

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů



Mgr. Klára Hahnová

Úloha adrenergí signalizace v adaptivním mechanismu kardioprotekce
vyvolané chronickou hypoxií

The role of adrenergic signaling in cardioprotection induced by adaptation
to chronic hypoxia

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2019

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci na téma „Úloha adrenergní signalizace v adaptivním mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií“ vypracovala samostatně, pouze za odborného vedení mého školitele doc. RNDr. Jiřího Novotného, DSc. Dále prohlašuji, že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje a literaturu řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 7. 2. 2019

.....
Mgr. Klára Hahnová

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala všem, kteří mě v průběhu mého doktorského studia podporovali a pomáhali. V první řadě tedy svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc., za jeho odborné vedení a vstřícný přístup během celého mého studia a především za jeho trpělivost v průběhu sepsání této disertační práce. Poděkování patří samozřejmě také všem mým kolegům z laboratoře. Jmenovitě RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D., které vděčím za většinu svých laboratorních dovedností, Mgr. Jitce Škrabalové, Ph.D. a Mgr. Barboře Melkes, které se staly nezbytnou součástí nejen mého vědeckého života, dvojčatům Mgr. Radce Moravcové a Mgr. Simoně Moravcové za jejich lásku k pečení a všemu chlupatému, Mgr. Ondřeji Honcovi za to, že když se chce, všechno jde nezávisle na tom, kolik Vám je, Mgr. Ivče Karlovské a Bc. Vendule Markové za vnesení svěžesti, RNDr. Míše Hájkové, Ph.D. za její pohled na svět a zimní vzpruhu a doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D., která vždy uměla člověka podpořit. Velké poděkování patří také Zuzce Soukupové za vytvoření příjemného pracovního prostředí a především za její každodenní péči o Emu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům. Víím, že to občas nebylo snadné, ale bez Vaší podpory a trpělivosti bych se nedostala tak daleko.

Abstrakt

Kardiovaskulární choroby patří v současné době stále k nejčastějším příčinám onemocnění a úmrtí v západním světě. Adaptace na chronickou hypoxii může přispět ke zlepšení ischemické tolerance myokardu, ale přesné molekulární mechanismy vedoucí k vývoji kardioprotektivního fenotypu nejsou stále známy. Existují určité náznaky, které poukazují na možnou úlohu β -adrenergní signalizace v těchto procesech.

V první části práce jsme se zaměřili na zkoumání vlivu protektivní kontinuální (CNH; 24 h/d) a neprotektivní intermitentní (INH; 23 h/d hypoxie, 1 h/d reoxygenace) normobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v pravé (RV) a levé (LV) komoře myokardu potkanů kmene Wistar. Oba hypoxické modely vedly k poklesu exprese β_1 -adrenergních receptorů (β_1 -ARs) v RV. Ve vzorcích LV nebyly zjištěny žádné významné změny v β -ARs. Ačkoliv aktivita adenylátcyklázy (AC) stimulovaná Gs proteiny byla po adaptaci na CNH i INH v RV snížena a v LV zvýšena, nedošlo k odhalení významnějších změn v expresi dominantních isoform AC 5/6. V případě exprese Gs proteinů byl u obou hypoxických modelů odhalen pokles v RV. Tyto výsledky naznačují, že chronická normobarická hypoxie může mít silný vliv na myokardiální β -adrenergní signalizaci bez rozdílů mezi protektivním a neprotektivním modelem hypoxie.

V druhé části jsme se věnovali sledování vlivu CNH na β -adrenergní signalizaci a antioxidační systém v LV myokardu spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a konplastického SHR-mtBN kmene, který nese mitochondriální genom kmene Brown Norway na genetickém pozadí SHR kmene. Podíl β_2 -ARs byl signifikantně vyšší u SHR-mtBN kmene než u SHR. Adaptace na CNH zvýšila celkový počet β -ARs a podíl β_2 -ARs u SHR a snížila celkové množství β -ARs u SHR-mtBN. Aktivita AC stimulována isoprenalinem byla vyšší u SHR-mtBN. Po expozici potkanů na CNH byly u zkoumaných kmenů pozorovány odlišné změny v aktivitě AC. Zatímco u SHR kmene došlo vesměs k jejímu nárůstu, u SHR-mtBN k poklesu. Naopak aktivita MAO-A a její exprese byly signifikantně nižší u SHR-mtBN než u SHR a po adaptaci na CNH došlo u obou kmenů ke zvýšení těchto hodnot. Kromě toho CNH výrazně zvýšila expresi katalázy a aldehyddehydrogenázy-2 u obou kmenů a snížila expresi Cu/Zn superoxid dismutázy u SHR. Tyto data ukazují, že výměna mitochondriálního

genomu může vést ke specifickým změnám v β -adrenergní signalizaci, aktivitě MAO-A a antioxidační obraně a může také ovlivnit adaptivní odpovědi na hypoxii.

V poslední části této práce jsme sledovali vliv chronické intermitentní hypobarické hypoxie (IHH) na β -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkanů kmene Wistar. Celkový počet β -ARs se po adaptaci na IHH nezměnil, ale poměr jednotlivých podtypů β -ARs výrazně vzrostl v důsledku nárůstu β_2 -ARs a poklesu β_1 -ARs. Současně došlo vlivem hypoxie ke snížení exprese AC5 a zvýšení hladiny Gi proteinů. Naše data společně s dalšími výsledky odhalenými v této studii naznačují možnou roli β -ARs ve vývoji kardioprotektivního fenotypu.

Klíčová slova: myokard, kardioprotekce, chronická hypoxie, β -adrenergní receptory, G-proteiny, adenylátcykláza, SHR, SHR-mtBN, MAO-A, antioxidační systém

Abstract

Cardiovascular diseases are currently one of the most common causes of morbidity and mortality in the Western world. Adaptation to chronic hypoxia can contribute to the improvement of ischemic tolerance of myocardium but exact molecular mechanisms leading to the development of a cardioprotective phenotype are still unclear. There are some indications that point to the possible role of β -adrenergic signaling in these processes.

In the first part of the thesis, we examined the effect of protective continuous (CNH; 24 h/day) and nonprotective intermittent (INH; 23 h/day hypoxia, 1 h/day reoxygenation) normobaric hypoxia on β -adrenergic signaling in the right (RV) and left ventricles (LV) of Wistar rats. Both hypoxic models led to decrease in the number of β_1 -adrenergic receptors (β_1 -ARs) in the RV. There were no significant changes in β -ARs in LV preparations. Although adenylyl cyclase (AC) activity stimulated through Gs proteins was decreased in the RV and increased in the LV after adaptation to CNH and INH, there were no significant changes in the expression of dominant AC 5/6 isoforms. Expression of Gs proteins was decreased in RV in both hypoxic models. These results suggest that chronic normobaric hypoxia may have a strong effect on myocardial β -adrenergic signaling without differences between protective and nonprotective model of hypoxia.

In the second part of this thesis, we studied the effect of CNH on β -adrenergic signaling and antioxidant system in the LV of spontaneously hypertensive rats (SHR) and in a conplastic SHR-mtBN strain carrying the mitochondrial genome of Brown Norway strain on the genetic background of SHR strain. The β_2 -ARs proportion was significantly higher in SHR-mtBN strain than in SHR. Adaptation to CNH elevated the total number of β -ARs and proportion of β_2 -ARs in SHR and decreased the total amount of β -ARs in SHR-mtBN. AC activity stimulated by isoprenaline was higher in SHR-mtBN. After exposure of rats to CNH were observed different changes in AC activity in both examined strains. Whereas AC activity in SHR strain increased, AC activity in SHR-mtBN decreased. On the other hand, the activity of MAO-A and its expression was significantly lower in SHR-mtBN than in SHR and these figures were elevated in both strains after exposure to CNH. In addition, CNH markedly enhanced the expression of catalase and aldehyde dehydrogenase-2 in both strains, and decreased

the expression of Cu/Zn superoxide dismutase in SHR. These data indicate that alterations in the mitochondrial genome can result in distinctive changes in β -adrenergic signaling, MAO-A activity and antioxidant system and may also affect the adaptive responses to hypoxia.

In the last part of this thesis, we examined the effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia (IHH) on β -adrenergic signaling in the LV of Wistar rats. The total number of β -ARs did not change after adaptation to IHH, but the ratio of β -ARs subtypes markedly increased due to the β_2 -ARs increase and β_1 -ARs decrease. In parallel, adaptation to hypoxia caused decrease in expression of AC5 and increase of Gi protein levels. Our data, together with other results revealed in this study, suggest a possible role of β -ARs in the development of a cardioprotective phenotype.

Keywords: myocardium, cardioprotection, chronic hypoxia, β -adrenergic receptors, G-proteins, adenylyl cyclase, SHR, SHR-mtBN, MAO-A, antioxidant system

Obsah

1	Seznam použitých zkratek	11
2	Úvod	14
2.1	Mechanismy kardioprotekce	14
2.2	Fyzická aktivita	14
2.3	Conditioning	15
2.3.1	Ischemický preconditioning	15
2.3.2	Ischemický postconditioning	16
2.3.3	Ischemický conditioning na dálku	18
2.3.4	Farmakologický conditioning	18
2.4	Hypoxie	19
2.4.1	Molekulární mechanismy	21
2.4.1.1	ATP-dependentní K ⁺ kanály	22
2.4.1.2	Oxid dusnatý	22
2.4.1.3	Reaktivní formy kyslíku	23
2.4.1.4	Antioxidanty	24
2.4.1.5	Proteinkináza C	25
2.4.1.6	Další proteinkinázy	25
2.4.1.7	Mitochondrie	26
2.4.1.8	Receptory spřažené s G-proteiny	27
2.5	β-Adrenergní receptory	28
2.5.1	Adrenergní receptory	28
2.5.2	Struktura β-adrenergních receptorů	29
2.5.3	Interakce ligandu s β-adrenergními receptory	29
2.5.4	Kompartmentalizace β-adrenergní signalizace v kardiomyocytech	30
2.5.5	Signální dráhy β-adrenergních receptorů	31
2.5.6	Regulační mechanismy β-adrenergní signalizace	34
2.5.7	Účinky dlouhodobé stimulace na β ₁ -adrenergní receptory	35
2.5.8	Účinky dlouhodobé stimulace na β ₂ -adrenergní receptory	36

3	Cíle disertační práce	38
4	Seznam vlastních publikací	40
4.1	Seznam použitých publikací	40
4.2	Seznam ostatních publikací.....	40
4.3	Podíl na použitých publikacích	41
5	Materiál a metody	42
5.1	Laboratorní zvířata	42
5.2	Experimentální modely chronické hypoxie	42
5.3	Homogenizace a frakcionace srdeční tkáně	43
5.4	Vazebné studie	44
5.5	Izolace RNA a Real-time PCR.....	45
5.6	SDS-PAGE elektroforéza a Western Blot analýza	46
5.7	Stanovení aktivity adenylátcyklázy.....	47
5.8	Stanovení aktivity monoaminoxidázy-A.....	47
5.9	Statistické zpracování dat.....	48
6	Výsledky	49
6.1	Cíl 1: Sledování vlivu protektivní kontinuální a neprotektivní intermitentní normobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v RV a LV myokardu potkana... 49	
6.1.1	Hmotnostní parametry	49
6.1.2	Vliv CHN a INH na β -adrenergní receptory.....	50
6.1.2.1	Charakterizace β -adrenergních receptorů	50
6.1.2.2	Distribuce β -ARs na úrovni mRNA.....	53
6.1.3	Vliv CNH a INH na expresi G-proteinů a adenylátcyklázy	54
6.1.4	Vliv CNH a INH na aktivitu adenylátcyklázy	55
6.2	Cíl 2: Sledování vlivu CNH na β -adrenergní signalizaci, monoaminoxidázu A a vybrané komponenty antioxidačního systému v LV myokardu SHR a SHR-mtBN potkanů.....	57
6.2.1	Hmotnostní parametry	57
6.2.2	Charakterizace β -adrenergních receptorů	58
6.2.3	Aktivita adenylátcyklázy	60

6.2.4	Genová exprese a aktivita monoaminoxidázy A	61
6.2.5	Antioxidační obranný systém	62
6.3	Cíl 3: Sledování vlivu chronické intermitentní hypobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkana	65
6.3.1	Hmotnostní parametry	65
6.3.2	Vliv IHH na β -adrenergní receptory	66
6.3.3	Vliv IHH na expresi inhibičních G-proteinů a adenylátcyklázy.....	68
7	Diskuze	69
7.1	Cíl 1: Sledování vlivu protektivní kontinuální a neprotektivní intermitentní normobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v RV a LV myokardu potkana... ..	69
7.2	Cíl 2: Sledování vlivu CNH na β -adrenergní signalizaci, monoaminoxidázu A a vybrané komponenty antioxidačního systému v LV myokardu SHR a SHR-mtBN potkanů.....	72
7.3	Cíl 3: Sledování vlivu chronické intermitentní hypobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkana	78
8	Závěr	81
9	Seznam použité literatury	83

1 Seznam použitých zkratek

AC	adenylátcykláza
Akt	kináza přežívání (známá také jako proteinkináza B)
ALDH-2	aldehyddehydrogenáza-2
ARs	adrenergní receptory
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
β -ARK1	β -adrenergní receptorová kináza 1
BKCa	draslíkové kanály aktivované prostřednictvím vápenatých iontů
B_{MAX}	celkový počet β -adrenergních receptorů
BW	hmotnost těla
Ca^{2+}	vápník
CaMKII	Ca^{2+} /kalmulin dependentní kináza II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	kataláza
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNH	kontinuální normobarické hypoxie
COX-2	cyklooxygenáza 2
cPLA ₂	cytosolická fosfolipáza A ₂
Cu/ZnSOD	měďňato/zinečnatá superoxiddismutáza
Drp1	dynaminu-příbuzný protein 1
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
ERK	extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza
G	G-protein
GC	guanylátcykláza
GDP	guanosindifosfát
G _i	inhibiční G-protein
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny
GRK	kináza receptorů spřažených s G-proteiny
G _s	stimulační G-protein
GSK-3 β	glykogensyntáza kináza-3 β
GTP	guanosintrifosfát
HM	hrubé membrány

HPRT	hypoxantin fosforibosyltransferáza
HW	hmotnost srdce
INH	intermitentní normobarická hypoxie
IH	intermitentní hypoxie
IHH	intermitentní hypobarická hypoxie
IM	infarkt myokardu
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
IPC	ischemický preconditioning
IPOC	ischemický postconditioning
I/R	ischemicko/reperfuzní
JAK	Janus kináza
JNK	c-Jun N-terminální kináza
K _{ATP}	ATP-dependentní draslíkové kanály
K _i	inhibiční konstanta
K _D	rovnovážná disociační konstanta
L-NAME	N omega-nitro-L-arginin metyl ester
LV	levá komora
MAO	monoaminoxidáza
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
mitoK _{ATP}	mitochondriální ATP-dependentní draslíkové kanály
MnSOD	manganová superoxiddismutáza
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti
mtDNA	mitochondriální DNA
N	Normoxie
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
O ₂	kyslík
ORs	opioidní receptory
PDE	fosfodiesteráza
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C

PKG	proteinkináza G
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PTX	pertusis toxin
RIC	ischemický conditioning na dálku
ROS	reaktivní formy kyslíku (kyslíkové radikály)
RV	pravá komora
S	septum
sarcK _{ATP}	sarkolemální ATP-dependentní draslíkové kanály
SDS	dodecylsulfát sodný
SEM	standardní chyba průměru
SHR	spontánně hypertenzní potkan
SNS	sympatický nervový systém
SOD	superoxiddismutáza
SR	sarkoplazmatické retikulum
STAT	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TM	transmembránový segment
t-tubuly	transverzální tubuly

2 Úvod

2.1 Mechanismy kardioprotekce

Srdeční selhání je stav, kdy srdce není schopno dodávat do tkání dostatečné množství krve, které by splňovalo požadavky těla. Výsledkem je kaskáda změn, které vedou k těžké únavě, dušnosti a nakonec mohou skončit smrtí. V posledních desetiletích bylo dosaženo značného pokroku v pochopení molekulárních a buněčných procesů, které přispívají k srdečnímu selhání, což vedlo k rozvoji účinných terapií. I navzdory těmto pokrokům v jejich léčbě, patří srdeční choroby, zejména akutní infarkt myokardu (IM), v dnešní době stále k nejčastějším příčinám úmrtí ve vyspělých zemích (Murray *et al.*, 2012). Experimentální kardiologie se proto i nadále intenzivně věnuje studiu přirozených adaptačních mechanismů, které myokard využívá k ochraně před ischemickým poškozením. V současné době jsou známé především tři způsoby, které mohou přispívat k navození kardioprotekce - fyzická aktivita, conditioning a adaptace na chronickou hypoxii (Yamashita *et al.*, 1999; Halkos *et al.*, 2004; Ostadal and Kolar, 2007; Heusch, 2015).

2.2 Fyzická aktivita

Bylo prokázáno, že pravidelné cvičení chrání srdce před různými úrovněmi srdečního poškození, včetně arytmií a infarktu myokardu (McElroy *et al.*, 1978; Yamashita *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005). Míra kardioprotekce indukovaná fyzickou aktivitou je závislá na době trvání a intenzitě cvičení (Lennon *et al.*, 2004b; Starnes *et al.*, 2005). Bylo zjištěno, že již krátkodobý trénink zvyšuje odolnost myokardu k ischemicko-reperfučnímu (I/R) poškození (Taylor *et al.*, 1999; Demirel *et al.*, 2001). Studie Lennona a spol. ukázala, že kardioprotekce indukovaná fyzickou aktivitou přetrvává nejméně 9 dní po ukončení cvičení (Lennon *et al.*, 2004a). Molekulární mechanismy zodpovědné za kardioprotekci indukovanou fyzickou aktivitou nejsou v současné době zcela objasněny. Ví se, že cvičení ovlivňuje regulaci klíčových antioxidantních enzymů, u kterých bylo prokázáno, že se podílí na ochraně myokardu proti I/R poškození (Yamashita *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2004). Existují také různé studie, které poukazují na možnou roli endoteliální NO syntázy (eNOS) (Hajnal *et al.*, 2005; Farah *et al.*, 2013), opioidního systému (Dickson *et al.*, 2008;

Galvão *et al.*, 2011; Borges *et al.*, 2014) a sarkolemálních a mitochondriálních ATP-dependentních K⁺ kanálů (Brown *et al.*, 2005; Chicco *et al.*, 2007; Quindry *et al.*, 2010). Také β-adrenergní receptory (β-ARs), především β₃-ARs, by mohly být zapojeny v signálních drahách aktivovaných cvičením (Calvert *et al.*, 2011).

2.3 Conditioning

Mezi další způsoby chránící srdce před ischemicko-reperfuzním poškozením patří již výše zmíněný “conditioning” :

1. ischemický preconditioning
2. ischemický postconditioning
3. ischemický conditioning na dálku
4. farmakologický conditioning

2.3.1 Ischemický preconditioning

První studie pojednávající o conditioningu, přesněji řečeno o ischemickém preconditioningu (IPC), byla studie Murryho a spol. Tato skupina ukázala, že 4 cykly 5-minutové ischemie následované 5-minutovou reperfuzí chrání myokard před následnou dlouhodobou ischemií. Tito výzkumníci předpokládali, že tento protektivní jev je způsoben sníženou deplecí ATP a/nebo sníženou akumulací katabolitů během dlouhodobé ischemie. (Murry *et al.*, 1986). V následujících letech bylo zjištěno, že během IPC dochází k uvolňování autakoidů, jako například adenosinu (Liu *et al.*, 1991), bradykininu (Wall *et al.*, 1994) či opioidů (Schultz *et al.*, 1995), které se váží na příslušné receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs), čímž aktivují signální dráhy vedoucí k aktivaci proteinkinázy C (PKC), která se účastní protektivního účinku IPC (Ytrehus *et al.*, 1994). Zatímco adenosin aktivuje PKC prostřednictvím fosfolipáz (PLC a PLD) (Parsons *et al.*, 2000), bradykinin a opiody k aktivaci PKC využívají signální dráhu zahrnující fosfatidylinositol-3 kinázu (PI3K), Akt kinázu, syntázu oxidu dusnatého (NO), guanylátcyklázu (GC), proteinkinázu G (PKG), otevření mitochondriálních ATP-dependentních K⁺ kanálů (K_{ATP}) a kyslíkové radikály (ROS). V časně reperfuzi dochází prostřednictvím PKC k aktivaci adenosinového receptoru A₂, což vede k aktivaci Akt a extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK). Tyto

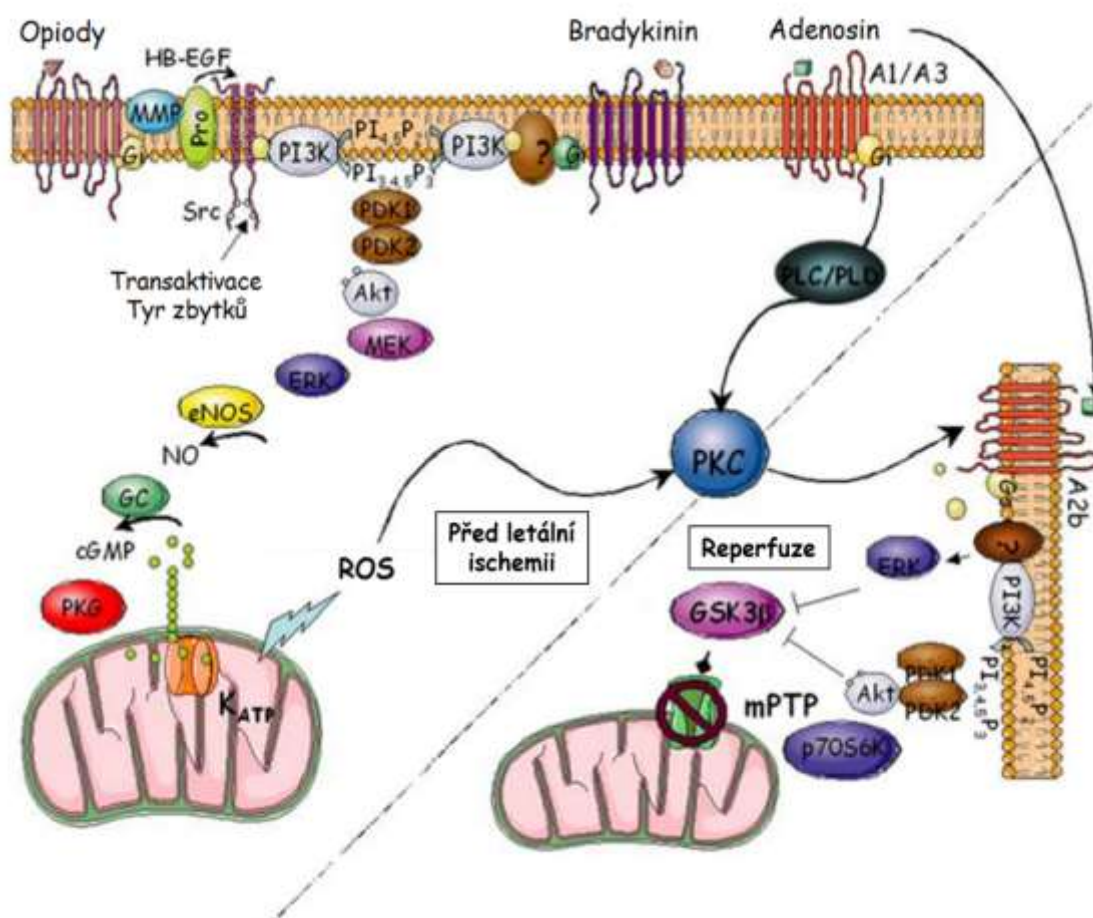
tzv. kinázy přežívání fosforylují glykogensyntázu kinázu-3 β (GSK-3 β), čímž ji inhibují. Inhibice GSK-3 β brání vytvoření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mPTP), čímž chrání kardiomyocyty před apoptózou (Obrázek č. 1) (Downey *et al.*, 2008). Studie Hattori a spol. ukázala, že také aktivace Stat 3 proteinu prostřednictvím JAK/STAT signalizace se účastní kardioprotekce indukované IPC (Hattori *et al.*, 2001). Výsledky studie Suematsu a spol. dále naznačily možnou roli β -ARs v signálních drahách spuštěných prostřednictvím IPC. Podávání neselektivních β -blokátorů potkanům 4 týdny před IPC zrušilo kardioprotekci vyvolanou IPC (Suematsu *et al.*, 2004).

Protektivní účinek IPC přichází ve dvou časových fázích. První fáze, nazývaná jako klasický preconditioning nebo první okno protekce, poskytuje okamžitou ochranu po IPC stimulu a trvá 1-2 hodiny (Lawson and Downey, 1993). Druhá fáze, nazývaná opožděný preconditioning nebo také druhé okno protekce, se objevuje po 12-24 hodinách a trvá přibližně 72 hodin (Kuzuya *et al.*, 1993; Baxter *et al.*, 1997).

2.3.2 Ischemický postconditioning

Ischemický postconditioning (IPOC) byl poprvé popsán ve studii Zhao a spol. Tato skupina ukázala, že 3 cykly 30 sekundové reperfuze/reokluze na počátku reperfuze po letální ischemii vedou ke zmenšení velikosti infarktu. Tyto data naznačují, že IPOC je stejně efektivní ve zmenšení velikosti infarktu a při zachování funkce endotelu stejně jako IPC (Zhao *et al.*, 2003). IPOC indukuje protektivní fenotyp prostřednictvím aktivace signálních drah, které ve výsledku inhibují vytváření mPTP (Argaud *et al.*, 2005). Tyto signální dráhy jsou podobné těm, které k dosažení kardioprotekce využívá IPC (Yang *et al.*, 2005; Philipp *et al.*, 2006). Ukázalo se, že kombinace obou těchto conditioningů nemá vliv na zmenšení velikosti infarktu (Halkos *et al.*, 2004). IPOC může být klinicky aplikován u pacientů, kteří podstupují například angioplastiku či transplantaci orgánu (Zhao *et al.*, 2003).

IPOC a IPC se sice obecně projevují silným kardioprotektivním účinkem, ale k jeho dosažení se využívá ischemie/reperfuze, které jsou jako takové škodlivé. Pochopení signálních přenosů, které vedou k takto indukované kardioprotekci, by mohlo pomoci najít způsob, jak dosáhnout protektivního fenotypu bez poškození spojeného s ischemií/reperfuzí.



Obrázek č. 1: Schématický obrázek signálních drah účastnících se ischemického preconditioningu. Obrázek zobrazuje signální dráhy, které jsou zapojeny v ischemickém preconditioningu před ischemickým poškozením (signální dráhy nad dělicí čarou) a těmi, které zprostředkovávají ochranu v prvních minutách reperfuze (signální dráhy pod dělicí čarou); Akt, kináza přežívání; cGMP, cyklický guanosinmonofosfát; HB-EGF, heparin vázající epidermální růstový faktor; eNOS, endoteliální syntáza oxidu dusnatého; ERK, extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza; G, G-protein; GC, guanylátcykláza; GSK3 β , glykogensyntáza kináza-3 β ; K_{ATP}, ATP-dependenční draslíkový kanál; MEK, kináza mitogenem aktivované proteinkinázy; MMP, matrixová metaloproteináza; mPTP, mitochondriální pór přechodné propustnosti; NO, oxid dusnatý; PDK, fosfoinositid dependentní kináza; PI3K, fosfatidylinositol-3 kináza; PI_{4,5}P₂, fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát; PI_{3,4,5}P₃, fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát; PKC, proteinkináza C; PKG, proteinkináza G; PLC, fosfolipáza C; PLD, fosfolipáza D; ROS, reaktivní formy kyslíku (upraveno podle Downey a spol. 2008).

2.3.3 Ischemický conditioning na dálku

První zmínka o tzv. ischemickém conditioningu na dálku (remote ischemic conditioning; RIC) pochází z roku 1993, kdy bylo na psím modelu prokázáno, že preconditioning jedné oblasti myokardu vedl k ochraně jiné, vzdálenější části myokardu (Przyklenk *et al.*, 1993). V současné době je RIC definován jako aplikace několika krátkých cyklů neletální ischemie následované reperfuzí na tkáň nebo orgán, která vede k vytvoření protektivního fenotypu, který činí vzdálené orgány či tkáně odolnějšími vůči následnému I/R poškození. Cykly krátkodobé ischemie/reperfuze mohou být aplikovány před letální ischemií (ischemický preconditioning na dálku), během letální ischemie (ischemický preconditioning na dálku) nebo během reperfuze (ischemický postconditioning na dálku). Zdá se, že přenos signálu v srdci po RIC se velmi podobá klasickému IPC a IPOC s podstatným zapojením NO, PKC, Akt, ERK 1/2 a mitochondrií (Heusch *et al.*, 2015). I přesto, že všechny tři způsoby ischemického conditioningu zmenšují reperfuzní poškození, RIC je nejlepší způsob, jak indukovat kardioprotekci, neboť je bezpečný a snadno proveditelný (Heusch, 2013).

2.3.4 Farmakologický conditioning

Identifikace signálních drah souvisejících s conditioningem umožňuje využití farmakologických látek (→ farmakologický conditioning), které jsou schopny kardioprotektivní efekt conditioningu nahradit a tudíž se vyhnout invazivnímu protokolu. Farmakologické látky, jako například agonisté adenosinových receptorů, látky produkující NO či agonisté opioidních receptorů, mohou napodobit účinek ischemického conditioningu (Stein *et al.*, 2004; Andreadou *et al.*, 2008).

Řada vědců se zaměřila na výzkum týkající se účasti opioidních receptorů (ORs) v navození kardioprotekce během conditioningu a jejich signálních drah (Schultz *et al.*, 1995; Fryer *et al.*, 1999; Zatta *et al.*, 2008; Rentoukas *et al.*, 2010). Studie Fryer a spol. naznačila, že aktivace δ -ORs 24 až 48 hodin před letální ischemií vede ke zmenšení velikosti infarktu (Fryer *et al.*, 1999). Skupina vědců okolo Grosse prokázala, že chronické působení opioidů má za následek přetrvávající kardioprotektivní fenotyp a zároveň, že akutní a chronické působení je zprostředkováno přes rozdílné signální dráhy (Peart and Gross, 2004, 2006). Zatímco kardioprotekce navozená chronickým

působením opioidů je zprostředkovaná aktivací proteinkinázy A (PKA) prostřednictvím β_2 -adrenergických receptorů (β_2 -AR) a stimulačních G-proteinů (Gs), akutní působení opioidů vede k aktivaci inhibičních G-proteinů (Gi) a PKC (Peart and Gross, 2006). Skupina okolo Fryere a spol. ukázala, že pro kardioprotekci indukovanou opioidy je esenciální aktivace konkrétní isoformy PKC a to PKC- δ (Fryer *et al.*, 2001). V roce 2007 vyšla studie Miura a spol., která prokázala zapojení také PKC- ϵ ve snížení velikosti infarktu (Miura *et al.*, 2007). Akutní podávání opioidů vede také k inhibici GSK-3 β (Gross *et al.*, 2004). Na inhibici GSK-3 β se podílí JAK2/STAT3 signální dráha v interakci s PI3K/Akt dráhou (Gross *et al.*, 2006). Jak bylo zmíněno výše, inhibice GSK-3 β indukovaná IPC brání vytvoření mPTP. Studie Janga a spol. ukázala, že také aktivace ORs zprostředkovává inhibici mPTP (Jang *et al.*, 2008).

2.4 Hypoxie

Různá data naznačují, že adaptace na chronickou hypoxii, a to buď přirozenou, nebo simulovanou v hypoxických komorách, zvyšuje srdeční toleranci ke všem škodlivým důsledkům akutní deprivace kyslíku (O_2). Chronická hypoxie ohrožuje křehkou rovnováhu mezi zásobením a poptávkou tkáně na O_2 , zejména v myokardu a dalších tkáních s vysokými požadavky na O_2 (Mallet *et al.*, 2006). Nejčastější příčinou narušení této rovnováhy je ischemická hypoxie vyvolaná sníženým nebo přerušným koronárním průtokem krve nebo systémová hypoxie, která je charakterizována poklesem parciálního tlaku O_2 v arteriální krvi bez narušení koronárního průtoku (Ostadal and Kolar, 2007). Zatímco systémová hypoxie postihuje celý myokard, ischemická hypoxie postihuje pouze tu oblast myokardu, která je zásobovaná postiženou koronární arterií (Ostadal *et al.*, 2014). Existují dva případy, kdy je systémová hypoxie pokládána za fyziologickou a to v případě fetálního myokardu a u myokardu lidí trvale žijících ve vysokých nadmořských výškách (Ostadal and Kolar, 2007). Bylo prokázáno, že populace lidí žijících ve vyšších nadmořských výškách vykazují nižší výskyt infarktu myokardu (IM) (HURTADO, 1960) a nižší úmrtnost způsobenou srdečním onemocněním (Mortimer *et al.*, 1977; Faeh *et al.*, 2009). Značné množství dat ukázalo, že adaptace myokardu na určité režimy chronické hypoxie vede ke zmenšení velikosti infarktu, snižuje počet komorových arytmií a zlepšuje obnovu srdeční kontraktility po akutním I/R poškození (Asemu *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2004;

Ostadal and Kolar, 2007; Wang *et al.*, 2011; Naghshin *et al.*, 2012; Neckár *et al.*, 2013). Vedle protektivních účinků indukuje adaptace na hypoxii také účinky nežádoucí, které mohou v případě nadměrné hypoxie vést k srdečnímu selhání (Ostadal and Kolar, 2007). Chronická hypoxie obvykle způsobuje hypertrofii pravé komory vyplývající ze zvýšené zátěže v důsledku plicní hypertenze. K hypertrofii levé komory může dojít v případě, kdy jsou zvířata vystavena dlouhotrvající intermitentní hypoxii (Ostádal *et al.*, 1981; Pelouch *et al.*, 1997).

