deacylaci peroxidovaných FA z molekuly fosfolipidů (McHowat a kol., 2001a; McHowat a kol., 2001b). Na druhou stranu může být působení iPLA₂ škodlivé. Za I/R podmínek totiž fosfolipidy pouze odbourávají, nedochází k obnově membrány, protože buňka nemá dostatečné zásoby ATP potřebné na reacylační reakce, což může v konečném důsledku vést ke změně fluidity membrány, narušení homeostáze Ca²⁺ iontů a k iniciaci apoptotického procesu (Balboa a Balsinde, 2002; Balsinde a kol., 1995; Pérez a kol., 2004; Pérez a kol., 2006; Williams a Gottlieb, 2002). V tomto ohledu

se zdá, že by námi pozorovaný pokles množství iPLA₂ v myokardu potkanů adaptovaných na IHH mohl být prospěšný.

Co se týče sPLA₂IIA, její snížené množství pozorované po adaptaci na IHH se zdá být prospěšné s ohledem na aktivaci tohoto enzymu při zánětlivých stavech (De Windt a kol., 1997; Nakano a kol., 1990; Schwemmer a kol., 2001; Yagami a kol., 2006). Zdá se však, že jde o časově závislý proces (Kuwata a kol., 2005). V experimentu s antioxidantem se nám nepodařilo prokázat zapojení ROS při regulaci sPLA₂IIA za IHH podmínek. Studie zabývající se úlohou sPLA₂IIA v srdeční tkáni za I/R podmínek prokázaly, že inhibicí tohoto proteinu je dosaženo menšího rozsahu poškození a také lepší viability kardiomyocytů (Krijnen a kol., 2006; Nijmeijer a kol., 2003; Van Dijk a kol., 2009). Při infarktu myokardu jsou buňky vyskytující se nejbliže akutního ohrožení poškozeny ireverzibilně, zatímco kardiomyocyty okolo této oblasti jsou poškozeny reverzibilně. S obnovením průtoku krve při reperfúzi se sPLA₂IIA dostává k reverzibilně poškozeným buňkám, jimž způsobí ještě větší míru poškození štěpením fosfolipidů z membrán těchto kardiomyocytů (Van Dijk a kol., 2009). Na druhou stranu De Windt a kol. ukázali, že srdce kontrolních myší i myší s delecí genu pro sPLA₂IIA vykazovaly po I/R stejnou míru postischemické obnovy srdeční tkáně a stejné hladiny ATP a akumulace FA (De Windt a kol., 2001).

5.2.2 VLIV IHH NA SLOŽENÍ FA: VLIV ANTIOXIDANTU TEMPOLU

IHH zvyšuje podíl n-3 PUFA a snižuje podíl n-6 PUFA v srdečních fosfolipidech.

Potvrdili jsme předchozí výsledky naší laboratoře ukazující vliv IHH na remodelaci FA v srdečních fosfolipidech. Po adaptaci na IHH došlo ke zvýšení SFA vlivem nárůstu obsahu kyseliny palmitové (16:0), zatímco množství MUFA zůstalo nezměněné. Adaptace na IHH snížila množství celkových n-6 PUFA v důsledku poklesu zastoupení kyseliny linolové (18:2n-6), přičemž toto snížení je vykompenzováno nárůstem podílu celkových n-3 PUFA vyvolaného adaptací na IHH, a to zejména zvýšením podílu DHA (22:6n-3). Ježková a kol. pozorovali po IHH pokles koncentrace mitochondriálního kardiolipinu provázený jeho remodelací. Po adaptaci na IHH došlo v kardiolipinu k poklesu kyseliny linolové ve prospěch DHA (Ježková a kol., 2002). Novák a kol. pozorovali v myokardu potkana po tlakovém přetížení během postnatálního vývoje podobnou remodelaci fosfolipidů. Zdá se tedy, že jde o adaptivní odpověď myokardu na stresové podmínky (Novák a kol., 2012). Navíc dieta obohacená o n-3 PUFA potencovala v myokardu potkana protektivní efekt IHH na arytmogenezi (Hlaváčková a kol., 2007). Nicméně zapojení ROS při remodelaci srdečních fosfolipidů se zdá být nepravděpodobné. Ukázali jsme, že podávání tempolu nemělo vliv na složení FA v srdečních

fosfolipidech jak u normoxických zvířat, tak u zvířat adaptovaných na IHH. Podobně antioxidant L-karnitin neovlivnil zvýšení n-3 PUFA pozorované v chronicky hypoxickém myokardu (Oka a kol., 2008).

Jak již bylo řečeno, iPLA₂ se v myokardu vyskytují ze všech PLA₂ nejhojněji (McHowat a Creer, 2004). Experimenty na mozkové tkáni ukázaly, že DHA, a nikoliv AA, je preferovaným substrátem pro iPLA₂ (Strokin a kol., 2003; Strokin a kol., 2007). V tomto ohledu snížené množství iPLA₂ pozorované po adaptaci na IHH může být možným vysvětlením zvýšeného podílu DHA v srdečních fosfolipidech za podmínek IHH.

5.3 CÍL 3: VLIV CNH A INH NA MNOŽSTVÍ PLA₂ A ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ V SRDEČNÍ TKÁNI

5.3.1 STANOVENÍ RELATIVNÍHO MNOŽSTVÍ PLA₂ PO ADAPTACI NA CNH A INH CNH zvýšila množství cPLA₂ α a iPLA₂, zatímco adaptace na INH neměla vliv.

V předchozí studii jsme stanovili množství PLA₂ na modelu protektivní IHH. V další etapě jsme analyzovali zastoupení PLA₂ v homogenátu na jiném protektivním modelu CNH a rovněž na neprotektivní INH. Po adaptaci na CNH došlo ke zvýšení množství iPLA₂ v homogenátu myokardu LV potkana, avšak denní 1hodinová epizoda reoxygenace během adaptace na INH toto navýšení zcela potlačila. Podobný trend lze pozorovat i u cPLA₂ α , kde vlivem velkého rozptylu dat došlo k podobným, leč nesignifikantním výsledkům. Avšak statisticky významného zvýšení množství cPLA₂ α a rovněž p-cPLA₂ α po adaptaci na CNH bylo dosaženo při studii vlivu CNH a fyzické zátěže (Alánová a kol., 2017 – příloha D). Adaptace jak na CNH, tak na INH neměly vliv na množství proteinu sPLA₂IIA.

Jak již bylo uvedeno, cPLA₂ α preferenčně hydrolyzuje AA z membránových fosfolipidů (Clark et al, 1991; Grandits and Oostenbrink, 2015). Volná AA je substrátem pro produkci bioaktivních eikosanoidů působením COX, LOX a epoxygenáz a volná AA může být rovněž signální molekulou (Kim a kol., 2008; Linkous a Yazlovitskaya, 2010). Bylo prokázáno, že AA aktivuje BK_{Ca} kanály v mitochondriích (Martín a kol., 2014). Tyto kanály se za hypoxických podmínek otevírají (Cheng a kol., 2008), a přispívají tak k protekci myokardu (Xu a kol., 2002). Borchert a kol. prokázali účast těchto kanálů v protektivním účinku CNH (Borchert a kol., 2011). Zvýšené množství cPLA₂ α pozorované po adaptaci na CNH by tedy mohlo vést ke zvýšení hladiny AA. Znamená to tedy, že AA produkovaná působením cPLA₂ α za podmínek CNH by mohla přispívat k otevírání BK_{Ca} kanálů, a tedy ke kardioprotektivnímu účinku

indukovanému adaptaci na CNH. Navíc zapojení cPLA₂ α v indukci protekce u tohoto hypoxického modelu naznačily výsledky, kdy chronickým podáváním antagonisty β_1 -AR metoprololu během adaptace došlo ke zrušení protektivního účinku CNH a rovněž k potlačení nárůstu celkové i fosforylované cPLA₂ α vyvolaného adaptací na CNH (nepublikovaná data).

Po adaptaci na CNH došlo ke zvýšení množství iPLA₂, ale adaptace na CNH neměla vliv na množství tohoto enzymu. Také výsledky analýzy mRNA ukázaly, že po adaptaci na CNH došlo k nárůstu exprese iPLA₂ (nepublikovaná data). Zdá se tedy, že by iPLA₂ mohla být zapojena v kardioprotektivním účinku v ochraně před I/R poškozením. Výsledky jednotlivých studií jsou ale značně kontroverzní. Některé studie poukazují na protektivní působení iPLA₂ prostřednictvím remodelace fosfolipidů v poškozených membránách. Podle těchto studií hraje iPLA₂ významnou roli v ochraně buněčných membrán před oxidačním poškozením (Cummings a kol., 2000; Cummings a kol., 2002; Kinsey a kol., 2005). Význam iPLA₂ lze demonstrovat v případě kardiotoxických účinků antracyklinů, které jsou účinnými farmaky při protinádorové terapii. Vedlejší toxické účinky antracyklinů spočívají ve zvyšování oxidační zátěže indukci produkce O₂[•] způsobující peroxidaci fosfolipidů v membráně (McHowat a kol., 2001a). Bylo prokázáno, že inhibice iPLA₂ způsobená antracykliny v kardiomyocytech je jednou z příčin jejich kardiotoxicity, protože dojde ke snížení schopnosti reparace fosfolipidů poškozených oxidačním stresem. Navíc snížením funkce iPLA₂ dochází k hromadění hydroperoxidů ve fosfolipidech, které způsobují destrukci membrány (McHowat a kol., 2001a; Swift a kol., 2003; Swift a kol., 2007). Z tohoto pohledu je její nárůst během adaptace na CNH jednoznačně prospěšný. Na druhou stranu řada studií poukazuje spíše na poškozující účinky iPLA₂ za I/R podmínek (Mancuso a kol., 2003; Sargent a kol., 1996; Williams a Gottlieb, 2002).

Po adaptaci na CNH nedošlo ke změnám v zastoupení sPLA₂IIA v myokardu LV potkana. Přestože bylo prokázáno, že zánětlivé procesy a nárůst hladiny ROS generovaných za I/R podmínek stimulují expresi a sekreci sPLA₂ (Yagami a kol., 2006), zdá se, že za podmínek CNH jako modelu mírné hypoxie nevzniká dostatečné množství zánětlivých faktorů a ROS, které by aktivovaly tento enzym. Nicméně pilotní výsledky demonstrovaly, že adaptace na CNH by mohla tento enzym indukovat na úrovni exprese mRNA (nepublikovaná data).

5.3.2 VLIV CNH NA SIGNÁLNÍ PROTEINY AKTIVUJÍCÍ $cPLA_2\alpha$ A CÍLOVÉ MOLEKULY TOHOTO ENZYMU

CNH zvýšila $cPLA_2\alpha$, p- $cPLA_2\alpha$ a COX-2, ale neměla vliv na množství celkových ani fosforylovaných MAPK (ERK1/2 a p38).

Po adaptaci na CNH nedošlo stejně jako u modelu IHH k žádným změnám exprese $cPLA_2\alpha$ na úrovni mRNA (nepublikovaná data). Znamená to tedy, že je tento enzym aktivován posttranslačně stejně jako v případě adaptace na IHH. Cílem této etapy bylo sledovat zastoupení proteinů aktivujících $cPLA_2\alpha$ po adaptaci na CNH. Výsledky, které jsme v naší laboratoři získali, nebyly jednoznačné. Kyclerová ve své diplomové práci pozorovala, že adaptace na CNH vedla k nepatrnému, leč signifikantnímu zvýšení fosforylovaných forem PKC α , ERK1/2 a p38, ačkoliv se celková množství těchto signálních proteinů nezměnila (Kyclerová, 2015). V dalším experimentu jsme rovněž pozorovali nepatrný nárůst u p-p38 a p-ERK1/2 po CNH, ten však nebyl statisticky významný. Lze tedy usuzovat, že na rozdíl od IHH, během adaptace na CNH nejsou ERK1/2 a p38 majoritními signálními molekulami aktivujícími $cPLA_2\alpha$. Avšak podobně jako u modelu IHH jsme pozorovali po adaptaci na CNH zvýšené množství COX-2, zatímco zastoupení COX-1 se nezměnilo (Alánová a kol., 2017 – příloha D). Podobně Chytilová a kol. pozorovali po adaptaci na CNH nárůst množství COX-2 v myokardu (Chytilová a kol., 2015). Tyto výsledky tedy naznačují význam $cPLA_2\alpha$ i v modelu CNH.

5.3.3 VLIV CNH A INH NA RELATIVNÍ MNOŽSTVÍ SOD A KONCENTRACI MARKERU OXIDAČNÍHO STRESU MDA

CNH zvýšila množství MnSOD, zatímco adaptace na INH neměla vliv na množství tohoto enzymu. INH zvýšila koncentraci MDA.

V další etapě projektu jsme sledovali zastoupení antioxidantních enzymů po adaptaci na CNH a INH. Prokázali jsme, že experimentální zvířata vystavená CNH jsou odolnější proti I/R poškození myokardu, avšak denní 1hodinová epizoda reoxygenace (INH) tuto odolnost zcela potlačila (Neckář a kol., 2013 – příloha C). Otázkou tedy zůstává, jaký mechanismus je spojený s adaptací na INH, při němž dochází k potlačení poklesu velikosti infarktu myokardu pozorovaného po adaptaci na CNH. Zdá se, že by roli mohl hrát nadbytek oxidačního stresu. Ukázalo se, že za podmínek chronické hypoxie dochází ke zvýšené produkci ROS, která je nezbytná pro indukci kardioprotekce (Kolář a kol., 2007). Zapojení ROS v signalizaci protektivního mechanismu může v srdci zvýšit kapacitu antioxidantních obranných systémů s cílem omezit oxidační stres a zmenšit poškození tkáně (Guo a kol., 2009; Zhu a kol., 2004).

Balková a kol. prokázali, že po adaptaci na IHH došlo v mitochondriích ke zvýšení množství a také aktivity MnSOD, která navíc negativně koreluje s velikostí infarktu myokardu (Balková a kol., 2011). Na druhou stranu na modelu chronické hypoxie napodobující podmínky obstrukční spánkové apnoe, která je charakterizována střídáním epizod hypoxie a normoxie během spánku a která je spojená se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění, nedošlo u myši k žádným změnám v zastoupení MnSOD (Park a Suzuki, 2007). V souladu s těmito pozorováními jsme prokázali, že adaptace na CNH zvýšila množství MnSOD v homogenátu myokardu LV potkana bez ovlivnění koncentrace MDA. Avšak denní 1hodinová epizoda reoxygenace během adaptace na INH potlačila zvýšené množství MnSOD pozorované po CNH a také zvýšila koncentraci MDA, což poukazuje na zvýšenou peroxidaci lipidů v srdeční tkáni. Zdá se tedy, že podmínky INH, podobně jako model chronické hypoxie napodobující podmínky obstrukční spánkové apnoe, mohou mít za následek narušení antioxidační obrany a následné zvýšení oxidačního stresu, což napomáhá k rozvoji I/R poškození myokardu. Tyto výsledky podpořila studie Ramond a kol., kteří na modelu napodobující podmínky obstrukční spánkové apnoe demonstrovali, že chronickým podáváním tempolu, který je mimetikem SOD, došlo k potlačení rozvoje poškození myokardu (Ramond a kol., 2013). Přesto stále není jasné, proč adaptace na INH zrušila protektivní efekt vyvolaný CNH. Neboť prodloužením reoxygenační epizody během adaptace (8 hodin/den, 5 dnů/týden, celkem 3 týdny, 10 % O₂) také došlo k rozvoji protektivních mechanismů v myokardu (Kašparová a kol., 2015). Z těchto výsledků tedy vyplývá, že by mohla být i délka reoxygenační periody během intermitentní hypoxie rozhodující pro rozvoj protekce myokardu.

