

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Daniel Benák**

**Role demetylázy FTO a adipokinů v srdci: efekt chronické hypoxie**

**The role of demethylase FTO and adipokines in the heart:  
effect of chronic hypoxia**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Markéta Hlaváčková, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19. 4. 2017

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své školitelce Mgr. Markétě Hlaváčkové, Ph.D. za odborné vedení této práce, za teoretickou i praktickou pomoc při její realizaci, za trpělivost, kterou při tom prokázala, a v neposlední řadě za její přátelský přístup.

Děkuji RNDr. Janu Neckáři, Ph.D. za adaptaci zvířat, jejich odoperování a cenné rady při vyhodnocování rozsahu infarktu myokardu.

Děkuji doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za poskytnutí srdečních apexů pro měření cirkadiánní rytmicity.

Děkuji také prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc.; RNDr. Kristýně Holzerové, Ph.D.; Mgr. Anně Svatoňové, Ph.D.; Mgr. Petru Telenskému, Ph.D., Mgr. Ditě Kašparové; Mgr. Jaroslavu Hrdličkovi, Bc. Michaele Cyprové a Bc. Janě Vašinové; za jejich odbornou pomoc a cenné rady, které umožnili napsání této práce.

Děkuji i všem ostatním, kteří přispěli podporou, radou nebo doporučením.

## ABSTRAKT

Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje toleranci srdce k ischemicko-reperfuznímu poškození. Tato adaptace je umožněna řadou fyziologických změn na buněčné úrovni. Jednou z nich je změna v buněčném energetickém metabolismu. Tento proces může být regulován proteinem FTO (z angl. *fat mass and obesity associated*), demetylázou epigeneticky regulující buněčnou syntézu proteinů. Srdeční metabolismus může být také modulován adipokiny leptinem a adiponektinem. Cílem tohoto projektu bylo proto studovat roli FTO a adipokinů v chronicky hypoxickém srdci. Dospělí samci potkanů kmene Sprague Dawley byli adaptováni na dva modely kontinuální normobarické hypoxie (CNH; 12 % O<sub>2</sub> a 10 % O<sub>2</sub>; 3 týdny). CNH (10 % O<sub>2</sub>) redukovala u těchto zvířat rozsah infarktu myokardu o 20 %. CNH (12 % O<sub>2</sub>) nebyla kardioprotektivní. Hladina proteinu FTO byla měřena v tkáni levých (LV) a pravých (RV) komor, stejně jako v játrech a koncovém mozku hypoxických i normoxických zvířat. Za normoxie je hladina FTO v RV o 50 % vyšší než v LV. Ve vysoce metabolicky aktivních tkáních jater a koncového mozku jsou pak hladiny FTO vyšší dokonce 6krát a 11krát. CNH (12 % O<sub>2</sub>) vedla k významnému nárůstu hladiny proteinu FTO v srdci. Jednalo se o 21% nárůst v LV a 27% v RV. Hladiny v játrech a koncových mozcích nebyly CNH ovlivněny. Silnější CNH (10 % O<sub>2</sub>) zvyšuje protein FTO v tkáni LV výrazněji, a to o 77 %. Podle měření v srdečních apexech není v srdci žádná cirkadiánní rytmicita FTO (3 vzorky odebírány každé 3 hodiny od 8:00 do 8:00 dalšího dne). V případě adipokinů jsme vlivem CNH (12 % O<sub>2</sub>) pozorovali významný 52% pokles adiponektinu v plazmě a 25% nárůst leptinu v tkáni LV, který však nebyl statisticky významný. Získané výsledky prokazují, že CNH zvyšuje v srdci hladinu demetylázy FTO, která tak může přispívat ke vzniku kardioprotektivního fenotypu.