To, zda bude kardiovaskulární odpověď na hypoxii příznivá či škodlivá závisí na experimentálních a patologických podmínkách, a to především na frekvenci, intenzitě a délce trvání hypoxických expozií. Příklad rozdílné odpovědi odhalila například studie Beguina a spol. Tato studie ukázala, že zatímco u potkanů adaptovaných na akutní intermitentní hypoxii (IH) po dobu 4 hodin s cykly 40 s 10% O₂ + 20 s 21% O₂ došlo ke zmenšení velikosti infarktu během I/R poškození, změna hladiny O₂ během hypoxické fáze z 10% na 5% vedla naopak ke zvětšení velikosti infarktu (Béguin *et al.*, 2005). Dalším aspektem rozhodujícím o účinku hypoxie je to, zda adaptace probíhá za normobarických či hypobarických podmínek. Dále také záleží na druhu pokusných zvířat (Wauthy *et al.*, 2004), jejich věku (Ostádalová *et al.*, 2002) či pohlaví (Netuka *et al.*, 2006). Ostádalová a spol. zjistili, že expozice březích samic na IH nevedla u novorozeňat ke zlepšení srdeční tolerance k ischemii. Na druhou stranu časná postnatální expozice na IH zvýšila toleranci myokardu k akutní ischemii již na konci prvního postnatálního týdne (Ostádalová *et al.*, 2002). Ukázalo se, že perinatální hypoxie může v pozdějším životě dospělých jedinců vést ke změnám kardioprotekce závislé na pohlaví. Hypoxická expozice v perinatálním období významně zvýšila srdeční toleranci k ischemickému poškození u dospělých samic, na druhou stranu u samců měla zcela opačný účinek (Netuka *et al.*, 2006).

Ke zkoumání vlivu chronické hypoxie na protekci myokardu se v laboratorních podmínkách používají dva základní modely adaptace. Prvním modelem je adaptace na chronickou kontinuální hypoxii, kdy jsou zvířata vystavena hypoxickému prostředí 24 hodin/denně po dobu několika týdnů (Holzerová *et al.*, 2015). Druhý model zkoumá vliv adaptace na intermitentní hypoxii (IH), kdy jsou zvířata vystavena hypoxii několik cyklů po sobě, přičemž jednotlivé cykly jsou od sebe odděleny návratem zvířat do normoxického prostředí (reoxygenace) (Hlaváčková *et al.*, 2010). Hypoxické podmínky jsou v laboratořích simulované v normobarických nebo hypobarických komorách.

V roce 2002 se skupina Koláře zabývala tím, zda kombinace adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH) a IPC poskytuje aditivní ochranu myokardu vůči následnému akutnímu I/R poškození. Tito autoři zjistili, že kombinace obou těchto kardioprotektivních fenoménů měla stejný vliv na ochranu srdce jako samotný IPC. Tyto výsledky naznačují, že chronická hypoxie a IPC mohou sdílet stejné signální dráhy během navození kardioprotekce (Neckár *et al.*, 2002a). Na rozdíl od IPC je adaptace na chronickou hypoxii neinvazivní a kardioprotekce jí indukovaná se vyvíjí postupně (Mallet *et al.*, 2006). Na druhou stranu protektivní účinek vyvolaný hypoxií není tak robustní ve srovnání s IPC, ale přetrvává mnohem déle. Doba trvání protekce navozené adaptací na chronickou hypoxii se ale výrazně liší v závislosti na zkoumaném I/R poškození. Zatímco zvýšená ochrana myokardu vůči infarktu přetrvává nejméně po dobu 5 týdnů po ukončení adaptace na hypoxii, antiarytmická ochrana mizí už během prvního týdne po návratu zvířat do normoxických podmínek (Neckár *et al.*, 2004).

Většina studií se zaměřuje na preventivní účinky chronické hypoxie na poškození myokardu, ale ne na terapeutické účinky s významnějším klinickým dopadem. První studii, která se věnovala terapeutickým účinkům chronické hypoxie na poškození srdce po IM, byla studie Xu a spol. Tato skupina prokázala, že adaptace na IHH 7 dní po IM zmírňuje remodelaci myokardu a zlepšuje jeho kontraktilitu (Xu *et al.*, 2011). Ukázalo se také, že chronická hypoxie nezlepšuje srdeční funkci jen u zdravých zvířat, ale také u zvířat se srdečním selháním (Naghshin *et al.*, 2012).

2.4.1 Molekulární mechanismy

Chronická hypoxie indukuje v srdci celou řadu adaptivních změn, které mohou být považovány za protektivní. I přesto, že je kardioprotektivní fenotyp indukovaný hypoxií známý po mnoho let a jeho objasnění může mít potencionální terapeutické využití, přesné molekulární mechanismy těchto adaptivních změn nejsou stále známe. Z výše uvedených dat vyplývá, že chronická hypoxie a IPC mohou sdílet stejné signální dráhy nebo alespoň jejich komponenty, které jsou zapojeny v mechanismu kardioprotekce (Neckár *et al.*, 2002a). Je zřejmé, že porozumění molekulárním mechanismům, které se účastní protekce myokardu, je nezbytným předpokladem pro vývoj účinných farmakologických látek, které by mohly být použity v klinické praxi.

2.4.1.1 ATP-dependentní K⁺ kanály

Bylo prokázáno, že dlouhodobá adaptace na různé metabolické stresy, včetně chronické hypoxie, vede k aktivaci ATP-dependentních K⁺ kanálů (K_{ATP}) v srdci (Baker *et al.*, 1997). V kardiomyocytech se vyskytují dva podtypy K_{ATP} kanálů, sarkolemální K_{ATP} (sarcK_{ATP}) a mitochondriální K_{ATP} (mitoK_{ATP}) (Kolár and Ostádal, 2004). Použitím specifických farmakologických modulátorů mitoK_{ATP} kanálů v různých experimentech se potvrdilo, že právě tyto kanály představují důležitou komponentu zprostředkovávající ochranu srdečních buněk před I/R poškozením (Asemu *et al.*, 1999; Eells *et al.*, 2000; Neckár *et al.*, 2002b; Béguin *et al.*, 2005; Kolár *et al.*, 2005). Zatímco 5-hydroxydekanoát, specifický blokátor mitoK_{ATP}, zrušil protektivní účinek chronické hypoxie týkající se snížení velikosti IM a obnovy kontraktilní funkce, na normoxické srdce neměl žádný vliv. Naopak diazoxid, specifický aktivátor mitoK_{ATP}, u normoxických srdcí výrazně zvýšil obnovu kontraktilní funkce, snížil velikost IM a počet komorových arytmií během ischemie, a to ve stejném rozsahu, jakého bylo dosaženo samotnou adaptací na chronickou hypoxii, ale neměl vliv na protekci v hypoxických srdcích (Asemu *et al.*, 1999; Neckár *et al.*, 2002b). Také studie Koláře a spol. podpořila názor, že právě otevření mitoK_{ATP} a nikoliv sarcK_{ATP} kanálů, hraje důležitou roli v mechanismu, kterým chronická hypoxie zlepšuje srdeční toleranci vůči I/R poškození. Použití modulátoru MCC-134, což je inhibitor mitoK_{ATP} kanálů a aktivátor sarcK_{ATP} kanálů, vedlo ke zrušení protektivního účinku u hypoxických zvířat. Na druhou stranu, pokud byl ale MCC-134 podán normoxickým potkanům, neměl žádný účinek (Kolár *et al.*, 2005). Uvedená data jsou v souladu s výsledky výzkumných skupin zabývajících se IPC (Fryer *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2003), tudíž se zdá, že mitoK_{ATP} kanály představují ústřední složku krátkodobých i dlouhodobých kardioprotektivních mechanismů.

2.4.1.2 Oxid dusnatý

Další důležitou komponentou, účastnící se protektivního účinku chronické hypoxie, se ukázala být molekula oxidu dusnatého (NO) (Manukhina *et al.*, 2006). Endogenní NO je produkováný rodinou syntáz oxidu dusnatého (NOS), která se skládá ze 3 isoform : endoteliální NOS (eNOS), neuronální NOS (nNOS) a indukibilní NOS (iNOS). Podáním L-NAME (N omega-nitro-L-arginin metyl ester), neselektivního

inhibitoru NOS, dochází ke zrušení kardioprotekce u hypoxických zvířat, což potvrzuje účast NO v ochraně před I/R poškozením (Béguin *et al.*, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2005). I přesto, že adaptace na hypoxii zvyšuje expresi a aktivitu NOS v myokardu, stále není jednoznačné, která isoforma je zodpovědná za zvýšenou produkci NO. Různé skupiny ukázaly, že během expozice potkanů na chronickou hypoxii dochází ke zvýšení hladiny iNOS (Grilli *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2005; Chytilová *et al.*, 2015; Alánová *et al.*, 2017). Studie Grilliho a spol. ukázala, že adaptace potkanů na hypoxii zvýšila hladinu iNOS na úrovni mRNA i proteinů. Tato skupina dále zjistila, že také aktivita iNOS byla mnohem vyšší u hypoxické skupiny v porovnání s normoxickou (Grilli *et al.*, 2003). Aplikace aminoguanidinu, selektivního inhibitoru iNOS, vedla ke zrušení kardioprotektivního účinku vyvolaného chronickou hypoxií (Ding *et al.*, 2005).

Na druhou stranu existují studie, které prokázaly, že chronická hypoxie vyvolává zvýšenou expresi eNOS a nNOS (Baker *et al.*, 1999; La Padula *et al.*, 2017). Mechanismus, kterým NO napomáhá k protekci myokardu, zahrnuje podle Bakera a spol. aktivaci solubilní guanylátcyklázy (GC). Tato aktivace vede k produkci 3',5'-cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), který aktivuje proteinkinázu G, která následně fosforyluje a tudíž aktivuje K_{ATP} kanály (Baker *et al.*, 1999). Tuto představu potvrdila studie, kdy po akutním podání donoru NO (molsidomin) nebo inhibitoru fosfodiesterázy 5 (sildenafil), která degraduje cGMP, došlo ke snížení velikosti IM u normoxických zvířat a posílení kardioprotekce u zvířat hypoxických (Alánová *et al.*, 2015). I další studie potvrdily, že chronická hypoxie zvýšila jak aktivitu NOS, tak aktivitu K_{ATP} kanálů (Baker *et al.*, 2001; Béguin *et al.*, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2005).

2.4.1.3 Reaktivní formy kyslíku

Je dobře známo, že reaktivní formy kyslíku (ROS) hrají dvojí roli během I/R poškození myokardu. Na jedné straně nadměrné množství ROS může vést k poškození biologických struktur, na druhé straně ROS představují důležitou komponentu protektivních signálních drah (Becker, 2004). Studie Neckáře a spol. ukázala, že u potkanů, současně vystaveným hypoxickým podmínkám a hyperkapnií, o níž je známo, že snižuje oxidační stres, došlo k oslabení protektivního vlivu hypoxie na velikost IM (Neckár *et al.*, 2003). Rovněž aplikace antioxidantu N-acetylcysteinu zrušila kardioprotekci indukovanou hypoxií, čímž se potvrdila účast ROS v mechanismu

ochrany před I/R poškozením (Kolár *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2016). Také další studie prokázaly klíčovou úlohu ROS v aktivaci endogenních protektivních drah v myokardu (Wang *et al.*, 2011; Chytilová *et al.*, 2015; Estrada *et al.*, 2016). Zvýšená produkce ROS se zdá být zapojená také v nežádoucích účincích chronické hypoxie, jako je například plicní hypertenze, která vede k hypertrofii pravé komory (RV). Tento patologický projev hypoxie byl oslaben vlivem hyperkapnie či aplikaci antioxidantů (Ooi *et al.*, 2000; Lachmanová *et al.*, 2005). Předpokládá se, že je to právě koncentrace ROS, která rozhoduje o jejich rozdílných rolích během I/R poškození. Při vysokých hladinách mají ROS škodlivý účinek, zatímco při nízkých se účastní endogenních protektivních drah (Sadoshima, 2006; Zuo *et al.*, 2013).

2.4.1.4 Antioxidanty

Signalizace závislá na ROS může u hypoxického myokardu zvýšit kapacitu antioxidantního obranného systému před I/R poškozením, čímž chrání srdce před nadměrným oxidačním stresem a snižuje poškození tkáně (Guo *et al.*, 2009; Balková *et al.*, 2011; Neckár *et al.*, 2013). Studie Balková a spol. ukázala, že chronická hypoxie zvyšuje v mitochondriích množství a aktivitu manganové superoxiddismutázy (MnSOD), což je klíčový enzym antioxidantního systému, který zneškodňuje superoxidový radikál jeho přeměnou na méně škodlivý peroxid vodíku a molekulární kyslík. Podávání N-acetylcysteinu potkanům během adaptace na hypoxii vedlo ke zrušení nárůstu aktivity i množství proteinů MnSOD, což naznačuje, že hypoxie indukuje změny u MnSOD prostřednictvím ROS (Balková *et al.*, 2011). Neckár a spol. zjistili, že hladina MnSOD se mění v závislosti na zvoleném modelu hypoxie. Zatímco kontinuální hypoxie zvýšila množství MnSOD ve srovnání s normoxickou skupinou, krátká reoxygenace během dne tento nárůst zrušila (Neckár *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že zlepšení ischemické tolerance myokardu adaptací na chronickou hypoxii je spojeno se zvýšenou aktivitou a množstvím MnSOD, zatímco cytosolická měďňato/zinečnatá superoxiddismutáza (Cu/ZnSOD) se nemění (Guo *et al.*, 2009; Neckár *et al.*, 2013). Chronická hypoxie má vliv také na další významný enzym antioxidantního systému. Zvyšuje expresi a aktivitu katalázy, která zodpovídá za rozklad peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík (Guo *et al.*, 2009).

2.4.1.5 Proteinkináza C

Je známo, že proteinkináza C (PKC) je důležitou komponentou protektivních signálních drah, ale účast jednotlivých izoform PKC za různých hypoxických podmínek není stále důkladně objasněna. Zapojení PKC v mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií je podpořeno studii, kdy použití chelerytrinu, neselektivního inhibitoru PKC, vedlo ke zrušení protektivního účinku hypoxie (Ding *et al.*, 2004; Béguin *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2017). Nejpravděpodobnějšími kandidáty na zprostředkování kardioprotekce se zdají být dvě izoformy PKC, a to PKC δ a PKC ϵ .

Studie Kolar a spol. ukázala, že adaptace na IHH vedla ke snížení velikosti IM, a to pravděpodobně přes PKC δ -dependentní signální dráhu (Kolár *et al.*, 2007). Tyto výsledky byly podpořeny dalšími studii, ve kterých byl použit rottlerin, selektivní inhibitor PKC δ . Rottlerin zrušil nárůst exprese PKC δ indukovaný IHH a zeslabil účinek hypoxie na snížení velikosti IM (Neckár *et al.*, 2005; Hlaváčková *et al.*, 2010). Na druhou stranu existují studie, které prokázaly zapojení PKC ϵ v mechanismu kardioprotekce indukované chronickou hypoxií (Rafiee *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011; Holzerová *et al.*, 2015). Holzerová a spol. ukázali, že protektivní model kontinuální normobarické hypoxie (CNH) zvýšil hladinu PKC ϵ na úrovni mRNA i proteinů, a že tento účinek hypoxie byl zrušen po aplikaci PKC ϵ inhibičního peptidu KP-1633 (Holzerová *et al.*, 2015). Je zajímavé, že prenatální expozice na chronickou hypoxií vedla naopak k významnému poklesu hladiny PKC ϵ v myokardu plodu (Patterson *et al.*, 2010). Snížená exprese myokardiální PKC ϵ byla pozorována také u dospělých potkanů adaptovaných na protektivní model IHH (Kolár *et al.*, 2007; Hlaváčková *et al.*, 2010). Zdá se tedy, že exprese a aktivace izoform PKC spojených se zvýšenou ochranou vůči I/R poškození závisí na konkrétním modelu a režimu chronické hypoxie.

2.4.1.6 Další proteinkinázy

Mezi další komponenty protektivních signálních drah stimulovaných chronickou hypoxií patří další serin/threoninové proteinkinázy jako např. mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK) - p-38-mitogenem aktivovaná proteinkináza (p38-MAPK) (Rafiee *et al.*, 2002; Béguin *et al.*, 2007), c-Jun N-terminální kináza (JNK) (Rafiee *et al.*, 2002) či extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza 1/2 (ERK 1/2) (Béguin *et al.*, 2007). Rafiee a spol. v roce 2002 prokázali zapojení p38 a JNK, ale ne ERK 1/2

kinázy v kardioprotekci indukované adaptací na chronickou hypoxii (Rafiee *et al.*, 2002). Na druhou stranu studie Béguin a spol. dokázala za použití selektivních inhibitorů, že rovněž ERK 1/2 se účastní signálních drah vedoucích k navození protektivního fenotypu vyvolaného hypoxií (Béguin *et al.*, 2007). Kromě výše zmíněných MAPK byla potvrzená účast také dalších proteinkináz - PI3K/Akt (Ravingerová *et al.*, 2007; Milano *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011), Ca²⁺-kalmodulin dependentní proteinkinázy II (CaMKII) (Xie *et al.*, 2004) a GSK3β (McCarthy *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

2.4.1.7 Mitochondrie

Stále rostou důkazy o tom, že také mitochondrie hrají důležitou roli v kardioprotekci. Zdá se, že zachování funkce mitochondrií je nezbytné pro ochranu srdce a jeho zotavení po letální ischemii (Di Lisa *et al.*, 2007; Heusch *et al.*, 2008). Různé studie ukázaly, že kromě již výše zmíněných mitoK_{ATP}, hypoxie otevírá další mitochondriální kanály, a to vysoce vodivé K⁺ kanály aktivované prostřednictvím Ca²⁺ (BKCa) (Cheng *et al.*, 2008). Za použití farmakologických modulátorů bylo zjištěno, že aktivace těchto kanálů taktéž přispívá k ochraně myokardu (Borchert *et al.*, 2011; Neckář *et al.*, 2013). Protektivní účinek aktivace BKCa kanálů spočívá především v zabránění otevření mPTP (Cheng *et al.*, 2008).

mPTP je velký nespecifický pór nacházející se na vnitřní membráně mitochondrií, který se otevírá v důsledku Ca²⁺ přetížení, zvláště je-li doprovázeno deplecí nukleotidu adeninu, zvýšenou koncentrací anorganického fosfátu a oxidativním stresem, což jsou všechno rysy I/R poškození (Halestrap *et al.*, 1998). Otevření mPTP umožňuje vstoupit vodě a látkám v ní rozpustných do mitochondrií, což vede k bobtnání mitochondriální matrix, ke kolapsu potenciálu vnitřní membrány, rozpražení dýchacího řetězce, úniku Ca²⁺ a uvolnění proapoptických faktorů z mitochondrií, což vede k apoptóze buněk (Halestrap *et al.*, 1998). Existují důkazy, že IHH zvyšuje toleranci mitochondrií k Ca²⁺ přetížení, čímž snižuje pravděpodobnost otevření mPTP (Zhu *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2014). Stejných výsledků bylo dosaženo při použití modelu CNH (Maslov *et al.*, 2015; Neckář *et al.*, 2017).

2.4.1.8 Receptory spřažené s G-proteiny

Ukázalo se, že podobně jako u preconditioningu (Yellon and Downey, 2003) se na navození kardioprotekce indukované adaptací na chronickou hypoxii podílejí také různé receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs) (Mallet *et al.*, 2006; Maslov *et al.*, 2013; Estrada *et al.*, 2016). Příkladem GPCRs, jejichž prostřednictvím lze dosáhnout spuštění signálních drah, které vedou ke kardioprotekci během adaptace na hypoxii, jsou opioidní receptory (ORs). Studie Maslov a spol. ukázala, že u potkanů adaptovaných na CNH došlo ke snížení velikosti infarktu pravděpodobně v důsledku zvýšené hladiny endogenních opioidních peptidů a stimulace ORs. Ke zjištění, které podtypy ORs by mohly být zapojeny v kardioprotekci indukované chronickou hypoxií, bylo použito několik selektivních antagonistů ORs. Protektivní efekt CNH byl zrušen po aplikaci antagonistů δ -ORs a μ -ORs. Tyto výsledky ukázaly, že endogenní opioidní peptidy působí protektivně prostřednictvím aktivace δ -ORs a μ -ORs (Maslov *et al.*, 2013). Použitím naltrindolu, selektivního inhibitoru δ -OR, se prokázala účast δ -OR také v mechanismu kardioprotekce indukované intermitentní hypoxií (Estrada *et al.*, 2016).

Existují určité indicie poukazující na to, že dalšími GPCRs, které hrají roli v protekci myokardu indukované hypoxií, jsou β -adrenergní receptory (β -ARs). Chronická hypoxie vede ke zvýšené aktivitě sympatického nervového systému, což má za následek zvýšenou hladinu katecholaminů v těle (Johnson *et al.*, 1983). Nárůst katecholaminů a jejich vliv na β -adrenergní signalizaci může přispět k rozvoji kardioprotektivního fenotypu (Frances *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2005; Salie *et al.*, 2011). Zapojení β -ARs v hypoxii-indukované kardioprotekci bylo prokázáno podáváním metoprololu psům během adaptace na intermitentní hypoxii. Metoprolol, což je selektivní antagonist β_1 -ARs, výrazně oslabil protektivní účinek indukovaný hypoxií (Mallet *et al.*, 2006).

2.5 β -Adrenergní receptory

Jak již bylo výše zmíněno, β -adrenergní receptory (β -ARs) patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs). GPCRs představují specializované integrální membránové proteiny, které tvoří největší rodinu receptorů v lidském genomu, zahrnující více než 800 genů (Lagerström and Schiöth, 2008). Tyto receptory vážou různé skupiny ligandů, které zahrnují hormony, peptidy, neurotransmitery a lipidy (Bockaert and Pin, 1999). Rodina GPCRs obsahuje konzervativní strukturu sedmi transmembránových α -helixů. Ligandem indukovaná aktivace GPCRs převádí extracelulární stimuly na intracelulární signály pro zprostředkování různých buněčných a fyziologických odpovědi. GPCRs byly rozsáhlé studovány v myokardu a kardiovaskulárním systému, kde má jejich aktivace hluboké homeostatické a regulační účinky. Význam těchto receptorů se odráží ve skutečnosti, že více než třetina léků na trhu je cílená na GPCRs (Rask-Andersen *et al.*, 2011).

2.5.1 Adrenergní receptory

β -ARs spadají do skupiny adrenergních receptorů, která zahrnuje dále α -ARs. Adrenergní receptory představují důležitou skupinu GPCRs, která je odpovědná za překlad chemických zpráv ze sympatického nervového systému do kardiovaskulárních odpovědi. Významnou roli v tomto překladu mají dva sympatické neurotransmitery a to adrenalin a noradrenalin. Jak adrenalin, tak noradrenalin hrají důležitou úlohu při kontrole krevního tlaku, rychlosti a síle myokardiální kontrakce, reaktivitě dýchacích cest a různých metabolických funkcí (Bylund *et al.*, 1994).

Ahlquist byl první, kdo farmakologicky rozlišil adrenergní receptory na α -ARs a β -ARs (AHLQUIST, 1948). O několik let později bylo pomocí podrobnějších analýz identifikováno celkem 9 podtypů adrenergních receptorů: α_{1A} -ARs, α_{1B} -ARs, α_{1D} -ARs, α_{2A} -ARs, α_{2B} -ARs, α_{2C} -ARs, β_1 -ARs, β_2 -ARs a β_3 -ARs (Kobilka, 2011). V lidském myokardu se nachází pouze malé množství α -ARs ve srovnání s β -ARs, poměr β -ARs k α -ARs je asi 10:1. Převládajícím podtypem β -ARs ve zdravém myokardu jsou β_1 -ARs, představují přibližně 75-80% z celkového množství β -ARs (Rockman *et al.*, 2002). Zastoupení β_1 -ARs a β_2 -ARs v komorách je 70-80% ku 30-20% a v síních 60-70% ku 40-30% (Brodde, 1991). Stimulace β_1 -ARs, a v menší míře β_2 -ARs, zvyšuje sílu srdeční

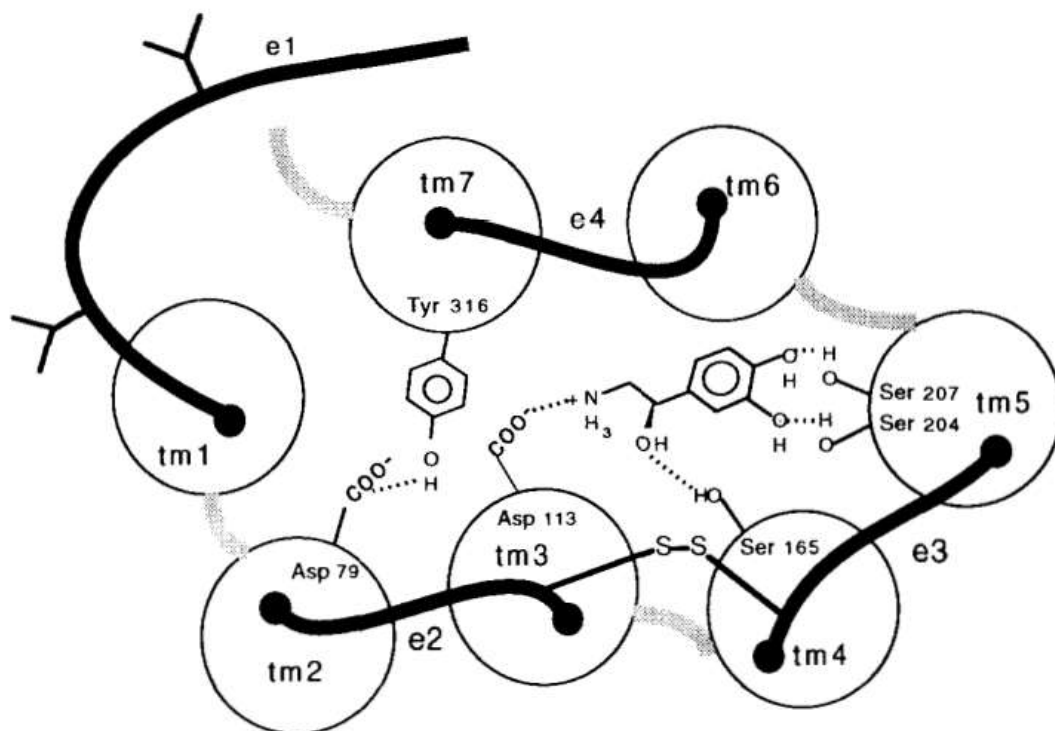
kontrakce (pozitivní ionotropní účinek), srdeční frekvenci (pozitivní chronotropní účinek) a rychlost relaxace (pozitivní lusitropní účinek), stejně jako urychluje šíření vzruchu atrioventrikulárním uzlem (pozitivní dromotropní účinek) a aktivitu peacemakeru sinoatriálního uzlu (Capote *et al.*, 2015).

2.5.2 Struktura β -adrenergních receptorů

β -ARs jsou stejně jako ostatní GPCRs charakterizovány sedmi transmembránovými α -helikálními doménami, které tvoří kapsu, ve které se nachází vazebná místa pro agonisty a kompetitivní antagonisty. Dále obsahují tři extracelulární a tři intracelulární smyčky. První a druhá extracelulární smyčka jsou spojeny prostřednictvím disulfidického můstku, který jak se ukázalo, je nezbytný pro vazbu ligandu (Dixon *et al.*, 1987). Receptor dále obsahuje extracelulární N-konec, na kterém se obvykle nachází jedno či dvě místa, která jsou glykosylovaná, a cytosolický C-konec. Pro interakci receptoru s G-proteinem se ukázal být klíčový N- a C-konec třetí intracelulární smyčky a cytosolický C-konec receptoru. C-konec společně s třetí intracelulární smyčkou rovněž obsahují sekvence, které mohou být fosforylované prostřednictvím proteinkinázy A (PKA) či kinázou receptorů spřažených s G-proteiny (GRK) (Strosberg, 1993).

2.5.3 Interakce ligandu s β -adrenergními receptory

Díky mutagenním analýzám bylo odhaleno několik aminokyselinových zbytků, které jsou nezbytné pro interakci β -ARs s ligandem. Nejdůležitější aminokyselinou se ukázala být bezpochyby kyselina asparagová v poloze 113 (Asp^{113}) ve třetím transmembránovém segmentu (TM3), která je konzervována nejen v ARs, ale ve všech receptorech vázajících monoaminy. Její karboxylová skupina vytváří vazbu s aminoskupinou ligandu. Substituce Asp^{113} má za následek neschopnost receptorů vázat monoaminy (Strader *et al.*, 1988). Jako další aminokyseliny, které se ukázaly být kritické pro vazbu agonisty a aktivaci β -ARs, byli identifikovány dva serinové zbytky v poloze 204 a 207 v TM5 (Strader *et al.*, 1989). Jak můžeme vidět na obrázku č. 2, pro vazbu noradrenalinu se zdá být důležitý také serinový zbytek v poloze 165 v TM4 (Strosberg, 1993).



Obrázek č. 2: Schéma interakce noradrenalinu s vazebnými místy β_2 -adrenergických receptorů. Na obrázku jsou znázorněny jednotlivé vazby noradrenalinu s různými aminokyselinovými zbytky β_2 -ARs. Kromě Asp¹¹³, Ser¹⁶⁵, Ser²⁰⁴ a Ser²⁰⁷, které se podílejí na vazbě noradrenalinu, zde můžeme vidět také aminokyseliny Tyr³¹⁶ a Asp⁷⁹ jejichž interakce může být důležitá pro přenos signálu na stimulační G-proteiny; Asp, kyselina asparagová; e1, extracelulární N-konec; e2-4, extracelulární smyčky; Ser, serin; S-S, disulfidický můstek; tm1-7, transmembránové segmenty; Tyr, tyrosin (Strosberg, 1993).

2.5.4 Kompartmentalizace β -adrenergní signalizace v kardiomyocytech

Vysoce diferenciované kardiomyocyty mají několik jedinečných membránových struktur. Nedávné studie významně rozšířily naše chápání těchto struktur v časoprostorové regulaci β -AR signalizace v kardiomyocytech. Mezi tyto struktury patří bohaté lipidové rafty, představující specializované oblasti plazmatické membrány obohacené o cholesterol a další lipidy, a kaveoly, což jsou podskupiny lipidových raftů, které vytvářejí baňkovité invaginace membrány obohacené zejména o proteiny, jako

jsou kaveoliny (Patel *et al.*, 2008). Kardiomyocyty dále obsahují rozsáhlou síť transverzálních tubulů (t-tubulů), které vznikají jako důsledek invaginace a prodloužení plazmatické membrány do vnitřního prostoru buněk. Na vzniku t-tubulů se podílí také kaveolin-3 (Parton *et al.*, 1997).

Zastoupení jednotlivých podtypů β -ARs v těchto membránových strukturách usnadňuje sdružování dalších signálních komponent a má silný vliv na produkci cAMP a účinnost a specifitu signalizace v kardiomyocytech. Studie Nikolaev a spol. ukázala, že za fyziologických podmínek jsou β_1 -ARs distribuovány po celém buněčném povrchu, zatímco β_2 -ARs jsou lokalizovány v t-tubulech a kaveolách (Nikolaev *et al.*, 2010). Bylo zjištěno, že také dvě hlavní myokardiální isoformy adenylátcyklázy (AC), AC5 a AC6, vykazují odlišnou kompartmentalizaci v kardiomyocytech. Zatímco AC6 je lokalizovaná v plazmatické membráně mimo t-tubulární oblasti a je zodpovědná za signalizaci zprostředkovanou β_1 -ARs, AC5 je lokalizovaná především v t-tubulární oblasti, kde je aktivovaná jak prostřednictvím β_1 - tak β_2 -ARs. Za kompartmentalizaci AC5 v t-tubulech je zodpovědná její interakce s kaveolinem-3. Kaveolin-3 dále interaguje s fosfodiesterázami (PDE) PDE4b a 4d, což vede k maskování účinku AC5 působením zmíněných PDE. (Timofeyev *et al.*, 2013).