6 ZÁVĚR

Cíl 1: Vliv IHH na zastoupení PLA₂ a aktivujících enzymů a cílů cPLA₂α v myokardu LV potkana

Analýza sledovaných izoform PLA₂ po adaptaci na IHH na úrovni proteinu ukázala nárůst množství cPLA₂α a její fosforylované formy (p-cPLA₂α) a naopak pokles iPLA₂ a sPLA₂IIA. Rovněž bylo prokázáno, že adaptace na IHH vedla k translokaci p-cPLA₂α na jaderné struktury. Na úrovni mRNA nebyly detekovány žádné změny v zastoupení cPLA₂α, iPLA₂ a sPLA₂IIA.

Dále jsme prokázali, že adaptace na IHH vede ke komplexní změně signální dráhy vedoucí od β-AR. Pozorovali jsme zvýšení podílu srdečních β₂-AR a G_i proteinů, které následně stimulovaly PKCα a MAPK (ERK1/2 a p38), což přímo souvisí s aktivací signální dráhy cPLA₂α/COX-2/PGE₂. Tyto výsledky naznačují, že by se cPLA₂α mohla podílet na rozvoji kardioprotektivního fenotypu během adaptace na IHH. Do jaké míry hraje zvýšení celkové a fosforylované cPLA₂α roli v mechanismu kardioprotekce indukované adaptací na IHH proti akutnímu I/R poškození zbývá ještě objasnit. Lze však předpokládat, že vyřešení této otázky by mohlo mít význam v klinické praxi.

Cíl 2: Vliv IHH na zastoupení PLA₂ a složení FA v myokardu LV potkana: vliv antioxidantu tempolu

Ukázali jsme, že za IHH podmínek jsou ROS zodpovědné za aktivaci cPLA₂α. Na druhou stranu jsme za těchto podmínek neprokázali zapojení ROS při regulaci iPLA₂ a sPLA₂IIA ani jejich podíl na remodelaci FA pozorované po adaptaci na IHH.

Cíl 3: Vliv CNH a INH na množství PLA₂ a antioxidantních enzymů v myokardu LV potkana

Ukázali jsme, že adaptace na CNH vedla ke zvýšenému zastoupení cPLA₂α, iPLA₂ a MnSOD bez ovlivnění koncentrace MDA. Avšak denní 1hodinová reoxygenace během adaptace na INH potlačila nárůst množství těchto enzymů pozorovaný po CNH a rovněž navýšila koncentraci MDA, což poukazuje na zvýšený oxidační stres provázený zvýšenou peroxidací lipidů.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Ackermann EJ, Kempner ES, Dennis EA (1994) Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D₁ cells. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 269(12):9227-9233. [PMID: 8132660]
- Aimo A, Borrelli C, Giannoni A, Pastormerlo LE, Barison A, Mirizzi G, Emdin M, Passino C (2015) Cardioprotection by remote ischemic conditioning: Mechanisms and clinical evidences. *World J Cardiol.* 7(10):621-632. doi:[10.4330/wjc.v7.i10.621](https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i10.621) [PMID: 26516416]
- Ait-Mamar B, Cailleret M, Rucker-Martin C, Bouabdallah A, Candiani G, Adamy C, Duvaldestin P, Pecker F, Defer N, Pavoine C (2005) The cytosolic phospholipase A₂ pathway, a safeguard of β₂-adrenergic cardiac effects in rat. *J Biol Chem.* 280(19):18881-18890. doi:[10.1074/jbc.M410305200](https://doi.org/10.1074/jbc.M410305200) [PMID: 15728587]
- Akiba S, Mizunaga S, Kume K, Hayama M, Sato T (1999) Involvement of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in protein kinase C-dependent arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D₁ cells. *J Biol Chem.* 274(28):19906-19912. doi:[10.1074/jbc.274.28.19906](https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19906) [PMID: 10391937]
- Alánová P, Chytilová A, Neckář J, Hrdlička J, Míčová P, Holzerová K, Hlaváčková M, Macháčková K, Papoušek F, Vašinová J, Benák D, Nováková O, Kolář F (2017) Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *J Appl Physiol.* *Publikace v tisku.* doi:[10.1152/jappphysiol.00671.2016](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00671.2016) [PMID: 28209739]
- Alánová P, Kolář F, Ošťádal B, Neckář J (2015) Role of NO/cGMP signaling pathway in cardiac ischemic tolerance of chronically hypoxic rats. *Physiol Res.* 64(5):783-787. [PMID: 25804095]
- Alleman RJ, Stewart LM, Tsang AM, Brown DA (2015) Why does exercise "trigger" adaptive protective responses in the heart? *Dose Response* 13(1):14-023. doi:[10.2203/dose-response.14-023.Alleman](https://doi.org/10.2203/dose-response.14-023.Alleman) [PMID: 26674259]
- Anfuso CD, Lupo G, Romeo L, Giurdanella G, Motta C, Pascale A, Tirolo C, Marchetti B, Alberghina M (2007) Endothelial cell-pericyte cocultures induce PLA₂ protein expression through activation of PKCα and the MAPK/ERK cascade. *J Lipid Res.* 48(4):782-793. doi:[10.1194/jlr.M600489-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M600489-JLR200) [PMID: 17267947]
- Aon MA, Cortassa S, Wei AC, Grunnet M, O'Rourke B (2010) Energetic performance is improved by specific activation of K⁺ fluxes through K_{Ca} channels in heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1797(1):71-80. doi:[10.1016/j.bbabbio.2009.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.08.002) [PMID: 19744465]
- Asemu G, Papoušek F, Ošťádal B, Kolář F (1999) Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat hearts against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K_{ATP} channels. *J Mol Cell Cardiol.* 31(10):1821-1831. doi:[10.1006/jmcc.1999.1013](https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.1013) [PMID: 10525420]
- Asemu G, Neckář J, Szárszoi O, Papoušek F, Ošťádal B, Kolář F (2000) Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res.* 49(5):597-606. [PMID: 11191364]

- Atsumi G, Murakami M, Kojima K, Hadano A, Tajima M, Kudo I (2000) Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A₂α inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ augments spontaneous fatty acid release. *J Biol Chem.* 275(24):18248-18258. doi:[10.1074/jbc.M000271200](https://doi.org/10.1074/jbc.M000271200) [PMID: 10747887]
- Avkiran M, Marber MS (2002) Na⁺/H⁺ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol.* 39(5):747-753. doi:[10.1016/s0735-1097\(02\)01693-5](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)01693-5) [PMID: 11869836]
- Baker JE, Holman P, Kalyanaraman B, Griffith OW, Pritchard KA Jr. (1999) Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann N Y Acad Sci.* 874:236-253. doi:[10.1111/j.1749-6632.1999.tb09239.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09239.x) [PMID: 10415535]
- Balboa MA, Balsinde J (2002) Involvement of calcium-independent phospholipase A₂ in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J Biol Chem.* 277(43):40384-40389. doi:[10.1074/jbc.M206155200](https://doi.org/10.1074/jbc.M206155200) [PMID: 12181317]
- Balderas E, Zhang J, Stefani E, Toro L (2015) Mitochondrial BK_{Ca} channel. *Front Physiol.* 6:104. doi:[10.3389/fphys.2015.00104](https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00104) [PMID: 25873902]
- Balková P, Hlaváčková M, Milerová M, Neckář J, Kolář F, Novák F, Nováková O (2011) N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiol Res* 60(3):467-474. [PMID: 21401304]
- Balková P, Ježková K, Hlaváčková M, Neckář J, Staňková B, Kolář F, Novák F, Nováková O (2009) *Br J Nutr.* 102(9):1297-1307. doi:[10.1017/S0007114509389242](https://doi.org/10.1017/S0007114509389242) [PMID: 19480730]
- Balsinde J (2002) Roles of various phospholipase A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem J.* 364(Pt 3):695-702. doi:[10.1042/BJ20020142](https://doi.org/10.1042/BJ20020142) [PMID: 12049633]
- Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA (1997) Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D₁ macrophages. *J Biol Chem.* 272(46):29317-29321. doi:[10.1074/jbc.272.46.29317](https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.29317) [PMID: 9361012]
- Balsinde J, Balboa MA, Li WH, Llopis J, Dennis EA (2000) Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A₂ by phosphatidylinositol bisphosphate levels. *J Immunol.* 164(10):5398-5402. doi:[10.4049/jimmunol.164.10.5398](https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5398) [PMID: 10799904]
- Balsinde J, Bianco ID, Ackermann EJ, Conde-Frieboes K, Dennis EA (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D₁ macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 29(18):8527-8531. doi:[10.1073/pnas.92.18.8527](https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8527) [PMID: 7667324]
- Bassuk SS, Manson JE (2003) Physical activity and the prevention of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 5(4):299-307. [PMID: 12793971]
- Béguin PC, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Lévy P, Ribouot C (2005) Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol* (1985). 99(3):1064-1069. doi:[10.1152/jappphysiol.00056.2005](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00056.2005) [PMID: 15879170]
- Belaidi E, Béguin PC, Levy P, Ribouot C, Godin-Ribuot D (2008) Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial

- hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(2):H901-H908. doi:[10.1152/ajpheart.00715.2007](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00715.2007) [PMID: 18083903]
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabó I, Zoratti M (1992) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem*. 267(5):2934-2939. [PMID: 1737749]
- Bezzine S, Bollinger JG, Singer AG, Veatch SL, Keller SL, Gelb MH (2002) On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A₂ for membranes with anionic phospholipids. *J Biol Chem*. 277(50):48523-48534. doi:[10.1074/jbc.M203137200](https://doi.org/10.1074/jbc.M203137200) [PMID: 12244093]
- Birts CN, Baton CH, Wilton DC (2010) Catalytic and non-catalytic functions of human IIA phospholipase A₂. *Trends Biochem Sci*. 35(1):28-35. doi:[10.1016/j.tibs.2009.08.003](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.08.003) [PMID: 19818633]
- Bohuslavová R, Kolář F, Kuthanová L, Neckář J, Tichopád A, Pavlínková G (2010) Gene expression profiling of sex differences in HIF1-dependent adaptive cardiac responses to chronic hypoxia. *J Appl Physiol*. 109:1195-1202. doi:[10.1152/jappphysiol.00366.2010](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00366.2010) [PMID: 20634361]
- Bolli R (2007) Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(1):H19-H27. doi:[10.1152/ajpheart.00712.2006](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00712.2006) [PMID: 16963615]
- Bolli R, Shinmura K, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Guo Y, Dawn B (2002) Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res*. 55(3):506-519. doi:[10.1016/s0008-6363\(02\)00414-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00414-5) [PMID: 12160947]
- Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, Sapirstein A (1997) Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂. *Nature*. 390(6660):622-625. doi:[10.1038/37635](https://doi.org/10.1038/37635) [PMID: 9403693]
- Borchert GH, Yang C, Kolář F (2011) Mitochondrial BK_{Ca} channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300(2):H507-H513. doi:[10.1152/ajpheart.00594.2010](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00594.2010) [PMID: 21112945]
- Borges JP, Lessa MA (2015) Mechanisms involved in exercise-induced cardioprotection: a systematic review. *Arg Bras Cardiol*. 105(1):71-81. doi:[10.5935/abc.20150024](https://doi.org/10.5935/abc.20150024) [PMID: 25830711]
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-254. doi:[10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3) [PMID: 942051]
- Brewer AC, Murray TV, Arno M, Zhang M, Anilkumar NP, Mann GE, Shah AM (2011) Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes *in vivo*. *Free Radic Biol Med*. 51(1):205-215. doi:[10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.022](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.022) [PMID: 21554947]
- Brown DA, Lynch JM, Armstrong CJ, Caruso NM, Ehlers LB, Johnson MS, Moore RL (2005) Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol* 564: 619-30. doi:[10.1113/jphysiol.2004.081323](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.081323) [PMID: 15718263]
- Budas GR, Churchill EN, Mochly-Rosen D (2007) Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res*. 55(6):523-536. doi:[10.1016/j.phrs.2007.04.005](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.005) [PMID: 17576073]

- Burdon RH, Rice-Evans C (1989) Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic Res Commun.* 6(6):345-358. doi:[10.3109/10715768909087918](https://doi.org/10.3109/10715768909087918) [PMID: 2676744]
- Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM (2012) Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res.* 111(8):1091-1106. doi:[10.1161/CIRCRESAHA.111.255216](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255216) [PMID: 23023511]
- Burke JE, Dennis EA (2009a) Phospholipase A₂ biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther.* 23(1):49-59. doi:[10.1007/s10557-008-6132-9](https://doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9) [PMID: 18931897]
- Burke JE, Dennis EA (2009b) Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res.* 50 Suppl:S237-S242. doi:[10.1194/jlr.R800033-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200) [PMID: 19011112]
- Burke JE, Hsu YH, Deems RA, Li S, Woods VL Jr., Dennis EA (2008) A phospholipid substrate molecule residing in the membrane surface mediates opening of the lid region in group IVA cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 283(45):31227-31236. doi:[10.1074/jbc.M804492200](https://doi.org/10.1074/jbc.M804492200) [PMID: 18753135]
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL (2003) Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 108(1):79-85. doi:[10.1161/01.CIR.0000078635.89229.8A](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000078635.89229.8A) [PMID: 12796124]
- Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA, Semenza GL (2008) Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 α . *Cardiovasc Res.* 77(3):463-470. doi:[10.1093/cvr/cvm035](https://doi.org/10.1093/cvr/cvm035) [PMID: 18006459]
- Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (2000) Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(21):11280-11285. doi:[10.1073/pnas.200367597](https://doi.org/10.1073/pnas.200367597) [PMID: 11005842]
- Carreira R, Duarte A, Monteiro P, Santos MS, Rego AC, Oliveira CR, Gonçalves LM, Providência LA (2004) Carvediol protects ischemic cardiac mitochondria by preventing oxidative stress. *Rev Port Cardiol.* 23(11):1447-1455. [PMID: 15693697]
- Cedars A, Jenkins CM, Mancuso DJ, Gross RW (2009) Calcium-independent phospholipase in the heart: mediators of cellular signaling, bioenergetics, and ischemia-induced electrophysiologic dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 53(4):277-289. [PMID: 19390346]
- Chakraborti S (2003) Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. *Cell Signal.* 15(7):637-665. doi:[10.1016/s0898-6568\(02\)00144-4](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00144-4) [PMID: 12742226]
- Chakraborti S, Chowdhury A, Chakraborti T (2015) Cross-talk between p³⁸MAPK and G_i α in regulating cPLA₂ activity by ET-1 in pulmonary smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 400(1-2):107-123. doi:[10.1007/s11010-014-2267-0](https://doi.org/10.1007/s11010-014-2267-0) [PMID: 25399298]
- Chakraborti T, Das S, Chakraborti S (2005) Proteolytic activation of protein kinase C α by peroxynitrite in stimulating cytosolic phospholipase A₂ in pulmonary endothelium: involvement of a pertussis toxin sensitive protein. *Biochemistry.* 44(13):5246-5257. doi:[10.1021/bi0477889](https://doi.org/10.1021/bi0477889) [PMID: 15794661]
- Channon JY, Leslie CC (1990) A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem.* 265(10):5409-5413. [PMID: 2108137]