**Klíčová slova:** srdce, kardioprotekce, hypoxie, FTO, adipokiny

## ABSTRACT

Adaptation to chronic hypoxia renders the heart more tolerant to ischemia/reperfusion injury. This adaptation is enabled by many physiological changes on the cellular level. One of these changes is a shift in the cellular energy metabolism. This process can be regulated by fat mass and obesity associated (FTO) protein, demethylase epigenetically regulating cell protein synthesis. Heart metabolism can be also modulated by adipokines leptin and adiponectin. This project aimed to study the role of FTO and adipokines in the chronically hypoxic heart. Adult male Sprague Dawley rats were adapted to two models of continuous normobaric hypoxia (CNH; 10% O<sub>2</sub> and 12% O<sub>2</sub>; 3 weeks). CNH (10% O<sub>2</sub>) reduced the size of myocardial infarction by 20 % in these animals. CNH (12% O<sub>2</sub>) was not cardioprotective. The FTO protein level was measured in the tissues of left (LV) and right (RV) ventricles of the heart and moreover in the liver and the cerebrum of both hypoxic and normoxic animals. Under the normoxic conditions, the level of FTO in the RV was by 50% higher than in the LV. In the highly active metabolic tissues of the liver and the cerebrum, the levels of FTO were even 6 times and 11 times higher than in the LV. CNH (12% O<sub>2</sub>) led to a significant increase of FTO protein level in the heart by 21% in the LV and by 27% in the RV. In the liver and the cerebrum, the levels were unaffected by CNH. According to the analyses in the heart apexes, there is no circadian rhythmicity (3 samples collected every 3 hours from 8 AM to the next day 8 AM) of FTO protein in the heart. Regarding adipokine levels after CNH (12% O<sub>2</sub>) adaptation, we observed significantly lower levels of adiponectin (52% decrease) in the plasma and slightly increasing trend of leptin levels in the LV (25% increase), which was not statistically significant. Our results show that CNH increases level of the demethylase FTO in the heart, which may potentially participate in the ischemia-resistant phenotype.

**Key words:** heart, cardioprotection, hypoxia, FTO, adipokines

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>6</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>12</b>
2.1. Hypoxie.....	12
2.1.1. Kardioprotektivní účinek chronické hypoxie.....	12
2.1.1.1. Molekulární mechanismus kardioprotekce zprostředkované adaptací na chronickou hypoxii .....	13
2.2. FTO .....	14
2.2.1. Biochemická funkce FTO .....	15
2.2.2. Struktura FTO .....	16
2.2.3. Fyziologická funkce FTO .....	17
2.2.3.1. Fyziologická funkce FTO v srdci .....	18
2.2.4. Jednonukleotidové polymorfismy v genu pro FTO .....	19
2.3. Adipokiny .....	19
2.3.1. Leptin.....	20
2.3.1.1. Fyziologická funkce leptinu v srdci.....	20
2.3.2. Adiponektin .....	22
2.3.2.1. Fyziologická funkce adiponektinu v srdci.....	22
2.3.3. Poměr leptinu k adiponektinu jako marker kardiovaskulárních onemocnění.....	23
<b>3. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>25</b>
<b>4. METODIKA</b> .....	<b>27</b>
4.1. Laboratorní zvířata a adaptace na chronickou hypoxii .....	27
4.2. Odběr tkáně .....	27
4.3. Homogenizace vzorků .....	27
4.4. SDS-PAGE, Western blot a imunodetekce .....	27
4.5. ELISA.....	30
4.6. qPCR .....	30

4.7.	Experimentální model infarktu myokardu.....	31
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>32</b>
5.1.	Hmotnostní parametry zvířat.....	32
5.2.	Velikost infarktu myokardu: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ) a (10 % O <sub>2</sub> ) .....	33
5.3.	Detekce FTO v tkáních.....	34
5.3.1.	Celkový protein v tkáních.....	35
5.3.2.	Referenční proteiny pro hypoxii.....	35
5.4.	Cirkadiánní rytmicita FTO v srdci .....	36
5.5.	Zastoupení FTO v tkáních.....	37
5.6.	Hladina FTO v tkáních: efekt adaptace na CNH .....	38
5.6.1.	Hladina FTO v tkáních: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ).....	38
5.6.2.	Hladina mRNA a proteinu FTO v levé komoře: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ) a (10 % O <sub>2</sub> ).....	39
5.7.	Hladina adipokinů v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ) .....	40
5.7.1.	Hladina leptinu v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ).....	40
5.7.2.	Hladina adiponektinu v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ) .....	40
5.7.3.	Poměr hladin leptinu a adiponektinu v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ) .....	41
<b>6.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
6.1.	Hmotnostní parametry zvířat.....	42
6.2.	Velikost infarktu myokardu: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ) a (10 % O <sub>2</sub> ) .....	42
6.3.	Zastoupení FTO v tkáních.....	43
6.4.	Cirkadiánní rytmicita FTO v srdci .....	43
6.5.	Hladina FTO v tkáních: efekt adaptace na CNH .....	43
6.6.	Hladina adipokinů v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O <sub>2</sub> ) .....	44
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>46</b>
	<b>CITOVANÁ LITERATURA .....</b>	<b>48</b>