Dále bylo zjištěno, že během srdečního selhání dochází k rozptýlení β_2 -ARs z t-tubulů a kaveol na celý buněčný povrch, což vede k difuzi receptory zprostředkované cAMP signalizace (Nikolaev *et al.*, 2010; Schobesberger *et al.*, 2017). Srdeční selhání se projevuje podstatnými strukturálními změnami kardiomyocytů, což způsobuje narušení AC5/PDE interakce a přesun β_2 -ARs z kaveolin-3 obohacených t-tubulů a kaveol do jiných membránových frakcí. Redistribuce β_2 -ARs v průběhu srdečního selhání mění kompartmentaci cAMP a může přispět k selhání myokardu (Nikolaev *et al.*, 2010; Timofeyev *et al.*, 2013).

2.5.5 Signální dráhy β -adrenergických receptorů

Sympatický nervový systém (SNS) pozitivně moduluje funkci myokardu tím, že podporuje sekreci katecholaminu z nervových zakončení. Aktivita SNS se zvyšuje v důsledku zvýšené poptávky těla po srdečním výdeji. Osa SNS-katecholaminy- β -ARs je hlavním mechanismem, kterým je srdce řízeno k většímu výkonu (Woo *et al.*, 2015). β -ARs transdukuje signál obdržený po vazbě katecholaminu přes G-proteiny k jejich

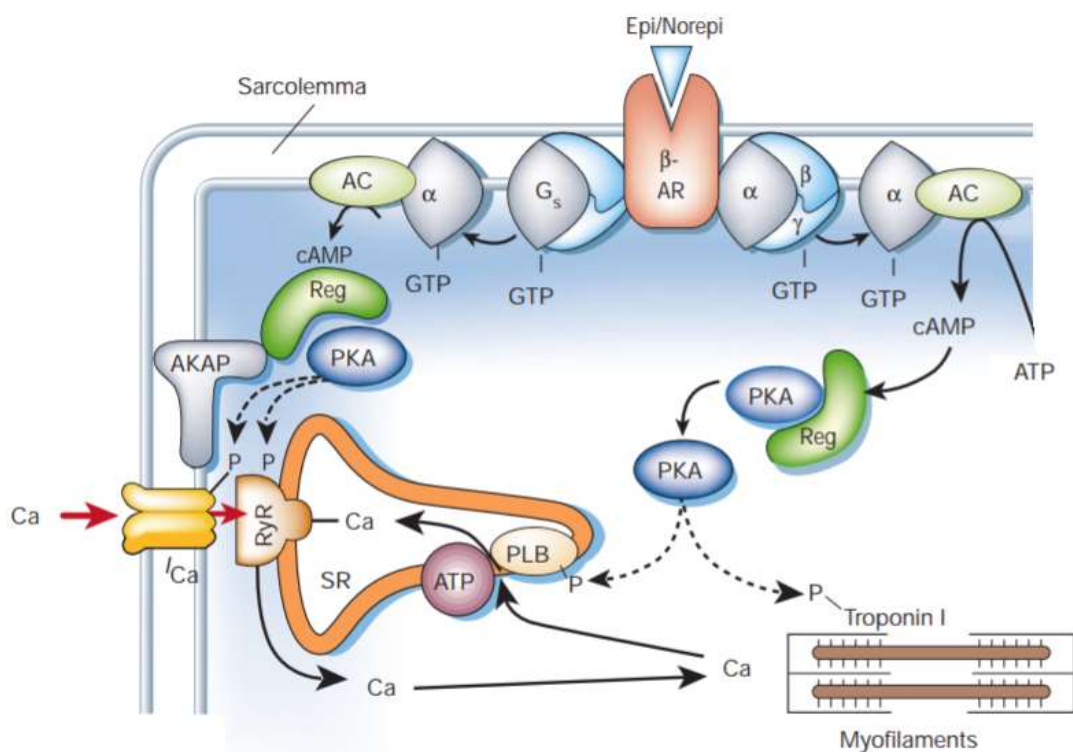
následným efektorovým molekulám. Navázáním ligandu do vazebného místa na receptoru dochází k jeho aktivaci, což vede ke konformační změně. Konformační změna katalyzuje výměnu guanosindifosfátu (GDP) za guanosintrifosfát (GTP) na $G\alpha$ podjednotce heterotrimérního G-proteinu, což vyústí v disociaci heterotrimeru na aktivní $G\alpha$ a $G\beta\gamma$ podjednotky. Obě tyto podjednotky mohou přenášet intracelulární signály nezávisle na sobě. $G\beta\gamma$ podjednotka je vždy pevně spojená, je to heterodimer fungující jako monomer (Capote *et al.*, 2015).

Jak β_1 -ARs tak β_2 -ARs jsou spřaženy se stimulačními G-proteiny (Gs-proteiny). G_s podjednotka aktivuje adenylátcyklázu (AC), která je zodpovědná za konverzi ATP na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). V myokardu mají největší zastoupení dvě isoformy AC, a to AC5 a AC6. Obě tyto isoformy mají vysoce homologní sekvence a patří do skupiny AC, které mohou být inhibovány fyziologickými koncentracemi Ca^{2+} (Beazely and Watts, 2006). cAMP je malá molekula, která funguje jako druhý posel. I přes svou malou velikost a schopnost difuze je distribuce cAMP poněkud omezená kvůli její degradaci prostřednictvím PDEs (Zaccolo, 2009). Zvýšená koncentrace cAMP vede k jeho vazbě na regulační podjednotku cAMP-dependentní proteinkinázy A (PKA), což má za následek její aktivaci. Aktivovaná PKA fosforyluje různé substráty od receptorů a jejich přidružených partnerů k proteinům, které se podílejí na zvýšení srdeční kontrakce a frekvence (Salazar *et al.*, 2007).

β_2 -ARs mohou na rozdíl od β_1 -ARs působit také dráhou, která není zprostředkována přes Gs proteiny a cAMP, a která je spojená s inhibičními G-proteiny (G_i proteiny). Studie Foerster a spol. ukázala, že β_2 -ARs mohou přenášet signál na dva odlišné G_i proteiny a to G_{i2} a pravděpodobně G_{i3} (Foerster *et al.*, 2003). K přepnutí signalizace z Gs na G_i je zapotřebí fosforylace intracelulární části receptoru. Aktivovaná $G_{\alpha i}$ podjednotka může inhibovat aktivitu AC, čímž zamezí další syntéze cAMP (Daaka *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1999). Dále bylo prokázáno, že β_2 -ARs- G_i signalizace indukuje nábor a aktivaci dalších signálních molekul, včetně ERK, PI3K a Akt kinázy, u kterých se prokázalo, že ovlivňují růst kardiomyocytů a zabraňují jejich apoptóze (Luttrell *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001).

Stimulace myokardu SNS prostřednictvím β -ARs je klíčovým regulátorem srdeční frekvence (chronotropní účinek), síly srdeční kontrakce (inotropní účinek) a rychlosti srdeční relaxace (lusitropní účinek). Tyto účinky jsou důsledkem aktivace výše zmíněné cAMP-dependentní PKA a následné fosforylace klíčových proteinů (Obrázek č. 3). Mezi tyto proteiny patří L-typ vápenatých kanálů, jejichž fosforylace zvyšuje

proud vápníku (Ca^{2+}) do kardiomyocytů, nebo ryanodinové receptory, u nichž fosforylace zvyšuje citlivost pro uvolňování Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula (SR) do buňky. Fosforylace těchto dvou proteinů má za následek zvýšenou koncentraci intracelulárního Ca^{2+} , což vede k srdeční kontrakci (Bers, 2002). Lusitropní účinek je zprostředkován fosforylací regulačních proteinů fosfolambanu a troponinu I. Fosforylací fosfolambanu dochází ke zrušení jeho inhibičního vlivu na Ca^{2+} -ATPázu SR a tudíž zvýšenému toku Ca^{2+} zpět do SR a fosforylace troponinu I vede k uvolnění Ca^{2+} z myofilament (Li *et al.*, 2000).



Obrázek č. 3: Aktivace β -adrenergických receptorů a fosforylace klíčových proteinů účastnících se srdeční kontrakce a relaxace. AC, adenylátcykláza; AKAP, kotvicí protein proteinkinázy A; β -AR, β -adrenergní receptor; ATP, adenosintrifosfát; Ca, vápník; cAMP, cyklický adenosinmonofosfát; Gs, stimulační G-protein; I_{Ca} , L-tyt vápenatých kanálů; PKA, proteinkináza A; PLB, fosfolamban; Reg, regulační podjednotka proteinkinázy A; RyR, ryanodinový receptor; SR, sarkoplazmatické retikulum (upraveno podle Bers 2002)

2.5.6 Regulační mechanismy β -adrenergní signalizace

Změny v β -ARs signalizaci jsou zásadní pro patogenezi srdečního selhání, kdy chronické zvýšení hladiny katecholaminů vede k dysregulaci β -ARs signalizace prostřednictvím desensitizace (Bristow *et al.*, 1986). Desensitizace popisuje tendenci biologických systémů a receptorů ztrácet svou schopnost reagovat na nepřetržitou a opakovanou stimulaci. Regulační mechanismy, které přispívají k β -ARs desensitizaci, mohou být zařazeny do těch, které ovlivňují funkci receptorů (rozpřažení receptorů od G-proteinů) a mezi ty, které ovlivňují jejich množství (downregulace) (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

Downregulace β -ARs v reakci na nadměrnou stimulaci agonistou je pomalý proces, který přispívá k dlouhodobému znečitlivění. Mechanismy, které vedou k downregulaci zahrnují internalizaci a degradaci receptoru, destabilizaci receptorové mRNA či sníženou syntézu receptoru (Hausdorff *et al.*, 1990; Pitcher *et al.*, 1998). Pokles množství β -ARs je důsledkem selektivní redukce β_1 -ARs s malou nebo žádnou změnou v množství β_2 -ARs (Bristow *et al.*, 1986; Ungerer *et al.*, 1993).

Na rozdíl od downregulace, k agonistou indukované ztrátě funkce receptoru dochází během několika minut po stimulaci receptoru a je způsobená rozpřažením receptoru od příslušných G-proteinů. Za rozpřažení receptoru od G-proteinů je zodpovědná fosforylace třetí intercelulární smyčky či C-konce receptoru. Fosforylace β -ARs je zprostředkována dvěma typy proteinkináz: druhým poslem aktivovanou proteinkinázou, cAMP-dependentní PKA, a kinázou receptorů spřažených s G-proteiny (GRK) (Strosberg, 1993). Nejzastoupenější GRK v srdci je GRK2, známá také jako β -adrenergní receptorová kináza 1 (β -ARK1). Zatímco GRKs fosforylují pouze ty receptory, které jsou stimulované agonistou (homologní desensitizace), PKA fosforyluje jak stimulované, tak nestimulované receptory (heterologní desensitizace) (Madamanchi, 2007). V obou případech fosforylace umožňuje vazbu β -arrestinu, který představuje prostředníka pro receptorovou endocytózu, ubiquitinylaci a signalizaci nezávislou na G-proteinech.

Vazba β -arrestinu zvyšuje afinitu receptoru k adaptorovému proteinu AP-2 a klatrinu, což vede k internalizaci receptoru. Po internalizaci jsou receptory transportovány do endosomů, odkud mohou být recyklovány zpět do plazmatické membrány, kde se vrátí zpět do funkčního stavu (Claing *et al.*, 2002). Avšak v odezvě na přetrvávající stimulaci receptoru může být internalizovaný receptor místo návratu

zpět na membránu degradován v lysozomu, což vede k výše zmíněné downregulaci receptoru. O tom, zda bude receptor degradován či ne, rozhoduje pravděpodobně ubiquitylace receptoru a β -arrestinu prostřednictvím E3 ubiquitin ligázy Mdm2, která je navázána na β -arrestin. Bylo zjištěno, že ubiquitylace β -arrestinu je nezbytná pro internalizaci receptoru, ale pro cílení receptoru do lysozomu a jeho degradaci se ukázala být klíčová ubiquitylace receptoru (Shenoy *et al.*, 2001; Jean-Charles *et al.*, 2016). Další funkcí β -arrestinu je jeho role při vytváření jakéhosi lešení, které spojuje prvky komplexních signálních drah nezávislých na G-proteinech. Často je to způsob, jak spojit receptor s komponenty MAPK kaskád. β -arrestin může vázat členy Src rodiny, což je rodina nerekceptorových tyrosinkináz, a tato interakce může vést k aktivaci ERK 1/2 kinázy (Luttrell *et al.*, 1999). Dále jsou β -arrestiny schopné vázat nejen další klíčové hráče MAPK signalizace jako například p-38 a c-Jun N-terminální kinázu 3 (JNK3) (McDonald *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2008), ale mohou také zprostředkovat aktivaci PI3K/Akt signální dráhy (Povsic *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2009).

Studie Daaka a spol. ukázala, že fosforylace β_2 -ARs zprostředkovaná PKA slouží také k přepnutí spojení receptoru od Gs proteinů ke Gi proteinům. Zmíněná fosforylace β_2 -ARs vede nejen ke snížené interakci s Gs proteiny, ale vede k aktivaci MAPK prostřednictvím $G\beta\gamma$ podjednotky, a to díky zvýšené interakci β_2 -ARs s Gi proteiny (Daaka *et al.*, 1997). Další studie zjistily, že taktéž fosforylace receptorů prostřednictvím GRK2 může zvýšit spřažení β_2 -ARs s Gi proteiny (Wang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

2.5.7 Účinky dlouhodobé stimulace na β_1 -adrenergní receptory

Farmakologické důkazy naznačují, že dlouhodobá aktivita SNS a tudíž stimulace β_1 -ARs a β_2 -ARs, má odlišné účinky na přežívání kardiomyocytů (Communal *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001). Dlouhodobá chronická stimulace β_1 -ARs podporuje downregulaci těchto receptorů a negativní remodelaci srdce včetně hypertrofie a apoptózy kardiomyocytů (Ungerer *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Morisco *et al.*, 2001). Apoptóza se podílí na I/R poškození myokardu a je zapojená v přechodu od srdeční hypertrofie k srdečnímu selhání (Narula *et al.*, 1996; Shizukuda *et al.*, 1998). Existují studie, které poukazují na to, že apoptóza kardiomyocytů vyvolaná β_1 -ARs je zprostředkovaná cAMP-PKA dráhou (Communal *et al.*, 1999; Zaugg *et al.*,

2000). Na druhou stranu, studie Zhu a spol., ve které byly použity specifitější metody k inhibici PKA dráhy, ukázala, že apoptotický účinek trvalé stimulace β_1 -ARs může být na cAMP-PKA dráze nezávislý (Zhu *et al.*, 2003). Dále tito autoři prokázali, že prodloužená stimulace β_1 -ARs je schopná zvýšit hladinu intracelulárního Ca^{2+} a aktivitu Ca^{2+} /kalmodulin dependentní kinázy II (CaMKII) taktéž způsobem nezávislým na PKA. Snížení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} či inhibice CaMKII vedly k ochraně kardiomyocytů před apoptózou indukovanou β_1 -ARs a naopak nadměrná exprese myokardiální isoformy CaMKII, CaMK- δC , výrazně zvýšila apoptotický účinek β_1 -ARs. Tyto výsledky prokázali zapojení CaMKII v indukci apoptózy stimulované β_1 -ARs. (Zhu *et al.*, 2003). Studie Xu a spol. naznačila možný mechanismus, prostřednictvím kterého CaMKII indukuje apoptózu vedoucí k srdeční dysfunkci. Aktivovaná CaMKII zprostředkovává fosforylaci mitochondriálního dynaminu-příbuzného proteinu 1 (Drp1), což vede k otevření mPTP a následné smrti kardiomyocytů. Inhibice aktivity Drp1 brání otevření mPTP, čímž chrání kardiomyocyty před apoptózou (Xu *et al.*, 2016).

2.5.8 Účinky dlouhodobé stimulace na β_2 -adrenergní receptory

Další studie poskytly důkazy o tom, že i přesto, že chronická stimulace β_2 -ARs může aktivovat jak apoptotickou, tak antiapoptotickou signální dráhu, výsledný účinek vede k přežívání buněk (Zhu *et al.*, 2001; Ahmet *et al.*, 2004; Bhushan *et al.*, 2012). Protektivní účinek β_2 -ARs je z velké části zprostředkován jejich interakcí s Gi proteiny, což následně vede k postupné aktivaci dráhy přežívání zahrnující $\text{G}\beta\gamma$ podjednotku, PI3K a Akt (Chesley *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001). PI3K představuje významného prostředníka β_2 -ARs-Gi signalizace, který chrání kardiomyocyty před apoptózou zprostředkovanou Gs proteiny, a to aktivací faktoru přežívání Akt. Inhibice Gi ($\text{G}\beta\gamma$) signalizace prostřednictvím toxinu pertuse (PTX) nebo inhibice PI3K pomocí inhibitoru LY294002 zcela zrušila aktivaci Akt stimulovanou β_2 -ARs, a co je důležitější, konvertovala β_2 -ARs signalizaci z dráhy přežívání na dráhu apoptotickou. Tyto výsledky tedy naznačují, že β_2 -ARs-Gs signální dráha může vést k apoptóze kardiomyocytů v případě zablokování β_2 -ARs-Gi signalizace (Zhu *et al.*, 2001).

Dále bylo zjištěno, že β_2 -ARs-Gi signalizace je klíčovým mechanismem, který je základem kardioprotekce také u některých forem preconditioningu (Tong *et al.*, 2005).

Další studie ukázaly, že stimulace β_2 -ARs vede kromě aktivace Akt také k aktivaci eNOs a PKC. Tyto studie prokázaly účast zmíněných signálních molekul v ochraně kardiomyocytů před buněčnou smrtí a při zachování srdeční funkce po I/R (Fajardo *et al.*, 2011; Bhushan *et al.*, 2012). Akt a PKC, známé také jako kinázy přežívání, chrání kardiomyocyty prostřednictvím inhibice otevírání mPTP (Fajardo *et al.*, 2011). Podobný mechanismus vedoucí k inhibici vytváření mPTP je zapojen v kardioprotekci navozené conditioningem (Argaud *et al.*, 2005; Downey *et al.*, 2008).

Další důležitou molekulou zapojenou v β_2 -ARs-Gi signální dráze se ukázala být cytosolická fosfolipáza A_2 (cPLA₂). Bylo zjištěno, že za stresových podmínek dochází ke zvýšení aktivity cPLA₂ α , a to v důsledku rozpřažení β_2 -ARs od Gs proteinem regulované AC signální dráhy a současným zvýšením spřažení β_2 -ARs s Gi proteiny. Tato data naznačují, že β_2 -ARs-Gi-cPLA₂ α signální dráha by mohla být funkční náhradou za defektní či chybějící β -AR-Gs-AC signální dráhu při srdečním selhání či dalších patofyziologických stavech srdce (Pavoine *et al.*, 2003).

3 Cíle disertační práce

Hlavním cílem této disertační práce bylo rozšířit naše vědomosti o vlivu chronické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v myokardu potkana a možném zapojení této signální dráhy v molekulárních mechanismech kardioprotekce. Zkoumali jsme vliv odlišných režimů chronické hypoxie, a to jak protektivních režimů kontinuální normobarické hypoxie (CNH) a intermitentní hypobarické hypoxie (IHH), tak neprotektivního režimu intermitentní normobarické hypoxie (INH). Studovali jsme vliv hypoxie na β -adrenergní signalizaci především u dospělých samců potkanů kmene Wistar, ale porovnávali jsme také možné rozdíly v této signalizaci mezi dalšími kmeny potkanů (kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a konplastický kmen SHR-mtBN). Zajímaly nás především změny v distribuci β -adrenergních receptorů (β -ARs), G-proteinů a adenylátcyklázy (AC), a to jak na úrovni proteinů, tak mRNA, ale také funkční stav tohoto důležitého signálního systému. U SHR a SHR-mtBN kmene jsme kromě β -adrenergní signalizace sledovali změny v expresi u vybraných antioxidantních enzymů a monoaminoxidázy A (MAO-A) a také funkční stav MAO-A.

Přehled specifických cílů:

Cíl 1: Sledování vlivu protektivní kontinuální a neprotektivní intermitentní normobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v RV a LV myokardu potkana

- stanovení celkového počtu (B_{MAX}) a disociační konstanty (K_D) β -ARs
- zjištění poměru jednotlivých podtypů β -ARs (β_1 -ARs a β_2 -ARs) a hodnoty inhibiční konstanty (K_i) β -ARs pomocí vazebných studií
- stanovení zastoupení β -ARs na úrovni mRNA
- analýza změn na úrovni proteinů u vybraných komponent β -adrenergní signalizace ($G_s\alpha$, $G\beta$, AC)
- stanovení enzymové aktivity AC

Cíl 2: Sledování vlivu CNH na β -adrenergní signalizaci, monoaminoxidázu A (MAO-A) a vybrané komponenty antioxidantního systému v LV myokardu SHR a SHR-mtBN potkanů

- stanovení celkového počtu (B_{MAX}) a disociační konstanty (K_D) β -ARs
- zjištění poměru jednotlivých podtypů β -ARs (β_1 -ARs a β_2 -ARs) a hodnoty inhibiční konstanty (K_i) β -ARs pomocí vazebných studií
- stanovení aktivity AC a MAO-A
- sledování zastoupení MAO-A a vybraných antioxidantních enzymů (katalázy, aldehyddehydrogenázy-2 (ALDH-2), Cu/ZnSOD, MnSOD) na úrovni mRNA a proteinů
- porovnání možných rozdílů v β -adrenergní signalizaci a antioxidantním systému mezi jednotlivými kmeny potkanů (SHR, SHR-mtBN)

Cíl 3: Sledování vlivu chronické intermitentní hypobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkana

- stanovení celkového počtu (B_{MAX}) a disociační konstanty (K_D) β -ARs
- zjištění poměru jednotlivých podtypů β -ARs (β_1 -ARs a β_2 -ARs) a hodnoty inhibiční konstanty (K_i) β -ARs pomocí vazebných studií
- sledování zastoupení vybraných komponent β -adrenergní signalizace (AC5, AC6, $G\alpha_{1,2}$, $G\alpha_3$)

4 Seznam vlastních publikací

4.1 Seznam použitých publikací

- 1) **Hahnova K.**, Kasparova D., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novotny J. (2016) β -Adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia. *Gen Physiol Biophys*, 35(2):165-73 (**IF = 1,479**)
- 2) **Hahnova K.**, Brabcova I., Neckar J., Weisssova R., Svatonova A., Novakova O., Zurmanova J., Kalous M., Silhavy J., Pravenec M., Kolar F., Novotny J. (2017) β -Adrenergic signaling, monoamine oxidase A and antioxidant defence in the myocardium of SHR and SHR-mtBN conplastic rat strains: the effect of chronic hypoxia. *J Physiol Sci*, 68(4):441-454 (**IF = 2,757**)
- 3) Micova P., **Hahnova K.**, Hlavackova M., Elsnicova B., Chytilova A., Holzerova K., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novakova O., Novotny 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(1-2):151-163 (**IF = 2,561**)

4.2 Seznam ostatních publikací

- 4) Hejnova L., **Hahnova K.**, Kockova R., Svatunkova J., Sedmera D., Novotny J. (2014) Adenylyl cyclase signaling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs. *BioMed Research International*, 2014:463123 (**IF = 2,583**)
- 5) **Hahnova K.**, Pacesova D., Volfova B., Cervena K., Kasparova D., Zurmanova J., Bendova Z. (2016) Circadian Dexras1 in rats: Development, location and responsiveness to light. *Chronobiol Int*, 33(2):141-50 (**IF = 2,643**)

4.3 Podíl na použitých publikacích

- 1) **Hahnova K.**, Kasparova D., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novotny J. (2016) β -Adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia. *Gen Physiol Biophys*, 35(2):165-73

Studentka Klára Hahnová, jakožto hlavní řešitelka publikace, provedla většinu experimentů – zpracování tkáně a příprava vzorků, stanovení distribuce β -ARs pomocí vazebných studií, stanovení exprese zkoumaných proteinů a aktivity AC. Dále analyzovala získaná data, připravila veškeré grafy a podílela se na přípravě manuskriptu.

- 2) **Hahnova K.**, Brabcova I., Neckar J., Weissova R., Svatonova A., Novakova O., Zurmanova J., Kalous M., Silhavy J., Pravenec M., Kolar F., Novotny J. (2017) β -Adrenergic signaling, monoamine oxidase A and antioxidant defence in the myocardium of SHR and SHR-mtBN conplastic rat strains: the effect of chronic hypoxia. *J Physiol Sci*, 68(4):441-454

Studentka stanovila distribuci β -ARs pomocí vazebných studií a aktivitu AC a MOA-A. Podílela se na určení exprese zkoumaných proteinů, zpracování tkáně, analýze dat a přípravě grafů a manuskriptu.

- 3) Micova P., **Hahnova K.**, Hlavackova M., Elsnicova B., Chytilova A., Holzerova K., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novakova O., Novotny 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(1-2):151-163

Studentka provedla experimenty týkající se β -adrenergní signalizace (vazebné studie a stanovení exprese vybraných komponent dané signální dráhy) a podílela se na zpracování tkáně, analýze dat a přípravě grafů.

.....
doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

5 Materiál a metody

5.1 Laboratorní zvířata

K experimentům byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar, SHR (spontánně hypertenzní potkan) a SHR-mtBN. SHR-mtBN je konplastický kmen, který nese mitochondriální genom vysoce inbredního kmene Brown Norway na jaderném genetickém pozadí SHR potkanů. Tento kmen byl vytvořen selektivní výměnou mitochondriálního genomu SHR potkanů za mitochondriální genom potkanů Brown Norway (Neckář *et al.*, 2017). Potkani byli krmeni standardní chovnou dietou s neomezeným přísunem vody a chováni v klecích po třech jedincích v režimu 12 hodin světlo/12 hodin tma při teplotě 22 ± 2 °C. Po ukončení experimentu byla zvířata usmrcena cervikální dislokací. Experimentální protokoly byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České Republiky. Všechny experimenty byly provedeny v souladu s „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ publikovaným v US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revidováno 1996).

5.2 Experimentální modely chronické hypoxie

V našich studiích byly použity tři modely chronické hypoxie: kontinuální normobarická hypoxie (CNH), intermitentní normobarická hypoxie (INH) a intermitentní hypobarická hypoxie (IHH). V případě CNH byly potkani vystaveni nepřetržitému působení hypoxie (24 hodin/denně) v normobarické komoře po dobu 3 týdnů. Tato komora je vybavena hypoxickým generátorem (Everest Summit, Hypoxico Inc., NY, USA), který snížil obsah kyslíku v komoře na 10%. Další skupina potkanů byla adaptována po dobu 3 týdnů na INH. Podmínky v normobarické komoře byly pro INH skupinu nastaveny stejně jako v případě CNH (10% O₂) s tím, že zvířata z INH skupiny byla během dne vrácena na 1 hodinu zpět do normoxického prostředí (reoxygenace). Posledním použitým modelem v našich experimentech byla IHH. Adaptace na IHH probíhala v hypobarické komoře 8 hodin denně, 5 dní v týdnu po celkovou dobu 5 týdnů (25 expozič). IHH podmínky simulovaly nadmořskou výšku 7000 m n. m. ($P_B = 40,9$ kPa, $P_{O_2} = 8,5$ kPa). Barometrický tlak byl snižován postupně

tak, že finální nadmořské výšky 7000 m n. m. bylo dosaženo po 13 expozicích (Kolár *et al.*, 2007). Kontrolní skupiny potkanů byly chovány v normoxických podmínkách odpovídajících nadmořské výšce 200 m ($P_B = 99$ kPa, $P_{O_2} = 20,7$ kPa).

5.3 Homogenizace a frakcionace srdeční tkáně

Ihned po usmrcení zvířat byla srdce vyjmuta a promyta ve vychlazeném fyziologickém roztoku. Následně byly odstraněny síně a zbytek srdce byl rozdělen na levou komoru (LV), pravou komoru (RV) a septum (S). Jednotlivé srdeční oddíly byly poté zváženy, zamraženy v kapalném dusíku a před dalším zpracováním byly uchovány v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

Pro izolaci mRNA byly kousky zmrzlé tkáně rozdrceny v třecích miskách v přítomnosti kapalného dusíku a následně homogenizovány v RNAzolu (Molecular Research Center, Inc.) nebo TRIzolu (Invitrogen, CA) pomocí kuličkového homogenizátoru (30 Hz, 10 min; Retsch MM200, Haan, Německo). Získané homogenáty byly poté centrifugovány, aby se odstranily homogenizační kuličky a zbytky tkání. Vzniklé supernatanty jednotlivých vzorků byly před dalším zpracováním uchovány při teplotě -80 °C.

Pro vazebné studie, Western blotting a stanovení enzymových aktivit byla tkáň homogenizována v TMES pufru (20 mM Tris, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 250 mM sacharóza; pH 7,4) doplněného o inhibitory proteáz (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). V tomto případě byly jednotlivé vzorky tkáně pomocí chirurgických nůžek rozstříhány na malé kousky a pomocí Ultra-Turraxu rozmělněny (24 000 rpm, 30 s). Vzniklé směsi byly poté homogenizovány pomocí Potter-Elvehjem sklo-teflonového homogenizátoru (1200 rpm, 1 min). Suspenze homogenátu byly následně centrifugovány (600 x g, 10 min, 4 °C), aby se odstranily jádra a buněčné zbytky. Vzniklé postnukleární supernatanty byly dále centrifugovány (50 000 x g, 30 min, 4 °C) za účelem oddělení membránové a cytosolické frakce. Pelety, které obsahovaly hrubé membrány (HM), byly resuspendovány v TME pufru (20 Mm Tris, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA; pH 7,4). Obě frakce byly rozalikvotovány a uchovány při teplotě -80 °C do dalšího použití. Všechny úkony při homogenizaci a frakcionaci tkáně probíhaly při teplotě 4 °C.

5.4 Vazebné studie

Ke stanovení celkového počtu (B_{MAX}) β -adrenergických receptorů (β -ARs) ve vzorcích srdečních komor bylo využito saturačních vazebných studií za použití radioligandu [3H]CGP 12177 (PerkinElmer, Inc., MA, USA), což je neselektivní antagonist β -ARs. Tyto studie byly dále použity k určení rovnovážné disociační konstanty (K_D) β -ARs, která odpovídá koncentraci radioligandu, při níž je obsazena polovina receptorů. V saturačních experimentech se stanovuje množství specificky vázaného radioligandu v závislosti na jeho rostoucí koncentraci. Vzorky hrubých membrán (HM) (100 μ g proteinů) byly inkubovány v inkubačním pufru (50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM kyselina askorbová; pH 7,4) obsahujícím vzrůstající koncentraci [3H]CGP 12177 (0,06 - 4 nM) po dobu 1 hodiny při 37 °C v celkovém objemu 0,5 ml. Vazebná reakce byla ukončena přidáním 3 ml vychlazeného promývacího pufru (50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$; pH 7,4) a následnou vakuovou filtrací přes Whatman GF/C filtry, které byly během inkubace namočené v 0,3% polyethyleniminu. Filtry byly poté dvakrát promyty 3 ml promývacího pufru a umístěny do scintilačních lahvíček, kde k nim byl přidán scintilační roztok EcoLite (MP Biomedicals, CA, USA) či CytoScint (ICN Biomedicals, CA, USA). Radioaktivita zachycená na filtrech se nechala přes noc eluovat a druhý den byla změřena na kapalinovém scintilačním detektoru TriCarb 2910TR LSC (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Nеспецифická vazba byla stanovena inkubací vzorků s radioligandem v přítomnosti 10 μ M L-propranololu a představovala méně než 30% celkové vazby.

Poměr jednotlivých podtypů β -ARs (β_1 -ARs a β_2 -ARs) a jejich inhibiční konstanty (K_i) byly stanoveny prostřednictvím kompetičních vazebných studií za použití fixní koncentrace radioligandu [3H]CGP 12177 a měnící se koncentrace nezařazeného ligandu (kompetitoru) ICI 118,551. ICI 118,551 je selektivní antagonist β_2 -ARs, což má za následek jeho vazbu k β_2 -ARs už při velmi nízkých koncentracích, zatímco k β_1 -ARs se váže až po obsazení všech přítomných β_2 -ARs, tudíž při vyšších koncentracích. V našem případě byly HM ze srdečních komor inkubovány s 1 mM [3H]CGP 12177 v přítomnosti vzrůstající koncentrace (10^{-10} – 10^{-4} M) ICI 118,551. Ostatní experimentální podmínky byly totožné jako u saturačních studií. Pokusy pro každou skupinu byly prováděny třikrát nezávisle na sobě a to v triplicátech. Údaje ze saturačních a kompetičních vazebných studií byly analyzovány nelineární regresní analýzou pomocí softwaru GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, USA).

5.5 Izolace RNA a Real-time PCR

Izolace RNA a stanovení exprese na úrovni mRNA metodou Real-time PCR bylo provedeno Mgr. Ivetou Nedvědovou, Ph.D.