- Chen J, Engle SJ, Seilhamer, JJ, Tischfield JA (1994) Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca^{2+} -dependent phospholipase A_2 . *J Biol Chem.* 269(4):2365-2368. [PMID: 8300559]
- Cheng Y, Gu XQ, Bednarczyk O, Wiedemann FR, Haddad GG, Siemen D (2008) Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore. *Cell Physiol Biochem.* 22(1-4):127-136. doi:[10.1159/000149790](https://doi.org/10.1159/000149790) [PMID: 18769039]
- Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, Crow MT (2000) The β_2 -adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G_i -dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res.* 87(12):1172-1179. doi:[10.1161/01.res.87.12.1172](https://doi.org/10.1161/01.res.87.12.1172) [PMID: 11110775]
- Chiarugi P, Cirri P (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 28(9):509-514. doi:[10.1016/S0968-0004\(03\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00174-9) [PMID: 13678963]
- Chytilová A, Borchert GH, Mandíková-Alánová P, Hlaváčková M, Kopkan L, Khan MA, Imig JD, Kolář F, Neckář J (2015) Tumor necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia. *Acta Physiol (Oxf).* 214(1):97-108. doi:[10.1111/apha.12489](https://doi.org/10.1111/apha.12489) [PMID: 25760892]
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CD, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA_2 contains a Ca^{2+} -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell.* 65(6):1043-1051. doi:[10.1016/0092-8674\(91\)90556-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90556-e) [PMID: 1904318]
- Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH (1998) Stimulation of “stress-regulated” mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem.* 273(13):7228-7234. doi:[10.1074/jbc.273.13.7228](https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7228) [PMID: 9516415]
- Colston JT, De la Rosa SD, Strader JR, Anderson MA, Freeman GL (2005) H_2O_2 activates Nox4 through PLA_2 -dependent arachidonic acid production in adult cardiac fibroblasts. *FEBS Lett.* 579(11):2533-2540. doi:[10.1016/j.febslet.2005.03.057](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.057) [PMID: 15848200]
- Couturier C, Brouillet A, Couriaud C, Koumanov K, Béréziat G, Andréani N (1999) Interleukin 1β induces type II-secreted phospholipase A_2 gene in vascular smooth muscle cells by a nuclear factor κB and peroxisome proliferator-activated receptor-mediated process. *J Biol Chem.* 274(33):23085-23093. doi:[10.1074/jbc.274.33.23085](https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23085) [PMID: 10438477]
- Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG (2000) Phospholipase A_2 s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther.* 294(3):793-799. [PMID: 10945826]
- Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG (2002) Role of an endoplasmic reticulum Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 in oxidant-induced renal cell death. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283(3):F492-F498. doi:[10.1152/ajprenal.00022.2002](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00022.2002) [PMID: 12167600]
- Cupillard K, Koumanov K, Mattéi MG, Lazdunski M, Lambeau G (1997) Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A_2 . *J Biol Chem.* 272(25):15745-15752. doi:[10.1074/jbc.272.25.15745](https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.15745) . [PMID: 9188469]
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature.* 390(6655):88-91. doi:[10.1038/36362](https://doi.org/10.1038/36362) [PMID: 9363896]

- Damiani E, Carloni P, Biondi C, Greci L (2000) Increased oxidative modification of albumin when illuminated in vitro in the presence of a common sunscreen ingredient: protection by nitroxide radicals. *Free Radic Biol Med.* 28(2):193-201. doi:[10.1016/s0891-5849\(99\)00221-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00221-x) [PMID: 11281286]
- Damiani E, Greci L, Parsons R, Knowland J (1999) Nitroxide radicals protect DNA from damage when illuminated in vitro in the presence of dibenzoylmethane and a common sunscreen ingredient. *Free Radic Biol Med.* 26(7-8):809-816. doi:[10.1016/s0891-5849\(98\)00292-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00292-5) [PMID: 10232823]
- Dana R, Leto TL, Malech HL, Levy R (1998) Essential requirement of cytosolic phospholipase A₂ for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 273(1):441-445. doi:[10.1074/jbc.273.1.441](https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.441) [PMID: 9417101]
- Dang H, Elliott JJ, Lin AL, Zhu B, Katz MS, Yeh CK (2008) Mitogen-activated protein kinase up-regulation and activation during rat parotid gland atrophy and regeneration: role of epidermal growth factor and β_2 -adrenergic receptors. *Differentiation.* 76(5):546-557. doi:[10.1111/j.1432-0436.2007.00251.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00251.x) [PMID: 18177419]
- De Windt LJ, Willemsen PH, Pöpping S, Van der Vusse GJ, Reneman RS, Van Bilsen M (1997) Cloning and cellular distribution of a group II phospholipase A₂ expressed in the heart. doi:[10.1006/jmcc.1997.0444](https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0444) [PMID: 9281442]
- De Windt LJ, Willems J, Roemen TH, Coumans WA, Reneman RS, Van der Vusse GJ, Van Bilsen M (2001) Ischemic-reperfused isolated working mouse hearts: membrane damage and type IIA phospholipase A₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(6):H2572-H2580. [PMID: 11356612]
- Deindl E, Kolář F, Neubauer E, Vogel S, Schaper W, Ošťádal B (2003) Effect of intermittent high altitude hypoxia on gene expression in rat heart and lung. *Physiol Res.* 52(2):147-157. [PMID: 12678657]
- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G (2011) Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev.* 111(10):6130-6185. doi:[10.1021/cr200085w](https://doi.org/10.1021/cr200085w) [PMID: 21910409]
- Dennis SC, Gevers W, Opie LH (1991) Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *J Mol Cell Cardiol.* 23(9):1077-1086. doi:[10.1016/0022-2828\(91\)91642-5](https://doi.org/10.1016/0022-2828(91)91642-5) [PMID: 1658348]
- Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, Somers WS (1999) Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell.* 97(3):349-360. doi:[10.1016/s0092-8674\(00\)80744-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80744-8) [PMID: 10319815]
- Dignam JD, Martin PL, Shastry BS, Roeder RG (1983) Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol.* 101:582-598. doi:[10.1016/0076-6879\(83\)01039-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)01039-3) [PMID: 6888276]
- Dijkstra BW, Drenth J, Kalk KH (1981) Active site and catalytic mechanism of phospholipase A₂. *Nature.* 289(5798):604-606. doi:[10.1038/289604a0](https://doi.org/10.1038/289604a0) [PMID: 7464926]
- Duda M, Konior A, Klemenska E, Beresewicz A (2007) Preconditioning protects endothelium by preventing ET-1-induced activation of NADPH oxidase and xanthine oxidase in post-ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 42(2):400-410. doi:[10.1016/j.yjmcc.2006.10.014](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.10.014) [PMID: 17156794]
- Dutour A, Achard V, Sell H, Naour N, Collart F, Gaborit B, Silaghi A, Eckel J, Alessi MC, Henegar C, Clément K (2010) Secretory type II phospholipase A₂ is produced and secreted

- by epicardial adipose tissue and overexpressed in patients with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(2):963-967. doi:[10.1210/jc.2009-1222](https://doi.org/10.1210/jc.2009-1222) [PMID: 20008021]
- Engelbrecht AM, Ellis B (2007) Apoptosis is mediated by cytosolic phospholipase A₂ during simulated ischaemia/reperfusion-induced injury in neonatal cardiac myocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77(1):37-43. doi:[10.1016/j.plefa.2007.06.002](https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.06.002) [PMID: 17643276]
- Esposito F, Ronchi R, Milano G, Margonato V, Di Tullio SS, Marini M, Veicsteinas A, Samaja M (2011) Myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury, training intensity and cessation. *Eur J Appl Physiol.* 111:859-868. doi:[10.1007/s00421-010-1707-0](https://doi.org/10.1007/s00421-010-1707-0) [PMID: 21063725]
- Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 164(3):894-912. doi:[10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x) [PMID: 21323907]
- Fenard D, Lambeau G, Valentin E, Lefebvre JC, Lazdunski M, Doglio A (1999) Secreted phospholipase A₂, a new class of HIC inhibitors that block virus entry into host cells. *J Clin Invest.* 104(5):611-618. doi:[10.1172/JCI6915](https://doi.org/10.1172/JCI6915) [PMID: 10487775]
- Finkel T (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 10(2):248-253. [PMID: 9561849]
- Flaherty JT, Weisfeldt ML (1988) Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 5(5-6):409-419. doi:[10.1016/0891-5849\(88\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90115-3) [PMID: 3076884]
- Folch J, Lees M, Sloan-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226:497-509. [PMID: 13428781]
- Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E (2001) Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res.* 88(8):802-809. doi:[10.1161/hh0801.089342](https://doi.org/10.1161/hh0801.089342) [PMID: 11325872]
- Ford DA, Hazen SL, Saffitz JE, Gross RW (1991) The rapid and reversible activation of calcium-independent plasmalogen-selective phospholipase A₂ during myocardial ischemia. *J Clin Invest.* 88(1):331-335. doi:[10.1172/JCI115296](https://doi.org/10.1172/JCI115296) [PMID: 2056126]
- Frasier CR, Moukdar F, Patel HD, Sloan RC, Stewart LM, Alleman RJ, La Favor JD, Brown DA (2013) Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovasc Res.* 98: 47-55. doi:[10.1093/cvr/cvt009](https://doi.org/10.1093/cvr/cvt009) [PMID: 23341578]
- Frasier CR, Sloan RC, Bostian PA, Gonzon MD, Kurowicki J, Lopresto SJ, Anderson EJ, Brown DA (2011) Short-term exercise preserves myocardial glutathione and decreases arrhythmias after thiol oxidation and ischemia in isolated rat hearts. *J Appl Physiol* 111: 1751-1759. doi:[10.1152/jappphysiol.01214.2010](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01214.2010) [PMID: 21940849]
- French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, Powers SK (2008) Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J.* 22(8):2862-2871. doi:[10.1096/fj.07-102541](https://doi.org/10.1096/fj.07-102541) [PMID: 18417547]
- Frolíková M, Stopková R, Antalíková J, Johnson PM, Stopka P, Dvořáková-Hortová K (2012) Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction. *Folia Zool.* 61:84-94.

- Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, Yano T, Tezuka H, Ishimoto Y, Suzuki N, Yokota Y, Nakamura T, Obata JE, Kanazawa M, Kawabata K, Hanasaki K, Kugiyama K (2008) Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A₂-deficient mice. *Circulation*. 117(23):2977-2985. doi:[10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743997](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743997) [PMID: 18506007]
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiratory in hypoxic cells. *Cell*. 129(1):111-122. doi:[10.1016/j.cell.2007.01.047](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.047) [PMID: 17418790]
- Ghomashchi F, Stewart A, Hefner Y, Ramanadham S, Turk J, Leslie CC, Gelb MH (2001) A pyrrolidine-based specific inhibitor of cytosolic phospholipase A₂ blocks arachidonic acid release in a variety of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1513(2):160-166. doi:[10.1016/s0005-2736\(01\)00349-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(01)00349-2) [PMID: 11470087]
- Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC (2006) Properties of the group IV phospholipase A₂ family. *Prog Lipid Res*. 45(6):487-510. doi:[10.1016/j.plipres.2006.05.003](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.05.003) [PMID: 16814865]
- Glover S, De Carvalho MS, Bayburt T, Jonas M, Chi E, Leslie CC, Gelb MH (1995) Translocation of the 85-kDa phospholipase A₂ from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem*. 270(25):15359-15367. doi:[10.1074/jbc.270.25.15359](https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.15359) [PMID: 7797525]
- Golbidi S, Laher I (2011) Molecular mechanisms in exercise-induced cardioprotection. *Cardiol Res Pract*. 972807. doi:[10.4061/2011/972807](https://doi.org/10.4061/2011/972807) [PMID: 21403846]
- Goldenthal MJ, Marín-García J (2004) Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem*. 262(1-2):1-16. doi:[10.1023/b:mcbi.0000038228.85494.3b](https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000038228.85494.3b) [PMID: 15532704]
- Granata F, Petraroli A, Boilard E, Bezzine S, Bollinger J, Del Vecchio L, Gelb MH, Lambeau G, Marone G, Triggiani M (2005) Activation of cytokine production by secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing in M-type receptor. *J Immunol*. 174(1):464-474. doi:[10.4049/jimmunol.174.1.464](https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.464) [PMID: 15611272]
- Grandits M, Oostenbrink C (2015) Selectivity of cytosolic phospholipase A₂ type IV toward arachidonyl phospholipids. *J Mol Recognit*. 28(7):447-457. doi:[10.1002/jmr.2462](https://doi.org/10.1002/jmr.2462) [PMID: 25703463]
- Graves LM, Lawrence JC Jr. (1996) Insulin, growth factors, and cAMP: antagonism in the signal transduction pathways. *Trends Endocrinol Metab*. 7(2):43-50. doi:[10.1016/1043-2760\(95\)00204-9](https://doi.org/10.1016/1043-2760(95)00204-9) [PMID: 18406723]
- Grewal S, Herbert SP, Ponnambalam S, Walker JH (2005) Cytosolic phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2 localize to intracellular membranes of EA.hy.926 endothelial cells that are distinct from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *FEBS J*. 272(5):1278-1290. doi:[10.1111/j.1742-4658.2005.04565.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04565.x) [PMID: 15720401]
- Griffiths EJ, Halestrap AP (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 307(Pt 1):93-98. doi:[10.1042/bj3070093](https://doi.org/10.1042/bj3070093) [PMID: 7717999]
- Grilli A, De Lutiis MA, Patruno A, Speranza L, Gizzi F, Taccardi AA, Di Napoli P, De Caterina R, Conti P, Felaco M (2003) Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in rat heart: direct effect of chronic exposure to hypoxia. *Ann Clin Lab Sci*. 33(2):208-215. [PMID: 12817626]

- Grönroos JO, Laine VJ, Janssen MJ, Egmond MR, Nevalainen TJ (2001) Bactericidal properties of group IIA and group V phospholipases A₂. *J Immunol.* 166(6):4029-4034. doi:[10.4049/jimmunol.166.6.4029](https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.4029) [PMID: 11238650]
- Grönroos JO, Laine VJ, Nevalainen TJ (2002) Bactericidal group IIA phospholipase A₂ in serum of patients with bacterial infections. *J Infect Dis.* 185(12):1767-1772. doi:[10.1086/340821](https://doi.org/10.1086/340821) [PMID: 12085323]
- Guo R, Gao XY, Wang W, Wang HJ, Zhang F, Zhang Y, Zhu GQ (2005) Tempol reduces reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats. *Pharmacol Res.* 52(2):192-198. doi:[10.1016/j.phrs.2005.03.001](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.001) [PMID: 15967386]
- Guo HC, Zhang Z, Zhang LN, Xiong C, Feng C, Liu Q, Liu X, Shi XL, Wang YL (2009) Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects the heart against ischemia/reperfusion injury through upregulation of antioxidant enzymes in adult guinea pigs. *Acta Pharmacol Sin.* 30(7):947-955. doi:[10.1038/aps.2009.57](https://doi.org/10.1038/aps.2009.57) [PMID: 19543301]
- Hahnová K, Kašparová D, Žurmanová J, Neckář J, Kolář F, Novotný J (2016) β -adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia. *Gen Physiol Biophys.* 35(2):165-173. doi:[10.4149/gpb_2015053](https://doi.org/10.4149/gpb_2015053) [PMID: 26891273]
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 61(3):372-385. doi:[10.1016/S0008-6363\(03\)00533-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00533-9) [PMID: 14962470]
- Hamilton KL, Staib JL, Philips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK (2003) Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 34(7):800-809. doi:[10.1016/s0891-5849\(02\)01431-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01431-4) [PMID: 12654467]
- Hammarberg C, Fredholm BB, Schulte G (2004) Adenosine A₃ receptor-mediated regulation of p38 and extracellular-regulated kinase ERK1/2 *via* phosphatidylinositol-3'-kinase. *Biochem Pharmacol.* 67(1):129-134. doi:[10.1016/j.bcp.2003.08.031](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.08.031) [PMID: 14667935]
- Han WK, Sapirstein A, Hung CC, Alessandrini A, Bonventre JV (2003) Cross-talk between cytosolic phospholipase A₂ α (cPLA₂ α) and secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA₂ regulates cPLA₂ α activity that is responsible for arachidonic acid release. *J Biol Chem.* 278(26):24153-24163. doi:[10.1074/jbc.M300424200](https://doi.org/10.1074/jbc.M300424200) [PMID: 12676927]
- Hanasaki K, Ono T, Saiga A, Morioka Y, Ikeda M, Kawamoto K, Higashino K, Nakano K, Yamada K, Ishizaki J, Arita H (1999) Purified group X secretory phospholipase A₂ induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem.* 274(48):34203-34211. doi:[10.1074/jbc.274.48.34203](https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34203) [PMID: 10567392]
- Harwig SS, Tan L, Qu XD, Cho Y, Eisenhauer PB, Lehrer RI (1995) Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A₂. *J Clin Invest.* 95(2):603-610. doi:[10.1172/jci117704](https://doi.org/10.1172/jci117704) [PMID: 7860744]
- Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D (2004) Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation.* 109(14):1714-1717. doi:[10.1161/01.CIR.0000126294.81407.7D](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000126294.81407.7D) [PMID: 15066952]
- Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM (2005) The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med.* 15(2):69-75. doi:[10.1016/j.tcm.2005.03.001](https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.03.001) [PMID: 15885573]