## SEZNAM ZKRATEK

AAR	ischemií ohrožená oblast
ABH	AlkB homolog
AdipoR	adiponektinový receptor
AGRP	z angl. <i>Agouti-related protein</i>
Akt	proteinkináza B
ALKHB5	AlkB homolog 5
AMPK	5'-AMP aktivovaná proteinkináza
BAD	protein z rodiny Bcl-2 účastníci se apoptózy
BAX	protein z rodiny Bcl-2 účastníci se apoptózy
BIM	protein z rodiny Bcl-2 účastníci se apoptózy
BW	tělesná hmotnost
cDNA	komplementární DNA
CNH	kontinuální normobarická hypoxie
CRP	C-reaktivní protein
CTD	C-koncová doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGTA	z angl. <i>ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
EKG	elektrokardiogram
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
Erk1/2	z angl. <i>extra.cellular signal-regulated kinase</i>
FiO <sub>2</sub>	inspirační koncentrace kyslíku
<i>Ft</i>	z angl. <i>fused toes</i>
FTO	z angl. <i>fat mass and obesity associated</i>



GLUT-1	glukózový transportér 1
HEK293T	z angl. <i>human embryonic kidney 293T</i>
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
HW/BW	hmotnostní index srdce
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-6	interleukin 6
IPC	ischemický preconditioning
I/R poškození	ischemicko-reperfuzní poškození
JAK	Janusova kináza
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LV	levá komora
LV/BW	hmotnostní index levé komory
m <sup>6</sup> A	N <sup>6</sup> -metyladenosin
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkináza
METTL3	z angl. <i>methyltransferase like 3</i>
MGN3-1	z angl. <i>mouse ghrelinoma 3-1</i>
mPTP	mitochondriální permeabilní tranzitní pór
mRNA	messenger RNA
mTORC1	z angl. <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
n	počet zvířat
N	normoxie
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NLS	jaderný lokalizační signál
NTD	N-koncová doména

Ob-R	leptinový receptor
P	hladina statistické významnosti
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	fosfoinositid-3-kináza
POMC	proopiomelanokortin
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RISK	z angl. <i>reperfusion injury salvage kinase pathway</i>
rRNA	ribozomální RNA
<i>rs</i>	z angl. <i>reference SNP</i>
RV	pravá komora
RV/BW	hmotnostní index pravé komory
siRNA	z angl. <i>small interfering RNA</i>
SDS	dodecylsulfát sodný
SEM	střední chyba průměru
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
STAT-3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$

# 1. ÚVOD

I přes velký pokrok v medicíně zůstávají kardiovaskulární onemocnění (KVO) celosvětově stále na první příčce žebříčku příčin smrti. Nejběžnější formou KVO je přitom ischemická choroba srdeční (ICHS), do které se řadí nechvalně známý infarkt myokardu. Cílem vědců po celém světě je proto vyvinout nové, klinicky aplikovatelné kardioprotektivní metody. Jako zdroj inspirace přitom mohou sloužit vrozené protektivní mechanismy, které se v těle samy aktivují, pokud je člověk vystaven chronické hypoxii. Výsledky různých studií ukázaly, že po adaptaci na chronickou hypoxii je myokard odolnější ke všem projevům akutního nedostatku kyslíku, přičemž se kromě rozsahu infarktu snižuje také počet ischemických arytmí a zlepšuje se obnova kontraktility myokardu během obnovení krevního průtoku. Přesto, že je již známa řada signálních molekul hrajících potenciální roli v kardioprotekci vyvolané adaptací na chronickou hypoxii, vlastní mechanismus tohoto jevu nebyl dosud plně objasněn.