Izolace celkové buněčné RNA z jednotlivých vzorků srdečních komor byla provedena za použití RNAzolu (Molecular Research Center, Inc.) či TRIzolu (Invitrogen, CA, USA) podle pokynů výrobce. Čistota a koncentrace izolované RNA byla stanovena použitím NanoDropu. Prostřednictvím RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kitu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) byl v procesu reverzní transkripce přepsán 1 µg celkové RNA do cDNA pomocí oligo(dT) primerů dle instrukcí výrobce. Analýzy Real-time PCR byly provedeny na přístroji Light Cycler LC 480 (Roche Applied Science, Branford, CT, USA) za použití Syber green Master Mixu (Eurogentec S. A., Seraing, Belgie). Genově specifické primery byly navrženy pomocí softwaru Universal Probe Library Assay Design Center (UPL, Roche Applied Science). Sekvence navržených primerů použitých v našich experimentech jsou uvedeny v tabulce č. 1. Relativní hladiny analyzovaných transkriptů byly vypočítány podle Pfaffla (Pfaffl, 2001) za použití genu ribosomální podjednotky 18S či hypoxanthin fosforibosyltransferázy (HPRT) jakožto vhodného referenčního genu. Všechna měření byla provedena v triplikátech.

Tabulka č. 1: Seznam použitých primerů pro Real-Time PCR

Geny	Forward primer	Reverse primer
AdrB1	<i>agagcagaaggcgctcaag</i>	<i>agccagcagagcgtgaac</i>
AdrB2	<i>acgagctcagtgctcagga</i>	<i>tcctggaagcttcattcagag</i>
MAOA	<i>tggtatcatgaccagtatgga</i>	<i>tgtgcctgcaaagtaaatect</i>
ALDH2	<i>agacgtcaaagatggcatga</i>	<i>ttgaggatctgcatcactgg</i>
CAT	<i>cagcgaccagatgaagca</i>	<i>ggtcaggacatcgggttcc</i>
Cu/ZnSOD	<i>taagaaacatggcggtcca</i>	<i>tggacacattggccacac</i>
MnSOD	<i>tggacaaaacctgagccctaa</i>	<i>gacccaaaagtcacgcttgata</i>

5.6 SDS-PAGE elektroforéza a Western Blot analýza

K separaci proteinů v jednotlivých vzorcích se používá metoda SDS-PAGE elektroforéza, která probíhá na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) v elektroforetické aparatuře. SDS způsobuje denaturaci proteinů a udává hodnotu jejich povrchového náboje, který je ve výsledku záporný, což umožňuje následnou separaci proteinů v gelu na základě jejich molekulové hmotnosti.

Vzorky hrubých membrán a cytosolu byly solubilizovány v Laemmliho vzorkovém pufru a naneseny na 10% nebo 15% akrylamidový gel v množství 10-30 μg proteinů na jamku. SDS-PAGE probíhala při konstantním napětí 200 V po dobu 1 hodiny v elektroforetické aparatuře Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Po ukončení elektroforézy byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), která byla poté obarvena pomocí Ponceau S, což posloužilo ke kontrole kvality přenosu. Membrány byly následně blokovány v roztoku 5% nízkotučného mléka v TBS pufru (10 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8,0) po dobu 1 hodiny a dále inkubovány 1,5 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C s příslušnými primárními protilátkami (protilátky anti-Gs α , anti-G β , anti-AC5/6, anti- β -actin, anti-Gi α_3 , anti-MAO-A, anti-ALDH-2 pocházely ze Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-kataláza a anti-AC5 z Abcamu (Cambridge, UK); anti-AC6 z Acris Antibodies (Rockville, MD, USA); anti-Cu/ZnSOD a anti-MnSOD z Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA); příprava anti-Gi $\alpha_{1,2}$ byla popsána v článku (Novotny *et al.*, 2001)). Po třech 10-minutových promytích v TBS pufru obsahujícím 0,3% Tween 20 byly membrány inkubovány se sekundárními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po dalším promytí membrán v TBS pufru byly proteiny vizualizovány pomocí zesilovací chemiluminiscenční techniky podle instrukcí výrobce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). K ověření správné identifikace námi zkoumaných proteinů byly použity standardy molekulových hmotností a pozitivní kontroly. Kvantifikace relativního množství stanovovaných proteinů byla vyhodnocena programem ImageQuant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). K opravě nepřesností spojených s nanášením vzorku na gel či přenosem na membránu byl použit β -actin jako referenční protein pro spolehlivou kvantifikaci dat získaných Western blottingem.

5.7 Stanovení aktivity adenylátcyklázy

Aktivita adenylátcyklázy (AC) ve vzorcích hrubých membrán (HM) izolovaných ze srdečních komor byla stanovena měřením přeměny [α - ^{32}P]ATP (Amersham Biosciences, UK) na [^{32}P]cAMP (Ihnatovych *et al.*, 2001). Vzorky HM (20 μg) byly inkubovány v reakční směsi obsahující 48 mM Tris pufr (pH 7,4), 2 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 20 μM GTP, 0,8 mg/ml BSA, 40 μM 3-isobutyl-1-methylxanthin, 5 mM fosfoenolpyruvát, 3,2 U pyruvát kinázy, 100 mM NaCl, 0,1 mM cAMP a přibližně 15 000 cpm [^3H]cAMP (Amersham Biosciences, UK) v celkovém objemu 100 μl . Kromě stanovení bazální aktivity AC byla její enzymová aktivita modulována různými stimulatory (10 μM isoprenalin, 10 μM forskolin, 10 mM MnCl_2 , 100 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ a 10 mM NaF) pro posouzení funkčního stavu jednotlivých komponent signální dráhy. AC byla aktivována buďto přímo svým kofaktorem Mn^{2+} nebo prostřednictvím forskolinu, který stimuluje jak AC, tak Gs proteiny, či přes stimulaci β -ARs isoprenalinem. Aktivace AC přes Gs byla stimulovaná také za použití $\text{GTP}\gamma\text{S}$ a NaF. Po 1 minutové preinkubaci vzorků v reakční směsi s nebo bez stimulatorů při teplotě 30 °C byla reakce spuštěna přidáním 10 μl 0,4 M ATP spolu s 2 000 000 cpm [α - ^{32}P]ATP, inkubace probíhala po dobu 20 minut při 30 °C. Reakce byla zastavena přidáním 200 μl 0,5 M HCl a zahříváním směsi na teplotu 100°C po dobu 5 minut. Vzorky byly neutralizovány 200 μl 1,5 M imidazolem. Separace nově vzniklého [^{32}P]cAMP, vyprodukovaného prostřednictvím AC v HM během reakce, od ostatních nukleotidů byla provedena kolonovou chromatografií za použití oxidu hlinitého. Zjištěné množství [^{32}P]cAMP v každé přefiltrované lahvičce bylo korigováno na výtěžnost [^3H]cAMP jakožto vnitřního standardu. Radioaktivita byla změřena na kapalinovém scintilačním detektoru TriCarb 2910TR LSC (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

5.8 Stanovení aktivity monoaminoxidázy-A

Aktivita monoaminoxidázy A (MAO-A) ve vzorcích izolovaných z LV byla stanovena za použití kynuramin dihydrobromidu jako substrátu v přítomnosti deprenylu, inhibitoru MAO-B (Xu *et al.*, 2005). Myokardiální HM (100 μg proteinů) byly lyzovány 2% Tritonem X-100. Výsledné lyzáty o objemu 200 μl byly smíchány s

0,2 μ l 1 mM deprenylu a 2,5 ml 50 mM fosfátového pufru (pH7,4) a inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo do každé reakční směsi přidáno 30 μ l 2,19 mM kynuramin dihydrobromidu a inkubace pokračovala dalších 30 minut. Reakce byla ukončena přidáním 200 μ l 5 M kyseliny chloristé. Následně byly reakční směsi centrifugovány (1500 x g, 10 min). Po centrifugaci bylo od každého vzorku odebráno 500 μ l supernatantu, který byl přidán do předem připravených zkumavek s 2,5 ml 1 M NaOH. Fluorescence vzniklého produktu byla měřená na 96-jamkové destičce při Ex 310-nm/Em 380-nm na přístroji Biotek Synergy HT. Pro výpočet aktivity MAO-A byla použita standartní křivka 4-chinolinolu v rozmezí koncentrací 0,03-0,5 mM.

5.9 Statistické zpracování dat

Všechny výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr a rozptyl dat jako standartní chyba průměru (SEM). Data pro jednotlivé analýzy pocházejí minimálně ze tří na sobě nezávislých experimentech. Výsledky byly statisticky zpracovány programem GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, USA). Pro porovnání významnosti rozdílu mezi experimentálními skupinami byl použit statistický test OneWay ANOVA a následně Student-Newman-Keuls test. Rozdíly mezi příslušnými skupinami byly považovány za statisticky významné, pokud p -hodnota byla menší než 0,05 ($p < 0.05$).

6 Výsledky

6.1 Cíl 1: Sledování vlivu protektivní kontinuální a neprotektivní intermitentní normobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v RV a LV myokardu potkana

6.1.1 Hmotnostní parametry

Hmotnosti těla a srdce potkanů kmene Wistar adaptovaných po dobu 3 týdnů na oba modely chronické hypoxie a potkanů chovaných v normoxických podmínkách jsou shrnuté v tabulce č. 2. Většina hmotnostních parametrů u zvířat vystavených chronické hypoxii byla ve srovnání s normoxickou skupinou poněkud změněna. Oba modely chronické hypoxie vedly k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti (CNH o 15%, INH o 14%), což bylo na druhou stranu doprovázeno zvýšením hmotnosti srdce a to v důsledku nárůstu hmotnosti RV, která hypertrofovala. Hmotnost RV se u obou adaptovaných skupin zvýšila přibližně o 80% a podíl RV/BW se oproti kontrolní skupině zvířat zdvojnásobil.

	Skupina		
	N (<i>n</i> = 10)	CNH (<i>n</i> = 10)	INH (<i>n</i> = 10)
Hmotnost těla (g)	359,9 ± 8,3	305,3 ± 7,7 *	309,9 ± 6,9 *
Hmotnost srdce (mg)	836,4 ± 20,9	936,4 ± 43,3 *	971,8 ± 56,5 *
Hmotnost RV (mg)	185,0 ± 5,9	314,4 ± 15,5 *	343,4 ± 27,6 *
Hmotnost LV (mg)	452,9 ± 15,1	442,5 ± 22,4	441,7 ± 26,2
RV/BW ($\times 10^{-3}$)	0,52 ± 0,01	1,03 ± 0,04 *	1,10 ± 0,07 *
LV/BW ($\times 10^{-3}$)	1,26 ± 0,04	1,44 ± 0,05	1,43 ± 0,08

Tabulka č. 2: Hmotnostní parametry normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na CNH a INH. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± SEM; počet zvířat v experimentální skupině (*n* = 10); N – normoxie; CNH – kontinuální normobarická hypoxie; INH – intermitentní normobarická hypoxie; RV – pravá komora; LV – levá komora; BW – hmotnost těla; RV/BW – relativní hmotnost pravé komory; LV/BW – relativní hmotnost levé komory; * statisticky významný rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)

6.1.2 Vliv CHN a INH na β -adrenergní receptory

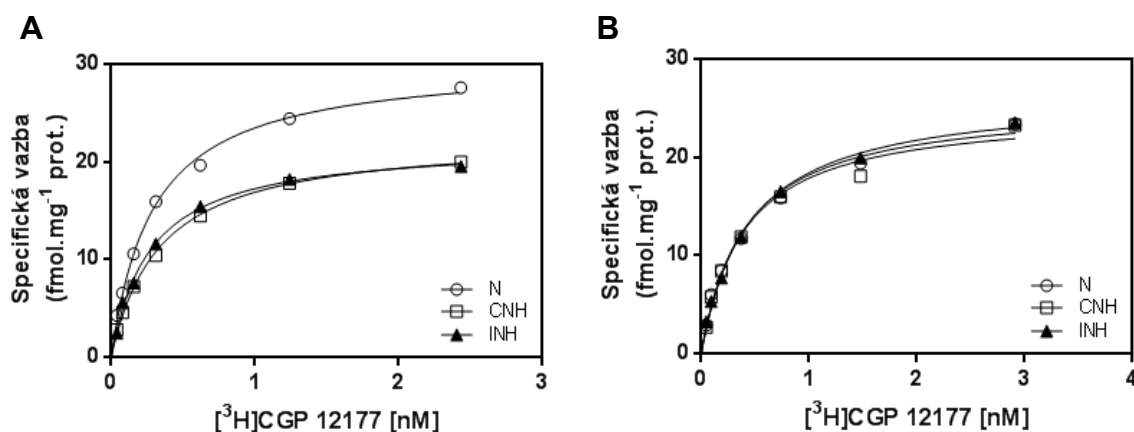
6.1.2.1 Charakterizace β -adrenergních receptorů

Pomocí saturačních vazebných studií byl stanoven celkový počet (B_{MAX}) a disociační konstanta (K_D) β -ARs v RV a LV (obrázek č. 4). Naše výsledky ukázaly, že ani jeden model chronické hypoxie neměl vliv na tyto parametry v LV (tabulka č. 3). Na druhou stranu jak CNH tak INH snížila počet β -ARs v RV, a to o 26%, respektive o 28%, ve srovnání s kontrolní skupinou. Podobné hodnoty K_D , které byly pozorovány pro vazbu [3H]CGP12177 v normoxických i v obou hypoxických skupinách ukázaly, že adaptace na hypoxii nemá vliv na vazebnou afinitu β -ARs.

Pro posouzení distribuce jednotlivých podtypů β -ARs a afinity ICI 118,551 k β -ARs byly použity kompetiční vazebné studie (obrázek č. 5). Jak můžeme vidět v tabulce č. 4, poměr jednotlivých podtypů β -ARs se po adaptaci na CNH a INH v LV významně nezměnil. Dále se ukázalo, že u inhibiční konstanty vyjadřující afinitu ICI 118,551 k β_1 -ARs v LV došlo u obou hypoxických modelů k poklesu. Na rozdíl od LV, podíl β_2 -ARs v RV byl zvýšen u obou adaptovaných skupin ve srovnání s kontrolní skupinou, ale toto zvýšení bylo statisticky významné pouze u modelu CNH. Afinita ICI 118,551 k β -ARs se v RV nezměnila ani u jednoho hypoxického modelu.

	Skupina		
	N	CNH	INH
<i>RV</i>			
B_{MAX} (fmol/mg)	29,47 \pm 1,24	21,68 \pm 1,45 *	21,17 \pm 0,65 *
K_D (nM)	0,30 \pm 0,01	0,35 \pm 0,03	0,30 \pm 0,02
<i>LV</i>			
B_{MAX} (fmol/mg)	24,64 \pm 0,73	25,62 \pm 0,54	25,78 \pm 1,00
K_D (nM)	0,41 \pm 0,03	0,38 \pm 0,05	0,37 \pm 0,06

Tabulka č. 3: Hodnoty B_{MAX} a K_D β -ARs v RV a LV u normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na CNH a INH. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) ze tří nezávislých pokusů provedených v triplikátech; N – normoxie; CNH – kontinuální normobarická hypoxie; INH – intermitentní normobarická hypoxie; RV – pravá komora; LV – levá komora; B_{MAX} - celkový počet β -adrenergních receptorů; K_D – rovnovážná disociační konstanta; * statisticky významný rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)



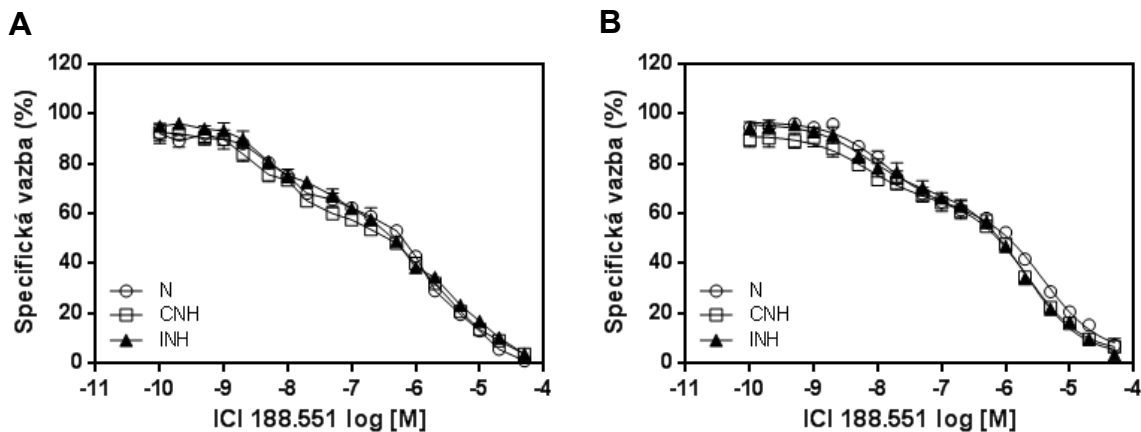
Obrázek č. 4: Saturační křivky [³H]CGP 12177

Charakterizace β -adrenergních receptorů v pravé (A) a levé (B) komoře myokardu potkanů adaptovaných na CNH (prázdné čtverce) nebo INH (plné trojúhelníky) a v normoxické skupině potkanů (prázdná kolečka). Saturační studie představují specifickou vazbu [³H]CGP 12177 k β -adrenergním receptorům hrubých membrán izolovaných z komor zkoumaných potkanů v závislosti na jeho rostoucí koncentraci. Koncentrace [³H]CGP 12177 byla použita v rozpětí 0,06 - 4 nM. Zobrazeny jsou reprezentativní [³H]CGP 12177 saturační křivky jednotlivých skupin.; N – normoxie; CNH – kontinuální normobarická hypoxie; INH – intermitentní normobarická hypoxie

	Skupina		
	N	CNH	INH
<i>RV</i>			
β_2 (%)	32,30 ± 1,41	40,43 ± 0,29 *	37,80 ± 3,08
$K_i\beta_2$ (nM)	2,24 ± 0,67	2,11 ± 0,73	1,95 ± 0,56
$K_i\beta_1$ (μ M)	0,51 ± 0,06	0,68 ± 0,10	0,52 ± 0,17
<i>LV</i>			
β_2 (%)	34,93 ± 2,13	29,67 ± 1,56	30,33 ± 1,59
$K_i\beta_2$ (nM)	3,58 ± 0,71	2,04 ± 0,52	2,19 ± 0,53
$K_i\beta_1$ (μ M)	1,26 ± 0,21	0,62 ± 0,07 *	0,56 ± 0,02*

Tabulka č. 4: Distribuce jednotlivých podtypů β -ARs a hodnoty K_i v RV a LV u normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na CNH a INH.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) ze tří nezávislých pokusů provedených v triplicáttech; N – normoxie; CNH - kontinuální normobarická hypoxie; INH – intermitentní normobarická hypoxie; RV – pravá komora; LV – levá komora; β_2 (%) – procento β_2 -ARs ze všech myokardiálních β -ARs; K_i - inhibiční konstanta vyjadřující afinitu ICI 118,551 k β -adrenergním receptorům; * statisticky významný rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)

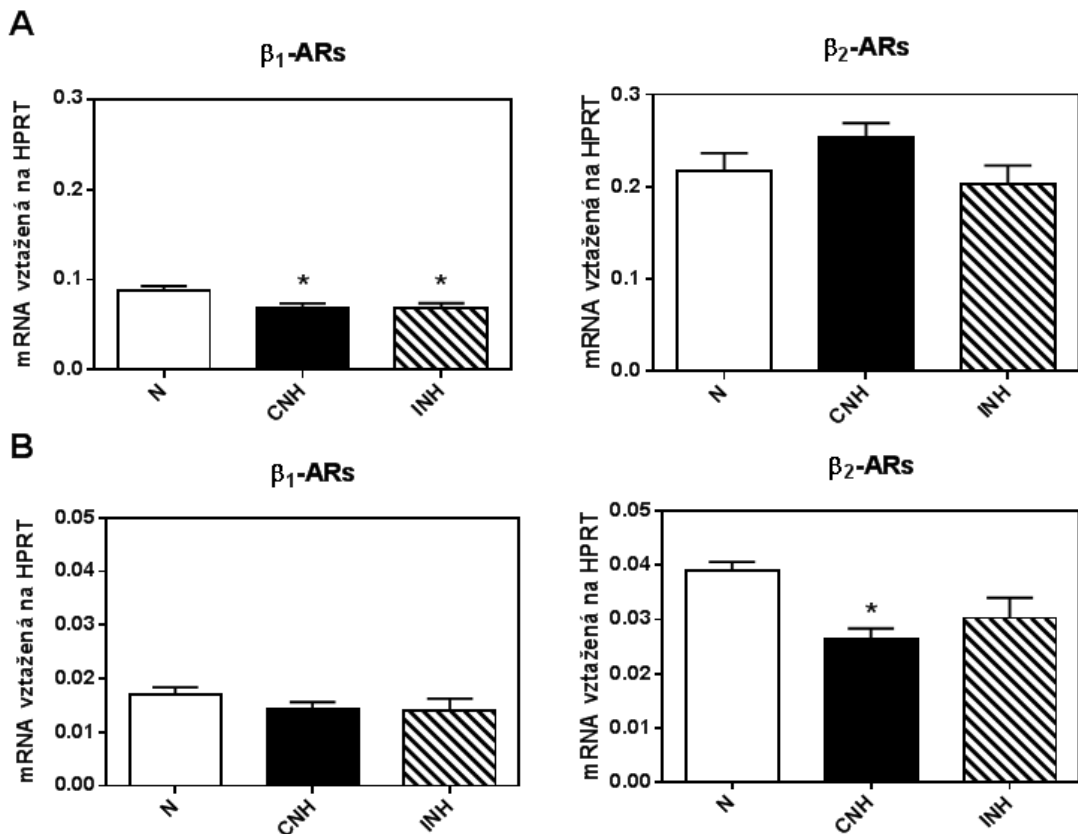


Obrázek č. 5: Kompetiční křivky s využitím kompetitoru ICI 118,551

Charakterizace β -adrenergních receptorů v pravé (A) a levé (B) komoře myokardu potkanů adaptovaných na CNH (prázdné čtverce) nebo INH (plné trojúhelníky) a v normoxické skupině potkanů (prázdna kolečka). Kompetiční studie představují změny v množství vázaného radioligandu [^3H]CGP 12177 k β -adrenergním receptorům hrubých membrán izolovaných z komor zkoumaných potkanů v závislosti na přítomnosti měnící se koncentrace kompetitoru ICI 118,551. Koncentrace [^3H]CGP 12177 byla 1 nM a koncentrace ICI 118,551 se pohybovala v rozpětí od 10^{-4} M do 10^{-10} M. Jednotlivé body představují aritmetický průměr (\pm SEM) ze tří nezávislých pokusů provedených v triplicátech.; N – normoxie; CNH - kontinuální normobarická hypoxie; INH - intermitentní normobarická hypoxie

6.1.2.2 Distribuce β -ARs na úrovni mRNA

Výsledky z Real-time PCR analýzy odhalily významný pokles (přibližně o 20%) v hladinách transkriptů β_1 -ARs v hrubých membránách izolovaných z RV myokardu potkanů adaptovaných na oba modely chronické hypoxie. Podobný pokles byl sledován u hladiny transkriptů β_2 -ARs v LV u zvířat adaptovaných na CNH (obrázek č. 6)

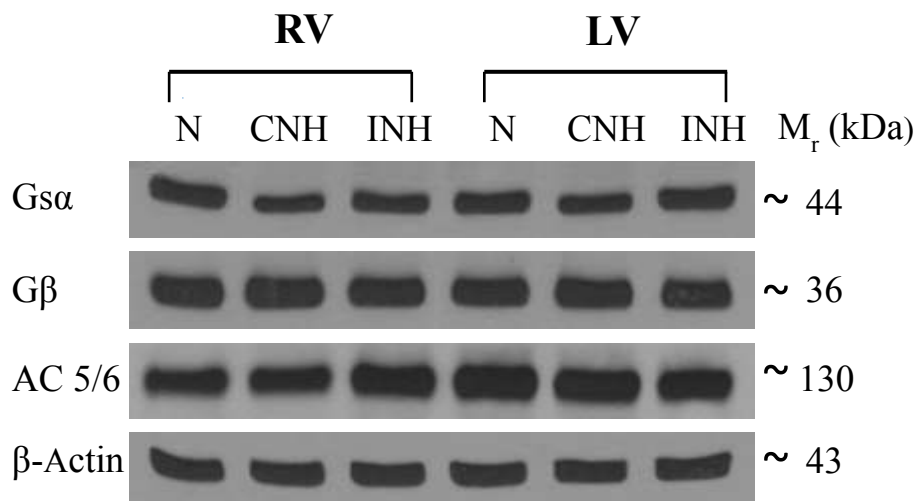


Obrázek č. 6: Vliv CNH a INH na distribuci β -ARs na úrovni mRNA.

Stanovení hladiny β_1 - a β_2 -adrenergických receptorů na úrovni mRNA v RV (A) a LV (B) myokardu potkanů adaptovaných na CNH (plné sloupce) nebo INH (šrafované sloupce) a v normoxické skupině potkanů (prázdné sloupce). Hladiny mRNA β_1 - a β_2 -adrenergických receptorů byly normalizovány na hladinu referenčního genu hypoxanthin fosforibosyltransferázy (HPRT). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM.; N – normoxie; CNH - kontinuální normobarická hypoxie; INH - intermitentní normobarická hypoxie; RV – pravá komora; LV – levá komora; * statisticky významný rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)

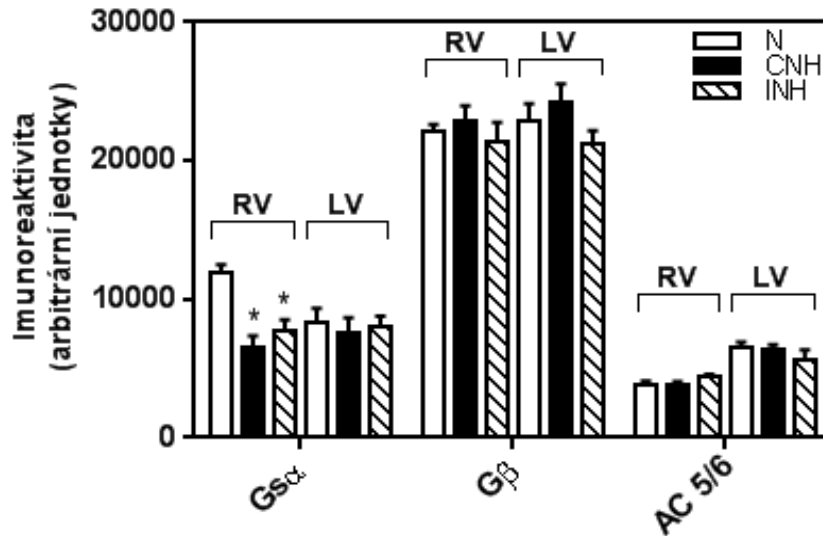
6.1.3 Vliv CNH a INH na expresi G-proteinů a adenylátcyklázy

Pro posouzení možného vlivu CNH a INH na myokardiální AC signalizaci jsme se rozhodli nejprve zaměřit na distribuci stimulačních G-proteinů (Gs) a dominantních izoform srdeční adenylátcyklázy (AC 5 a 6) v hrubých membránách izolovaných z pravých a levých komor. Naše výsledky odhalily významný pokles (okolo 40-50%) v expresi G_{α} proteinu v RV myokardu potkanů adaptovaných na oba modely hypoxie (obrázek č. 7 a 8). U ostatních zkoumaných proteinů se ukázalo, že expozice na chronickou hypoxii neměla vliv na jejich expresi ani v jedné komoře.



Obrázek č. 7: Vliv CNH a INH na expresi G_{α} , G_{β} a AC 5/6.

Stanovení exprese vybraných podjednotek G-proteinů a adenylátcyklázy v pravé (RV) a levé (LV) komoře myokardu potkanů adaptovaných na CNH nebo INH a v normoxické skupině potkanů. Proteiny ve vzorcích byly rozděleny pomocí SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a označeny specifickými protilátkami proti G_{α} a G_{β} podjednotce G-proteinů a adenylátcykláze 5/6 (AC5/6). Zobrazeny jsou reprezentativní obrázky Western blotů. Relativního množství G_{α} , G_{β} a AC 5/6 bylo vyhodnoceno programem ImageQuant a normalizováno na referenční protein β -actin; N - normoxie; CNH - kontinuální normobarická hypoxie; INH - intermitentní normobarická hypoxie; M_r – relativní molekulová hmotnost

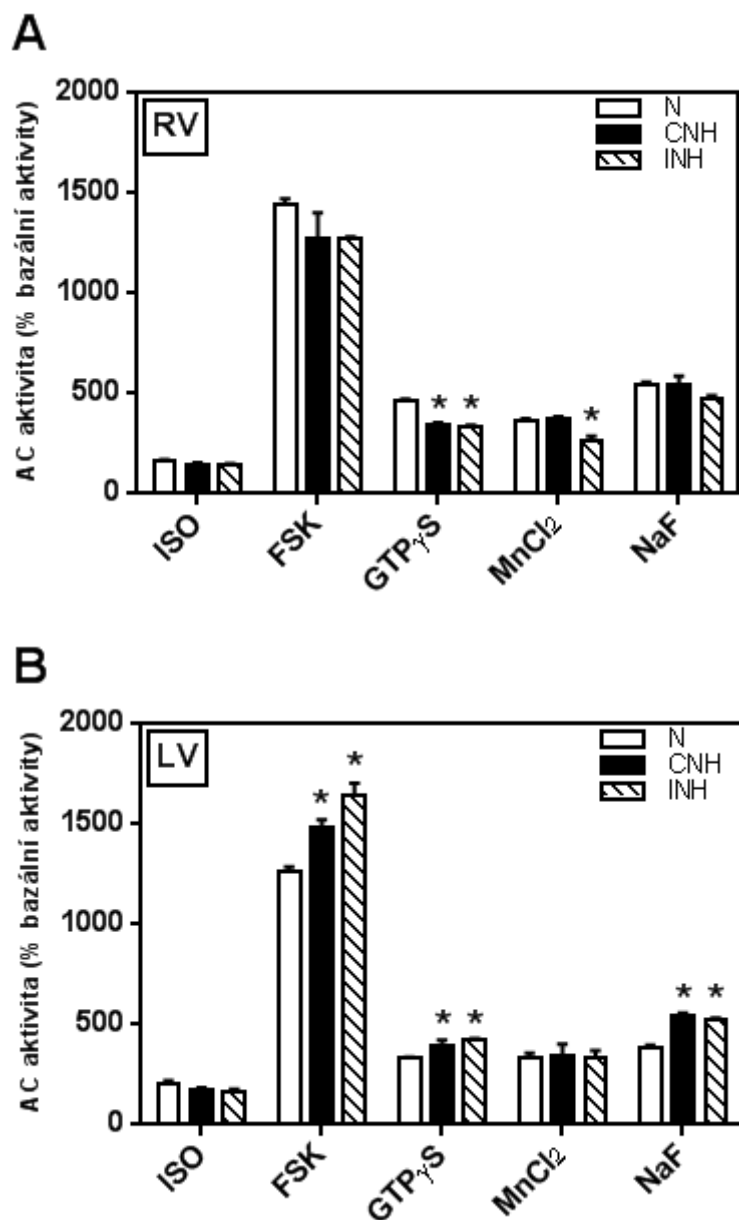


Obrázek č. 8: Vliv CNH a INH na expresi G α , G β a AC 5/6.

Stanovení exprese vybraných podjednotek G-proteinů a adenylátcyklázy v pravé (RV) a levé (LV) komoře myokardu potkanů adaptovaných na CNH (plné sloupce) nebo INH (šrafované sloupce) a v normoxické skupině potkanů (prázdné sloupce). Proteiny ve vzorcích byly rozděleny pomocí SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulozovou membránu a označeny specifickými protilátkami proti G α a G β podjednotce G-proteinů a adenylátcykláze 5/6 (AC5/6). Relativního množství G α , G β a AC 5/6 bylo vyhodnoceno programem ImageQuant a normalizováno na referenční protein β -actin. Sloupce zobrazují normalizované integrované hodnoty optické hustoty a představují průměr (\pm SEM) ze tří nezávislých pokusů.; N – normoxie; CNH - kontinuální normobarická hypoxie; INH - intermitentní normobarická hypoxie; * statisticky významný rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)

6.1.4 Vliv CNH a INH na aktivitu adenylátcyklázy

Ačkoliv se bazální aktivita AC mezi jednotlivými vzorky nijak významně nelišila, ukázalo se, že chronická hypoxie zřejmě ovlivnila schopnost Gs proteinu regulovat enzymovou aktivitu AC (obrázek č. 9). Zatímco adaptace potkanů na oba modely hypoxie vedla ke snížení AC aktivity stimulované prostřednictvím GTP γ S v RV o přibližně 25% ve srovnání s normoxickou skupinou, v LV měla CNH i INH opačný vliv na aktivitu modulovanou stejným stimulem (nárůst okolo 20%). Podobné zvýšení aktivity AC v LV bylo pozorováno po stimulaci zprostředkované NaF. Forskolin, jakožto aktivátor AC i Gs proteinu, neměl na enzymovou aktivitu AC v RV významný vliv, na druhou stranu v LV jí zvýšil u hypoxických potkanů přibližně o 30% ve srovnání s normoxickou skupinou.