- Hausenloy DJ, Yellon DM (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 123(1):92-100. doi:[10.1172/JCI62874](https://doi.org/10.1172/JCI62874) [PMID: 23281415]
- Hazen SL, Ford DA, Gross RW (1991) Activation of a membrane-associated phospholipase A₂ during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate. *J Biol Chem.* 266(9):5629-5633. [PMID: 2005103]
- Hearse DJ (1990) Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovasc Drugs Ther.* 4 Suppl 4:767-776. doi:[10.1007/bf00051274](https://doi.org/10.1007/bf00051274) [PMID: 2093367]
- Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, Wilde JI, Pasquet S, Schieltz D, Ghomasshchi F, Yates JR 3rd, Armstrong CG, Paterson A, Cohen P, Fukunaga R, Hunter T, Kudo I, Watson SP, Gelb MH (2000) Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem.* 275(48):37542-37551. doi:[10.1074/jbc.M003395200](https://doi.org/10.1074/jbc.M003395200) [PMID: 10978317]
- Heusch G, Bøtket HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D (2015) Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol.* 65(2):177-195. doi:[10.1016/j.jacc.2014.10.031](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.10.031) [PMID: 25593060]
- Hirabayashi T, Kume K, Hirose K, Yokomizo T, Iino M, Itoh H, Shimizu T (1999) Critical duration of intracellular Ca²⁺ response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 274(8):5163-5169. doi:[10.1074/jbc.274.8.5163](https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.5163) [PMID: 9988766]
- Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F, Nováková O (2010) Up-regulation and redistribution of protein kinase C-δ in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem.* 345(1-2):271-282. doi:[10.1007/s11010-010-0581-8](https://doi.org/10.1007/s11010-010-0581-8) [PMID: 20853175]
- Hlaváčková M, Neckář J, Ježková J, Balková P, Staňková B, Nováková O, Kolář F, Novák F (2007) Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood).* 232(6):823-832. [PMID: 17526775]
- Hochachka PW, Lutz PL (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 130(4):435-459. doi:[10.1016/s1096-4959\(01\)00408-0](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00408-0) [PMID: 11691622]
- Hoffman A, Goldstein S, Samuni A, Borman JB, Schwalb H (2003) Effect of nitric oxide and nitroxide SOD-mimic on the recovery of isolated rat heart following ischemia and repletion. *Biochem Pharmacol.* 66(7):1279-1286. doi:[10.1016/s0006-2952\(03\)00441-6](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00441-6) [PMID: 14505807]
- Holzerová K, Hlaváčková M, Žurmanová J, Borchert G, Neckář J, Kolář F, Novák F, Nováková O (2015) Involvement of PKCε in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. *Physiol Res.* 64(2):191-201. [PMID: 25317680]
- Hrbasová M, Novotný J, Hejnová L, Kolář F, Neckář J, Svoboda P (2003) Altered myocardial G_s protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J Appl Physiol (1985).* 94(6):2423-2432. doi:[10.1152/jappphysiol.00958.2002](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00958.2002) [PMID: 12736191]
- Hurtado A (1960) Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med.* 53(2):247-258. doi:[10.7326/0003-4819-53-2-247](https://doi.org/10.7326/0003-4819-53-2-247) [PMID: 14405552]
- Hsieh CC, Yen MH, Liu HW, Lau YT (2000) Lysophosphatidylcholine induced apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cells: in comparison with oxidized LDL.

- Atherosclerosis. 151(2):481-491. doi:[10.1016/s0021-9150\(00\)00453-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(00)00453-6) [PMID: 10924725]
- Ignarro LJ, Balestrieri ML, Napoli C (2007) Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc Res.* 73(2):326-340. doi:[10.1016/j.cardiores.2006.06.030](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.06.030) [PMID: 16945357]
- Ishikawa Y, Komiyama K, Masuda S, Murakami M, Akasaka Y, Ito K, Akishima-Fukasawa Y, Kimura M, Fujimoto A, Kudo I, Ishii T (2005) Expression of type V secretory phospholipase A₂ in myocardial remodelling after infarction. *Histopathology.* 47(3):257-267. doi:[10.1111/j.1365-2559.2005.02227.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02227.x) [PMID: 16115226]
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 236(2):313-322. doi:[10.1006/bbrc.1997.6943](https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943) [PMID: 9240432]
- Jankov RP, Kantores C, Pan J, Belik J (2008) Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294(2):L233-L245. doi:[10.1152/ajplung.00166.2007](https://doi.org/10.1152/ajplung.00166.2007) [PMID: 18083771]
- Jenkins CM, Cedars A, Gross RW (2009) Eicosanoid signalling pathways in the heart. *Cardiovasc Res.* 82(2):240-249. doi:[10.1093/cvr/cvn346](https://doi.org/10.1093/cvr/cvn346) [PMID: 19074824]
- Jenkins CM, Wolf MJ, Mancuso DJ, Gross RW (2001) Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A₂β. Implications for structure and function. *J Biol Chem.* 276(10):7129-7135. doi:[10.1074/jbc.M010439200](https://doi.org/10.1074/jbc.M010439200) [PMID: 11118454]
- Jeyapaul J, Jaiswal AK (2000) Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Pharmacol.* 59(11):1433-1439. doi:[10.1016/s0006-2952\(00\)00256-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00256-2) [PMID: 10751553]
- Ježková J, Nováková O, Kolář F, Tvrzická E, Neckář J, Novák F (2002) Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem.* 232(1-2):49-56. [PMID: 12030379]
- Jirkovský E, Popelová O, Křiváková-Staňková P, Vávrová A, Hroch M, Hašková P, Brčáková-Doleželová E, Mičuda S, Adamcová M, Šimůnek T, Červinková Z, Geršl V, Štěrba M (2012) Chronic anthracycline cardiotoxicity: molecular and functional analysis with focus on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and mitochondrial biogenesis pathways. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 343:468-478. doi:[10.1124/jpet.112.198358](https://doi.org/10.1124/jpet.112.198358) [PMID: 22915767]
- Kacimi R, Moalic JM, Aldashev A, Vatner DE, Richalet JP, Crozatier B (1995) Differential regulation of G protein expression in rats hearts exposed to chronic hypoxia. *Am J Physiol.* 262(6 Pt 2):H1865-H1873. [PMID: 8594894]
- Kamata H, Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 11(1):1-14. doi:[10.1016/s0898-6568\(98\)00037-0](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(98)00037-0) [PMID: 10206339]
- Kan H, Ruan Y, Malik KU (1996) Involvement of mitogen-activated protein kinase and traslocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope in acetylcholine-induced prostacyclin synthesis in rabbit coronary endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 50(5):1139-1147. [PMID: 8913345]

- Kang SH, Park WS, Kim N, Youm JB, Warda M, Ko JH, Ko EA, Han J (2007) Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channels more efficiently reduce mitochondrial Ca^{2+} overload in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(1):H307-H313. doi:[10.1152/ajpheart.00789.2006](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00789.2006) [PMID: 17351070]
- Kasalický J, Ressler J, Urbanová D, Widimský J, Ošťádal B, Pelouch V, Vízek M, Procházka J (1977) Relative organ blood flow in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia. *Pflügers Arch.* 368(1-2):111-115. doi:[10.1007/bf01063462](https://doi.org/10.1007/bf01063462) [PMID: 558583]
- Kašparová D, Neckář J, Dabrowská L, Novotný J, Mráz J, Kolář F, Žurmanová J (2015) Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol Genomics.* 47(12):612-620. doi:[10.1152/physiolgenomics.00058.2015](https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00058.2015) [PMID: 26465708]
- Kerkelä R, Boucher M, Zaka R, Gao E, Harris D, Piuholo J, Song J, Serpi R, Woulfe KC, Cheung JY, O'Leary E, Bonventre JV, Force T (2011) Cytosolic phospholipase $\text{A}_2\alpha$ protects against ischemia/reperfusion injury in the heart. *Clin Transl Sci.* 4(4):236-242. doi:[10.1111/j.1752-8062.2011.00294.x](https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00294.x) [PMID: 21884509]
- Khan NS, Song CY, Jennings BL, Estes AM, Fang XR, Bonventre JV, Malik KU (2015) Cytosolic phospholipase $\text{A}_2\alpha$ is critical for angiotensin II-induced hypertension and associated cardiovascular pathophysiology. *Hypertension.* 65(4):784-792. doi:[10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04803](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04803) [PMID: 25667212]
- Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R (2009) Mammalian patation domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res.* 50 Suppl: S63-S68. doi:[10.1194/jlr.R800082-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R800082-JLR200) [PMID: 19029121]
- Kikawada E, Bonventre JV, Arm JP (2007) Group V secretory PLA_2 regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and $\text{cPLA}_2\alpha$ activation. *Blood.* 110(2):561-567. doi:[10.1182/blood-2006-10-052258](https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-052258) [PMID: 17369491]
- Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM (2000) β_2 -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G_s and G_i . *Circ Res.* 87(8):705-759. doi:[10.1161/01.res.87.8.705](https://doi.org/10.1161/01.res.87.8.705) [PMID: 11029407]
- Kim C, Kim JY, Kim JH (2008) Cytosolic phospholipase A_2 , lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Rep.* 41(8):555-559. doi:[10.5483/bmbrep.2008.41.8.555](https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.8.555) [PMID: 18755069]
- Kim D, Duff RA (1990) Regulation of K^+ channels in cardiac myocytes by free fatty acids. *Circ Res.* 67(4):1040-1046. doi:[10.1161/01.res.67.4.1040](https://doi.org/10.1161/01.res.67.4.1040) [PMID: 2119911]
- Kim YJ, Kim KP, Han SK, Munoz NM, Zhu X, Sano H, Leff AR, Cho W (2002) Group V phospholipase A_2 induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A_2 . *J Biol Chem.* 277(39):36479-36488. doi:[10.1074/jbc.M205399200](https://doi.org/10.1074/jbc.M205399200) [PMID: 12124392]
- Kimura-Matsumoto M, Ishikawa Y, Komiyama K, Tsuruta T, Murakami M, Masuda S, Akasaka Y, Ito K, Ishiguro S, Morita H, Sato S, Ishii T (2008) Expression of secretory phospholipase A_2s in human atherosclerosis development. *Atherosclerosis.* 196(1):81-91. doi:[10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.062](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.062) [PMID: 17653016]

- Kinsey GR, Cummings BS, Beckett CS, Saavedra G, Zhang W, McHowat J, Schnellmann RG (2005) Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA₂. *Biochem Biophys Res Commun.* 327(1):287-293. doi:[10.1016/j.bbrc.2004.12.016](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.016) [PMID: 15629460]
- Kinsey GR, McHowat J, Beckett CS, Schnellmann RG (2007a) Identification of calcium-independent phospholipase A₂ γ in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292(2):F853-F860. doi:[10.1152/ajprenal.00318.2006](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00318.2006) [PMID: 17047165]
- Kinsey GR, McHowat J, Patrick KS, Schnellmann RG (2007b) Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ γ in Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther.* 321(2):707-715. doi:[10.1124/jpet.107.119545](https://doi.org/10.1124/jpet.107.119545) [PMID: 17312185]
- Kishimoto K, Li RC, Zhang J, Klaus JA, Kibler KK, Doré S, Koehler RC, Sapirstein A (2010) Cytosolic phospholipase A₂ α amplifies early cyclooxygenase-2 expression, oxidative stress and MAP kinase phosphorylation after cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation.* 7:42. doi:[10.1186/1742-2094-7-42](https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-42) [PMID: 20673332]
- Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G (2011) TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail Rev.* 16(1):49-69. doi:[10.1007/s10741-010-9180-8](https://doi.org/10.1007/s10741-010-9180-8) [PMID: 20571888]
- Koduri RS, Grönroos JO, Laine VJ, Le Calvez C, Lambeau G, Nevalainen TJ, Gelb MH (2002) Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem.* 277(8):5849-5857. Doi:[10.1074/jbc.M109699200](https://doi.org/10.1074/jbc.M109699200) [PMID: 11694541]
- Kolář F, Ježková J, Balková P, Břeh J, Neckář J, Novák F, Nováková O, Tomašová H, Srbová M, Ošťádal B, Wilhelm J, Herget J (2007) Role of oxidative stress in PKC- δ upregulation and cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292:H224-H230. doi:[10.1152/ajpheart.00689.2006](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00689.2006) [PMID: 16936002]
- Kolář F, Ošťádal B (1991) Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Pflugers Arch.* 419(2):121-126. doi:[10.1007/bf00372996](https://doi.org/10.1007/bf00372996) [PMID: 1835788]
- Kolář F, Ošťádal B (2004) Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. 53 Suppl 1:S3-S13. [PMID: 15119931]
- Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Rajecová O, Štrec V, Bárta E (1988) Age-dependent influence of a moderate altitude (1,350 m) on the rat cardiopulmonary system. *Physiol Bohemoslovaca.* 37(5):443-450. [PMID: 2975801]
- Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Widimský J (1989) Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration.* 56(1-2):57-62. [PMID: 2532385]
- Kolář F, Ošťádalová I, Ošťádal B, Neckář J, Szárszoi O (2003) Role of mitochondrial K_{ATP} channels in improved ischemic tolerance of chronically hypoxic adult and immature hearts. V knize: Dhalla NS, Hryshko LV, Kardami E, Singal PK (eds); Signal transduction and cardiac hypertrophy. Boston: Kluwer Academic Publishers, pp 69-83.
- Kolář F, Neckář J, Ošťádal B (2005) MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. *Physiol Res.* 54(4):467-471. [PMID: 16117602]
- Kopecký M, Daum S (1958) Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium. *Čs Fyziol.* 7:518-521