Podstatnou roli zde pravděpodobně hraje změna v buněčném metabolismu hypoxického myokardu. Svou roli zde může mít i nedávno objevený protein FTO (z angl. *fat mass and obesity associated*), který metabolismus ovlivňuje, a který byl objeven také v srdci. Funkce FTO spočívá v odstraňování metylové skupiny N<sup>6</sup>-metyladenosinu (m<sup>6</sup>A) v mRNA. Metylace adenosinu je přitom významnou epigenetickou modifikací vedoucí k rozkladu této nukleové kyseliny. FTO tedy rozhoduje o osudu mRNA a ovlivňuje tak regulaci genové exprese. Hladina FTO navíc koreluje s hladinami leptinu. Tento adipokin hraje roli v energetické homeostáze organismu, ovlivňuje metabolismus srdeční svaloviny a jeho hladiny reagují na nedostatek kyslíku. Přesto, že jeho vysoké hladiny bývají spojovány spíše s rizikem vzniku KVO, byly u něj také pozorovány kardioprotektivní účinky. Za jednoznačně prospěšný protein bývá považován naopak jiný adipokin – adiponektin. I ten reguluje metabolismus myokardu a dokáže reagovat na množství kyslíku v organismu.

V této práci jsme proto analyzovali vliv dvou modelů chronické hypoxie na rozsah infarktu myokardu. Studovali jsme, zda adaptace na chronickou hypoxii ovlivňuje hladinu demetylázy FTO v levé a pravé komoře myokardu. Pro porovnání jsme také zkoumali vliv hypoxie na hladinu FTO v dalších metabolicky aktivních tkáních – játrech a koncovém mozku. Protože metabolismus souvisí s denní dobou, a protože FTO ovlivňuje expresi hodinových genů, zjišťovali jsme také, zda se v srdci objevuje nějaká cirkadiánní rytmicita této demetylázy. Zároveň jsme měřili hladiny adipokinů leptinu a adiponektinu v plazmě a levých komorách u normoxických a hypoxických potkanů.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Hypoxie

Hypoxie je stav, kdy tkáň nemá dostatek kyslíku pro pokrytí svých metabolických potřeb. Může být navozena různými mechanismy. Nejčastější formou hypoxie je tzv. hypoxie ischemická (typy hypoxií viz. tabulka 1), která je způsobená omezením nebo přerušением krevního toku v koronárních cévách (Ošťádal a Kolář, 2007). Její nejběžnější příčinou je ischemická choroba srdeční (ICHS), která je nejčastějším důvodem smrti celosvětově. Za rok 2015 na její následky zemřelo 8,76 milionů lidí (Světová zdravotnická organizace, 2017). Dalším typem hypoxie je tzv. hypoxie hypoxická, kdy je průtok cév normální, ale je snížený parciální tlak kyslíku v arteriální krvi. Tento stav je spojován s chronickým *cor pulmonale* (plicní srdce) nebo se spánkovou apnoe. Existují však i fyziologické formy hypoxické hypoxie. Jednou z nich je pobyt ve vysokých nadmořských výškách, kde je nízký tlak vzduchu. V druhém případě se jedná o hypoxickou adaptaci plodu v děloze matky, kde parciální tlak kyslíku odpovídá přibližně výšce 8000 m.n.m. Dále existuje také hypoxie anémická způsobená sníženou transportní kapacitou krve a hypoxie cytotoxická, která je způsobena poškozením mitochondriálních enzymů využívajících kyslík (Ošťádal a Kolář, 2007; Silbernagl a Despopoulos, 2004).