Obrázek č. 9: Vliv CNH a INH na aktivitu AC.

Stanovení aktivity myokardiální AC v pravé (A) a levé (B) komoře myokardu potkanů adaptovaných na CNH (plně sloupce) nebo INH (šrafované sloupce) a v normoxické skupině potkanů (prázdné sloupce) za použití následujících stimulatorů: isoprenalinu (ISO), forskolinu (FSK), GTP γ S, MnCl $_2$ and NaF. Data jsou vyjádřena jako procenta odpovídající bazální aktivitě AC (100%). Bazální aktivita (9.98 ± 0.90 pmol cAMP/mg/min v RV a 9.90 ± 1.05 pmol cAMP/mg/min v LV) nebyla ovlivněna adaptací na hypoxii. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) z pěti nezávislých pokusů provedených v duplikátu.; N – normoxie; CNH - kontinuální normobarická hypoxie; INH - intermitentní normobarická hypoxie; RV – pravá komora; LV – levá komora; * statisticky významný rozdíl mezi daným hypoxickým modelem a kontrolou ($p < 0,05$)

6.2 Cíl 2: Sledování vlivu CNH na β -adrenergní signalizaci, monoaminoxidázu A a vybrané komponenty antioxidačního systému v LV myokardu SHR a SHR-mtBN potkanů

6.2.1 Hmotnostní parametry

Hmotnosti těla a srdce SHR a SHR-mtBN potkanů adaptovaných po dobu 3 týdnů na CNH (SHR/H, SHR-mtBN/H) a odpovídajících normoxických skupin jsou shrnuté v tabulce č. 5. Normoxické SHR a SHR-mtBN skupiny se kromě relativní hmotnosti LV, která byla vyšší u konplastického kmene (o 5,3%), nelišily v žádném jiném hmotnostním parametru. Adaptace potkanů na CNH vedla ke zpomalení růstu těla a k výrazné hypertrofii RV u obou kmenů ve srovnání s příslušnými normoxickými skupinami. Také mezi hypoxickými skupinami byl odhalen rozdíl v hmotnosti RV, která byla u konplastického kmene nižší, což se projevilo také v poklesu relativní hmotnosti RV o 12,1% ve srovnání s SHR/H (Neckář *et al.*, 2017).

	Skupina			
	SHR	SHR/H	SHR-mtBN	SHR-mtBN/H
Hmotnost těla (g)	314 ± 5	267 ± 6 ⁺	300 ± 4	269 ± 8 [#]
Hmotnost RV (mg)	189 ± 5	374 ± 11 ⁺	180 ± 3	331 ± 17 ^{#§}
Hmotnost LV (mg)	596 ± 7	592 ± 15	607 ± 15	621 ± 17
Hmotnost S (mg)	236 ± 4	215 ± 5	229 ± 6	220 ± 7
RV/BW ($\times 10^{-3}$)	0,60 ± 0,01	1,40 ± 0,01 ⁺	0,60 ± 0,01	1,23 ± 0,01 ^{#§}
(LV+S)/BW ($\times 10^{-3}$)	2,65 ± 0,02	3,02 ± 0,04 ⁺	2,79 ± 0,06 [*]	3,13 ± 0,03 [#]
HW/BW ($\times 10^{-3}$)	3,25 ± 0,03	4,42 ± 0,04 ⁺	3,39 ± 0,06	4,37 ± 0,06 [#]

Tabulka č 5: Hmotnostní parametry SHR a SHR-mtBN potkanů chovaných v normoxických podmínkách a adaptovaných na CNH (SHR/H, SHR-mtBN/H).

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± SEM; RV – pravá komora; LV – levá komora; S - septum; BW – hmotnost těla; RV/BW – relativní hmotnost pravé komory; (LV+S)/BW - relativní hmotnost levé komory; HW/BW – relativní hmotnost srdce; ^{*} $p < 0,05$ SHR vs. SHR-mtBN; ⁺ $p < 0,05$ SHR vs. SHR/H; [#] $p < 0,05$ SHR-mtBN vs. SHR-mtBN/H; [§] $p < 0,05$ SHR/H vs. SHR-mtBN/H

6.2.2 Charakterizace β -adrenergických receptorů

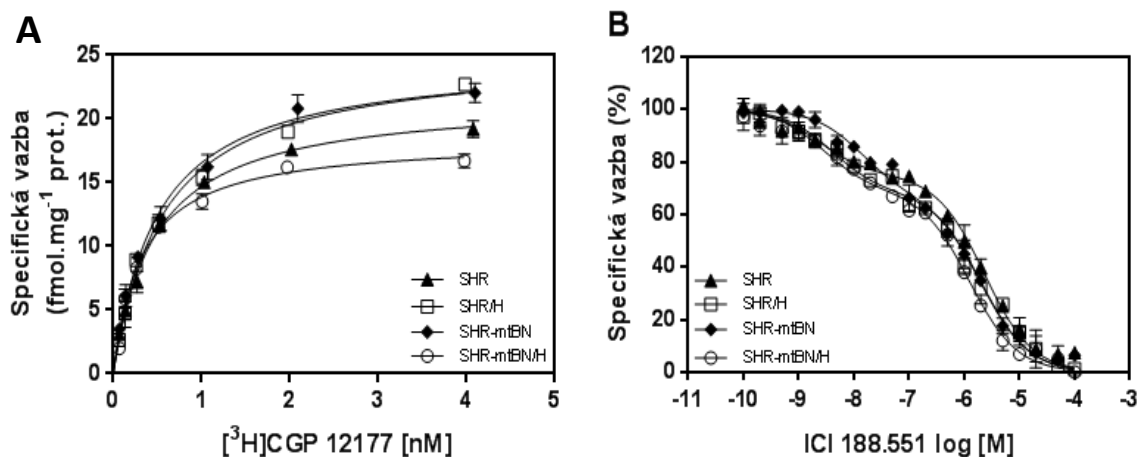
Celkový počet β -ARs (B_{MAX}) a jejich disociační konstanty (K_D) byly v myokardiálních membránách LV stanoveny saturačními vazebnými studii (obrázek č. 10; A). Ukázalo se, že u konplastického kmene došlo k nárůstu B_{MAX} (přibližně o 15%) v porovnání s SHR kmenem, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Počet β -ARs byl ovlivněn také adaptací potkanů na chronickou hypoxii. Zatímco CNH vyvolala signifikantní nárůst B_{MAX} (o 16%) u SHR/H, u konplastického SHR-mtBN/H kmene vedla k výraznému poklesu (o 26%) (tabulka č. 6). K_D se mezi kmeny nelišily a jejich hodnoty nebyly ovlivněny ani adaptací na hypoxii.

Ke stanovení distribuce jednotlivých podtypů β -ARs v LV byly použity kompetiční vazebné studie (obrázek č. 10; B). Jak můžeme vidět v tabulce č. 7, podíl β_2 -ARs byl u konplastického SHR-mtBN kmene signifikantně zvýšen (o 37%) v porovnání s SHR kmenem. Adaptace na hypoxii zvýšila podíl β_2 -ARs u SHR/H o 30%, ale neměla vliv na distribuci podtypů β -ARs u konplastického SHR-mtBN/H kmene.

	Skupina			
	SHR	SHR/H	SHR-mtBN	SHR-mtBN/H
B_{MAX} (fmol/mg)	21,71 \pm 0.88	25,20 \pm 0,38 ⁺	24,87 \pm 0.73	18,37 \pm 0.46 ^{#§}
K_D (nM)	0,49 \pm 0.10	0,58 \pm 0.07	0,51 \pm 0.03	0,32 \pm 0.01

Tabulka č. 6: Hodnoty B_{MAX} a K_D β -ARs v LV u SHR a SHR-mtBN potkanů chovaných v normoxických podmínkách a adaptovaných na CNH (SHR/H, SHR-mtBN/H).

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) ze tří nezávislých pokusů provedených v triplikátech; B_{MAX} – celkový počet β -adrenergických receptorů; K_D – rovnovážná disociační konstanta; ⁺ $p < 0,05$ SHR vs. SHR/H; [#] $p < 0,05$ SHR-mtBN vs. SHR-mtBN/H; [§] $p < 0,05$ SHR/H vs. SHR-mtBN/H



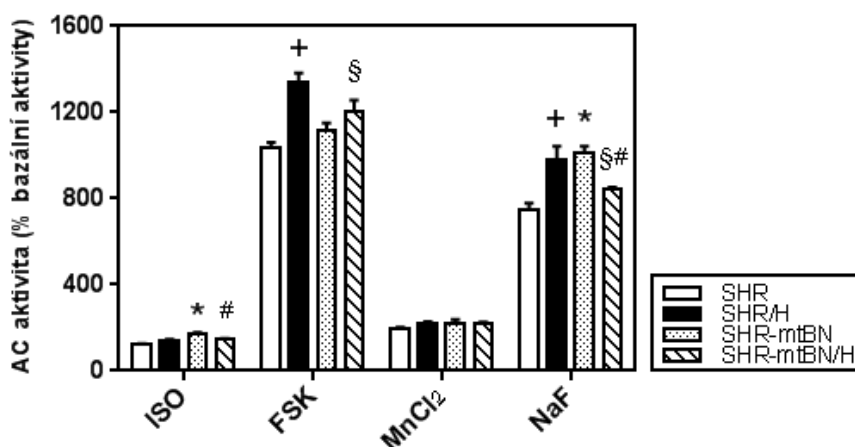
Obrázek č. 10: Vazebné studie β -AR v LV u SHR a SHR-mtBN potkanů chovaných v normoxických podmínkách a adaptovaných na CNH (SHR/H, SHR-mtBN/H). Charakterizace β -ARs v LV u SHR (plně trojúhelníky), SHR/H (prázdné čtverce), SHR-mtBN (plně kosočtverce) a SHR-mtBN/H (prázdná kolečka) potkanů prostřednictvím vazebných studií. Zobrazené jsou [³H]CGP 12177 saturační křivky (A) a kompetiční křivky (B), které byly získány za použití β_2 -ARs antagonisty ICI 188,551, jehož koncentrace se pohybovala v rozpětí od 10⁻⁴ M do 10⁻¹⁰ M. Koncentrace [³H]CGP 12177 v saturačních studiích byla použita v rozpětí 0,06 - 4 nM, zatímco pro kompetiční studie byla použita koncentrace 1 nM. Jednotlivé body představují aritmetický průměr (\pm SEM) ze tří nezávislých pokusů provedených v triplikátech.

	Skupina			
	SHR	SHR/H	SHR-mtBN	SHR-mtBN/H
β_2 (%)	24,03 \pm 0.30	31,12 \pm 1.42 ⁺	32,97 \pm 2.01 [*]	31,15 \pm 0.42
K _i β_2 (nM)	0,80 \pm 0.53	1,43 \pm 0.17	4,80 \pm 1.25	0,75 \pm 0.21
K _i β_1 (μ M)	0,73 \pm 0.06	0,77 \pm 0.25	0,70 \pm 0.07	0,31 \pm 0.03

Tabulka č. 7: Distribuce jednotlivých podtypů β -ARs a hodnoty K_i v LV u SHR a SHR-mtBN potkanů chovaných v normoxických podmínkách a adaptovaných na CNH (SHR/H, SHR-mtBN/H). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) ze tří nezávislých pokusů provedených v triplikátech; β_2 (%) – procento β_2 -ARs ze všech myokardiálních β -ARs; K_i - inhibiční konstanta vyjadřující afinitu ICI 118,551 k β -adrenergním receptorům; ^{*} $p < 0,05$ SHR vs. SHR-mtBN, ⁺ $p < 0,05$ SHR vs. SHR/H;

6.2.3 Aktivita adenylátcyklázy

Výsledky experimentů, ve kterých byla aktivita AC stanovována za různých experimentálních podmínek, jsou shrnuté na obrázku č. 11. Kromě stanovení bazální aktivity AC, byla aktivita enzymu modulována různými stimulatory. Bazální aktivita se mezi kmeny nijak významně nelišila a ani adaptace na CNH neměla vliv na její hodnotu. Na druhou stranu aktivita AC byla různě ovlivněna stimulatory. Zatímco mezi SHR a SHR-mtBN nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v aktivaci AC prostřednictvím forskolinu či $MnCl_2$, aktivita stimulovaná isoprenalinem a NaF byla výrazně vyšší u SHR-mtBN (přibližně o 35%). Také adaptace potkanů na hypoxii ovlivnila stimulatory modulovanou aktivitu AC. Zatímco u SHR/H kmene CNH zvýšila AC aktivitu stimulovanou forskolinem a NaF přibližně o 30%, u konplastického SHR-mtBN/H kmene neměla na forskolinem stimulovanou aktivitu AC vliv a snížila o 17% aktivitu stimulovanou NaF, ve srovnání s odpovídajícími normoxickými skupinami. Stimulační účinek forskolinu a NaF byl u SHR-mtBN/H nižší o 10%, respektive 14%, ve srovnání s SHR/H kmenem. Hypoxie neměla vliv na schopnost isoprenalinu stimulovat aktivitu AC u SHR/H, ale snížila jeho stimulační účinek o 13% u SHR-mtBN/H.

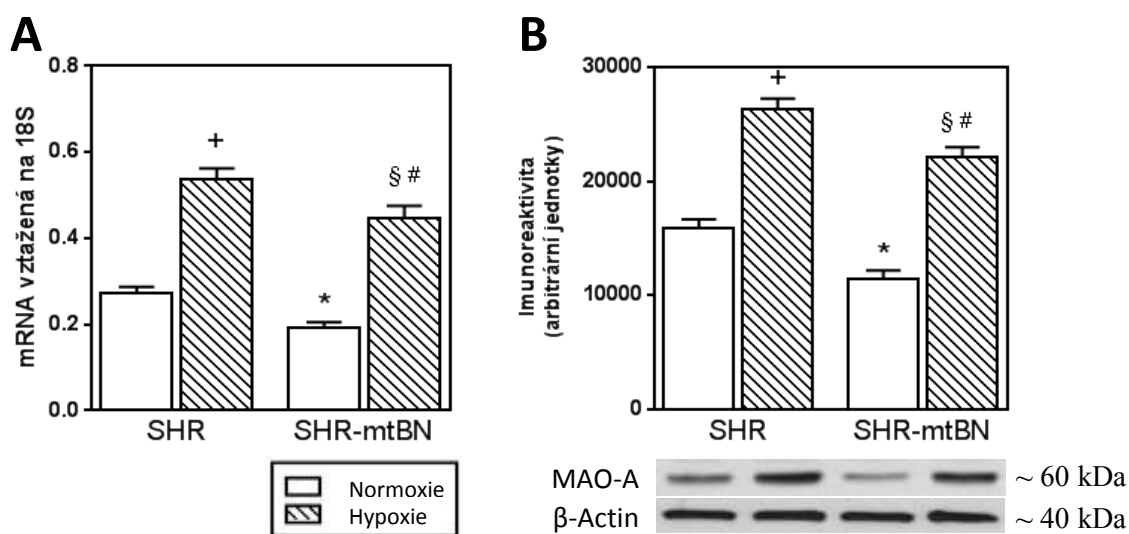


Obrázek č. 11: Aktivita adenylátcyklázy.

Stanovení aktivity AC v LV u SHR (prázdné sloupce), SHR/H (plné sloupce), SHR-mtBN (tečkované sloupce) a SHR-mtBN/H (šrafované sloupce) za použití následujících stimulatorů: isoprenalinu (ISO), forskolinu (FSK), $MnCl_2$ a NaF. Data jsou vyjádřena jako procenta odpovídající bazální aktivitě AC (100%). Hodnoty bazálních aktivit se mezi jednotlivými skupinami významně nelišily a pohybovaly se v rozmezí 7,9 – 9,2 pmol cAMP/mg/min ve všech měřeních. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) z pěti nezávislých pokusů provedených v triplicátech.; * $p < 0,05$ SHR vs. SHR-mtBN, + $p < 0,05$ SHR vs. SHR/H; # $p < 0,05$ SHR-mtBN vs. SHR-mtBN/H; § $p < 0,05$ SHR/H vs. SHR-mtBN/H

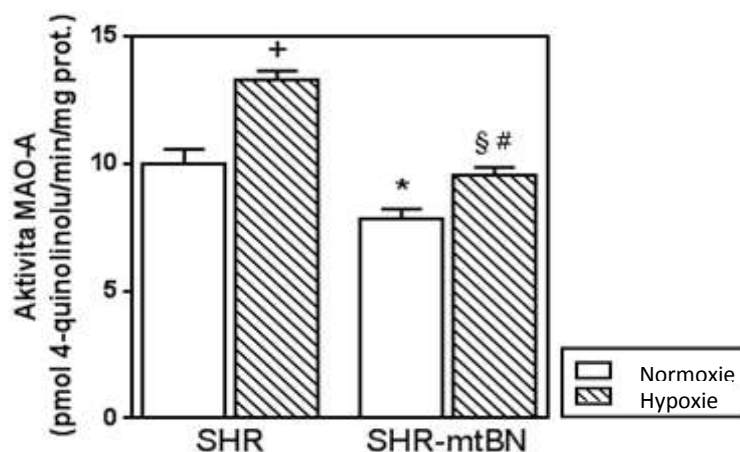
6.2.4 Genová exprese a aktivita monoaminoxidázy A

V myokardiálních membránách LV izolovaných z normoxických a hypoxických SHR a SHR-mtBN potkanů byla dále stanovena genová exprese a enzymová aktivita MAO-A. Hladina mRNA MAO-A byla signifikantně nižší (o 30%) u konplatického SHR-mtBN kmene ve srovnání s SHR kmenem (obrázek č. 12; A). Adaptace na CNH vedla k výraznému nárůstu hladiny mRNA v obou kmenech (o 97% u SHR/H a o 132% u SHR-mtBN/H). Stejný trend byl pozorován na úrovni proteinů a v aktivitě MAO-A. Exprese proteinu MAO-A byla u SHR-mtBN kmene nižší o 28% než u SHR kmene a CNH zvýšila množství tohoto proteinu o 66% u SHR/H a o 92% u SHR-mtBN/H (obrázek č. 12; B). Enzymová aktivity MAO-A u SHR-mtBN byla nižší o 21% ve srovnání s SHR a hypoxie vedla k jejímu nárůstu o 33% u SHR/H a o 22% u SHR-mtBN/H (obrázek č. 13).



Obrázek č. 12: Stanovení genové exprese monoaminoxidázy A.

Hladiny mRNA a proteinu MAO-A v LV u SHR a SHR-mtBN potkanů chovaných v normoxických (prázdné sloupce) a hypoxických (šrafované sloupce) podmínkách byly stanoveny prostřednictvím RT-PCR a Western blotu. Množství MAO-A mRNA bylo normalizováno na hladinu referenčního genu ribosomální podjednotky 18S (A). Hladiny 18S nebyly ovlivněny adaptací na CNH. Reprezentativní obrázky Western blotů jsou zobrazeny pod příslušným grafem zobrazujícím relativní hladiny MAO-A proteinu (B). Relativní množství proteinu MAO-A bylo vyhodnoceno programem ImageQuant a normalizováno na referenční protein β-actin. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (± SEM) nejméně ze tří nezávislých pokusů.; * $p < 0,05$ SHR vs. SHR-mtBN, + $p < 0,05$ SHR vs. SHR/H; # $p < 0,05$ SHR-mtBN vs. SHR-mtBN/H; § $p < 0,05$ SHR/H vs. SHR-mtBN/H



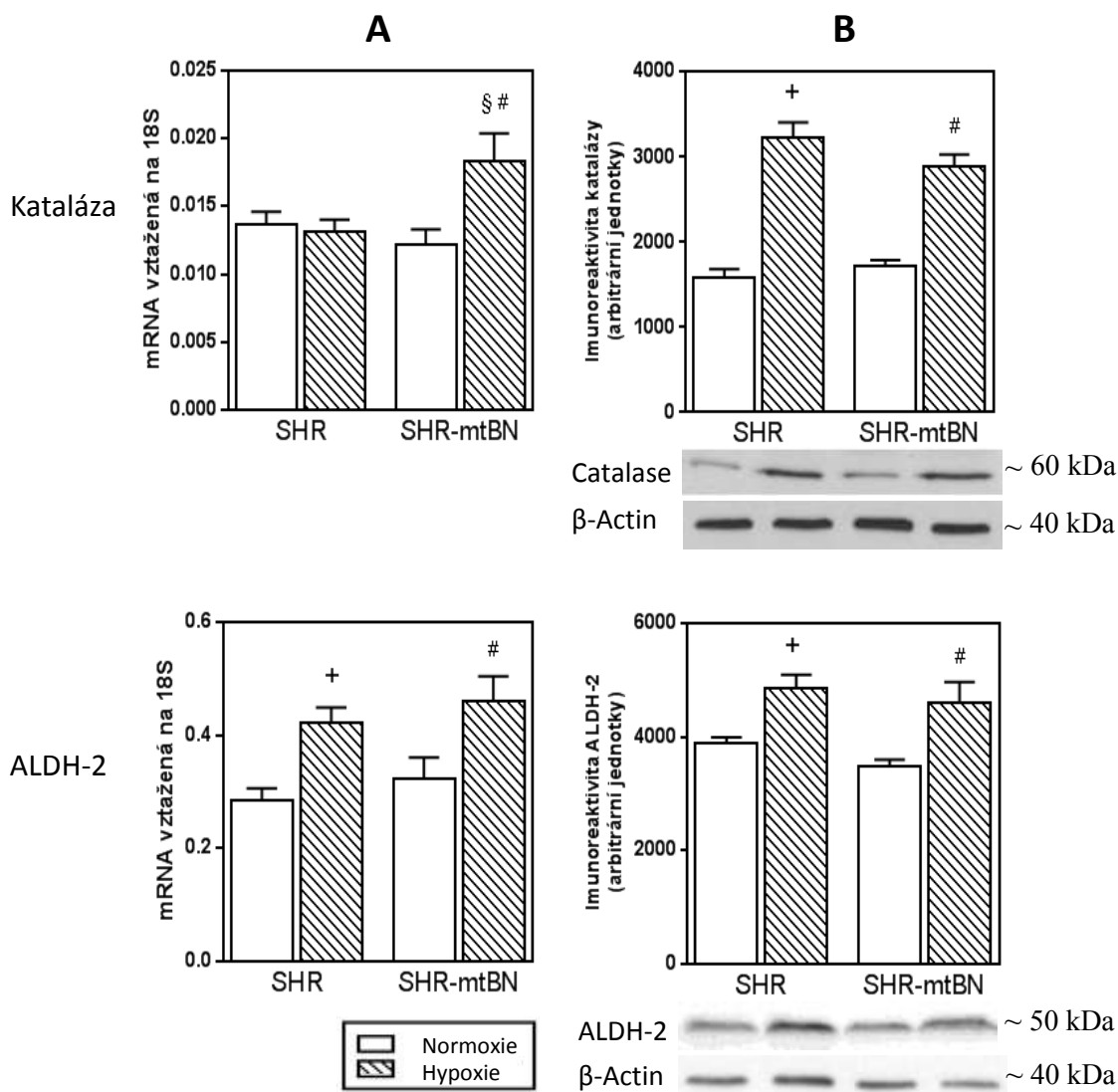
Obrázek č 13: Stanovení aktivity monoaminoxidázy A.

Enzymová aktivita MAO-A v LV u SHR a SHR-mtBN potkanů chovaných v normoxických (prázdné sloupce) a hypoxických (šrafované sloupce) podmínkách byla stanovena spektrofotometricky za použití kynuraminu jako substrátu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) nejméně ze tří nezávislých pokusů.; * $p < 0,05$ SHR vs. SHR-mtBN, + $p < 0,05$ SHR vs. SHR/H; # $p < 0,05$ SHR-mtBN vs. SHR-mtBN/H; § $p < 0,05$ SHR/H vs. SHR-mtBN/H

6.2.5 Antioxidační obranný systém

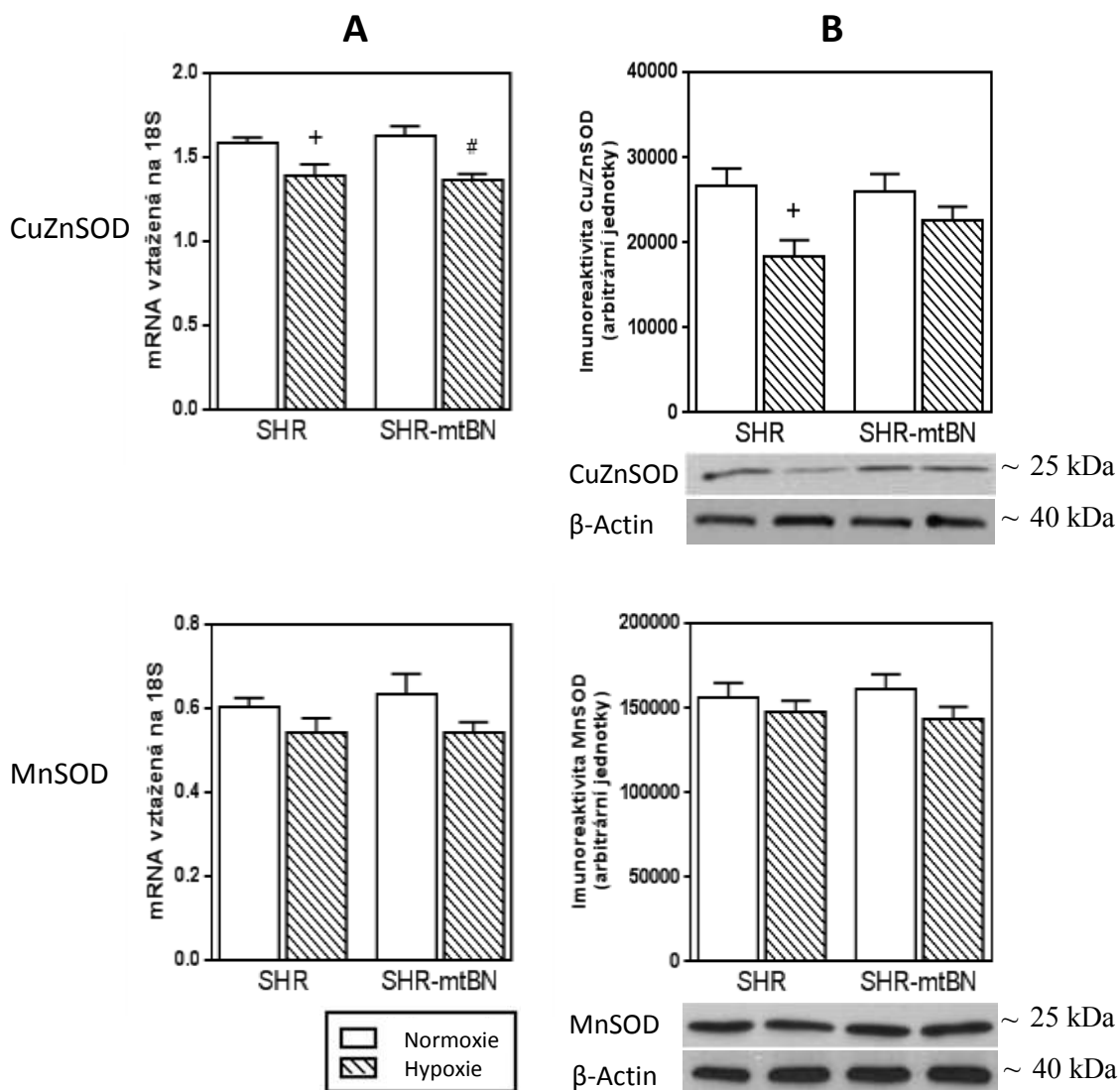
V další sérii pokusů jsme zjišťovali, zda má adaptace na CNH vliv na expresi vybraných antioxidačních enzymů v LV u obou kmenů. Naše výsledky ukázaly, že CNH neměla vliv na hladinu mRNA katalázy (CAT) u SHR/H kmene, ale výrazně zvýšila (o 51%) množství tohoto transkriptu u SHR-mtBN/H (obrázek č. 14; panel A). Expres CAT na úrovni proteinu byla zvýšená o 105% u SHR/H a o 68% u SHR-mtBN/H (obrázek č. 14; panel B). Adaptace na hypoxii zvýšila mRNA hladinu aldehyddehydrogenázy-2 (ALDH-2) u obou kmenů o přibližně 40 - 50% (obrázek č. 14, panel A). Expres ALDH-2 na úrovni proteinu byla zvýšená o 25% u SHR/H a o 32% u SHR-mtBN/H ve srovnání s odpovídajícími normoxickými skupinami (obrázek č. 14; panel B).

Na rozdíl od CAT a ALDH-2, hladina mRNA a proteinu u superoxiddismutáz (SODs) byla snížena (Cu/ZnSOD) nebo zůstala nezměněná (MnSOD) po adaptaci na CNH (obrázek č. 15). Hladina mRNA cytosolické Cu/ZnSOD byla snížena o 12% u SHR/H a o 16% u SHR-mtBN/H, ale změna na úrovni proteinu se ukázala pouze u SHR/H kmene (pokles o 31%).



Obrázek č. 14: Vliv CNH na hladinu katalázy a aldehyddehydrogenázy-2.

Hladiny mRNA a proteinů katalázy a ALDH-2 v LV u SHR a SHR-mtBN potkanů chovaných v normoxických (prázdné sloupce) a hypoxických (šrafované sloupce) podmínkách byly stanoveny prostřednictvím RT-PCR a Western blotu. Množství mRNA bylo normalizováno na hladinu referenčního genu ribosomální podjednotky 18S (panel A). Hladiny 18S nebyly ovlivněny adaptací na CNH. Reprezentativní obrázky Western blotů jsou zobrazeny pod příslušnými grafy zobrazujícími relativní hladiny proteinů (panel B). Relativní množství obou zmíněných proteinů bylo vyhodnoceno programem ImageQuant a normalizováno na referenční protein β-actin. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (± SEM) nejméně ze tří nezávislých pokusů.; ⁺ $p < 0,05$ SHR vs. SHR/H; [#] $p < 0,05$ SHR-mtBN vs. SHR-mtBN/H; [§] $p < 0,05$ SHR/H vs. SHR-mtBN/H



Obrázek č 15: Vliv CNH na hladinu cytosolické (Cu/ZnSOD) a mitochondriální (MnSOD) superoxididismutázy. Hladiny mRNA a proteinů Cu/ZnSOD a MnSOD v LV u SHR a SHR-mtBN potkanů chovaných v normoxických (prázdné sloupce) a hypoxických (šrafované sloupce) podmínkách byly stanoveny prostřednictvím RT-PCR a Western blotu. Množství mRNA bylo normalizováno na hladinu referenčního genu ribosomální podjednotky 18S (panel A). Hladiny 18S nebyly ovlivněny adaptací na CNH. Reprezentativní obrázky Western blotů jsou zobrazeny pod příslušnými grafy zobrazujícími relativní hladiny proteinů (panel B). Relativní množství obou zmíněných proteinů bylo vyhodnoceno programem ImageQuant a normalizováno na referenční protein β -actin. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) nejméně z pěti nezávislých pokusů.; + $p < 0,05$ SHR vs. SHR/H; # $p < 0,05$ SHR-mtBN vs. SHR-mtBN/H

6.3 Cíl 3: Sledování vlivu chronické intermitentní hypobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkana

6.3.1 Hmotnostní parametry

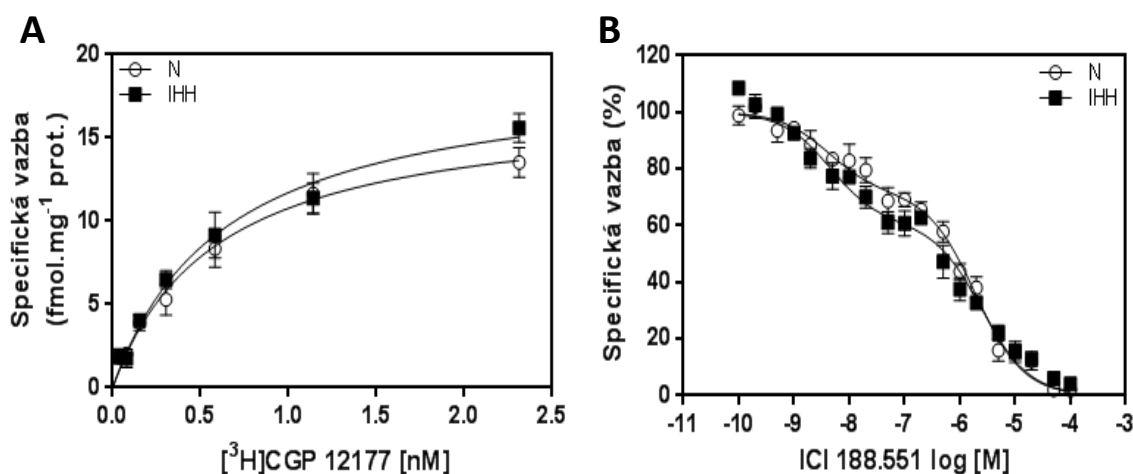
Podobně jako v předchozích dvou experimentech vedla adaptace potkanů kmene Wistar na chronickou hypoxii k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti (o 10 %) v porovnání s normoxickou skupinou (tabulka č. 8). Hmotnost srdce u hypoxických zvířat byla v důsledku hypertrofie obou komor zvýšená. Relativní hmotnost RV (RV/BW) u adaptovaných potkanů byla zvýšená o 61% a LV (LV/BW) o 22% ve srovnání s normoxickou skupinou.