- Kozlovski VI, Lomnocka M, Bartus M, Sternak M, Chlopicki S (2015) Anti-thrombotic effects of nebivolol and carvedilol: Involvement of β_2 receptors and COX-2/PGI₂ pathways. *Pharmacol Rep.* 67(5):1041-1047. doi:[10.1016/j.pharep.2015.03.008](https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.008) [PMID: 26398401]
- Kramer RM, Hession C, Johansen B, Hayes G, McGray P, Chow EP, Tizard R, Pepinsky RB (1989) Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 264(10):5768-5775. [PMID: 2925633]
- Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, Jakubowski JA (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA₂. *J Biol Chem.* 271(44):27723-27729. doi:[10.1074/jbc.271.44.27723](https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27723) [PMID: 8910365]
- Krijnen PA, Meischl C, Nijmeijer R, Visser CA, Hack CE, Niessen HW (2006) Inhibition of sPLA₂-IIA, C-reactive protein or complement: a new therapy for patients with acute myocardial infarction? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 6(2):113-123. doi:[10.2174/187152906777441830](https://doi.org/10.2174/187152906777441830) [PMID: 16787196]
- Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H (1999) Circulating levels of secretory type II phospholipase A₂ predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 100(12):1280-1284. doi:[10.1161/01.cir.100.12.1280](https://doi.org/10.1161/01.cir.100.12.1280) [PMID: 10491371]
- Kuwata H, Nonaka T, Murakami M, Kudo I (2005) Search of factors that intermediated cytokine-induced group IIA phospholipase A₂ expression through the cytosolic phospholipase A₂- and 12/15-lipoxygenase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 282(27):25830-25839. doi:[10.1074/jbc.M500168200](https://doi.org/10.1074/jbc.M500168200) [PMID: 15878884]
- Kyčerová E (2015) Úloha fosfolipáz A₂ v kardioprotekci indukované kontinuální normobarickou hypoxií v myokardu potkana. Diplomová práce, PřF UK, Katedra buněčné biologie.
- La Padula P, Costa LE (2005) Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. I. Mechanical activity. *J Appl Physiol* (1985). 98(6):2363-2369. doi:[10.1152/jappphysiol.00988.2004](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00988.2004) [PMID: 15705729]
- Lambeau G, Gelb MH (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipase A₂. *Annu Rev Biochem.* 77:495-520. doi:[10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007) [PMID: 18405237]
- Lands WE (1958) Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J Biol Chem.* 231(2):883-888. [PMID: 13539023]
- Lands WE (2000) Stories about acyl chains. *Biochim Biophys Acta.* 1483(1):1-14. doi:[10.1016/s1388-1981\(99\)00177-8](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(99)00177-8) [PMID: 10601692]
- Larson PK, Claesson HE, Kennedy BP (1998) Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A₂ and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem.* 273(1):207-214. doi:[10.1074/jbc.273.1.207](https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.207) [PMID: 9417066]
- Lee IM, Sesso HD, Paffenbarger RS (2000) Physical activity and coronary heart disease risk in men: does the duration of exercise episodes predict risk? *Circulation.* 102(9):981-986. doi:[10.1161/01.cir.102.9.981](https://doi.org/10.1161/01.cir.102.9.981) [PMID: 10961961]
- Lennon SL, Quindry J, Hamilton KL, French J, Staib J, Mehta JL, Powers SK (2004) Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J Appl Physiol* (1985). 96(4):1299-1305. doi:[10.1152/jappphysiol.00920.2003](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00920.2003) [PMID: 14672968]

- León-Velarde F, Bourin MC, Germack R, Mohammadi K, Crozatier B, Richalet JP (2001) Differential alterations in cardiac signaling in chronic hypoxia or norepinephrine infusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280(1):R274-R-281. [PMID: 11124161]
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ (1993) cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell.* 72(2):269-278. doi:[10.1016/0092-8674\(93\)90666-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90666-e) [PMID: 8381049]
- Linkous A, Yazlovitskaya E (2010) Cytosolic phospholipase A₂ as a mediator of disease pathogenesis. *Cell Microbiol.* 12(10):1369-1377. doi:[10.1111/j.1462-5822.2010.01505.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01505.x) [PMID: 20642808]
- Lio YC, Dennis EA (1998) Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta.* 1392(2-3):320-332. doi:[10.1016/s0005-2760\(98\)00049-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2760(98)00049-6) [PMID: 9630702]
- Liu SJ, McHowat J (1998) Stimulation of different phospholipase A₂ isoforms by TNF- α and IL-1 β in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 275(4 Pt 2):H1462-H1472. [PMID: 9746498]
- Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schönekeess BO (1994) Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1213(3):263-276. [PMID: 8049240]
- Mackay K, Mochly-Rosen D (2001) Arachidonic acid protects neonatal rat cardiac myocytes from ischaemic injury through protein kinase C. *Cardiovasc Res.* 50(1):65-74. doi:[10.1016/s0008-6363\(00\)00322-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00322-9) [PMID: 11282079]
- Magne S, Couchie D, Pecker F, Pavoine C (2001) β_2 -adrenergic receptor agonists increase intracellular free Ca²⁺ concentration cycling in ventricular cardiomyocytes through p38 and p42/44 MAPK-mediated cytosolic phospholipase A₂ activation. *J Biol Chem.* 276(43):39569-39548. doi:[10.1074/jbc.M100954200](https://doi.org/10.1074/jbc.M100954200) [PMID: 11507087]
- Man W, Ming D, Fang D, Chao L, Jing C (2014) Dimethyl sulfoxide attenuates hydrogen peroxide-induced injury in cardiomyocytes via heme oxygenase-1. *J Cell Biochem.* 115(6):1159-1165. doi:[10.1002/jcb.24761](https://doi.org/10.1002/jcb.24761) [PMID: 24415199]
- Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc.* 169:375-382. doi:[10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x)
- Mancuso DJ, Abendschein DR, Jenkins CM, Han X, Saffitz JE, Schuessler RB, Gross RW (2003) Cardiac ischemia activates calcium-independent phospholipase A₂ β , precipitating ventricular tacharrhythmias in transgenic mice: rescue of the lethal electrophysiologic phenotype by mechanism-based inhibition. *J Biol Chem.* 278(25):22231-22236. doi:[10.1074/jbc.C300033200](https://doi.org/10.1074/jbc.C300033200) [PMID: 12719436]
- Mancuso DJ, Han X, Jenkins CM, Lehman JJ, Sambandam N, Sims HF, Yang J, Yan W, Yang K, Green K, Abendschein DR, Saffitz JE, Gross RW (2007a) Dramatic accumulation of triglycerides and precipitation of cardiac hemodynamic dysfunction during brief caloric restriction in transgenic myocardium expressing human calcium-independent phospholipase A₂ γ . *J Biol Chem.* 282(12):9216-9227. doi:[10.1074/jbc.M607307200](https://doi.org/10.1074/jbc.M607307200) [PMID: 17213206]
- Mancuso DJ, Jenkins CM, Sims HF, Cohen JM, Yang J, Gross RW (2004) Complex transcriptional and translational regulation of iPLA₂ γ resulting in multiple gene products containing dual competing sites for mitochondrial or peroxisomal localization. *Eur J*

- Biochem. 271(23-24):4709-4724. doi:[10.1111/j.1432-1033.2004.04435.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04435.x) [PMID: 15606758]
- Mancuso DJ, Sims HF, Han X, Jenkins CM, Guan SP, Yang K, Moon SH, Pietka T, Abumrad NA, Schlesinger PH, Gross RW (2007*b*) Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A₂ γ leads to alterations in mitochondrial lipid metabolism and function resulting in a deficient mitochondrial bioenergetics phenotype. *J Biol Chem.* 282(48):34611-34622. doi:[10.1074/jbc.M707795200](https://doi.org/10.1074/jbc.M707795200) [PMID: 17923475]
- Martín P, Moncada M, Enrique N, Asuaje A, Valdez Capuccino JM, Gonzales C, Milesi V (2014) Arachidonic acid activation of BK_{Ca} (Slo1) channels associated to the β_1 -subunit in human vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 466(9):1779-1792. doi:[10.1007/s00424-013-1422-x](https://doi.org/10.1007/s00424-013-1422-x) [PMID: 24375290]
- McCord JM (1988) Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook. *Free Radic Biol Med.* 4(1):9-14. doi:[10.1016/0891-5849\(88\)90005-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90005-6) [PMID: 2830176]
- McDonald M, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S, Thiemermann C (1999) Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Free Rad Biol Med.* 27:493-503. doi:[10.1016/s0891-5849\(99\)00100-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00100-8) [PMID: 10490268]
- McHowat J, Creer MH (2004) Catalytic features, regulation and function of myocardial phospholipase A₂. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2(3):209-218. doi:[10.2174/1568016043356282](https://doi.org/10.2174/1568016043356282) [PMID: 15320787]
- McHowat J, Liu S, Creer MH (1998) Selective hydrolysis of plasmalogen phospholipids by Ca²⁺-independent PLA₂ in hypoxic ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 274(6 Pt 1):C1727-C1737. [PMID: 9611139]
- McHowat J, Swift LM, Arutunyan A, Sarvazyan N (2001*a*) Clinical concentrations of doxorubicin inhibit activity of myocardial membrane-associated, calcium-independent phospholipase A₂. *Cancer Res.* 61(10):4024-4029. [PMID: 11358821]
- McHowat J, Tappia PS, Liu S, McCrory R, Panagia V (2001*b*) Redistribution and abnormal activity of phospholipase A₂ isoenzymes in postinfarct congestive heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280(3):C573-580. [PMID: 11171577]
- McKew JC, Lee KL, Shen MW, Thakker P, Foley MA, Behnke ML, Hu B, Sum FW, Tam S, Hu Y, Chen L, Kirincich SJ, Michalak R, Thomason J, Ipek M, Wu K, Wooder L, Ramarao MK, Murphy EA, Goodwin DG, Albert L, Xu X, Donahue F, Ku MS, Keith J, Nickerson-Nutter CL, Abraham WM, Williams C, Hegen M, Clark JD (2008) Indole cytosolic phospholipase A₂ α inhibitors: discovery and in vitro and in vivo characterization of 4-{3-[5-chloro-2-(2-[(3,4-dichlorobenzyl)sulfonyl]amino)ethyl]-1-(diphenylmethyl)-1H-indol-3-yl]propyl}benzoic acid, eflpladib. *J Med Chem.* 51(12):3388-3413. doi:[10.1021/jm701467e](https://doi.org/10.1021/jm701467e) [PMID: 18498150]
- Meyer MC, Kell PJ, Creer MH, McHowat J (2005) Calcium-independent phospholipase A₂ is regulated by a novel protein kinase C in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288(2):C475-C482. doi:[10.1152/ajpcell.00306.2004](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00306.2004) [PMID: 15643055]
- Meyer MC, McHowat J (2007) Calcium-independent phospholipase A₂-catalyzed plasmalogen hydrolysis in hypoxic human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(1):C251-C258. doi:[10.1152/ajpcell.00120.2006](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2006) [PMID: 16943248]
- Míčová P, Hahnová K, Hlaváčková M, Elsnicová B, Chytilová A, Holzerová K, Žurmanová J, Neckář J, Kolář F, Nováková O, Novotný J (2016) Chronic intermittent hypoxia affects the

- cytosolic phospholipase A₂ α /cyclooxygenase 2 pathway via β ₂-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Mol Cell Biochem.* 423:151-163. doi:[10.1007/s11010-016-2833-8](https://doi.org/10.1007/s11010-016-2833-8) [PMID: 27686454]
- Míčová P, Klevstigová M, Holzerová K, Vecka M, Žurmanová J, Neckář J, Kolář F, Nováková O, Novotný J, Hlaváčková M (2017) Antioxidant tempol suppresses heart cytosolic phospholipase A₂ α stimulated by chronic intermittent hypoxia. *Can J Physiol Pharmacol. Publikace v tisku.* doi: [10.1139/cjpp-2017-0022](https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0022) [PMID: 28459156]
- Miller LE, Hosick PA, Wrieden J, Hoyt E, Quindry JC (2012) Evaluation of arrhythmia scoring systems and exercise-induced cardioprotection. *Med Sci Sports Exerc.* 44(3):435-441. doi:[10.1249/MSS.0b013e3182323f8b](https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182323f8b) [PMID: 21857371]
- Monti E, Cova D, Guido E, Morelli R, Oliva C (1996) Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of Adriamycin. *Free Radic Biol Med.* 21(4):463-470. doi:[10.1016/0891-5849\(96\)00124-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00124-4) [PMID: 8886796]
- Moon SH, Mancuso DJ, Sims HF, Liu X, Nguyen AL, Yang K, Guan S, Dilthey BG, Jenkins CM, Weinheimer CJ, Kovacs A, Abendschein D, Gross RW (2016) Cardiac myocyte-specific knock-out of calcium-independent phospholipase A₂ γ (iPLA₂ γ) decreases oxidized fatty acids during ischemia/reperfusion and reduces infarct size. *J Biol Chem.* 291(37):19687-19700. doi:[10.1074/jbc.M116.740597](https://doi.org/10.1074/jbc.M116.740597) [PMID: 27453526]
- Morel S, Milano G, Ludunge KM, Corno AF, Samaja M, Fleury S, Bonny Ch, Kappenberger L, Segesser LK, Vassalli G (2006) Brief reoxygenation episodes during chronic hypoxia enhance posthypoxic recovery of LV function. *Basic Res Cardiol.* 101(4):336-345. doi:[10.1007/s00395-006-0596-1](https://doi.org/10.1007/s00395-006-0596-1) [PMID: 16705469]
- Moret PR (1980) Hypoxia and the heart; v knize: *Hearts and Heart-like Organs* (Bourne GH ed.), New York: Academic Press, str. 333-337. ISBN 0-12-119402-7
- Mosior M, Six Da, Dennis EA (1998) Group IV cytosolic phospholipase A₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem.* 273(4):2184-2191. doi:[10.1074/jbc.273.4.2184](https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2184) [PMID: 9442060]
- Muñoz NM, Kim YJ, Meliton AY, Kim KP, Han SK, Boetticher E, O'Leary E, Myou S, Zhu X, Bonventre JV, Leff AR, Cho W (2003) Human group V phospholipase A₂ induces group IVA phospholipase A₂-independent cysteinyl leukotriene synthesis in human eosinophils. *J Biol Chem.* 278(40):38813-38820. doi:[10.1074/jbc.M302476200](https://doi.org/10.1074/jbc.M302476200) [PMID: 12796497]
- Murakami M, Kudo I (2002) Phospholipase A₂. *J Biochem.* 131(3):285-292. doi:[10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101) [PMID: 11872155]
- Murakami M, Shimbara S, Kambe T, Kuwata H, Winstead MV, Tischfield JA, Kudo I (1998) The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A₂s are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 273(23):14411-14423. doi:[10.1074/jbc.273.23.14411](https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14411) [PMID: 9603953]
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74(5):1124-1136. doi:[10.1161/01.cir.74.5.1124](https://doi.org/10.1161/01.cir.74.5.1124) [PMID: 3769170]
- Murphy E, Steenbergen C (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 88(2):581-609. doi:[10.1152/physrev.00024.2007](https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2007) [PMID: 18391174]

- Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Malik KU (1996) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α mediates activation of mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A₂ in norepinephrine-induced arachidonic acid release in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 271(47):30149-30157. doi:[10.1074/jbc.271.47.30149](https://doi.org/10.1074/jbc.271.47.30149) [PMID: 8939965]
- Nakatani Y, Tanioka T, Sunaga S, Murakami M, Kudo I (2000) Identification of a cellular protein that functionally interacts with the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂ α . *J Biol Chem.* 275(2):1161-1168. doi:[10.1074/jbc.275.2.1161](https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1161) [PMID: 10625659]
- Nakamura H, Hirabayashi T, Shimizu M, Murayama T (2006) Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A₂ α directly and by PKC pathway. *Biochem Pharmacol.* 71(6):850-857. doi:[10.1016/j.bcp.2005.12.027](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.027) [PMID: 16443193]
- Nakano T, Ohara O, Teraoka H, Arita H (1990) Glucocorticoids suppress group II phospholipase A₂ production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *J Biol Chem.* 265(21):12745-12748. [PMID: 2373711]
- Nalefski EA, Sultzman LA, Martin DM, Kriz RW, Towler PS, Knopf JL, Clark JD (1994) Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A₂, a regulatory Ca²⁺-dependent lipid-binding domain and a Ca²⁺-independent catalytic domain. *J Biol Chem.* 269(27):18239-18249. [PMID: 8027085]
- Neckář J, Borchert GH, Hloušková P, Mičová P, Nováková O, Novák F, Hroch M, Papoušek F, Ošťádal B, Kolář F (2013) Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BK_{Ca} channels. *Curr Pharm Des.* 19:6880-6889. doi:[10.2174/138161281939131127115154](https://doi.org/10.2174/138161281939131127115154) [PMID: 23590154]
- Neckář J, Marková I, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ošťádal B, Kolář F (2005) Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- δ in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(4):H1566-H1572. doi:[10.1152/ajpheart.00586.2004](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00586.2004) [PMID: 15576445]
- Neckář J, Ošťádal B, Kolář F (2004) Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res.* 53(6):621-628. [PMID: 15588130]
- Neckář J, Ošťádal B, Kolář F (2008) Acute but not chronic tempol treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open-chest rats. *Physiol Res.* 57(4):653-656. [PMID: 18783306]
- Neckář J, Papoušek F, Nováková O, Ošťádal B, Kolář F (2002a) Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol* 97(2):161-167. doi:[10.1007/s003950200007](https://doi.org/10.1007/s003950200007) [PMID: 12002264]
- Neckář J, Szárszoi O, Kotten L, Papoušek F, Ošťádal B, Grover GJ, Kolář F (2002b) Effects of mitochondrial K_{ATP} modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* 55(3):567-575. doi:[10.1016/s0008-6363\(02\)00456-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00456-x) [PMID: 12160954]
- Neely JR, Rovetto MJ, Whitmer JT, Morgan HE (1973) Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *Am J Physiol.* 225(3):651-658. [PMID: 4726499]
- Nelson SK, Wong GH, McCord JM (1995) Leukemia inhibitory factor and tumor necrosis factor induce manganese superoxide dismutase and protect rabbit hearts from reperfusion