	Skupina	
	N	IHH
Hmotnost těla (g)	388 ± 4	351 ± 9 *
Hmotnost srdce (mg)	919 ± 20	1048 ± 43 *
HW/BW ($\times 10^{-3}$)	2,37 ± 0,06	2,99 ± 0,12 *
LV/BW ($\times 10^{-3}$)	1,29 ± 0,03	1,58 ± 0,08 *
RV/BW ($\times 10^{-3}$)	0,49 ± 0,01	0,79 ± 0,03 *
S/BW ($\times 10^{-3}$)	3,55 ± 0,02	3,74 ± 0,03

Tabulka č. 8: Hmotnostní parametry normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na IHH. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± SEM; HW – hmotnost srdce; RV – pravá komora; LV – levá komora; S – septum; BW – hmotnost těla; HW/BW – relativní hmotnost srdce; LV/BW – relativní hmotnost levé komory; RV/BW – relativní hmotnost pravé komory; S/BW – relativní hmotnost septa; N – normoxie; IHH – intermitentní hypobarická hypoxie; * statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($p < 0,05$).

6.3.2 Vliv IHH na β -adrenergní receptory

β -ARs v myokardiálních hrubých membránách LV byly charakterizovány saturačními a kompetičními vazebnými studiemi (obrázek č. 16). Ukázalo se, že adaptace potkanů na IHH neměla vliv na celkový počet β -ARs (B_{MAX}) a ani na disociační konstantu (K_D) těchto receptorů (tabulka č. 9). Na druhou stranu IHH výrazně změnila poměr β -ARs podtypů. Podíl β_2 -ARs vzrostl z 29% na 39%, což odpovídá nárůstu β_2 -ARs o 35% a poklesu β_1 -ARs o 14 % u hypoxické skupiny (tabulka č. 10)



Obrázek č. 16: Vliv IHH na β -adrenergní receptory.

Charakterizace β -ARs v hrubých membránách LV izolovaných z potkanů chovaných v normoxických (prázdná kolečka) a hypoxických (plné čtverce) podmínkách. Zobrazeny jsou [³H]CGP 12177 saturační křivky (A) a kompetiční křivky (B), které byly získány za použití β_2 -ARs antagonisty ICI 188,551. Jednotlivé body představují aritmetický průměr (\pm SEM) ze čtyř nezávislých pokusů provedených v triplikátech; N – normoxie; IHH - intermitentní hypobarická hypoxie

	Skupina	
	N	IHH
B _{MAX} (fmol/mg)	17,23 ± 0,81	19,47 ± 0,70
K _D (nM)	0,62 ± 0,07	0,68 ± 0,09

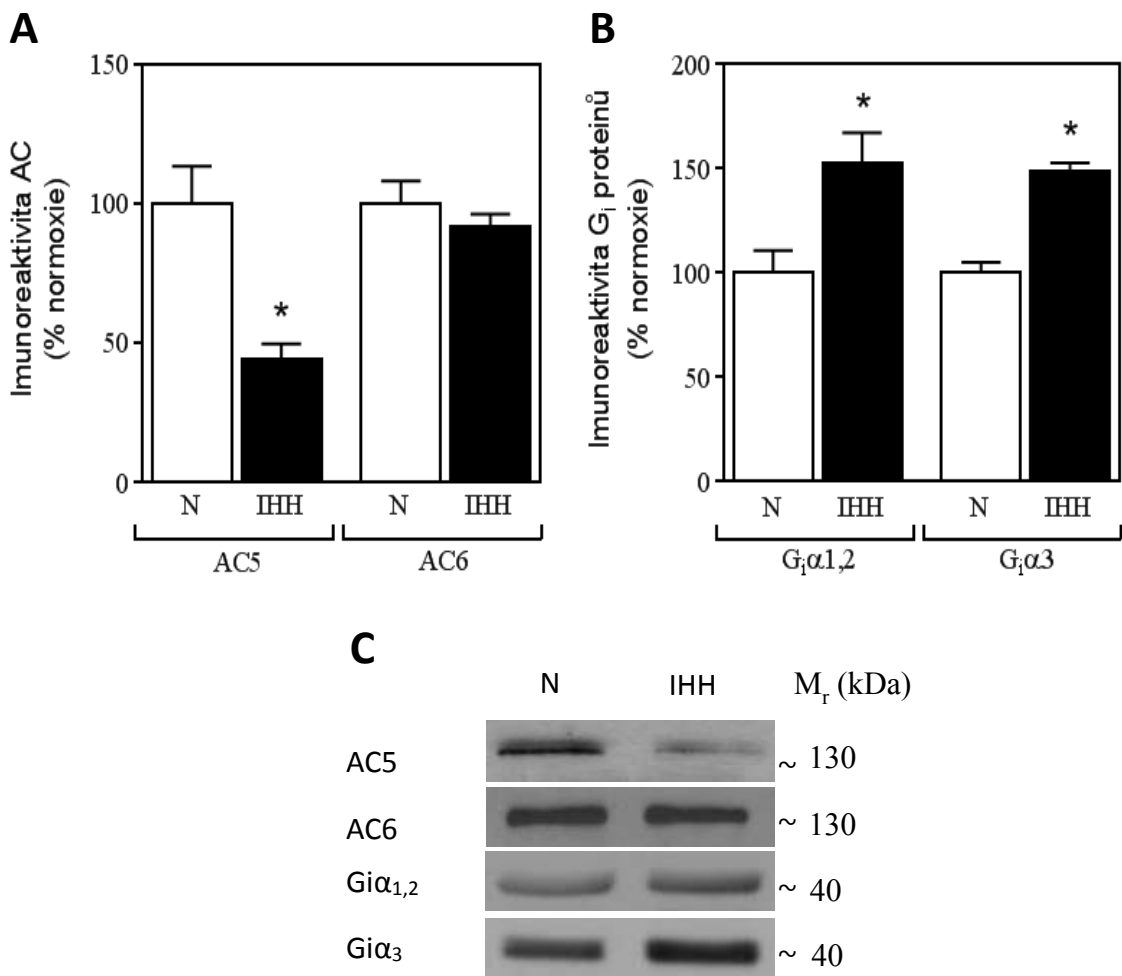
Tabulka č. 9: Hodnoty B_{MAX} a K_D β-ARs v LV u normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na IHH. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (± SEM) ze čtyř nezávislých pokusů provedených v triplikátech; B_{MAX} – celkový počet β-adrenergních receptorů; K_D – rovnovážná disociační konstanta; N – normoxie; IHH - intermitentní hypobarická hypoxie

	Skupina	
	N	IHH
β ₂ (%)	28,86 ± 2,55	39,02 ± 1,42 *
K _i β ₂ (nM)	2,16 ± 0,67	2,03 ± 0,51
K _i β ₁ (μM)	0,75 ± 0,14	1,03 ± 0,16

Tabulka č. 10: Distribuce jednotlivých podtypů β-ARs a hodnoty K_i v LV u normoxických potkanů a potkanů adaptovaných na IHH. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (± SEM) ze čtyř nezávislých pokusů provedených v triplikátech; β₂ (%) – procento β₂-ARs ze všech myokardiálních β-ARs; K_i - inhibiční konstanta vyjadřující afinitu ICI 118,551 k β-adrenergním receptorům; N – normoxie; IHH - intermitentní hypobarická hypoxie; * statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($p < 0,05$).

6.3.3 Vliv IHH na expresi inhibičních G-proteinů a adenylátcyklázy

Western blot analýzy inhibičních G-proteinů (G_i) a dominantních myokardiálních isoform AC5 a AC6 odhalily signifikantní účinek IHH na expresi těchto hlavních složek β -adrenergní signalizace (obrázek č. 17). Zatímco adaptace potkanů na IHH výrazně snížila expresi AC5 a to o 56 % ve srovnání s normoxickou skupinou, na expresi AC6 neměla vliv. Naopak hladiny $G_{i\alpha_{1,2}}$ a $G_{i\alpha_3}$ proteinů vlivem IHH vzrostly o 53% respektive 49%.



Obrázek č. 17: Vliv IHH na expresi adenylátcyklázy a inhibičních G-proteinů.

Stanovení exprese AC5, AC6, $G_{i\alpha_{1,2}}$ a $G_{i\alpha_3}$ v hrubých membránách LV u normoxických potkanů (prázdné sloupce) a potkanů adaptovaných na IHH (plné sloupce). Relativní množství jednotlivých proteinů je vyjádřeno jako procento z normoxických hodnot (100%) (A, B). Reprezentativní obrázky Western blotů jsou zobrazeny v panelu C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr (\pm SEM) nejméně ze čtyř nezávislých pokusů.; N – normoxie; IHH - intermitentní hypobarická hypoxie; M_r - relativní molekulová hmotnost, * statisticky významný rozdíl IHH vs. normoxie ($p < 0,05$).

7 Diskuze

7.1 Cíl 1: Sledování vlivu protektivní kontinuální a neprotektivní intermitentní normobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v RV a LV myokardu potkana

V minulosti již mnoho vědců testovalo různé režimy chronické hypoxie pro jejich kardioprotektivní účinky. Ukázalo se, že jak kontinuální, tak intermitentní hypoxie může vést ke zlepšení srdeční ischemické tolerance v závislosti na zvolených experimentálních podmínkách (Neckář *et al.*, 2002b; Guo *et al.*, 2009; Maslov *et al.*, 2013). O tom, zda adaptace na hypoxii bude mít protektivní účinek na myokard či ne, rozhoduje stupeň a délka trvání hypoxie, ale také počet a délka denních normoxických expozií. V roce 2013 Neckář a spol. prokázali, že krátká 1-hodinová epizoda reoxygenace během dne zrušila kardioprotektivní účinek vyvolaný adaptací na chronickou normobarickou hypoxii (Neckář *et al.*, 2013).

Jelikož neexistovaly žádné informace o možných odlišnostech mezi účinkem protektivního a neprotektivního modelu hypoxie na β -adrenergní signalizaci, hlavním cílem této studie proto bylo zkoumání případných rozdílů mezi vlivem protektivní kontinuální (CNH) a neprotektivní intermitentní (INH) normobarické hypoxie na myokardiální β -adrenergní signální systém, u kterého se předpokládá potencionální účast v průběhu navození kardioprotekce. Zajímala nás distribuce β -adrenergních receptorů (β -ARs), G-proteinů a adenylátcyklázy (AC), stejně jako funkční stav tohoto klíčového signálního systému. Dále jsme porovnávali rozdíly u této signální dráhy mezi pravou (RV) a levou komorou (LV) myokardu.

První výsledky této studie ukázaly, že třítýdenní adaptace dospělých samců potkana kmene Wistar na různé režimy chronické normobarické hypoxie vedla k signifikantnímu zpomalení tělesného růstu v porovnání s normoxickou skupinou. Pokles tělesné hmotnosti u obou zvolených modelů hypoxie byl přibližně stejný (CNH o 15%; INH o 14%). Hmotnost srdce u hypoxických modelů na rozdíl od tělesné hmotnosti vzrostla a to v důsledku výrazné hypertrofie RV, což mělo za následek zdvojnásobení relativní hmotnosti RV oproti kontrolní skupině. Námi zaznamenané změny v hmotnostních parametrech se shodují s výsledky předchozích studií na podobných modelech (Tual *et al.*, 2006; Laursen *et al.*, 2008; Baandrup *et al.*, 2011; Neckář *et al.*, 2013).

Podstatou této práce bylo charakterizovat β -adrenergní signalizaci v srdečních komorách zvířat adaptovaných na zvolené modely hypoxie. Ke stanovení distribuce samotných β -ARs v hrubých membránách izolovaných z RV a LV normoxických a hypoxických potkanů bylo využito saturačních a kompetičních vazebných studií. Saturační studie nám ukázali, že v případě LV neměla hypoxie vliv na celkové množství β -ARs u ani jedné skupiny adaptovaných zvířat, což odpovídá některým předchozím studiím (Winter *et al.*, 1986; Germack *et al.*, 2002; Hrbasová *et al.*, 2003). Na druhou stranu ale existují studie, které naopak prokázaly pokles β -ARs v LV (Voelkel *et al.*, 1981; Kacimi *et al.*, 1992; León-Velarde *et al.*, 2001; Favret *et al.*, 2001). Tento odlišný výsledek může být daný rozdílnými experimentálními podmínkami. V případě studií, u kterých byl pozorovaný snížený počet β -ARs v LV, byl oproti našim normobarickým modelům použitý model hypobarické hypoxie. Také poměr jednotlivých podtypů β -ARs se po adaptaci na CNH a INH v této komoře významně nezměnil. Jediná signifikantní změna v LV byla zaznamenána v afinitě ICI 118,551 k β_1 -ARs, kde u obou modelů hypoxie došlo oproti kontrole k poklesu, avšak tento rozdíl v afinitě není obecně nijak významný.

Na rozdíl od LV byl u RV v naší studii zaznamenán signifikantní pokles celkového počtu β -ARs u obou hypoxických skupin potkanů. Z výsledků kompetičních studií, které u CNH i IHN odhalily změnu poměru jednotlivých podtypů β -ARs ve prospěch β_2 -ARs, se zdá, že tento pokles lze přičíst úbytku β_1 -ARs. Je známo, že změny v celkovém počtu myokardiálních β -ARs úzce souvisí se změnami hladiny katecholaminů. Jejich zvýšená hladina mívá za následek redukcii β_1 -ARs, zatímco hladina β_2 -ARs zůstává beze změny (Ungerer *et al.*, 1993; Mardon *et al.*, 1998; Lohse *et al.*, 2003). Selektivní pokles β_1 -ARs je obvykle pozorován během srdeční hypertrofie. Převážná většina studií zaměřujících se na spojení srdeční hypertrofie se změnami v distribuci jednotlivých podtypů β -ARs byla ale provedena na LV (Galinier *et al.*, 1992; Communal *et al.*, 1998; Sethi *et al.*, 2007). V případě hypertrofie RV byl sice taktéž zaznamenán signifikantní pokles v celkovém množství β -ARs, ale změny na úrovni jednotlivých podtypů β -ARs nebyly v těchto studiích zjišťovány (Voelkel *et al.*, 1981; Ishikawa *et al.*, 1991; Yoshie *et al.*, 1994; Favret *et al.*, 2001). Existuje studie, která po adaptaci na hypobarickou hypoxii sledovala jak změny v celkovém množství β -ARs, tak v zastoupení jednotlivých podtypů, ale pravděpodobně z důvodu krátkodobé expozice v tomto případě nedošlo k hypertrofii RV. Tato studie u hypoxické skupiny prokázala pokles celkového počtu β -ARs v obou komorách, který byl způsoben selektivním

poklesem β_1 -ARs (Mardon *et al.*, 1998). Naše výsledky tedy ukázaly, že expozice potkanů na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii vyvolává v hypertrofované RV podobné změny v distribuci β -ARs podtypů, jako byly pozorovány u různých typů hypertrofie LV a ve studii Mardon a spol.

Pozorovaný pokles hladiny β_1 -ARs na úrovni proteinů v RV u CNH a INH byl dále podpořen výsledky z Real-time PCR analýzy, která u obou hypoxických skupin odhalila signifikantní pokles β_1 -ARs rovněž na úrovni mRNA ve srovnání s normoxickou skupinou. Podobný výsledek byl také prokázán ve studii Piao a spol., kde byl ale oproti naší studii zjištěn pokles hladiny mRNA β_1 -ARs nejen v hypertrofované RV, ale také v LV (Piao *et al.*, 2012). Naše výsledky dále ukázaly znatelný pokles mRNA β_2 -ARs v LV u potkanů adaptovaných na CNH, ale tento výsledek nebyl následován změnou exprese tohoto podtypu receptoru na úrovni proteinů.

Naše další experimenty v této studii byly zaměřeny na zkoumání vlivu zvolených modelů normobarické hypoxie na distribuci Gs proteinů a dominantních myokardiálních izoforem AC 5 a 6 v hrubých membránách izolovaných z RV a LV. Adaptace na oba modely chronické hypoxie měla vliv pouze na distribuci Gs α proteinů v RV, ve které byl zaznamenán významný úbytek exprese těchto proteinů. Pozorovaný pokles Gs α proteinů v RV po adaptaci zvířat na oba modely normobarické hypoxie odpovídá výsledkům studie Guan a spol., ve které byla odhalena nižší exprese tohoto proteinu v RV po expozici potkanů na intermitentní hypobarickou hypoxii (Guan *et al.*, 2010). Hladina AC 5/6 se u hypoxických potkanů ve srovnání s normoxickou skupinou nijak významně nelišila ani v jedné komoře.

Kromě exprese AC na úrovni proteinu jsme dále zkoumali aktivitu tohoto enzymu. Zajímala nás jak bazální aktivita AC, tak její enzymová aktivita modulována různými stimulatory. Naše studie odhalila zajímavé výsledky, které ukázaly, že působení jednotlivých stimulatorů mělo opačný účinek na aktivitu AC v hrubých membránách izolovaných ze vzorků RV a LV. Ačkoliv adaptace na CNH i INH mezi jednotlivými vzorky nezpůsobila žádné znatelné změny v bazální aktivitě AC, oba tyto hypoxické modely snížily enzymovou aktivitu stimulovanou Gs proteiny prostřednictvím GTP γ S v RV a naopak zvýšily tuto aktivitu v LV. Snížení aktivity AC v RV může být alespoň částečně vysvětleno pozorovaným poklesem hladiny Gs proteinů po adaptaci na oba modely chronické hypoxie, což zároveň dobře odpovídá dříve pozorovaným změnám enzymové aktivity AC u vzorků hypertrofovaných srdcí (Böhm *et al.*, 1997; Tse *et al.*, 2000; Novotny *et al.*, 2003). Některé předchozí studie

zkoumající účinek chronické hypoxie na signalizaci AC zaznamenaly podobné změny, tedy pokles aktivity tohoto systému, nejen v RV, ale také v LV. V případě těchto studií byl použit model hypobarické hypoxie a potlačení aktivity AC bylo pozorováno také po aplikaci jiných stimulatorů než jen GTP γ S (Mardon *et al.*, 1998; León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). Ve studii Hrbasova a spol. byla odhalena hypertrofie obou komor a rovněž ve studii León-Velarde a spol. došlo kromě hypertrofie RV k nárůstu hmotnosti LV ve srovnání s kontrolní skupinou (León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). K hypertrofii LV obvykle dochází u modelu těžké či dlouhotrvající intermitentní hypoxie. V našich experimentech, kdy byl použit model mírné normobarické hypoxie, nebyly mezi zkoumanými skupinami ani v porovnání s normoxickou skupinou zjištěny žádné rozdíly v hmotnosti LV. Za těchto podmínek je celkem pravděpodobné, že se regulační dráhy mezi oběma komorami mohou lišit. Z tohoto důvodů může být opačný účinek jednotlivých stimulatorů na aktivitu AC v RV a LV potkanů adaptovaných na CNH a INH přičítán hypertrofii RV, která vede k narušení tohoto signálního systému. Na druhou stranu, pozorované zvýšení enzymové aktivity AC v LV po stimulaci prostřednictvím GTP γ S a rovněž pomocí forskolinu a NaF u obou hypoxických modelů naznačuje efektivnější spojení mezi Gs proteiny a AC. Zdá se, že toto spojení by se mohlo nějakým způsobem podílet na vývoji kardioprotektivního fenotypu. Je zajímavé, že schopnost isoprenalinu, jakožto agonisty β -ARs, ke stimulaci AC byla v obou komorách jen mírně snížena. V RV může být tento pokles pravděpodobně vysvětlen snížením celkového počtu β -ARs. Zeslabená β -adrenergní signalizace se často objevuje u srdeční hypertrofie, stejně jako za jiných stresových podmínek (Böhm *et al.*, 1997; Vatner *et al.*, 1999; Nishizawa *et al.*, 2004; Mysliveček *et al.*, 2008).

7.2 Cíl 2: Sledování vlivu CNH na β -adrenergní signalizaci, monoaminoxidázu A a vybrané komponenty antioxidačního systému v LV myokardu SHR a SHR-mtBN potkanů

V této studii jsme se zaměřili na zkoumání vlivu substituce mitochondriálního genomu na β -adrenergní signalizaci a antioxidační systém u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) za normoxických a hypoxických podmínek. SHR kmen je jedním z nejčastěji používaných zvířecích modelů v kardiovaskulárním výzkumu. Tento kmen má v dospělosti predispozici k rozvoji hypertenze a srdeční hypertrofie (Hajri *et al.*,

2001). Srdce SHR potkanů vykazuje vyšší citlivost k ischemicko/reperfučnímu (I/R) poškození a náchylnost ke komorovým arytmiím ve srovnání s normotenzními potkany (Itter *et al.*, 2004; Ravingerová *et al.*, 2011; Penna *et al.*, 2014).

Pro naše experimenty byl zvolen konplastický kmen SHR-mtBN, který je charakterizovaný selektivní výměnou mitochondriálního genomu SHR kmene za mitochondriální genom kmene Brown Norway (BN), který je více rezistentní k ischemii. Pokusy byly prováděny souběžně na obou kmenech, SHR i SHR-mtBN, a jako model hypoxie byla zvolená kontinuální normobarická hypoxie (CNH). Studie Neckář a spol. v roce 2017 prokázala, že konplastický kmen SHR-mtBN vykazuje stejnou velikost infarktu myokardu způsobenou I/R poškozením jako původní SHR kmen. Ačkoliv se ukázalo, že adaptace na chronickou hypoxii zlepšila ischemickou toleranci myokardu u obou testovaných kmenů, její účinnost na snížení velikosti infarktu byla větší u konplastického SHR-mtBN kmene než u SHR, což korelovalo se sníženou citlivostí mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mPTP) k jeho otevření prostřednictvím Ca^{2+} (Neckář *et al.*, 2017).

Rostoucí množství důkazů naznačuje, že mitochondriální DNA (mtDNA) je nezbytná pro buněčný fenotyp a tudíž může pomáhat buňkám se adaptovat na stres a další podmínky prostředí (Kelly *et al.*, 2013). Je známo, že mtDNA moduluje buněčnou bioenergetiku a generování reaktivních forem kyslíku. Změny v mtDNA mohou mít tedy za následek větší náchylnost k onemocnění (Wallace, 2005). Pro zjištění potenciale role mitochondriálního genomu v modulaci srdeční funkce a rezistenci k I/R poškození jsme se v našem případě zaměřili na zkoumání β -adrenergní signální dráhy a vybraných komponent antioxidačního obranného systému ve vzorcích levých komor (LV) izolovaných z SHR a SHR-mtBN potkanů. Sledovali jsme hladiny vybraných signálních molekul, antioxidačních enzymů a expresi a aktivitu monoaminoxidázy A (MAO-A) ve vzorcích získaných jak z normoxických, tak hypoxických zvířat.

Výsledky porovnávací hmotnostní parametry mezi jednotlivými skupinami ukázaly, že se oba testované kmene potkanů za normoxických podmínek kromě relativní hmotnosti LV nelišily v žádném jiném parametru. Naproti tomu adaptace na CNH vedla u obou kmenů k poklesu tělesné hmotnosti a k nárůstu většiny ostatních hmotnostních parametrů ve srovnání s příslušnými normoxickými skupinami. Změny vyvolané CNH odpovídají výsledkům získaným v naší předchozí studii, kdy byl použit stejný model hypoxie (Hahnova *et al.*, 2016).

V první části studie jsme se zaměřili na β -adrenergní signalizaci. Zajímaly nás změny v distribuci β -adrenergních receptorů (β -ARs), které jsme sledovali prostřednictvím vazebných studií a případné změny v aktivitě adenylátcyklázy (AC) a to jak na bazální úrovni, tak po modulaci různými stimulatory. Již předchozí studie prokázali, že výměna defektního genu Cd36 u SHR kmene vedla kromě snížení velikosti infarktu také ke zvýšené expresi β -ARs a zvýšené aktivitě AC (Neckář *et al.*, 2012; Klevstvig *et al.*, 2013). Tyto údaje naznačují, že transgenní exprese zjevně nepřibuzného genu může silně ovlivnit β -adrenergní signalizaci a rezistenci myokardu k I/R poškození. Naše výsledky z vazebných studií odhalily významně vyšší podíl myokardiálních β_2 -ARs ve vzorcích LV izolovaných z konplastického SHR-mtBN kmene ve srovnání s SHR a že adaptace na chronickou hypoxii měla různý vliv na distribuci β -ARs v obou kmenech. Zatímco expozice potkanů na CNH vedla u SHR kmene k nárůstu celkového počtu β -ARs pravděpodobně v důsledku zvýšené exprese β_2 -ARs, u konplastického kmene došlo naopak k poklesu celkového množství β -ARs bez změny podílu jednotlivých podtypů β -ARs.

Za normoxických podmínek bylo u SHR-mtBN potkanů odhaleno zvýšené množství β -ARs ve srovnání s SHR kmenem, což se projevilo zvýšenou schopností isoprenalinu stimulovat aktivitu AC. Na druhou stranu, aktivita AC stimulovaná isoprenalinem u vzorků izolovaných z konplastického kmene po adaptaci na CNH byla snižena, což bylo v souladu s nižší expresí β -ARs u těchto zvířat. Enzymová aktivita stimulována forskolinem a NaF, tedy stimulatory, které mohou modulovat aktivitu AC přímo nebo prostřednictvím G-proteinů, byla zvýšená u hypoxické SHR skupiny. U konplastického kmene měla adaptace na hypoxii rozdílný účinek na modulaci aktivity AC těmito stimulatory. Aktivita AC stimulovaná NaF byla u těchto zvířat zvýšená již za normoxických podmínek a po vystavení hypoxickým podmínkám došlo k jejímu poklesu. Tyto specifické rozdíly mezi kmeny mohou být pravděpodobně vysvětleny změnou schopnosti G-proteinů regulovat aktivitu AC.

Pozorovaný pokles celkového počtu β -ARs u hypoxické skupiny SHR-mtBN byl v souladu s výsledky předchozích studií poukazujících rovněž na nižší expresi myokardiálních β -ARs u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii (Mader *et al.*, 1991; Kacimi *et al.*, 1992; León-Velarde *et al.*, 2001). V těchto studiích ale nezkoumali zastoupení jednotlivých podtypů β -ARs. Výjimkou byla studie Mardon a spol., která prokázala selektivní pokles β_1 -ARs způsobený vlivem 5-denní hypoxie (Mardon *et al.*, 1998). Tato studie, společně s několika dalšími (León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et*

al., 2003), dále odhalila sníženou aktivitu AC ve vzorcích myokardu izolovaných z potkanů vystavených vlivu hypoxie. Námi pozorovaný pokles aktivity AC po stimulaci isoprenalinem a NaF u konplastického kmene potkanů adaptovaného na CNH tedy dobře odpovídá dříve publikovaným datům. Na druhou stranu zvýšená schopnost G-proteinů stimulovat enzymovou aktivitu AC u hypoxické skupiny SHR nebyla dříve pozorována a může představovat specifický rys tohoto kmene.

Ukázalo se, že jsou to zejména β_2 -ARs, které se zdají být důležitým hráčem v generování kardioprotektivních účinků preconditioningu (Mieno *et al.*, 2005; Salie *et al.*, 2011). V souladu s těmito výsledky bylo zjištěno, že β_2 -ARs aktivují kinázy přežívání a zmírňují dysfunkci mitochondrií během oxidačního stresu prostřednictvím inhibice otevírání mPTP (Fajardo *et al.*, 2011). Zvýšený podíl β_2 -ARs u konplastického kmene ve srovnání s SHR a pokles celkového množství β -ARs u tohoto kmene po adaptaci na CNH může tedy přispět k lepší ochraně SHR-mtBN potkanů před akutním I/R poškozením (Neckář *et al.*, 2017).

Po stanovení distribuce β -ARs a aktivity AC jsme zaměřili náš zájem na další enzym a to monoaminoxidázu (MAO). Je dobře známo, že chronická hypoxie je spojená se zvýšenou aktivitou sympatického nervového systému, což má za následek zvýšenou produkci a uvolňování katecholaminů do těla (Johnson *et al.*, 1983). Katecholaminy jsou sloučeniny, které patří do skupiny monoaminů a mohou být tedy podrobeny oxidační deaminaci katalyzované MAO (Schömig *et al.*, 1987). V poslední době se objevily důkazy, které ukázaly, že tyto enzymy představují důležitý mitochondriální zdroj oxidačního stresu v kardiovaskulárním systému a jejich inhibice může mít terapeutické využití během léčby srdečních onemocnění a to ischemického i neischemického původu (Kaludercic *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že přítomnost inhibitorů MAO během ischemického preconditioningu (IPC) vedla k zesílení postischemické funkční regenerace myokardu potkanů indukované prostřednictvím IPC, ale neměla vliv na snížení velikosti infarktu (Dānilā *et al.*, 2015).

I přestože MAO patří mezi hlavní producenty reaktivních forem kyslíku (ROS) v srdečních buňkách (Anderson *et al.*, 2014), dosud chyběly podrobnější informace o chování tohoto mitochondriálního enzymu v myokardu zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii. Proto jsme se v této části studie zaměřili na zkoumání funkčního stavu a expresi MAO-A, což je převládající izoforma MAO v myokardu. Naše výsledky ukázaly, že jak exprese, tak aktivita tohoto mitochondriálního enzymu byla nižší ve vzorcích LV izolovaných z SHR-mtBN zvířat než SHR a že adaptace potkanů na CNH

vedla k nárůstu exprese i aktivity MAO-A u obou kmenů. Nicméně aktivita MAO-A zůstala u konplastického kmene i za hypoxických podmínek stále signifikantně nižší ve srovnání s SHR, což lze považovat za specifický rys tohoto kmene. Pozorovaný nárůst obou sledovaných parametrů MAO-A po adaptaci zvířat na hypoxii může poukazovat na důležitou roli tohoto enzymu v adaptačních reakcích na chronickou hypoxii. Naše výsledky, které ukázaly poměrně velké zvýšení aktivity MAO-A po expozici potkanů na CNH, jsou v rozporu s dřívějšími výsledky ze studie Maher a spol. (Maher *et al.*, 1978). V této studii autoři neprokázali žádnou významnou změnu aktivity MAO v kožím myokardu po adaptaci na hypobarickou hypoxii. Tento rozpor může být vysvětlen použitím rozdílných modelů a experimentálních podmínek. Existují určité náznaky, které poukazují na to, že případné změny v aktivitě MAO mohou záviset na délce trvání hypoxické expozice. Zatímco 5-denní adaptace na hypoxii vedla k poklesu aktivity MAO v játrech potkanů, 21-denní expozice zvýšila aktivitu tohoto enzymu (Shatemirova *et al.*, 1990).

Je dobře známo, že chronická hypoxie a stimulace β -ARs může mít za následek zvýšení produkce mitochondriálních ROS v kardiomyocytech (Földes-Papp *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). Adaptivní změny indukované různými režimy hypoxie nejsou omezeny pouze na β -ARs nebo jiné membránové receptory a jejich signální dráhy, ale jsou také úzce spojeny se změnami v produkci ROS a jejich detoxikaci. ROS představují jeden z dobře známých mediátorů příznivých účinků ischemického a hypoxického preconditioningu (Zuo *et al.*, 2013). Zatímco přiměřený nárůst hladiny ROS je důležitý pro dosažení protektivního účinku hypoxické expozice (Kolár *et al.*, 2007; Kasparova *et al.*, 2015), vysoká hladina ROS může naopak způsobit nadměrný oxidační stres v kardiomyocytech. V této souvislosti přitahují velkou pozornost mitochondrie, které představují hlavní místo produkce ROS, ale zároveň i cíl škodlivých účinků jejich nadměrné produkce (Cadenas *et al.*, 2010). Škodlivé účinky ROS generovaných z různých zdrojů, včetně mitochondrií a MAO, jsou pravidelně potlačovány řadou endogenních antioxidačních obranných mechanismů.

V další části této práce jsme se tedy zaměřili na studium exprese jednotlivých komponent antioxidačního obranného systému. Antioxidační obranný systém se skládá z různých typů enzymů s rozdílnými funkcemi (Yan *et al.*, 2010). Soustředili jsme se především na vybrané enzymy degradující ROS (superoxiddismutázy (SOD) a katalázu (CAT)) a enzym podílející se na udržování buněčné redoxní homeostázy (aldehyddehydrogenázu-2 (ALDH-2)). Porovnání hladin exprese těchto enzymů na

úrovni mRNA a proteinů ve vzorcích LV izolovaných z SHR a SHR-mtBN zvířat neodhalilo za normoxických podmínek žádné významné rozdíly mezi těmito kmeny. Adaptace na chronickou hypoxii vyvolala velmi podobné změny v expresi většiny zmíněných enzymů jak u SHR, tak u konplastického kmene. Expozice potkanů na CNH výrazně zvýšila hladiny proteinů CAT a ALDH-2, ale neměla vliv na expresi MnSOD ve vzorcích obou kmenů. Na druhou stranu měla CNH za následek výrazný pokles hladiny proteinu Cu/ZnSOD u SHR kmene, bez významného rozdílu u SHR-mtBN skupiny.

Je zajímavé, že většina odhalených změn v expresi antioxidantních enzymů spojených s CNH u SHR a SHR-mtBN kmene se výrazně liší od těch, které jsou uvedeny v předchozích studiích. Na rozdíl od našich současných výsledků Kasparova a spol. v roce 2015 zjistily, že po adaptaci potkanů kmene Wistar na stejný model chronické hypoxie došlo k nárůstu exprese Cu/ZnSOD a MnSOD a k poklesu hladiny CAT (Kasparova *et al.*, 2015). Významný nárůst hladiny myokardiální Cu/ZnSOD a MnSOD byl také pozorován u Wistar potkanů adaptovaných na odlišné hypoxické podmínky (Nakanishi *et al.*, 1995; Neckář *et al.*, 2013; Bu *et al.*, 2015). Z tohoto důvodu se zdá, že zjištěné nesourodé změny v expresi antioxidantních enzymů po adaptaci potkanů na chronickou hypoxii jsou specifické pro konkrétní kmeny. Pozorovaná downregulace Cu/ZnSOD u hypoxické skupiny SHR zvířat může částečně vysvětlit nižší kardioprotektivní účinek CNH proti I/R poškození u tohoto kmene ve srovnání s konplastickým SHR-mtBN kmenem (Neckář *et al.*, 2017). Vliv hypoxie na expresi ALDH-2 nebyl dosud zkoumán a námi odhalené zvýšení hladiny tohoto enzymu u obou kmenů potkanů po adaptaci na CNH podporuje názor, že ALDH-2 je velmi důležitý enzym účastnící se snižování ischemického poškození myokardu (Chen *et al.*, 2008) a může následovat aktivaci MAO-A.

7.3 Cíl 3: Sledování vlivu chronické intermitentní hypobarické hypoxie na β -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkana

Poslední publikace použitá k sepsání této disertační práce se zabývala možnou úlohou β -adrenergní signalizace v regulaci syntézy prostaglandinu E_2 (PGE_2) závislé na cytosolické fosfolipáze $A_2\alpha$ ($cPLA_2\alpha$) u potkanů adaptovaných na intermitentní hypobarickou hypoxie (IHH). Výsledky uvedené v této práci se týkají části studie zkoumající β -adrenergní signalizaci. Zaměřili jsme se především na stanovení distribuce β -ARs a exprese vybraných komponent dané signální dráhy v LV po expozici potkanů kmene Wistar na IHH.

Adaptace na IHH může mít stejně jako adaptace na CNH dlouhodobé kardioprotektivní účinky proti akutnímu I/R poškození, což se může projevit zmenšením velikosti infarktu, sníženým počtem komorových arytmií vyvolaných I/R a zlepšením obnovy srdeční kontraktility (Asemu *et al.*, 1999; Neckár *et al.*, 2002b). Bylo zjištěno, že v kardioprotektivních mechanismech IHH je zapojená celá řada signálních molekul, včetně reaktivních forem kyslíku (ROS), proteinkinázy C (PKC), fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K) a Akt kinázy (Kolár *et al.*, 2007; Ravingerová *et al.*, 2007; Hlaváčková *et al.*, 2010), nicméně přesný molekulární mechanismus tohoto jevu není ještě stále objasněn.

Je známo, že β -ARs a signální dráhy jimi spuštěné hrají klíčovou roli v regulaci srdeční funkce (Florea and Blatter, 2012). Za stresových podmínek, které vedou k dlouhodobé stimulaci β -ARs, dochází ke spuštění odlišných signálních drah u jednotlivých podtypů. Na rozdíl od β_1 -ARs, β_2 -ARs mohou za těchto podmínek přepnout signalizaci z Gs proteinů na Gi proteiny, což následně vede k postupné aktivaci dráhy přežívání zahrnující $G\beta\gamma$ podjednotku, PI3K a Akt kinázy, které hrají zásadní roli v protekci kardiomyocytů před apoptózou (Chesley *et al.*, 2000). PI3K může rovněž aktivovat mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) ERK 1/2 (extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza 1/2) a p38 a tyto MAPK mohou dále stimulovat $cPLA_2\alpha$ (Lin *et al.*, 1993; Kramer *et al.*, 1996; Hammarberg *et al.*, 2004). Bylo odhaleno, že za stresových podmínek dochází také ke zvýšení aktivity $cPLA_2\alpha$ a to v důsledku snížené hladiny β_1 -ARs, odpojení β_2 -ARs od Gs-AC-PKA signální dráhy a současného zvýšení spřažení β_2 -ARs s Gi- $cPLA_2\alpha$ -COX-2 (cyklooxygenáza 2) dráhou (Pavoine *et al.*, 2003; Kozlovski *et al.*, 2015). Jelikož bylo prokázáno, že cAMP-PKA signalizace může bránit aktivaci MAPK kaskády v mnoha

typech buněk (Graves and Lawrence, 1996), potlačení aktivity AC a produkce cAMP může usnadnit aktivaci ERK 1/2 a p38 a tím i následnou stimulaci cPLA₂α. cPLA₂α uvolňuje z fosfolipidů kyselinu arachidonovou, která může sloužit jako substrát pro COX, jejíchž metabolické dráhy vedou k tvorbě eikosanoidů (např. PGE₂) (Burke and Dennis, 2009). I přes tyto známé poznatky nebyla dosud studována možná role β-adrenergní signální dráhy v regulaci syntézy PGE₂ zprostředkované prostřednictvím cPLA₂α v chronicky hypoxickém myokardu.

Naše první výsledky porovnávající hmotnostní parametry mezi normoxickou kontrolní skupinou a skupinou adaptovanou na IHH ukázaly, že podobně jako v předchozích dvou studiích (Hahnova *et al.*, 2016; Hahnova *et al.*, 2017) vedla adaptace potkanů na chronickou hypoxii k výraznému zpomalení tělesného růstu v porovnání s kontrolou. Tyto data ukazují, že pokles tělesné hmotnosti po hypoxické adaptaci je pozorován jak u modelu normobarické, tak hypobarické hypoxie. Avšak na rozdíl od normobarické hypoxie, byla u potkanů adaptovaných na IHH odhalena nejen hypertrofie RV, ale také LV, což vedlo k nárůstu většiny ostatních hmotnostních parametrů oproti kontrolní skupině.

Jak již bylo zmíněno výše, existuje celá řada studií zabývajících se myokardiální β-adrenergní signalizací během adaptace na odlišné modely chronické hypoxie. Ukázalo se, že adaptace na modely chronické hypoxie, které vedou ke vzniku kardioprotektivního fenotypu, mohou být spojeny se změnami β-adrenergní signalizace v srdci. Zdá se, že aktivace β-ARs hraje zásadní roli při rozvoji silné ischemické rezistence myokardu indukované hypoxickou expozicí (Mallet *et al.*, 2006). Nicméně publikovaná data o účincích chronické hypoxie na β-ARs se liší. Většina dřívějších studií uvádí pokles celkového počtu β-ARs v myokardu adaptovaných zvířat (Voelkel *et al.*, 1981; Mader *et al.*, 1991; Kacimi *et al.*, 1992; Mardon *et al.*, 1998; Favret *et al.*, 2001; León-Velarde *et al.*, 2001). Na druhou stranu ale existují studie, které nezaznamenaly žádnou změnu v množství těchto receptorů (Winter *et al.*, 1986; Germack *et al.*, 2002; Hahnova *et al.*, 2016) či naopak detekovaly jejich zvýšenou expresi (Li *et al.*, 1996). Z těchto výsledků můžeme soudit, že důsledky chronické hypoxie se mohou lišit v závislosti na zvolených experimentálních podmínkách. Současně bylo zjištěno, že množství Gs proteinů nebylo adaptací na chronickou hypoxii nijak významně ovlivněno nebo došlo k jeho poklesu a hladina Gi proteinů byla obvykle nezměněná nebo zvýšena (Kacimi *et al.*, 1995; Mardon *et al.*, 1998; Pei *et al.*, 2000; Hahnova *et al.*, 2016).

Námi zvolené experimentální podmínky, při nichž byli potkani vystaveni IHH, neměly vliv na celkový počet β -ARs ani na jejich disociační konstanty. Na druhou stranu se výrazně změnil poměr jednotlivých podtypů β -ARs a to ve prospěch β_2 -ARs. Nárůst podílu β_2 -ARs po adaptaci na IHH byl dále doprovázen signifikantním snížením exprese AC5 a zvýšenou expresí Gi proteinů. Pozorovaný pokles hladiny AC5 odpovídá předchozím zjištěním, při nichž byla odhalena snížená aktivita AC po expozici potkanů na hypobarickou hypoxii (Mardon *et al.*, 1998; León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). Okumura a spol. ve své studii ukázaly, že narušení exprese AC5 hraje důležitou roli v protekci myokardu před rozvojem srdečního selhání (Okumura *et al.*, 2003). Také studie Yan a spol. prokázala, že AC5 je důležitou signální molekulou regulující životnost a odolnost proti stresu (Yan *et al.*, 2007). Zvýšená exprese Gi proteinů odhalena v naší studii se shoduje s výsledky studie Mardon a spol. (Mardon *et al.*, 1998). Aktivace signální dráhy, při níž dochází k přepnutí β_2 -ARs od Gs ke Gi proteinům, vyžaduje, aby byl daný receptor fosforylován pravděpodobně prostřednictvím PKA. Studie Daaka a spol. už dříve ukázala, že fosforylace β_2 -ARs zprostředkovaná PKA nejenže snižuje vazbu tohoto receptoru s Gs, ale také zvyšuje interakci receptoru s Gi proteiny, čímž dochází k poklesu produkce cAMP a to v důsledku inhibice AC zprostředkované právě Gi proteiny (Daaka *et al.*, 1997).

Další výsledky z naší studie odhalily ve vzorcích LV izolovaných z potkanů adaptovaných na IHH výrazný nárůst nejen celkového množství cPLA₂ α , ale také její fosforylované formy. Kromě toho došlo ke zvýšení exprese COX-2 a PGE₂ a souběžně byla zjištěna zvýšená fosforylace ERK 1/2 a p38 kináz (Micova *et al.*, 2016). Získané poznatky naznačily, že expozice potkanů na IHH vede k posílení myokardiální β_2 -ARs-Gi signalizace, což může vést k aktivaci cPLA₂ α -COX-2 signální dráhy prostřednictvím ERK/p38 kaskády. Zapojení β_2 -ARs v aktivaci ERK/p38 bylo pozorováno už dříve za různých experimentálních podmínek (Dang *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2013).

8 Závěr

Společným cílem publikací použitých k sepsání této disertační práce bylo sledování vlivu adaptace potkanů na chronickou hypoxii na myokardiální β -adrenergní signální dráhu a možnou účast této dráhy v molekulárních mechanismech kardioprotekce.

Výsledky naší první studie ukázaly, že adaptace na chronickou normobarickou hypoxii je doprovázena nesourodými změnami v β -adrenergní signalizaci v RV a LV. Expozice zvířat na kontinuální a intermitentní model chronické hypoxie vedla v obou případech k narušení této signální dráhy v RV bez významnějších změn v LV a nebyl odhalen výraznější rozdíl ani mezi účinky protektivního (CNH) a neprotektivního (INH) modelu hypoxie. Tyto výsledky tedy ukázaly, že změny v β -adrenergní signalizaci jsou v tomto případě komorově specifické a nezdají se být závislé na konkrétním modelu hypoxie. I přestože námi odhalena data neumožňují určit specifickou roli β -ARs a AC signalizace v adaptačním procesu chronické hypoxie, není možné vyloučit účast tohoto signálního systému na vývoji kardioprotektivního fenotypu.

Výsledky získané v druhé studii nám naznačily, že selektivní výměna mitochondriálního genomu SHR potkanů za mitochondriální genom potkanů kmene Brown Norway, který je více odolný k ischemii, může ovlivnit fungování myokardiální AC signalizace regulované prostřednictvím β -ARs, stejně jako expresi a aktivitu MAO-A a některé komponenty antioxidačního obranného systému. Tato výměna genomu ovlivnila také adaptivní odpovědi na chronickou hypoxii. Zatímco expozice SHR a SHR-mtBN potkanů na CNH měla odlišný vliv na β -adrenergní signální dráhu, MAO-A a jednotlivé komponenty antioxidačního systému reagovali na účinek CNH u obou kmenů podobně. Jedná se o první studii, která prokázala, že manipulace s mitochondriálním genomem může mít relativně dalekosáhlé důsledky pro β -adrenergní signalizaci a redoxní rovnováhu v myokardech potkanů a může tedy vést ke složitým změnám v cílových buňkách. Tyto poznatky je potřeba vzít v úvahu při plánování použití těchto genetických manipulací pro výzkumné či terapeutické účely.

Naše poslední studie prokázala, že expozice potkanů na IHH měla za následek komplexní změny v signální kaskádě spouštěné β -ARs. Pozorovaný nárůst myokardiálních β_2 -ARs byl doprovázen poklesem hladiny AC5 a zvýšenou expresi Gi proteinů. Další výsledky dané studie odhalily zvýšenou fosforylaci ERK 1/2 a p38 kinázy. Stimulace těchto MAPK prostřednictvím β_2 -ARs-Gi signalizace může být přímo

spojena s aktivací cPLA₂α-COX-2-PGE₂ signální dráhy. Tyto výsledky naznačují, že se β-ARs mohou podílet na vývoji kardioprotektivního fenotypu u potkanů adaptovaných na IHH a to prostřednictvím aktivace signální dráhy vedoucí ke stimulaci cPLA₂α.

9 Seznam použité literatury

- Ahlquist R P 1948 A study of the adrenotropic receptors *Am J Physiol* **153** 586-600
- Ahmet I, Krawczyk M, Heller P, Moon C, Lakatta E G and Talan M I 2004 Beneficial effects of chronic pharmacological manipulation of beta-adrenoreceptor subtype signaling in rodent dilated ischemic cardiomyopathy *Circulation* **110** 1083-90
- Ahn S, Kim J, Hara M R, Ren X R and Lefkowitz R J 2009 {beta}-Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation *J Biol Chem* **284** 8855-65
- Alánová P, Chytilová A, Neckář J, Hrdlička J, Míčová P, Holzerová K, Hlaváčková M, Macháčková K, Papoušek F, Vašinová J, Benák D, Nováková O and Kolář F 2017 Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia *J Appl Physiol (1985)* **122** 1452-61
- Alánová P, Kolář F, Ošťádal B and Neckář J 2015 Role of NO/cGMP signaling pathway in cardiac ischemic tolerance of chronically hypoxic rats *Physiol Res* **64** 783-7
- Anderson E J, Efird J T, Davies S W, O'Neal W T, Darden T M, Thayne K A, Katunga L A, Kindell L C, Ferguson T B, Anderson C A, Chitwood W R, Koutlas T C, Williams J M, Rodriguez E and Kypson A P 2014 Monoamine oxidase is a major determinant of redox balance in human atrial myocardium and is associated with postoperative atrial fibrillation *J Am Heart Assoc* **3** e000713
- Andersson D C, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang S J, Katz A and Westerblad H 2011 Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes *J Physiol* **589** 1791-801
- Andreadou I, Iliodromitis E K, Koufaki M, Farmakis D, Tsotinis A and Kremastinos D T 2008 Alternative pharmacological interventions that limit myocardial infarction *Curr Med Chem* **15** 3204-13
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D and Ovize M 2005 Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition *Circulation* **111** 194-7
- Asemu G, Papousek F, Ostádal B and Kolář F 1999 Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel *J Mol Cell Cardiol* **31** 1821-31
- Baandrup J D, Markvarsdén L H, Peters C D, Schou U K, Jensen J L, Magnusson N E, Ørntoft T F, Kruhøffer M and Simonsen U 2011 Pressure load: the main factor for altered gene expression in right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats *PLoS One* **6** e15859

Baker J E, Contney S J, Gross G J and Bosnjak Z J 1997 KATP channel activation in a rabbit model of chronic myocardial hypoxia *J Mol Cell Cardiol* **29** 845-8

Baker J E, Contney S J, Singh R, Kalyanaraman B, Gross G J and Bosnjak Z J 2001 Nitric oxide activates the sarcolemmal K(ATP) channel in normoxic and chronically hypoxic hearts by a cyclic GMP-dependent mechanism *J Mol Cell Cardiol* **33** 331-41

Baker J E, Holman P, Kalyanaraman B, Griffith O W and Pritchard K A 1999 Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production *Ann N Y Acad Sci* **874** 236-53

Balková P, Hlaváčková M, Milerová M, Neckář J, Kolář F, Novák F and Nováková O 2011 N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts *Physiol Res* **60** 467-74

Baxter G F, Goma F M and Yellon D M 1997 Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium *Basic Res Cardiol* **92** 159-67

Beazely M A and Watts V J 2006 Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report *Eur J Pharmacol* **535** 1-12

Becker L B 2004 New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology *Cardiovasc Res* **61** 461-70

Bers D M 2002 Cardiac excitation-contraction coupling *Nature* **415** 198-205

Bhushan S, Kondo K, Predmore B L, Zlatopolsky M, King A L, Pearce C, Huang H, Tao Y X, Condit M E and Lefer D J 2012 Selective β_2 -adrenoreceptor stimulation attenuates myocardial cell death and preserves cardiac function after ischemia-reperfusion injury *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32** 1865-74

Bockaert J and Pin J P 1999 Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success *EMBO J* **18** 1723-9

Borchert G H, Yang C and Kolář F 2011 Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300** H507-13

Borges J P, Verdoorn K S, Daliry A, Powers S K, Ortenzi V H, Fortunato R S, Tibiriçá E and Lessa M A 2014 Delta opioid receptors: the link between exercise and cardioprotection *PLoS One* **9** e113541

Bristow M R, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P and Jamieson S 1986 Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of

both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure *Circ Res* **59** 297-309

Brodde O E 1991 Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure *Pharmacol Rev* **43** 203-42

Brown D A, Chicco A J, Jew K N, Johnson M S, Lynch J M, Watson P A and Moore R L 2005 Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat *J Physiol* **569** 913-24

Bu H M, Yang C Y, Wang M L, Ma H J, Sun H and Zhang Y 2015 K(ATP) channels and MPTP are involved in the cardioprotection bestowed by chronic intermittent hypobaric hypoxia in the developing rat *J Physiol Sci* **65** 367-76

Burke J E and Dennis E A 2009 Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling *J Lipid Res* **50 Suppl** S237-42

Bylund D B, Eikenberg D C, Hieble J P, Langer S Z, Lefkowitz R J, Minneman K P, Molinoff P B, Ruffolo R R and Trendelenburg U 1994 International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors *Pharmacol Rev* **46** 121-36

Béguin P C, Belaidi E, Godin-Ribuot D, Lévy P and Ribuot C 2007 Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2 *J Mol Cell Cardiol* **42** 343-51

Béguin P C, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Lévy P and Ribuot C 2005 Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia *J Appl Physiol (1985)* **99** 1064-9

Böhm M, Flesch M and Schnabel P 1997 Beta-adrenergic signal transduction in the failing and hypertrophied myocardium *J Mol Med (Berl)* **75** 842-8

Cadenas S, Aragonés J and Landázuri M O 2010 Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease *Cardiovasc Res* **88** 219-28

Calvert J W, Condit M E, Aragón J P, Nicholson C K, Moody B F, Hood R L, Sindler A L, Gundewar S, Seals D R, Barouch L A and Lefer D J 2011 Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of $\beta(3)$ -adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols *Circ Res* **108** 1448-58

Capote L A, Mendez Perez R and Lymperopoulos A 2015 GPCR signaling and cardiac function *Eur J Pharmacol* **763** 143-8

Chen C H, Budas G R, Churchill E N, Disatnik M H, Hurley T D and Mochly-Rosen D 2008 Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart *Science* **321** 1493-5

- Cheng Y, Gu X Q, Bednarczyk P, Wiedemann F R, Haddad G G and 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** 127-36
- Chesley A, Lundberg M S, Asai T, Xiao R P, Ohtani S, Lakatta E G and Crow M T 2000 The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase *Circ Res* **87** 1172-9
- Chicco A J, Johnson M S, Armstrong C J, Lynch J M, Gardner R T, Fasen G S, Gillenwater C P and Moore R L 2007 Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292** H2432-7
- Chytilová A, Borchert G H, Mandíková-Alánová P, Hlaváčková M, Kopkan L, Khan M A, Imig J D, Kolář F and Neckář J 2015 Tumour necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia *Acta Physiol (Oxf)* **214** 97-108
- Claing A, Laporte S A, Caron M G and Lefkowitz R J 2002 Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins *Prog Neurobiol* **66** 61-79
- Communal C, Ribouot C, Durand A and Demenge P 1998 Myocardial beta-adrenergic reactivity in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat *Fundam Clin Pharmacol* **12** 590-8
- Communal C, Singh K, Sawyer D B and Colucci W S 1999 Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein *Circulation* **100** 2210-2
- Daaka Y, Luttrell L M and Lefkowitz R J 1997 Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A *Nature* **390** 88-91
- Dang H, Elliott J J, Lin A L, Zhu B, Katz M S and Yeh C K 2008 Mitogen-activated protein kinase up-regulation and activation during rat parotid gland atrophy and regeneration: role of epidermal growth factor and beta2-adrenergic receptors *Differentiation* **76** 546-57
- Demirel H A, Powers S K, Zegeroglu M A, Shanely R A, Hamilton K, Coombes J and Naito H 2001 Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat *J Appl Physiol (1985)* **91** 2205-12
- Di Lisa F, Canton M, Menabò R, Kaludercic N and Bernardi P 2007 Mitochondria and cardioprotection *Heart Fail Rev* **12** 249-60

Dickson E W, Hogrefe C P, Ludwig P S, Ackermann L W, Stoll L L and Denning G M 2008 Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294** H402-8

Ding H L, Zhu H F, Dong J W, Zhu W Z, Yang W W, Yang H T and Zhou Z N 2005 Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury *Acta Pharmacol Sin* **26** 315-22

Ding H L, Zhu H F, Dong J W, Zhu W Z and Zhou Z N 2004 Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C *Life Sci* **75** 2587-603

Dixon R A, Sigal I S, Candelore M R, Register R B, Scattergood W, Rands E and Strader C D 1987 Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor *EMBO J* **6** 3269-75

Downey J M, Krieg T and Cohen M V 2008 Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach *Ann N Y Acad Sci* **1123** 187-96

Dănilă M D, Privistirescu A I, Mirica S N, Sturza A, Ordodi V, Noveanu L, Duicu O M and Muntean D M 2015 Acute inhibition of monoamine oxidase and ischemic preconditioning in isolated rat hearts: interference with postischemic functional recovery but no effect on infarct size reduction *Can J Physiol Pharmacol* **93** 819-25

Eells J T, Henry M M, Gross G J and Baker J E 2000 Increased mitochondrial K(ATP) channel activity during chronic myocardial hypoxia: is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? *Circ Res* **87** 915-21

Estrada J A, Williams A G, Sun J, Gonzalez L, Downey H F, Caffrey J L and Mallet R T 2016 δ -Opioid receptor (DOR) signaling and reactive oxygen species (ROS) mediate intermittent hypoxia induced protection of canine myocardium *Basic Res Cardiol* **111** 17

Faeh D, Gutzwiller F, Bopp M and Group S N C S 2009 Lower mortality from coronary heart disease and stroke at higher altitudes in Switzerland *Circulation* **120** 495-501

Fajardo G, Zhao M, Berry G, Wong L J, Mochly-Rosen D and Bernstein D 2011 β 2-adrenergic receptors mediate cardioprotection through crosstalk with mitochondrial cell death pathways *J Mol Cell Cardiol* **51** 781-9

Farah C, Kleindienst A, Bolea G, Meyer G, Gayrard S, Geny B, Obert P, Cazorla O, Tanguy S and Reboul C 2013 Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites *Basic Res Cardiol* **108** 389

Favret F, Richalet J P, Henderson K K, Germack R and Gonzalez N C 2001 Myocardial adrenergic and cholinergic receptor function in hypoxia: correlation with O₂ transport in exercise *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280** R730-8

Fitzpatrick C M, Shi Y, Hutchins W C, Su J, Gross G J, Ostadal B, Tweddell J S and Baker J E 2005 Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and KATP channels *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288** H62-8

Florea S M and Blatter L A 2012 Regulation of cardiac alternans by β -adrenergic signaling pathways *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303** H1047-56

Foerster K, Groner F, Matthes J, Koch W J, Birnbaumer L and Herzig S 2003 Cardioprotection specific for the G protein Gi2 in chronic adrenergic signaling through beta 2-adrenoceptors *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** 14475-80

Frances C, Nazeyrollas P, Prevost A, Moreau F, Pisani J, Davani S, Kantelip J P and Millart H 2003 Role of beta 1- and beta 2-adrenoceptor subtypes in preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion *J Cardiovasc Pharmacol* **41** 396-405

Fryer R M, Eells J T, Hsu A K, Henry M M and Gross G J 2000 Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278** H305-12

Fryer R M, Hsu A K, Eells J T, Nagase H and Gross G J 1999 Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels *Circ Res* **84** 846-51

Fryer R M, Wang Y, Hsu A K and Gross G J 2001 Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280** H1346-53

Földes-Papp Z, Domej W, Demel U and Tilz G P 2005 Oxidative stress caused by acute and chronic exposition to altitude *Wien Med Wochenschr* **155** 136-42

Galinier M, Sénard J M, Valet P, Dréan G, Planat V, Arias A, Tran M A and Montastruc J L 1992 Myocardial hypertrophy, cardiac beta-adrenoceptors and adenylate cyclase activity during sinoaortic denervation in dogs *Br J Pharmacol* **105** 341-6

Galvão T F, Matos K C, Brum P C, Negrão C E, Luz P L and Chagas A C 2011 Cardioprotection conferred by exercise training is blunted by blockade of the opioid system *Clinics (Sao Paulo)* **66** 151-7

Germack R, Leon-Velarde F, Valdes De La Barra R, Farias J, Soto G and Richalet J P 2002 Effect of intermittent hypoxia on cardiovascular function, adrenoceptors and muscarinic receptors in Wistar rats *Exp Physiol* **87** 453-60

Gong K, Li Z, Xu M, Du J, Lv Z and Zhang Y 2008 A novel protein kinase A-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors *J Biol Chem* **283** 29028-36

Graves L M and Lawrence J C 1996 Insulin, growth factors, and cAMP: antagonism in the signal transduction pathways *Trends Endocrinol Metab* **7** 43-50

Grilli A, De Lutiis M A, Patruno A, Speranza L, Cataldi A, Centurione L, Taccardi A A, Di Napoli P, De Caterina R, Barbacane R, Conti P and Felaco M 2003 Effect of chronic hypoxia on inducible nitric oxide synthase expression in rat myocardial tissue *Exp Biol Med (Maywood)* **228** 935-42

Gross E R, Hsu A K and Gross G J 2004 Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts *Circ Res* **94** 960-6

Gross E R, Hsu A K and Gross G J 2006 The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291** H827-34

Guan Y, Gao L, Ma H J, Li Q, Zhang H, Yuan F, Zhou Z N and Zhang Y 2010 Chronic intermittent hypobaric hypoxia decreases beta-adrenoceptor activity in right ventricular papillary muscle *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298** H1267-72

Guo H C, Zhang Z, Zhang L N, Xiong C, Feng C, Liu Q, Liu X, Shi X L and Wang Y L 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** 947-55

Hahnova K, Brabcova I, Neckar J, Weissova R, Svatonova A, Novakova O, Zurmanova J, Kalous M, Silhavy J, Pravenec M, Kolar F and Novotny J 2017 β -Adrenergic signaling, monoamine oxidase A and antioxidant defence in the myocardium of SHR and SHR-mtBN conplastic rat strains: the effect of chronic hypoxia *J Physiol Sci*

Hahnova K, Kasparova D, Zurmanova J, Neckar J, Kolar F and Novotny J 2016 β -Adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia *Gen Physiol Biophys* **35** 165-73

Hajnal A, Nagy O, Litvai A, Papp J, Parratt J R and Végh A 2005 Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs *Life Sci* **77** 1960-71

Hajri T, Ibrahim A, Coburn C T, Knapp F F, Kurtz T, Pravenec M and Abumrad N A 2001 Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy *J Biol Chem* **276** 23661-6

Halestrap A P, Kerr P M, Javadov S and Woodfield K Y 1998 Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart *Biochim Biophys Acta* **1366** 79-94

Halkos M E, Kerendi F, Corvera J S, Wang N P, Kin H, Payne C S, Sun H Y, Guyton R A, Vinten-Johansen J and Zhao Z Q 2004 Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning *Ann Thorac Surg* **78** 961-9; discussion 9

Hamilton K L, Quindry J C, French J P, Staib J, Hughes J, Mehta J L and Powers S K 2004 MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias *Free Radic Biol Med* **37** 1360-8

Hammarberg C, Fredholm B B and Schulte G 2004 Adenosine A3 receptor-mediated regulation of p38 and extracellular-regulated kinase ERK1/2 via phosphatidylinositol-3'-kinase *Biochem Pharmacol* **67** 129-34

Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman R M, Siddiqui M A and Das D K 2001 Role of STAT3 in ischemic preconditioning *J Mol Cell Cardiol* **33** 1929-36

Hausdorff W P, Caron M G and Lefkowitz R J 1990 Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function *FASEB J* **4** 2881-9

Heusch G 2013 Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic *Lancet* **381** 166-75

Heusch G 2015 Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning *Circ Res* **116** 674-99

Heusch G, Boengler K and Schulz R 2008 Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria *Circulation* **118** 1915-9

Heusch G, Bøtker H E, Przyklenk K, Redington A and Yellon D 2015 Remote ischemic conditioning *J Am Coll Cardiol* **65** 177-95

Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters R J, Novák F and Nováková O 2010 Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart *Mol Cell Biochem* **345** 271-82

Holzerová K, Hlaváčková M, Žurmanová J, Borchert G, Neckář J, Kolář F, Novák F and Nováková O 2015 Involvement of PKCepsilon in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia *Physiol Res* **64** 191-201

Hrbasová M, Novotny J, Hejnová L, Kolář F, Neckář J and Svoboda P 2003 Altered myocardial Gs protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery *J Appl Physiol (1985)* **94** 2423-32

HURTADO A 1960 Some clinical aspects of life at high altitudes *Ann Intern Med* **53** 247-58

- Ihnatovych I, Hejnová L, Kostrnová A, Mares P, Svoboda P and Novotný J 2001 Maturation of rat brain is accompanied by differential expression of the long and short splice variants of G(s)alpha protein: identification of cytosolic forms of G(s)alpha *J Neurochem* **79** 88-97
- Ishikawa S, Honda M, Yamada S, Morioka S and Moriyama K 1991 Biventricular down-regulation of beta-adrenergic receptors in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline *Jpn Circ J* **55** 1077-85
- Itter G, Jung W, Juretschke P, Schoelkens B A and Linz W 2004 A model of chronic heart failure in spontaneous hypertensive rats (SHR) *Lab Anim* **38** 138-48
- Jang Y, Xi J, Wang H, Mueller R A, Norfleet E A and Xu Z 2008 Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors *Anesthesiology* **108** 243-50
- Jean-Charles P Y, Rajiv V and Shenoy S K 2016 Ubiquitin-Related Roles of β -Arrestins in Endocytic Trafficking and Signal Transduction *J Cell Physiol* **231** 2071-80
- Johnson T S, Young J B and Landsberg L 1983 Sympathoadrenal responses to acute and chronic hypoxia in the rat *J Clin Invest* **71** 1263-72
- Kacimi R, Moalic J M, Aldashev A, Vatner D E, Richalet J P and Crozatier B 1995 Differential regulation of G protein expression in rat hearts exposed to chronic hypoxia *Am J Physiol* **269** H1865-73
- Kacimi R, Richalet J P, Corsin A, Abousahl I and Crozatier B 1992 Hypoxia-induced downregulation of beta-adrenergic receptors in rat heart *J Appl Physiol (1985)* **73** 1377-82
- Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F and Paolocci N 2011 Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury *Biochim Biophys Acta* **1813** 1323-32
- Kasparova D, Neckar J, Dabrowska L, Novotny J, Mraz J, Kolar F and Zurmanova J 2015 Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems *Physiol Genomics* **47** 612-20
- Kelly R D, Rodda A E, Dickinson A, Mahmud A, Nefzger C M, Lee W, Forsythe J S, Polo J M, Trounce I A, McKenzie M, Nisbet D R and St John J C 2013 Mitochondrial DNA haplotypes define gene expression patterns in pluripotent and differentiating embryonic stem cells *Stem Cells* **31** 703-16
- Klevstig M, Manakov D, Kasparova D, Brabcova I, Papousek F, Zurmanova J, Zidek V, Silhavy J, Neckar J, Pravenec M, Kolar F, Novakova O and Novotny J 2013 Transgenic rescue of defective Cd36 enhances myocardial adenylyl cyclase signaling in spontaneously hypertensive rats *Pflugers Arch* **465** 1477-86