- injury. *J Mol Cell Cardiol.* 27(1):223-229. doi:[10.1016/s0022-2828\(08\)80021-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(08)80021-1) [PMID: 7760346]
- Nemenoff RA, Winitz S, Qian NX, Van Putten V, Johnson GL, Heasley LE (1993) Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A₂ by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J Biol Chem.* 268(3):1960-1964. [PMID: 8380583]
- Netuka I, Szárszoi O, Malý J, Besík J, Neckář J, Kolář F, Ošťádalová I, Pirk J, Ošťádal B (2006) Effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to acute ischaemia in adult male and female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* doi:[10.1111/j.1440-1681.2006.04423.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04423.x) [PMID: 16895545]
- Nevalainen TJ, Cardoso JC, Riikonen PT (2011) Conserved domains and evolution of secreted phospholipase A₂. *FEBS J.* 279(4):636-649. doi:[10.1111/j.1742-4658.2011.08453.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08453.x) [PMID: 22177112]
- Niessen HW, Krijnen PA, Visser CA, Meijer CJ, Erik Hack C (2003) Type II secretory phospholipase A₂ in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes? *Cardiovasc Res.* 60(1):68-77. doi:[10.1016/s0008-6363\(03\)00324-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00324-9) [PMID: 14522408]
- Nijmeijer R, Lagrand WK, Baidoshvili A, Lubbers YT, Hermens WT, Meijer CJ, Visser CA, Hack CE, Niessen HW (2002) Secretory type II phospholipase A₂ binds to ischemic myocardium during myocardial infarction in humans. *Cardiovasc Res.* 53(1):138-146. doi:[10.1016/s0008-6363\(01\)00480-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00480-1) [PMID: 11744022]
- Nijmeijer R, Willemsen M, Meijer CJ, Visser CA, Verheijen RH, Gottlieb RA, Hack CE, Niessen HW (2003) Type secretory phospholipase A₂ binds to ischemic flip-flopped cardiomyocytes and subsequently induces cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(5):H2218-H2224. doi:[10.1152/ajpheart.00887.2002](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00887.2002) [PMID: 12805018]
- Noma A (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature.* 305(5930):147-148. doi:[10.1038/305147a0](https://doi.org/10.1038/305147a0) [PMID: 6310409]
- Novák F, Kolář F, Voců S, Vecka M, Nováková O (2012) Pressure overload selectively increases n-3 PUFA in myocardial phospholipids during early postnatal period. *Physiol Res.* 61 Suppl 1:S155-S163. [PMID: 22827872]
- Novotný J, Bouřová L, Málková O, Svoboda P, Kolář F (1999) G proteins, β-adrenoceptors and β-adrenergic responsiveness in immature and adult rat ventricular myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J Mol Cell Cardiol.* 31(4):761-772. doi:[10.1006/jmcc.1998.0913](https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0913) [PMID: 10329204]
- Oka S, Arita H (1991) Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A₂ in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. *J Biol Chem.* 266(15):9956-9960. [PMID: 2033082]
- Oka T, Itoi T, Terada N, Nakanishi H, Taquchi R, Hamaoka K (2008) Change in the membranous lipid composition accelerates lipid peroxidation in young rat hearts subjected to 2 weeks of hypoxia followed by hyperoxia. *Circ J.* 72(8):1359-1366. doi:[10.1253/circj.72.1359](https://doi.org/10.1253/circj.72.1359) [PMID: 18654026]
- Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Yang G, Lee MC, Hong C, Liu J, Vatner DE, Sadoshima J, Vatner SF, Ishikawa Y (2003) Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(17):9986-9990. doi:[10.1073/pnas.1733772100](https://doi.org/10.1073/pnas.1733772100) [PMID: 12904575]

- Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ (2015) The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 78:23-34. doi:[10.1016/j.yjmcc.2014.11.005](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.005) [PMID: 25446182]
- Ono T, Yamada K, Chikazawa Y, Ueno M, Nakamoto S, Okuno T, Seno K (2002) Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A₂ α , pyrrophenone. *Biochem J.* 363(Pt 3):727-735. doi:[10.1042/0264-6021:3630727](https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630727) [PMID: 11964173]
- Opie LH (1978) Myocardial metabolism and heart disease. *Jpn Circ J.* 42(11):1223-1247. doi:[10.1253/jcj.42.1223](https://doi.org/10.1253/jcj.42.1223) [PMID: 34741]
- Opie LH (1990) What is new in myocardial ischemia? *Cardiovasc Drugs Ther.* 4 Suppl 4:765-766. [PMID: 2093366]
- Oshima K, Takeyoshi I, Tsutsumi H, Mohara J, Ohki S, Koike N, Nameki T, Matsumoto K, Morishita Y (2006) Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function following long-term preservation. *J Surg Res.* 135(2):380-384. doi:[10.1016/j.jss.2006.03.044](https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.03.044) [PMID: 16713604]
- Ošťádal B, Kolář F (2007) Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol.* 158(2-3):224-236. doi:[10.1016/j.resp.2007.03.005](https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.03.005) [PMID: 17442631]
- Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Urbanová D, Widimský J (1984) Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov.* 33(2):129-138. [PMID: 6233623]
- Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Urbanová D, Widimský J, Faltová E, Staněk V (1985) Pharmacological treatment and spontaneous reversibility of cardiopulmonary changes induced by intermittent high altitude hypoxia. *Prog Resp Res.* 29:17-25.
- Ošťádalová I, Ošťádal B, Jarkovská D, Kolář F (2002) Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res.* 52(4):561-567. doi:[10.1203/00006450-200210000-00016](https://doi.org/10.1203/00006450-200210000-00016) [PMID: 12357051]
- Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B (1997) Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tacharrhythmia. *Am J Physiol.* 273(4 Pt 2):H1707-1712. [PMID: 9362234]
- Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM (2000) Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res.* 87(6):460-466. doi:[10.1161/01.res.87.6.460](https://doi.org/10.1161/01.res.87.6.460) [PMID: 10988237]
- Park A-M, Suzuki YJ (2007) Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol* (1985). 102(5):1806-1814. doi:[10.1152/japplphysiol.01291.2006](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01291.2006) [PMID: 17272404]
- Pavoine C, Behforouz N, Gauthier C, Le Gouvello S, Roudot-Thoraval F, Martin CR, Pawlak A, Feral C, Defer N, Houel R, Magne S, Amadou A, Loisançe D, Duvaldestin P, Pecker F (2003) β_2 -adrenergic signaling in human heart: shift from cyclic AMP to the arachidonic acid pathway. *Mol Pharmacol.* 64(5):1117-1125. doi:[10.1124/mol.64.5.1117](https://doi.org/10.1124/mol.64.5.1117) [PMID: 14573761]
- Peart JN, Headrick JP (2008) Sustained cardioprotection: exploring unconventional modalities. *Vascul Pharmacol.* 49(2-3):63-70. doi: [10.1016/j.vph.2008.07.001](https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.07.001) [PMID: 18675381]

- Pei JM, Yu XC, Fung ML, Zhou JJ, Cheung CS, Wong NS, Leung MP, Wong TM (2000) Impaired G_sα and adenylyl cyclase cause β-adrenoceptor desensitization in chronically hypoxic rat hearts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 279(5):C1455-C1463. [PMID: 11029293]
- Pérez R, Matabosch X, Llebaria A, Balboa MA, Balsinde J (2006) Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J Lipid Res*. 47(3):484-491. doi:[10.1194/jlr.M500397-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M500397-JLR200) [PMID: 16326977]
- Pérez R, Melero R, Balboa MA, Balsinde J (2004) Role of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 279(39):40385-40391. doi:[10.1074/jbc.M402562200](https://doi.org/10.1074/jbc.M402562200) [PMID: 15252038]
- Peters-Golden M, Song K, Marshall T, Brock T (1996) Translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem J*. 318(Pt 3):797-803. doi:[10.1042/bj3180797](https://doi.org/10.1042/bj3180797) [PMID: 8836122]
- Petrosillo G, Di Venosa N, Ruggiero FM, Pistolese M, D'Agostino D, Tiravanti E, Fiore T, Paradies G (2005) Mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia/reperfusion can be attenuated by oxygen tension control. Role of oxygen-free radicals and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta*. 1710(2-3):78-86. doi:[10.1016/j.bbabi.2005.10.003](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.10.003) [PMID: 16325647]
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29:e45. doi: [10.1093/nar/29.9.e45](https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45) [PMID: 11328886]
- Pilz J, Meineke I, Gleiter Ch (2000) Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 742:315-325. doi:[10.1016/s0378-4347\(00\)00174-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00174-2) [PMID: 10901136]
- Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M (1998) A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 38(2):291-300. doi:[10.1016/s0008-6363\(98\)00033-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00033-9) [PMID: 9709390]
- Piper HM, Abdallah Y, Schäfer (2004) The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 61(3):365-371. doi:[10.1016/j.cardiores.2003.12.012](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.012) [PMID: 14962469]
- Poulsen KA, Pedersen SF, Kolko M, Lambert IH (2007) Induction of group VIA phospholipase A₂ activity during *in vitro* ischemia in C2C12 myotubes is associated with changes in the level of its splice variants. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293(5):C1605-1615. doi:[10.1152/ajpcell.00012.2007](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00012.2007) [PMID: 17804611]
- Poupa O, Krofta K, Procházka J, Turek Z (1966) Acclimation to stimulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc*. 25(4):1243-1246. [PMID: 5913895]
- Powers SK, Lennon SL, Quindry J, Mehta JL (2002) Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol*. 17(5):495-502. doi:[10.1097/00001573-200209000-00009](https://doi.org/10.1097/00001573-200209000-00009) [PMID: 12357126]
- Powers SK, Murlasits Z, Wu M, Kavazis AN (2007) Ischemia-reperfusion-induced cardiac injury: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*. 39(9):1529-1536. doi:[10.1249/mss.0b013e3180d099c1](https://doi.org/10.1249/mss.0b013e3180d099c1) [PMID: 17805085]
- Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN (2008) Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 44(2):193-201. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.006) [PMID: 18191755]

- Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Quindry JC (2014) Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology (Bethesda)*. 29(1):27-38. doi:[10.1152/physiol.00030.2013](https://doi.org/10.1152/physiol.00030.2013) [PMID: 24382869]
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P (1993) Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87(3):893-899. doi:[10.1161/01.cir.87.3.893](https://doi.org/10.1161/01.cir.87.3.893) [PMID: 7680290]
- Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard KA Jr., Tweddell JS, Litwin SB, Mussatto K, Jacquiss RD, Su J, Baker JE (2002) Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: a role in cardioprotection. *Circulation*. 106(2):239-245. doi:[10.1161/01.cir.0000022018.68965.6d](https://doi.org/10.1161/01.cir.0000022018.68965.6d) [PMID: 12105165]
- Ramond A, Godin-Ribuot D, Ribuoat C, Totoston P, Koritchneva I, Cachot S, Levy P, Joyeux-Faure M (2013) Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol*. 27(3):252-261. doi:[10.1111/j.1472-8206.2011.01015.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.01015.x) [PMID: 22145601]
- Ravingerová T, Matejíková J, Neckář J, Anđelová E, Kolář F (2007) Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol Cell Biochem*. 297(1-2):111-120. doi:[10.1007/s11010-006-9335-z](https://doi.org/10.1007/s11010-006-9335-z) [PMID: 17016676]
- Richalet JP, Hornych A, Pathat C, Aumont J, Larmignat P, Rémy P (1991) Plasma prostaglandins, leukotrienes and thromboxane in acute high altitude hypoxia. *Respir Physiol*. 85(2):205-215. doi:[10.1016/0034-5687\(91\)90062-n](https://doi.org/10.1016/0034-5687(91)90062-n) [PMID: 1947460]
- Rosenson RS, Gelb MH (2009) Secretory phospholipase A₂: a multifaceted family of proatherogenic enzymes. *Curr Cardiol Rep*. 11(6):445-451. doi:[10.1007/s11886-009-0064-2](https://doi.org/10.1007/s11886-009-0064-2) [PMID: 19863869]
- Rouet-Benzineb P, Eddahibi S, Raffestin B, Laplace M, Depond S, Adnot S, Crozatier B (1999) Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. *J Mol Cell Cardiol*. 31(9):1697-1708. doi:[10.1006/jmcc.1999.1005](https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.1005) [PMID: 10471353]
- Saiga A, Uozumi N, Ono T, Seno K, Ishimoto Y, Arita H, Shimizu T, Hanasaki K (2005) Group X secretory phospholipase A₂ can induce arachidonic acid release and eicosanoid production without activation of cytosolic phospholipase A₂ α . *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 75(1-4):79-89. doi:[10.1016/j.prostaglandins.2004.10.001](https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.10.001) [PMID: 15789617]
- Saito T, Rodger IW, Hu F, Robinson R, Huynh T, Giaid A (2004) Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 37(1):71-77. doi:[10.1016/j.yjmcc.2004.04.002](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.04.002) [PMID: 15242737]
- Saito Y, Watanabe K, Fujioka D, Nakamura T, Obata JE, Kawabata K, Watanabe Y, Mishina H, Tamaru S, Kita Y, Shimizu T, Kugiyama K (2012) Disruption of group IVA cytosolic phospholipase A₂ attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury partly through inhibition of TNF- α -mediated pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302(10):H2018-H2030. doi:[10.1152/ajpheart.00955.2011](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00955.2011) [PMID: 22427514]
- Samuni A, Godinger D, Aronovitch J, Russo A, Mitchell JB (1991) Nitroxides block DNA scission and protect cells from oxidative damage. *Biochemistry*. 30(2):555-561. doi:[10.1021/bi00216a033](https://doi.org/10.1021/bi00216a033) [PMID: 1846300]
- Samuni AM, Barenholz Y (1997) Stable nitroxide radicals protect lipid acyl chains from radiation damage. *Free Radic Biol Med*. 22(7):1165-1174. doi:[10.1016/s0891-5849\(96\)00509-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00509-6) [PMID: 9098090]