- Kobilka B K 2011 Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology *Trends Pharmacol Sci* **32** 213-8
- Kolár F, Jezková J, Balková P, Breh J, Neckár J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ostádal B, Wilhelm J and Herget J 2007 Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292** H224-30
- Kolár F, Neckár J and Ostádal 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** 467-71
- Kolár F and Ostádal B 2004 Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia *Physiol Res* **53 Suppl 1** S3-13
- Kozlovski V I, Lomnicka M, Bartus M, Sternak M and Chlopicki S 2015 Anti-thrombotic effects of nebivolol and carvedilol: Involvement of β_2 receptors and COX-2/PGI2 pathways *Pharmacol Rep* **67** 1041-7
- Kramer R M, Roberts E F, Um S L, Börsch-Haubold A G, Watson S P, Fisher M J and Jakubowski J A 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** 27723-9
- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T and Tada M 1993 Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia *Circ Res* **72** 1293-9
- La Padula P H, Etchegoyen M, Czerniczyniec A, Piotrkowski B, Arnaiz S L, Milei J and Costa L E 2017 Cardioprotection after acute exposure to simulated high altitude in rats. Role of nitric oxide *Nitric Oxide* **73** 52-9
- Lachmanová V, Hnilicková O, Povýsilová V, Hampl V and Herget J 2005 N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia *Life Sci* **77** 175-82
- Lagerström M C and Schiöth H B 2008 Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery *Nat Rev Drug Discov* **7** 339-57
- Laursen B E, Dam M Y, Mulvany M J and Simonsen U 2008 Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy is unaltered by long-term oral L-arginine administration *Vascul Pharmacol* **49** 71-6
- Lawson C S and Downey J M 1993 Preconditioning: state of the art myocardial protection *Cardiovasc Res* **27** 542-50

Lefkowitz R J and Shenoy S K 2005 Transduction of receptor signals by beta-arrestins *Science* **308** 512-7

Lennon S L, Quindry J, Hamilton K L, French J, Staib J, Mehta J L and Powers S K 2004a Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise *J Appl Physiol (1985)* **96** 1299-305

Lennon S L, Quindry J C, French J P, Kim S, Mehta J L and Powers S K 2004b Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion *Acta Physiol Scand* **182** 161-9

León-Velarde F, Bourin M C, Germack R, Mohammadi K, Crozatier B and Richalet J P 2001 Differential alterations in cardiac adrenergic signaling in chronic hypoxia or norepinephrine infusion *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280** R274-81

Li H T, Honbo N Y and Karliner J S 1996 Chronic hypoxia increases beta 1-adrenergic receptor mRNA and density but not signaling in neonatal rat cardiac myocytes *Circulation* **94** 3303-10

Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias E G and Bers D M 2000 Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278** H769-79

Lin L L, Wartmann M, Lin A Y, Knopf J L, Seth A and Davis R J 1993 cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase *Cell* **72** 269-78

Liu G S, Thornton J, Van Winkle D M, Stanley A W, Olsson R A and Downey J M 1991 Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart *Circulation* **84** 350-6

Liu R, Ramani B, Soto D, De Arcangelis V and Xiang Y 2009 Agonist dose-dependent phosphorylation by protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase regulates beta2 adrenoceptor coupling to G(i) proteins in cardiomyocytes *J Biol Chem* **284** 32279-87

Lohse M J, Engelhardt S and Eschenhagen T 2003 What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* **93** 896-906

Luttrell L M, Ferguson S S, Daaka Y, Miller W E, Maudsley S, Della Rocca G J, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell D K, Caron M G and Lefkowitz R J 1999 Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes *Science* **283** 655-61

Madamanchi A 2007 Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure *Mcgill J Med* **10** 99-104

Mader S L, Downing C L and Van Lunteren E 1991 Effect of age and hypoxia on beta-adrenergic receptors in rat heart *J Appl Physiol (1985)* **71** 2094-8

Magalhães J, Gonçalves I O, Lumini-Oliveira J, Marques-Aleixo I, Passos E, Rocha-Rodrigues S, Machado N G, Moreira A C, Rizo D, Viscor G, Oliveira P J, Torrella J R and Ascensão A 2014 Modulation of cardiac mitochondrial permeability transition and apoptotic signaling by endurance training and intermittent hypobaric hypoxia *Int J Cardiol* **173** 40-5

Maher J T, Deniiston J C, Wolfe D L and Cymerman A 1978 Mechanism of the attenuated cardiac response to beta-adrenergic stimulation in chronic hypoxia *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **44** 647-51

Mallet R T, Ryou M G, Williams A G, Howard L and Downey H F 2006 Beta1-Adrenergic receptor antagonism abrogates cardioprotective effects of intermittent hypoxia *Basic Res Cardiol* **101** 436-46

Manukhina E B, Downey H F and Mallet R T 2006 Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia *Exp Biol Med (Maywood)* **231** 343-65

Mardon K, Merlet P, Syrota A and Mazière B 1998 Effects of 5-day hypoxia on cardiac adrenergic neurotransmission in rats *J Appl Physiol (1985)* **85** 890-7

Maslov L N, Naryzhnaia N V, Tsibulnikov S Y, Kolar F, Zhang Y, Wang H, Gusakova A M and Lishmanov Y B 2013 Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia *Life Sci* **93** 373-9

Maslov L N, Naryzhnaya N V, Prokudina E S, Kolar F, Gorbunov A S, Zhang Y, Wang H, Tsibulnikov S Y, Portnichenko A G, Lasukova T V and Lishmanov Y B 2015 Preserved cardiac mitochondrial function and reduced ischaemia/reperfusion injury afforded by chronic continuous hypoxia: role of opioid receptors *Clin Exp Pharmacol Physiol* **42** 496-501

McCarthy J, Lochner A, Opie L H, Sack M N and Essop M F 2011 PKC ϵ promotes cardiac mitochondrial and metabolic adaptation to chronic hypobaric hypoxia by GSK3 β inhibition *J Cell Physiol* **226** 2457-68

McDonald P H, Chow C W, Miller W E, Laporte S A, Field M E, Lin F T, Davis R J and Lefkowitz R J 2000 Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3 *Science* **290** 1574-7

McElroy C L, Gissen S A and Fishbein M C 1978 Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat *Circulation* **57** 958-62

Micova P, Hahnova K, Hlavackova M, Elsnicova B, Chytilova A, Holzerova K, Zurmanova J, Neckar J, Kolar F, Novakova O and Novotny J 2016 Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A(2)alpha/cyclooxygenase 2 pathway via

beta(2)-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation *Molecular and Cellular Biochemistry* **423** 151-63

Mieno S, Horimoto H, Sawa Y, Watanabe F, Furuya E, Horimoto S, Kishida K and Sasaki S 2005 Activation of beta2-adrenergic receptor plays a pivotal role in generating the protective effect of ischemic preconditioning in rat hearts *Scand Cardiovasc J* **39** 313-9

Milano G, von Segesser L K, Morel S, Joncic A, Bianciardi P, Vassalli G and Samaja M 2010 Phosphorylation of phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B and extracellular signal-regulated kinases 1/2 mediate reoxygenation-induced cardioprotection during hypoxia *Exp Biol Med (Maywood)* **235** 401-10

Miura T, Yano T, Naitoh K, Nishihara M, Miki T, Tanno M and Shimamoto K 2007 Delta-opioid receptor activation before ischemia reduces gap junction permeability in ischemic myocardium by PKC-epsilon-mediated phosphorylation of connexin 43 *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293** H1425-31

Morisco C, Zebrowski D C, Vatner D E, Vatner S F and Sadoshima J 2001 Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart *J Mol Cell Cardiol* **33** 561-73

Mortimer E A, Monson R R and MacMahon B 1977 Reduction in mortality from coronary heart disease in men residing at high altitude *N Engl J Med* **296** 581-5

Murray C J, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman A D, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon J A, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn S Y, Ali M K, Alvarado M, Anderson H R, Anderson L M, Andrews K G, Atkinson C, Baddour L M, Bahalim A N, Barker-Collo S, Barrero L H, Bartels D H, Basáñez M G, Baxter A, Bell M L, Benjamin E J, Bennett D, Bernabé E, Bhalla K, Bhandari B, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Black J A, Blencowe H, Blore J D, Blyth F, Bolliger I, Bonaventure A, Boufous S, Bourne R, Boussinesq M, Braithwaite T, Brayne C, Bridgett L, Brooker S, Brooks P, Brugha T S, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Buckle G, Budke C M, Burch M, Burney P, Burstein R, Calabria B, Campbell B, Canter C E, Carabin H, Carapetis J, Carmona L, Cella C, Charlson F, Chen H, Cheng A T, Chou D, Chugh S S, Coffeng L E, Colan S D, Colquhoun S, Colson K E, Condon J, Connor M D, Cooper L T, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro K C, Couser W, Cowie B C, Criqui M H, Cross M, Dabhadkar K C, Dahiya M, Dahodwala N, Damsere-Derry J, Danaei G, Davis A, De Leo D, Degenhardt L, Dellavalle R, Delossantos A, Denenberg J, Derrett S, Des Jarlais D C, Dharmaratne S D, Dherani M, Diaz-Torne C, Dolk H, Dorsey E R, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Edmond K, Elbaz A, Ali S E, Erskine H, Erwin P J, Espindola P, Ewoigbokhan S E, Farzadfar F, Feigin V, Felson D T, Ferrari A, Ferri C P, Fèvre E M, Finucane M M, Flaxman S, Flood L, Foreman K, Forouzanfar M H, Fowkes F G, Fransen M, Freeman M K, Gabbe B J, Gabriel S E, Gakidou E, Ganatra H A, Garcia B, Gaspari F, Gillum R F, Gmel G, Gonzalez-Medina D, Gosselin R, Grainger R, Grant B, Groeger J, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Haagsma J, Hagan H, Halasa Y A, Hall W, Haring D, Haro J M, Harrison J E, Havmoeller R, Hay R J, Higashi H, Hill C, Hoen B, Hoffman H, Hotez P J, Hoy D,

Huang J J, Ibeanusi S E, Jacobsen K H, James S L, Jarvis D, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas J B, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo J P, King C H, Knowlton L M, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Laden F, Lalloo R, Laslett L L, Lathlean T, Leasher J L, Lee Y Y, Leigh J, Levinson D, Lim S S, Limb E, Lin J K, Lipnick M, Lipshultz S E, Liu W, Loane M, Ohno S L, Lyons R, Mabweijano J, MacIntyre M F, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis D J, Marks G B, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi B M, McAnulty J H, McDermott M M, McGill N, McGrath J, Medina-Mora M E, Meltzer M, Mensah G A, Merriman T R, Meyer A C, Miglioli V, Miller M, Miller T R, Mitchell P B, Mock C, Mocumbi A O, Moffitt T E, Mokdad A A, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch M E, Mwaniki M K, Naidoo K, Nair M N, Naldi L, Narayan K M, Nelson P K, Nelson R G, Nevitt M C, Newton C R, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer S B, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Page A, Pahari B, Pandian J D, Rivero A P, Patten S B, Pearce N, Padilla R P, Perez-Ruiz F, Perico N, Pesudovs K, Phillips D, Phillips M R, Pierce K, Pion S, Polanczyk G V, Polinder S, Pope C A, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan R L, Ramaiah K D, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm J T, Rein D B, Remuzzi G, Richardson K, Rivara F P, Roberts T, Robinson C, De Leòn F R, Ronfani L, Room R, Rosenfeld L C, Rushton L, Sacco R L, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel D C, Scott J G, Segui-Gomez M, Shahraz S, Shepard D S, Shin H, Shivakoti R, Singh D, Singh G M, Singh J A, Singleton J, Sleet D A, Sliwa K, Smith E, Smith J L, Stapelberg N J, Steer A, Steiner T, Stolk W A, Stovner L J, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor H R, Taylor J A, Taylor W J, Thomas B, Thomson W M, Thurston G D, Tleyjeh I M, Tonelli M, Towbin J A, Truelsen T, Tsilimbaris M K, Ubeda C, Undurraga E A, van der Werf M J, van Os J, Vavilala M S, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall D J, Weinstock M A, Weintraub R, Weisskopf M G, Weissman M M, White R A, Whiteford H, Wiebe N, Wiersma S T, Wilkinson J D, Williams H C, Williams S R, Witt E, Wolfe F, Woolf A D, Wulf S, Yeh P H, Zaidi A K, Zheng Z J, Zonies D, Lopez A D, AlMazroa M A and Memish Z A 2012 Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 *Lancet* **380** 2197-223

Murry C E, Jennings R B and Reimer K A 1986 Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium *Circulation* **74** 1124-36

Myslivecek J, Tillinger A, Novakova M and Kvetnanský R 2008 Regulation of adrenoceptor and muscarinic receptor gene expression after single and repeated stress *Ann N Y Acad Sci* **1148** 367-76

Naghshin J, Rodriguez R H, Davis E M, Romano L C, McGaffin K R and O'Donnell C P 2012 Chronic intermittent hypoxia exposure improves left ventricular contractility in transgenic mice with heart failure *J Appl Physiol (1985)* **113** 791-8

Nakanishi K, Tajima F, Nakamura A, Yagura S, Ookawara T, Yamashita H, Suzuki K, Taniguchi N and Ohno H 1995 Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats *J Physiol* **489** (Pt 3) 869-76

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo T G, Kolodgie F D, Hajjar R J, Schmidt U, Semigran M J, Dec G W and Khaw B A 1996 Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure *N Engl J Med* **335** 1182-9

Neckár J, Borchert G H, Hlousková P, Míková P, Nováková O, Novák F, Hroch M, Papoušek F, Ost'ádal B and Kolár F 2013 Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels *Curr Pharm Des* **19** 6880-9

Neckár J, Marková I, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ost'ádal B and Kolár F 2005 Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288** H1566-72

Neckár J, Ostádal B and Kolár F 2004 Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery *Physiol Res* **53** 621-8

Neckár J, Papoušek F, Nováková O, Ost'ádal B and Kolár F 2002a Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive *Basic Res Cardiol* **97** 161-7

Neckár J, Szárszoi O, Koten L, Papoušek F, Ost'ádal B, Grover G J and Kolár F 2002b Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats *Cardiovasc Res* **55** 567-75

Neckár J, Szárszoi O, Herget J, Ostádal B and Kolár F 2003 Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia *Physiol Res* **52** 171-5

Neckář J, Svatoňová A, Weissová R, Drahotka Z, Zajíčková P, Brabcová I, Kolář D, Alánová P, Vašinová J, Šilhavý J, Hlaváčková M, Tauchmannová K, Milerová M, Oš'ádal B, Červenka L, Žurmanová J, Kalous M, Nováková O, Novotný J, Pravenec M and Kolář F 2017 Selective replacement of mitochondrial DNA increases the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats *Clin Sci (Lond)* **131** 865-81

Neckár J, Šilhavy J, Zídek V, Landa V, Mlejnek P, Šimáková M, Seidman J G, Seidman C, Kazdová L, Klevstig M, Novák F, Vecka M, Papoušek F, Houšťek J, Drahotka Z, Kurtz T W, Kolář F and Pravenec M 2012 CD36 overexpression predisposes to arrhythmias but reduces infarct size in spontaneously hypertensive rats: gene expression profile analysis *Physiol Genomics* **44** 173-82

Netuka I, Szarszoi O, Maly J, Besik J, Neckar J, Kolar F, Ostadalova I, Pirk J and Ostadal B 2006 Effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to acute ischaemia in adult male and female rats *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33** 714-9

- Nikolaev V O, Moshkov A, Lyon A R, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse M J, Korchev Y E, Harding S E and Gorelik J 2010 Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation *Science* **327** 1653-7
- Nishizawa T, Iwase M, Kanazawa H, Ichihara S, Ichihara G, Nagata K, Obata K, Kitaichi K, Yokoi T, Watanabe M, Tsunematsu T, Ishikawa Y, Murohara T and Yokota M 2004 Serial alterations of beta-adrenergic signaling in dilated cardiomyopathic hamsters: possible role of myocardial oxidative stress *Circ J* **68** 1051-60
- Novotny J, Bourová L, Kolár F and Svoboda P 2001 Membrane-Bound and cytosolic forms of heterotrimeric G proteins in young and adult rat myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism *J Cell Biochem* **82** 215-24
- Novotny J, Hrbasová M, Kolár F and Svoboda P 2003 Cardiomegaly induced by pressure overload in newborn rats is accompanied by altered expression of the long isoform of G(s)alpha protein and deranged signaling of adenylyl cyclase *Mol Cell Biochem* **245** 157-66
- Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Yang G, Lee M C, Hong C, Liu J, Vatner D E, Sadoshima J, Vatner S F and Ishikawa Y 2003 Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** 9986-90
- Ooi H, Cadogan E, Sweeney M, Howell K, O'Regan R G and McLoughlin P 2000 Chronic hypercapnia inhibits hypoxic pulmonary vascular remodeling *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278** H331-8
- Ostadal B and Kolar F 2007 Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects *Respir Physiol Neurobiol* **158** 224-36
- Ostadal B, Ostadalova I, Kolar F and Sedmera D 2014 Developmental determinants of cardiac sensitivity to hypoxia *Can J Physiol Pharmacol* **92** 566-74
- Ostádal B, Urbanová D, Ressler J, Procházka J, Pelouch V and Widimský J 1981 Changes of the right and left ventricles in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia *Cor Vasa* **23** 111-20
- Ostádalová I, Ostádal B, Jarkovská D and Kolár F 2002 Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart *Pediatr Res* **52** 561-7
- Parsons M, Young L, Lee J E, Jacobson K A and Liang B T 2000 Distinct cardioprotective effects of adenosine mediated by differential coupling of receptor subtypes to phospholipases C and D *FASEB J* **14** 1423-31
- Parton R G, Way M, Zorzi N and Stang E 1997 Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation *J Cell Biol* **136** 137-54

- Patel H H, Murray F and Insel P A 2008 Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48** 359-91
- Patterson A J, Chen M, Xue Q, Xiao D and Zhang L 2010 Chronic prenatal hypoxia induces epigenetic programming of PKC{epsilon} gene repression in rat hearts *Circ Res* **107** 365-73
- Pavoine C, Behforouz N, Gauthier C, Le Gouvello S, Roudot-Thoraval F, Martin C R, Pawlak A, Feral C, Defer N, Houel R, Magne S, Amadou A, Loisanche D, Duvaldestin P and Pecker F 2003 beta2-Adrenergic signaling in human heart: shift from the cyclic AMP to the arachidonic acid pathway *Mol Pharmacol* **64** 1117-25
- Pearl J N and Gross G J 2004 Chronic exposure to morphine produces a marked cardioprotective phenotype in aged mouse hearts *Exp Gerontol* **39** 1021-6
- Pearl J N and Gross G J 2006 Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment are mediated via different signaling pathways *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291** H1746-53
- Pei J M, Yu X C, Fung M L, Zhou J J, Cheung C S, Wong N S, Leung M P and Wong T M 2000 Impaired G(s)alpha and adenylyl cyclase cause beta-adrenoceptor desensitization in chronically hypoxic rat hearts *Am J Physiol Cell Physiol* **279** C1455-63
- Pelouch V, Kolár F, Ost'ádal B, Milerová M, Cihák R and Widimský J 1997 Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and fibrosis: effect of enalapril *Cardiovasc Drugs Ther* **11** 177-85
- Penna C, Pasqua T, Amelio D, Perrelli M G, Angotti C, Tullio F, Mahata S K, Tota B, Pagliaro P, Cerra M C and Angelone T 2014 Catestatin increases the expression of anti-apoptotic and pro-angiogenic factors in the post-ischemic hypertrophied heart of SHR *PLoS One* **9** e102536
- Pfaffl M W 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR *Nucleic Acids Res* **29** e45
- Philipp S, Yang X M, Cui L, Davis A M, Downey J M and Cohen M V 2006 Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade *Cardiovasc Res* **70** 308-14
- Piao L, Fang Y H, Parikh K S, Ryan J J, D'Souza K M, Theccanat T, Toth P T, Pogoriler J, Paul J, Blaxall B C, Akhter S A and Archer S L 2012 GRK2-mediated inhibition of adrenergic and dopaminergic signaling in right ventricular hypertrophy: therapeutic implications in pulmonary hypertension *Circulation* **126** 2859-69
- Pitcher J A, Freedman N J and Lefkowitz R J 1998 G protein-coupled receptor kinases *Annu Rev Biochem* **67** 653-92

- Povsic T J, Kohout T A and Lefkowitz R J 2003 Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis *J Biol Chem* **278** 51334-9
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner R A and Whittaker P 1993 Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion *Circulation* **87** 893-9
- Quindry J C, Schreiber L, Hosick P, Wrieden J, Irwin J M and Hoyt E 2010 Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299** H175-83
- Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard K A, Tweddell J S, Litwin S B, Mussatto K, Jaquiss R D, Su J and Baker J E 2002 Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection *Circulation* **106** 239-45
- Rask-Andersen M, Almén M S and Schiöth H B 2011 Trends in the exploitation of novel drug targets *Nat Rev Drug Discov* **10** 579-90
- Ravingerová T, Bernátová I, Matejíková J, Ledvényiová V, Nemčeková M, Pecháňová O, Tribulová N and Slezák J 2011 Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress *Exp Clin Cardiol* **16** e23-9
- Ravingerová T, Matejíková J, Neckár J, Andelová E and Kolár F 2007 Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart *Mol Cell Biochem* **297** 111-20
- Rentoukas I, Giannopoulos G, Kaoukis A, Kossyvakis C, Raisakis K, Driva M, Panagopoulou V, Tsarouchas K, Vavetsi S, Pyrgakis V and Deftereos S 2010 Cardioprotective role of remote ischemic preconditioning in primary percutaneous coronary intervention: enhancement by opioid action *JACC Cardiovasc Interv* **3** 49-55
- Rockman H A, Koch W J and Lefkowitz R J 2002 Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function *Nature* **415** 206-12
- Sadoshima J 2006 Redox regulation of growth and death in cardiac myocytes *Antioxid Redox Signal* **8** 1621-4
- Salazar N C, Chen J and Rockman H A 2007 Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts *Biochim Biophys Acta* **1768** 1006-18
- Salie R, Moolman J A and Lochner A 2011 The role of β -adrenergic receptors in the cardioprotective effects of beta-preconditioning (β PC) *Cardiovasc Drugs Ther* **25** 31-46
- Sasaki N, Murata M, Guo Y, Jo S H, Ohler A, Akao M, O'Rourke B, Xiao R P, Bolli R and 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** 1183-8

Sato S, Shirato K, Mitsuhashi R, Inoue D, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K and 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** 211-8

Schobesberger S, Wright P, Tokar S, Bhargava A, Mansfield C, Glukhov A V, Poulet C, Buzuk A, Monzpart A, Sikkell M, Harding S E, Nikolaev V O, Lyon A R and Gorelik J 2017 T-tubule remodelling disturbs localized β 2-adrenergic signalling in rat ventricular myocytes during the progression of heart failure *Cardiovasc Res* **113** 770-82

Schultz J E, Rose E, Yao Z and Gross G J 1995 Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts *Am J Physiol* **268** H2157-61

Schömig A, Fischer S, Kurz T, Richardt G and Schömig E 1987 Nonexocytotic release of endogenous noradrenaline in the ischemic and anoxic rat heart: mechanism and metabolic requirements *Circ Res* **60** 194-205

Sethi R, Saini H K, Guo X, Wang X, Elimban V and Dhalla N S 2007 Dependence of changes in beta-adrenoceptor signal transduction on type and stage of cardiac hypertrophy *J Appl Physiol (1985)* **102** 978-84

Shatemirova K K, Zelenshchikova V A and Min'ko I V 1990 [Catalytic properties of monoamine oxidases during adaptation to altitude chamber hypoxia] *Kosm Biol Aviakosm Med* **24** 54-6

Shenoy S K, McDonald P H, Kohout T A and Lefkowitz R J 2001 Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin *Science* **294** 1307-13

Shizukuda Y, Buttrick P M, Geenen D L, Borczuk A C, Kitsis R N and Sonnenblick E H 1998 beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy *Am J Physiol* **275** H961-8

Singh K, Xiao L, Remondino A, Sawyer D B and Colucci W S 2001 Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis *J Cell Physiol* **189** 257-65

Singh M, Thomas P, Shukla D, Tulsawani R, Saxena S and Bansal A 2013 Effect of subchronic hypobaric hypoxia on oxidative stress in rat heart *Appl Biochem Biotechnol* **169** 2405-19

Starnes J W, Taylor R P and Ciccolo J T 2005 Habitual low-intensity exercise does not protect against myocardial dysfunction after ischemia in rats *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **12** 169-74

Stein A B, Tang X L, Guo Y, Xuan Y T, Dawn B and Bolli R 2004 Delayed adaptation of the heart to stress: late preconditioning *Stroke* **35** 2676-9

Strader C D, Candelore M R, Hill W S, Sigal I S and Dixon R A 1989 Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor *J Biol Chem* **264** 13572-8

Strader C D, Sigal I S, Candelore M R, Rands E, Hill W S and Dixon R A 1988 Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function *J Biol Chem* **263** 10267-71

Strosberg A D 1993 Structure, function, and regulation of adrenergic receptors *Protein Sci* **2** 1198-209

Suematsu Y, Anttila V, Takamoto S and del Nido P 2004 Cardioprotection afforded by ischemic preconditioning interferes with chronic beta-blocker treatment *Scand Cardiovasc J* **38** 293-9

Taylor R P, Harris M B and Starnes J W 1999 Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content *Am J Physiol* **276** H1098-102

Timofeyev V, Myers R E, Kim H J, Woltz R L, Sirish P, Heiserman J P, Li N, Singapuri A, Tang T, Yarov-Yarovoy V, Yamoah E N, Hammond H K and Chiamvimonvat N 2013 Adenylyl cyclase subtype-specific compartmentalization: differential regulation of L-type Ca²⁺ current in ventricular myocytes *Circ Res* **112** 1567-76

Tong H, Bernstein D, Murphy E and Steenbergen C 2005 The role of beta-adrenergic receptor signaling in cardioprotection *FASEB J* **19** 983-5

Tse J, Huang M W, Leone R J, Weiss H R, He Y Q and Scholz P M 2000 Down regulation of myocardial beta1-adrenoceptor signal transduction system in pacing-induced failure in dogs with aortic stenosis-induced left ventricular hypertrophy *Mol Cell Biochem* **205** 67-73

Tual L, Morel O E, Favret F, Fouillit M, Guernier C, Buvry A, Germain L, Dhonneur G, Bernaudin J F and Richalet J P 2006 Carvedilol inhibits right ventricular hypertrophy induced by chronic hypobaric hypoxia *Pflugers Arch* **452** 371-9

Ungerer M, Böhm M, Elce J S, Erdmann E and Lohse M J 1993 Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart *Circulation* **87** 454-63

Vatner D E, Asai K, Iwase M, Ishikawa Y, Shannon R P, Homcy C J and Vatner S F 1999 Beta-adrenergic receptor-G protein-adenylyl cyclase signal transduction in the failing heart *Am J Cardiol* **83** 80H-5H

Voelkel N F, Hegstrand L, Reeves J T, McMurty I F and Molinoff P B 1981 Effects of hypoxia on density of beta-adrenergic receptors *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **50** 363-6

Wall T M, Sheehy R and Hartman J C 1994 Role of bradykinin in myocardial preconditioning *J Pharmacol Exp Ther* **270** 681-9

Wallace D C 2005 A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine *Annu Rev Genet* **39** 359-407

Wang Y, De Arcangelis V, Gao X, Ramani B, Jung Y S and Xiang Y 2008 Norepinephrine- and epinephrine-induced distinct beta2-adrenoceptor signaling is dictated by GRK2 phosphorylation in cardiomyocytes *J Biol Chem* **283** 1799-807

Wang Z H, Chen Y X, Zhang C M, Wu L, Yu Z, Cai X L, Guan Y, Zhou Z N and Yang H T 2011 Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301** H1695-705

Wauthy P, Pagnamenta A, Vassalli F, Naeije R and Brimiouille S 2004 Right ventricular adaptation to pulmonary hypertension: an interspecies comparison *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286** H1441-7

Winter R J, Dickinson K E, Rudd R M and Sever P S 1986 Tissue specific modulation of beta-adrenoceptor number in rats with chronic hypoxia with an attenuated response to down-regulation by salbutamol *Clin Sci (Lond)* **70** 159-65

Woo A Y, Song Y, Xiao R P and Zhu W 2015 Biased β 2-adrenoceptor signalling in heart failure: pathophysiology and drug discovery *Br J Pharmacol* **172** 5444-56

Xiao R P, Avdonin P, Zhou Y Y, Cheng H, Akhter S A, Eschenhagen T, Lefkowitz R J, Koch W J and Lakatta E G 1999 Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes *Circ Res* **84** 43-52

Xie Y, Zhu W Z, Zhu Y, Chen L, Zhou Z N and Yang H T 2004 Intermittent high altitude hypoxia protects the heart against lethal Ca²⁺ overload injury *Life Sci* **76** 559-72

Xu S, Wang P, Zhang H, Gong G, Gutierrez Cortes N, Zhu W, Yoon Y, Tian R and Wang W 2016 CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic β -AR stimulation *Nat Commun* **7** 13189

Xu W Q, Yu Z, Xie Y, Huang G Q, Shu X H, Zhu Y, Zhou Z N and Yang H T 2011 Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats *Basic Res Cardiol* **106** 329-42

- Xu Y, Ku B S, Yao H Y, Lin Y H, Ma X, Zhang Y H and Li X J 2005 The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice *Eur J Pharmacol* **518** 40-6
- Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T and Hori M 1999 Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation *J Exp Med* **189** 1699-706
- Yan F, Mu Y, Yan G, Liu J, Shen J and Luo G 2010 Antioxidant enzyme mimics with synergism *Mini Rev Med Chem* **10** 342-56
- Yan L, Vatner D E, O'Connor J P, Ivessa A, Ge H, Chen W, Hirotsu S, Ishikawa Y, Sadoshima J and Vatner S F 2007 Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress *Cell* **130** 247-58
- Yang X M, Philipp S, Downey J M and Cohen M V 2005 Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation *Basic Res Cardiol* **100** 57-63
- Yellon D M and Downey J M 2003 Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology *Physiol Rev* **83** 1113-51
- Yoshie H, Tobise K and Onodera S 1994 Intraventricular changes in the beta-adrenoceptor-adenylate cyclase system of the rat heart with the progress of monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy *Jpn Circ J* **58** 855-65
- Ytrehus K, Liu Y and Downey J M 1994 Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation *Am J Physiol* **266** H1145-52
- Yuan F, Zhang L, Li Y Q, Teng X, Tian S Y, Wang X R and Zhang Y 2017 Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia Improves Cardiac Function through Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress *Sci Rep* **7** 7922
- Zaccolo M 2009 cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies *Br J Pharmacol* **158** 50-60
- Zatta A J, Kin H, Yoshishige D, Jiang R, Wang N, Reeves J G, Mykytenko J, Guyton R A, Zhao Z Q, Caffrey J L and Vinten-Johansen J 2008 Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294** H1444-51
- Zaugg M, Xu W, Lucchinetti E, Shafiq S A, Jamali N Z and Siddiqui M A 2000 Beta-adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes *Circulation* **102** 344-50
- Zhao Z Q, Corvera J S, Halkos M E, Kerendi F, Wang N P, Guyton R A and Vinten-Johansen J 2003 Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during

reperfusion: comparison with ischemic preconditioning *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285** H579-88

Zhu W Z, Wang S Q, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown J H, Devic E, Kobilka B K, Cheng H and Xiao R P 2003 Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II *J Clin Invest* **111** 617-25

Zhu W Z, Xie Y, Chen L, Yang H T and Zhou Z N 2006 Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury *J Mol Cell Cardiol* **40** 96-106

Zhu W Z, Zheng M, Koch W J, Lefkowitz R J, Kobilka B K and Xiao R P 2001 Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** 1607-12

Zong P, Setty S, Sun W, Martinez R, Tune J D, Ehrenburg I V, Tkatchouk E N, Mallet R T and Downey H F 2004 Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction *Exp Biol Med (Maywood)* **229** 806-12

Zuo L, Roberts W J, Tolomello R C and Goins A R 2013 Ischemic and hypoxic preconditioning protect cardiac muscles via intracellular ROS signaling. *Front Biol.* **8** 305-11