- Samuni AM, Barenholz Y, Crommelin DJ, Zuidam NJ (1997) γ -irradiation damage to liposomes differing in composition and their protection by nitroxides. *Free Radic Biol Med.* 23(7):972-979. doi:[10.1016/s0891-5849\(97\)00123-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00123-8) [PMID: 9358239]
- Samuni AM, Lipman A, Barenholz Y (2000) Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. *Chem Phys Lipids.* 105(2):121-134. doi:[10.1016/s0009-3084\(99\)00136-x](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(99)00136-x) [PMID: 10823461]
- Sargent CA, Wilde MW, Dzwonczyk S, Tuttle JG, Murray HN, Atwal K, Grover GJ (1996) Glyburide-reversible cardioprotective effects of calcium-independent phospholipase A₂ inhibition in ischemic rat hearts. *Cardiovasc Res.* 31(2):270-277. doi:[10.1016/0008-6363\(95\)00198-0](https://doi.org/10.1016/0008-6363(95)00198-0) [PMID: 8730404]
- Sartipy P, Camejo G, Svensson L, Hurt-Camejo E (2002) Phospholipase A₂ modification of lipoproteins: potential effects on atherogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 507:3-7. doi:[10.1007/978-1-4615-0193-0_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0193-0_1) [PMID: 12664556]
- Sasaki N, Murata M, Guo Y, Jo SH, Ohler A, Akao M, O'Rourke B, Xiao RP, Bolli R, Marbán E (2003) MCC-134, a single pharmacophore, opens surface ATP-sensitive potassium channels, blocks mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, and suppresses preconditioning. *Circulation.* 107(8):1183-1188. doi:[10.1161/01.cir.0000051457.64240.63](https://doi.org/10.1161/01.cir.0000051457.64240.63) [PMID: 12615799]
- Sato S, Shirato K, Mitsuhashi R, Inoue D, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2013) Intracellular β_2 -adrenergic receptor signaling specificity in mouse skeletal muscle in response to single-dose β_2 -agonist clenbuterol treatment and acute exercise. *J Physiol Sci.* 63(3):211-218. doi:[10.1007/s12576-013-0253-z](https://doi.org/10.1007/s12576-013-0253-z) [PMID: 23508836]
- Savourey G, Launay JC, Besnard Y, Guinet A, Travers S (2003) Normobaric and hypobaric hypoxia: are there any physiological differences? *Eur J Appl Physiol.* 89(2):122-126. doi:[10.1007/s00421-002-0789-8](https://doi.org/10.1007/s00421-002-0789-8) [PMID: 12665974]
- Schaloske RH, Dennis EA (2006) The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta.* 1761(11):1246-1259. doi:[10.1016/j.bbalip.2006.07.011](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011) [PMID: 16973413]
- Schievella AR, Regier MK, Smith WL, Lin LL (1995) Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 270(51):30749-30754. doi:[10.1074/jbc.270.51.30749](https://doi.org/10.1074/jbc.270.51.30749) [PMID: 8530515]
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartensen V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9:676-682. doi: [10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019) [PMID: 22743772]
- Schlüter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Piper HM (1996) Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *Am J Physiol.* 271(2 Pt 2):H428-H434. [PMID: 8770080]
- Schmedtje JF Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS (1997) Hypoxia induced cyclooxygenase-2 *via* the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 272(1):601-608. doi:[10.1074/jbc.272.1.601](https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.601) [PMID: 8995303]
- Schwemmer M, Aho H, Michel JB (2001) Interleukin-1 β -induced type IIA secreted phospholipase A₂ gene expression and extracellular activity in rat vascular endothelial cells. *Tissue Cell.* 33(3):233-240. doi: [10.1054/tice.2000.0163](https://doi.org/10.1054/tice.2000.0163) [PMID: 11469536]

- Scott DL, White SP, Browning JL, Rosa JJ, Gelb MH, Sigler PB (1991) Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A₂ from inflammatory exudate. *Science*. 254(5034):1007-1010. doi:[10.1126/science.1948070](https://doi.org/10.1126/science.1948070) [PMID: 1948070]
- Seilhamer JJ, Pruzanski W, Vadas P, Plant S, Miller JA, Kloss J, Johnson LK (1989) Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem*. 264(10):5335-5338. [PMID: 2925608]
- Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y (1997) Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65^{PAK}, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 239(3):840-844. doi:[10.1006/bbrc.1997.7570](https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7570) [PMID: 9367856]
- Seko Y, Tobe K, Ueki K, Kadowaki T, Yazaki Y (1996) Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate Raf-1, mitogen-activated protein kinase kinase, mitogen-activated protein kinases, and S6 kinase in cultured rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 78(1):82-90. doi:[10.1161/01.res.78.1.82](https://doi.org/10.1161/01.res.78.1.82) [PMID: 8603510]
- Semenza GL (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*. 7(8):345-350. doi:[10.1016/s1471-4914\(01\)02090-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(01)02090-1) [PMID: 11516994]
- Semenza GL (2004) O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology HIF-1. *J Appl Physiol* (1985). 96(3):1173-1177. doi:[10.1152/jappphysiol.00770.2003](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00770.2003) [PMID: 14766767]
- Sierra-Honigmann MR, Bradley JR, Pober JS (1996) "Cytosolic" phospholipase A₂ is in the nucleus of subconfluent endothelial cells but confined to the cytoplasm of confluent endothelial cells and redistributes to the nuclear envelope and cell junctions upon histamine stimulation. *Lab Invest*. 74(3):684-695. [PMID: 8600319]
- Simonsen U, Christensen FH, Buus NH (2009) The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure. *Pharmacol Ther*. 122:(2)109-124. doi:[10.1016/j.pharmthera.2009.02.002](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.02.002) [PMID: 19268689]
- Sheedy W, Thompson JS, Morice AH (1996) A comparison of pathophysiological changes during hypobaric and normobaric hypoxia in rats. *Respiration*. 63(4):217-222. doi:[10.1159/000196548](https://doi.org/10.1159/000196548) [PMID: 8815968]
- Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R (2000) Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(18):10197-10202. doi:[10.1073/pnas.97.18.10197](https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10197) [PMID: 10963682]
- Shinohara H, Balboa MA, Johnson CA, Balsinde J, Dennis EA (1999) Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D₁ macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A₂s. *J Biol Chem*. 274(18):12263-12268. doi:[10.1074/jbc.274.18.12263](https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12263) [PMID: 10212194]
- Shiose A, Sumimoto H (2000) Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47^{phox} to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 275(18):13793-13801. doi:[10.1074/jbc.275.18.13793](https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13793) [PMID: 10788501]
- Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem*. 277(50):48535-48549. doi:[10.1074/jbc.M205855200](https://doi.org/10.1074/jbc.M205855200) [PMID: 12359733]

- Skulachev VP (2001) The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology. *Exp Gerontol.* 36(7):995-1024. doi:[10.1016/s0531-5565\(01\)00109-7](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00109-7) [PMID: 11404047]
- Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, Heusch G (2007) Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res.* 100(1):140-146. doi:[10.1161/01.RES.0000255031.15793.86](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255031.15793.86) [PMID: 17170366]
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 69:145-182. doi:[10.1146/annurev.biochem.69.1.145](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145) [PMID: 10966456]
- Soilaini G, Harris DA (2005) Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J.* 390(Pt 2):377-394. doi:[10.1042/bj20042006](https://doi.org/10.1042/bj20042006) [PMID: 16108756]
- Song H, Bao S, Ramanadham S, Turk J (2006) Effects of biological oxidants on the catalytic activity and structure of group VIA phospholipase A₂. *Biochemistry.* 45(20):6392-6406. doi:[10.1021/bi060502a](https://doi.org/10.1021/bi060502a) [PMID: 16700550]
- Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM (1994) Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res.* 75(3):586-590. doi:[10.1161/01.res.75.3.586](https://doi.org/10.1161/01.res.75.3.586) [PMID: 8062429]
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem.* 273(16):9886-9893. doi:[10.1074/jbc.273.16.9886](https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9886) [PMID: 9545330]
- Strnisková M, Ravingerová T, Neckář J, Kolář F, Pastoreková S, Barančík M (2006) Changes in the expression and/or activation of regulatory proteins in rat hearts adapted to chronic hypoxia. *Gen Physiol Biophys.* 25(1):25-41. [PMID: 16714773]
- Strokin M, Sergeeva M, Reiser G (2003) Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A₂ and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺. *Br J Pharmacol.* 139(5):1014-1022. doi:[10.1038/sj.bjp.0705326](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705326) [PMID: 12839876]
- Strokin M, Sergeeva M, Reiser G (2007) Prostaglandin synthesis in rat brain astrocyte is under the control of the n-3 docosahexaenoic acid, released by group VIB calcium-independent phospholipase A₂. *J Neurochem.* 102(6):1771-1782. doi:[10.1111/j.1471-4159.2007.04663.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04663.x) [PMID: 17555549]
- Svoboda P, Teisinger J, Novotný J, Bourová K, Drmota T, Hejnová L, Moravcová Z, Lisý V, Rudajev V, Stöhr J, Vokurková A, Svandová I, Durchánková D (2004) Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiol Res.* 53 Suppl 1:141-152. [PMID: 15119945]
- Swift L, McHowat J, Sarvazyan N (2003) Inhibition of membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂ as a potential culprit of anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Res.* 63(1):5992-5998. [PMID: 14522926]
- Swift L, McHowat J, Sarvazyan N (2007) Anthracycline-induced phospholipase A₂ inhibition. *Cardiovasc Toxicol.* 7(2):86-91. doi:[10.1007/s12012-007-0012-6](https://doi.org/10.1007/s12012-007-0012-6) [PMID: 17652810]
- Štípek S (2000) Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Praha: Grada Publishing, 1. vydání. ISBN 80-7169-704-4

- Tabuchi S, Uozumi N, Ishii S, Shimizu Y, Watanabe T, Shimizu T (2003) Mice deficient in cytosolic phospholipase A₂ are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Acta Neurochir Suppl.* 86:169-172. doi:[10.1007/978-3-7091-0651-8_36](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0651-8_36) [PMID: 14753428]
- Tajima M, Katayose D, Bessho M, Isoyama S (1994) Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia. *Cardiovasc Res.* 28(3):312-319. doi:[10.1093/cvr/28.3.312](https://doi.org/10.1093/cvr/28.3.312) [PMID: 8174150]
- Tang J, Kriz RX, Wolfman N, Shaffer M, Sehra J, Jones SS (1997) A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A₂ contains eight ankyrin motifs. *J Biol Chem.* 272(13):8567-8775. doi:[10.1074/jbc.272.13.8567](https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8567) [PMID: 9079687]
- Taylor RP, Harris MB, Starnes JW (1999) Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am J Physiol.* 276(3 Pt 2):H1098-1102. [PMID: 10070097]
- Taylor RP, Olsen ME, Starnes JW (2007) Improved postischemic function following acute exercise is not mediated by nitric oxide synthase in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(1):H601-607. doi:[10.1152/ajpheart.00094.2006](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00094.2006) [PMID: 16951051]
- Tong H, Bernstein D, Murphy E, Steenbergen C (2005) The role of β -adrenergic receptor signaling in cardioprotection. *FASEB J.* 19(8):983-985. doi:[10.1096/fj.04-3067fje](https://doi.org/10.1096/fj.04-3067fje) [PMID: 15802488]
- Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL (2003) Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30:860-866. doi:[10.1046/j.1440-1681.2003.03930.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03930.x) [PMID: 14678251]
- Triggiani M, Granata F, Balestrieri B, Petraroli A, Scalia G, Del Vecchio L, Marone G (2003) Secretory phospholipases A₂ activate selective functions in human eosinophils. *J Immunol.* 170(6):3279-3288. doi:[10.4049/jimmunol.170.6.3279](https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3279) [PMID: 12626587]
- Triggiani M, Granata F, Frattini A, Marone G (2006) Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta.* 1761(11):1289-1300. doi:[10.1016/j.bbailip.2006.07.003](https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.07.003) [PMID: 16952481]
- Triggiani M, Granata F, Oriente A, De Marino V, Gentile M, Calabrese C, Palumbo C, Marone G (2000) Secretory phospholipase A₂ induce β -glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol.* 164(9):4908-4915. doi:[10.4049/jimmunol.164.9.4908](https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4908) [PMID: 10779801]
- Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, Kanagy NL (2007) *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(5):H2971-2976. doi:[10.1152/ajpheart.00219.2007](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00219.2007) [PMID: 17766485]
- Trueblood NA, Ramasamy R, Wang LF, Schaefer S (2000) Niacin protects the isolated heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279(2):H764-H771. [PMID: 10924076]
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res.* 95(3):230-232. doi:[10.1161/01.RES.0000138303.76488.fe](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000138303.76488.fe) [PMID: 15242972]
- Tvrzická E, Vecka M, Staňková B, Žák A (2002) Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection. Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta.* 465:337-350. doi:[10.1016/s0003-2670\(02\)00396-3](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(02)00396-3)

- ÚZIS, Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (2016) Zdravotnická ročenka České republiky 2015. Praha: ÚZIS. ISSN 12010-9991.
- Valen G (2004) Signal transduction through nuclear factor kappa B in ischemia-reperfusion and heart failure. *Basic Res Cardiol.* 99(1):1-7. doi:[10.1007/s00395-003-0442-7](https://doi.org/10.1007/s00395-003-0442-7) [PMID: 14685699]
- Van Bilsen M, Van der Vusse GJ (1995) Phospholipase-A₂-dependent signalling in the heart. *Cardiovasc Res.* 30(4):518-529. doi:[10.1016/0008-6363\(95\)00098-4](https://doi.org/10.1016/0008-6363(95)00098-4) [PMID: 8575000]
- Van Dijk A, Krijnen PA, Vermond RA, Pronk A, Spreeuwenberg M, Visser FC, Berney R, Paulus WJ, Hack CE, Van Millige FJ, Niessen HW (2009) Inhibition of type 2A secretory phospholipase A₂ reduces death of cardiomyocytes in acute myocardial infarction. *Apoptosis.* 14(6):753-763. doi:[10.1007/s10495-009-0350-x](https://doi.org/10.1007/s10495-009-0350-x) [PMID: 19421861]
- Van Rossum GS, Drummen GP, Verkleij AJ, Post JA, Boonstra J (2004) Activation of cytosolic phospholipase A₂ in Her14 fibroblasts by hydrogen peroxide: a p42/44^{MAPK}-dependent and phosphorylation-independent mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1636(2-3):183-195. doi:[10.1016/j.bbaliip.2003.12.008](https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2003.12.008) [PMID: 15164766]
- Venugopal R, Jaiswal AK (1996) Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase₁ gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(25):14960-14965. doi:[10.1073/pnas.93.25.14960](https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14960) [PMID: 8962164]
- Vuorinen K, Ylitalo K, Peuhkurinen K, Raatikainen P, Ala-Rämi A, Hassinen JE (1995) Mechanisms of ischemic preconditioning in rat myocardium. Roles of adenosine, cellular energy state, and mitochondrial F₁F₀-ATPase. *Circulation.* 91(11):2810-2818. doi:[10.1161/01.cir.91.11.2810](https://doi.org/10.1161/01.cir.91.11.2810) [PMID: 7758188]
- Wang ZH, Chen YX, Zhang CM, Wu L, Yu Z, Cai XL, Guan Y, Zhou ZN, Yang HT (2011) Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function *via* redox signaling during early reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301(4):H1695-H1705. doi:[10.1152/ajpheart.00276.2011](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00276.2011) [PMID: 21821784]
- Wauthy P, Pagnamenta A, Vassalli F, Naeije R, Brimiouille S (2004) Right ventricular adaptation to pulmonary hypertension: an interspecies comparison. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(4):H1441-1447. doi:[10.1152/ajpheart.00640.2003](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00640.2003) [PMID: 14684368]
- Widimský J, Urbanová D, Ressler J, Ošťádal B, Pelouch V, Procházka J (1973) Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. doi:[10.1093/cvr/7.6.798](https://doi.org/10.1093/cvr/7.6.798) [PMID: 4274229]
- Wilcox, C.D. 2010. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol. Ther.* 126(2):119-145. doi:[10.1016/j.pharmthera.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.01.003) [PMID: 20153367]
- Wilcox, C.D., Pearlman, A. 2008. Chemistry and antihypertensive effect of tempol and other nitroxides. *Pharmacol. Rev.* 60(4):418-469. doi:[10.1124/pr.108.000240](https://doi.org/10.1124/pr.108.000240) [PMID: 19112152]
- Williams SD, Gottlieb RA (2002) Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. *Biochem J.* 362(Pt 1):23-32. doi:[10.1042/0264-6021:3620023](https://doi.org/10.1042/0264-6021:3620023) [PMID: 11829736]

- Wilton DC (2008) Phospholipases. V knize: Vance DE, Vance JE (Eds.); *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (5th Edn.). Elsevier, pp 305-329. ISBN 978-0-444-53219-0
- Winstead MV, Lucas KK, Dennis EA (2005) Group IV cytosolic phospholipase A₂ mediates arachidonic acid release in H9c2 rat cardiomyocytes cells in response to hydrogen peroxide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 78:55-66. doi:[10.1016/j.prostaglandins.2005.03.004](https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2005.03.004) [PMID: 16303605]
- WHO, World Healthy Organization (2017) The 10 causes of death [on-line] [cit. 22-02-2017] Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, O'Rourke B (2002) Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science*. 298(5595):1029-1033. doi:[10.1126/science.1074360](https://doi.org/10.1126/science.1074360) [PMID: 12411707]
- Yagami T (2006) Cerebral arachidonate cascade in dementia: Alzheimer's disease and vascular dementia. *Curr Neuropharmacol*. 4(1):87-100. doi:[10.2174/157015906775203011](https://doi.org/10.2174/157015906775203011) [PMID: 18615138]
- Yamamoto K, Isogai Y, Sato H, Taketomi Y, Murakami M (2011) Secreted phospholipase A₂, lipoprotein hydrolysis, and atherosclerosis: integration with lipidomics. *Anal Bioanal Chem*. 400(7):1829-1842. doi:[10.1007/s00216-011-4864-z](https://doi.org/10.1007/s00216-011-4864-z) [PMID: 21445663]
- Yang X, Ma N, Szabolcs MJ, Zhong J, Athan E, Sciacca RR, Michler RE, Anderson GD, Wiese JF, Leahy KM, Gregory S, Cannon PJ (2000) Upregulation of COX-2 during cardiac allograft rejection. *Circulation*. 101(4):430-438. doi:[10.1161/01.cir.101.4.430](https://doi.org/10.1161/01.cir.101.4.430) [PMID: 10653836]
- Yano T, Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, Nakamura T, Obata JE, Kawabata K, Watanabe K, Watanabe Y, Mishina H, Tamaru S, Kugiyama K (2011) Group V secretory phospholipase A₂ plays a pathogenic role in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 90(2):335-343. doi:[10.1093/cvr/cvq399](https://doi.org/10.1093/cvr/cvq399) [PMID: 21169294]
- Yellon DM, Downey JM (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 83(4):1113-1151. doi:[10.1152/physrev.00009.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2003) [PMID: 14506302]
- You HJ, Lee JW, Yoo YJ, Kim JH (2004) A pathway involving protein kinase C δ up-regulates cytosolic phospholipase A₂ α in airway epithelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 321(3):657-664. doi:[10.1016/j.bbrc.2004.07.022](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.022) [PMID: 15358156]
- Zacharowski K, Zacharowski PA, Friedl P, Mastan P, Koch A, Boehm O, Rother RP, Reingruber S, Henning R, Emeis JJ, Petzelbauer P (2007) The effects of the fibrin-derived peptide B β ₁₅₋₄₂ in acute and chronic rodent models of myocardial ischemia-reperfusion. *Shock*. 27(6):631-637. doi:[10.1097/SHK.0b013e31802fa038](https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31802fa038) [PMID: 17505302]
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 33(3):337-349. doi:[10.1016/s0891-5849\(02\)00905-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x) [PMID: 12126755]
- Závišková K (2014) Vliv chronické hypoxie na antioxidační kapacitu myokardu potkana. Diplomová práce, PřF UK, Katedra buněčné biologie.
- Zhang C, Xu X, Potter BJ, Wang W, Kuo L, Michael L, Bagnsby GJ, Chilian WM (2006) TNF- α contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler*

- Thromb Vasc Biol. 26(3):475-480. doi:[10.1161/01.ATV.0000201932.32678.7e](https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000201932.32678.7e) [PMID: 16385082]
- Zhang J, Barasch N, Li RC, Sapirstein A (2012) Inhibition of cytosolic phospholipase A₂ alpha protects against focal ischemic brain damage in mice. *Brain Res.* 1471:129-137. doi:[10.1016/j.brainres.2012.06.031](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.031) [PMID: 22819928]
- Zhao X, Wang D, Zhao Z, Xiao Y, Sengupta S, Xiao Y, Zhang R, Lauber K, Wesselborg S, Feng L, Rose TM, Shen Y, Zhang J, Preswich G, Xu Y (2006) Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A₂ enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 281(39):29357-29368. doi:[10.1074/jbc.M513105200](https://doi.org/10.1074/jbc.M513105200) [PMID: 16882668]
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(2):H579-H588. doi:[10.1152/ajpheart.01064.2002](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002) [PMID: 12860564]
- Zhu WZ, Dong JW, Ding HL, Yang HT, Zhou ZN (2004) Postnatal development in intermittent hypoxia enhances resistance to myocardial ischemia/reperfusion in male rats. *Eur J Appl Physiol.* 91(5-6):716-722. doi:[10.1007/s00421-003-0939-7](https://doi.org/10.1007/s00421-003-0939-7) [PMID: 14985993]
- Zhu WZ, Xie Y, Chen L, Yang HT, Zhou ZN (2006) Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 40(1):96-106. doi:[10.1016/j.yjmcc.2005.09.016](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.09.016) [PMID: 16288778]

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová (5,8,11,14-eikosatetraenová kyselina)
AC	adenylátcykláza
Akt	proteinkináza B
AR	velikost oblasti infarktem ohrožené
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
β -AR	β adrenergní receptory
β_1 -AR	β_1 adrenergní receptory
β_2 -AR	β_2 adrenergní receptory
BEL	bromenollakton (inhibitor iPLA ₂)
BK _{Ca} kanály	mitochondriální draslíkové kanály s vysokou vodivostí, řízené napětím a aktivované vápníkem
BW	hmotnost těla (z angl. <i>body weight</i>)
C2 doména	doména odpovědná za vazbu Ca ²⁺ iontů do struktury cPLA ₂ α
CaMKII	Ca ²⁺ /kaldmodulin-dependentní proteinkináza II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNH	kontinuální normobarická hypoxie (3 týdny, 10 % O ₂ , ~ 5500 m)
CoA	koenzym A
COX	cyklooxygenázy, cyklooxygenázová
COX-1	cyklooxygenáza 1 (konstitutivní)
COX-2	cyklooxygenáza 2 (inducibilní)
cPLA ₂	cytosolické fosfolipázy A ₂
cPLA ₂ α	cytosolická fosfolipáza A ₂ izoforma α
CT	z angl. <i>threshold cycle</i>
Cu/ZnSOD	intracelulární měď zinková superoxiddismutáza
Cys	cystein
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DHA	kyselina dokosahexaenová
DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
E	specifická efektivita PCR
EC-SOD	extracelulární měď zinková superoxiddismutáza
eNOS	konstitutivní syntáza oxidu dusnatého
ERK	MAPK, extracelulární signálem regulované kinázy (z angl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ERK 1/2	MAPK, extracelulární signálem regulované kinázy 1 a 2 (z angl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1 a 2</i>)
FA	mastné kyseliny

GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (housekeeping protein)
G _{i/o} proteiny	trimerní G proteiny – inhibiční (inhibují adenylátcyklázu)
G _s proteiny	trimerní G proteiny – aktivační (aktivují adenylátcyklázu)
GSH	redukovaný glutathion
GSH-PX	glutathionperoxidáza
GSSG	oxidovaný glutathion
H	intermitentní hypobarická hypoxie (experiment s tempolem)
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (z angl. <i>high density lipoprotein</i>)
HIF-1 α	transkripční faktor, hypoxií indukovaný faktor 1 α
His	histidin
HPRT1	hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza 1 (housekeeping protein)
HW	hmotnost srdce (z angl. <i>heart weight</i>)
HW/BW	relativní hmotnost srdce
HT	Intermitentní hypobarická hypoxie s tempolem
I/R	ischemie/reperfúze, popř. ischemicko/reperfúzní
IHH	intermitentní hypobarická hypoxie (5 týdnů, 8hodin/den, 5dnů/týden, ~ 7000 m)
IL-1 β	interleukin 1 β
INH	intermitentní normobarická hypoxie (3 týdny, 23 hodin/den, 10 % O ₂ , ~ 5500 m)
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
iPLA ₂	na kalcium nezávislé fosfolipázy A ₂
iPLA ₂ β	na kalcium nezávislá fosfolipáza A ₂ izoforma β
iPLA ₂ γ	na kalcium nezávislá fosfolipáza A ₂ izoforma γ
iPLA ₂ VIA-1	sestříhovaná varianta na kalcium nezávislé fosfolipázy A ₂ izoformy β
iPLA ₂ VIA-2	sestříhovaná varianta na kalcium nezávislé fosfolipázy A ₂ izoformy β
IS	velikost oblasti infarktem zasažené
IS/AR	infarktová oblast ku oblasti infarktem ohrožené
JNK	proteinkinázy (z angl. <i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>)
K _{ATP}	draslíkové kanály závislé na ATP
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (z angl. <i>low density lipoprotein</i>)
LV	levá komora (z angl. <i>left ventricle</i>)
LVW	hmotnost levé komory (z angl. <i>left ventricle weight</i>)
LVW/BW	relativní hmotnost levé komory
LOX	lipoxygenázy, lipoxygenázová
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MDA	malondialdehyd
MI	metabolická inhibice
MI/R	metabolická inhibice s následnou re-energizací
mitoK _{ATP}	mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP
MnK	MAPK-interagující kináza
MnSOD	manganová superoxididmutáza

MPTP	mitochondriální pór odpovědný za změnu propustnosti (z angl. <i>mitochondrial permeability transition pores</i>)
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
N	normoxie (experiment s tempolem)
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NF-κB	transkripční faktor, jaderný faktor κB (z angl. <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NOX	NADPH oxidáza
Nrf2	transkripční faktor (z angl. <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor</i>)
NT	normoxie s tempolem
O ₂ [•]	superoxidový radikál
OH [•]	hydroxylový radikál
ox	oxidovaná forma enzymu
OXPPOS	MitoProfile Total OXPPOS Blue Native protilátka
P	fosfát
p38	MAPK, protein o molekulové hmotnosti 38 kDa
p-cPLA ₂ α	fosforylovaná forma proteinu cPLA ₂ α (Ser ⁵⁰⁵)
p-ERK1/2	fosforylovaná forma proteinu ERK1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)
p-p38	fosforylovaná forma proteinu p38 (Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸²)
P _B	barometrický tlak
PBS pufr	fosfátový roztok
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkinázy C
PKCα	proteinkináza C izoforma α
PKCδ	proteinkináza C izoforma δ
PKCε	proteinkináza C izoforma ε
PLA ₁	fosfolipáza A ₁
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLB	fosfolipáza B
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PO ₂	parciální tlak kyslíku
p-PKCα	fosforylovaná forma PKCα (Ser ⁶⁵⁷)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
R ₁	acylový řetězec mastné kyseliny v pozici <i>sn-1</i>
R ₂	acylový řetězec mastné kyseliny v pozici <i>sn-2</i>

red	redukována forma enzymu
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RT	pokožová teplota (z angl. <i>room temperature</i>)
RV	pravá komora (z angl. <i>right ventricle</i>)
RVW	hmotnost pravé komory (z angl. <i>right ventricle weight</i>)
RVW/BW	relativní hmotnost pravé komory
RVW/LVW	relativní poměr hmotnosti pravé a levé komory
S	septum
sarcK _{ATP}	sarkoplazmatické draslíkové kanály závislé na ATP
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SEM	střední chyba průměru
Ser	serin
SFA	nasyčené mastné kyseliny
<i>sn-1</i>	stereochemické číslování (z angl. <i>stereochemical numbering</i>) pozice prvního uhlíku v molekule fosfolipidu
<i>sn-2</i>	stereochemické číslování (z angl. <i>stereochemical numbering</i>) pozice druhého uhlíku v molekule fosfolipidu
<i>sn-3</i>	stereochemické číslování (z angl. <i>stereochemical numbering</i>) pozice třetího uhlíku v molekule fosfolipidu
SOD	superoxiddismutáza/y
sPLA ₂	sekretorické fosfolipázy A ₂
sPLA ₂ IIA	sekretorická fosfolipáza A ₂ třídy IIA
sPLA ₂ V	sekretorická fosfolipáza A ₂ třídy V
sPLA ₂ X	sekretorická fosfolipáza A ₂ třídy X
SR	sarkoplazmatické retikulum
SW	hmotnost septa (z angl. <i>septum weight</i>)
SW/BW	relativní hmotnost septa
Tempol	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TNF α	prozánětlivý cytokin, faktor nekrotizující nádory α (z angl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TNFR2	receptor 2 pro TNF α
TRX	thioredoxin
TTBS pufr	solný roztok pufovaný Tris s Tween
v/v	poměr objem ku objemu (z angl. <i>volume to volume</i>)
WGA	aglutinin z pšeničných klíčků konjugovaný s tetrametylrodaminem
X	báze v molekule fosfolipidu

9 PŘÍLOHY

Příloha A

Míčová P, Hahnová K, Hlaváčková M, Elsnicová B, Chytilová A, Holzerová K, Žurmanová J, Neckář J, Kolář F, Nováková O, Novotný J (2016) Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ /cyclooxygenase 2 pathway *via* β_2 -adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Mol Cell Biochem.* 423(1-2):151-163. doi:[10.1007/s11010-016-2833-8](https://doi.org/10.1007/s11010-016-2833-8) [PMID: 27686454]

IF = 2,613

Příspěvek autorky: plán studie (s: O. Nováková, J. Novotný, F. Kolář, J. Neckář), realizace experimentální práce (s: K. Hahnová, M. Hlaváčková, B. Elsnicová, A. Chytilová, K. Holzerová), vyhodnocení dat (s: K. Hahnová, M. Hlaváčková, B. Elsnicová, A. Chytilová, K. Holzerová, J. Žurmanová), sepisování publikace (s: O. Nováková, J. Novotný, F. Kolář, J. Neckář).

Příloha B

Míčová P, Klevstig M, Holzerová K, Vecka M, Žurmanová J, Neckář J, Kolář F, Nováková O, Novotný J, Hlaváčková M (2017) Antioxidant tempol suppresses heart cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ stimulated by chronic intermittent hypoxia. *Can J Physiol Pharmacol.* *Publikace v tisku.* doi: [10.1139/cjpp-2017-0022](https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0022) [PMID: 28459156]

IF = 1,910

Příspěvek autorky: plán studie (s: O. Nováková, F. Kolář, J. Neckář, J. Novotný), realizace experimentální práce (s: M. Klevstig, M. Hlaváčková, K. Holzerová, M. Vecka, J. Neckář), vyhodnocení dat (s: M. Klevstig, M. Hlaváčková, K. Holzerová, J. Žurmanová), sepisování publikace (s: M. Hlaváčková, O. Nováková, J. Novotný).

Příloha C

Neckář J, Borchert GH, Hloušková P, **Míčová P**, Nováková O, Novák F, Hroch M, Papoušek F, Ošťádal B, Kolář F (2013) Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BK_{Ca} channels. *Curr Pharm Des.* 19(39):6880-6889. doi:[10.2174/138161281939131127115154](https://doi.org/10.2174/138161281939131127115154) [PMID: 23590154]

IF = 3,311

Příspěvek autorky: realizace experimentální práce (s: P. Hloušková), vyhodnocení dat (s: P. Hloušková).

Příloha D

Alánová P, Chytilová A, Neckář J, Hrdlička J, **Míčová P**, Holzerová K, Hlaváčková M, Macháčková K, Papoušek F, Vašinová J, Benák D, Nováková O, Kolář F (2017) Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *J Appl Physiol.* *Publikace v tisku.* doi:[10.1152/jappphysiol.00671.2016](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00671.2016) [PMID: 28209739]

IF = 3,004

Příspěvek autorky: realizace experimentální práce (s: K. Holzerová), vyhodnocení dat (s: K. Holzerová).