**Tabulka 1: Typy tkáňové hypoxie dle příčiny**

Typ hypoxie	Příčina
Ischemická	nedostatečné prokrvení tkáně
Hypoxická	nízký parciální tlak kyslíku v krvi
Anémická	snížená transportní kapacita krve
Cytotoxická	poškození mitochondriálních enzymů

#### 2.1.1. Kardioprotektivní účinek chronické hypoxie

Buňky vystavené dlouhotrvající chronické hypoxii se na tento stav snaží adaptovat řadou fyziologických změn. Tyto fyziologické změny pak umožňují buňkám lépe se vypořádat s případným akutním nedostatkem kyslíku, jehož klasickým příkladem je infarkt myokardu. Adaptace na chronickou hypoxii na druhou stranu působí na kardiovaskulární systém také negativně. Dochází k rozvoji plicní hypertenze vedoucí k hypertrofii pravé komory srdeční (Ošťádal a Kolář, 2007).

Kardioprotektivní účinek chronické hypoxie je znám již od 50. let dvacátého století. Tehdy byl u skupiny peruánských obyvatel And pozorován signifikantně nižší výskyt infarktu myokardu než u lidí žijících blíže hladiny moře. Tento jev byl správně připisován adaptaci na nízký parciální tlak kyslíku ve větších nadmořských výškách (Burtscher, 2013; Hurtado, 1960) a byl potvrzen také experimentálně (Poupa a kol., 1966). Výsledky různých studií ukázaly, že po adaptaci na chronickou hypoxii je myokard odolnější ke všem projevům akutního nedostatku kyslíku, přičemž se kromě zmenšení rozsahu infarktu snižuje také počet ischemických arytmií a zlepšuje se obnova kontraktility myokardu během reperfúze (shrnutí v Kolář a Ošťádal, 2004).

Kardioprotekci navozenou adaptací na chronickou hypoxii nelze dále prohlubovat ischemickým preconditioningem (IPC) ani pravidelnou fyzickou zátěží (Alánová a kol., 2017; Neckář a kol., 2002). Je proto zřejmé, že tyto další protektivní modely sdílí s adaptací na chronickou hypoxii stejné signální dráhy. Hypoxie má však proti fyzické aktivitě a IPC podstatnou terapeutickou výhodu. Kardioprotektivní účinky IPC a fyzické aktivity totiž trvají pár dní (Bolli, 2000; Lennon a kol., 2004), zatímco efekt adaptace na chronickou hypoxii přetrvává až několik týdnů (Neckář a kol., 2004).

#### *2.1.1.1. Molekulární mechanismus kardioprotekce zprostředkované adaptací na chronickou hypoxii*

V dnešní době je známa již celá řada molekulárních mechanismů účastnících se hypoxií zprostředkované kardioprotekce. Svou roli zde hrají ATP senzitivní draslíkové kanály, reaktivní formy kyslíku a dusíku, cytokiny, erythropoetin nebo různé druhy proteinkináz a transkripčních faktorů (Chytilová a kol., 2015; Kolář a Ošťádal, 2004). Detailní mechanismus buněčné kardioprotektivní signalizace aktivovaný adaptací na chronickou hypoxii však stále není plně objasněn.

Podstatnou úlohu zde pravděpodobně mají hypoxií indukované faktory (HIFs). Jedná se o heterodimerní transkripční faktory, které se skládají z podjednotky HIF $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  či HIF-3 $\alpha$ ), která je v případě dostatku kyslíku degradována, a stabilní podjednotky HIF $\beta$  (opět HIF-1 $\beta$ , HIF-2 $\beta$  či HIF-3 $\beta$ ). Nepostradatelným genem, jehož delece je u savců letální již v prenatálním období, je HIF-1 (Formenti a kol., 2010). Exprese, stabilita i transkripční aktivita jeho podjednotky HIF-1 $\alpha$  se při hypoxii exponenciálně zvyšuje (Michiels a kol., 2002). HIF-1 $\alpha$  je stěžejní mediátor pro zvýšení transportu kyslíku skrze zvýšení exprese hormonu erythropoetinu a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru. Jakýkoliv nedostatek kyslíku v tkáni, ať už *in vivo* nebo *in vitro*, pravděpodobně slouží jako stimul pro aktivaci HIF-1 $\alpha$  zprostředkované adaptivní odpovědi (Haddad a Harb, 2005; Wenger, 2002). Hypoxie vede také k aktivaci

transkripčního faktoru označovaného jako nukleární faktor kappa B (NF- $\kappa$ B). Zvýšená exprese těchto transkripčních faktorů vede v hypoxickém myokardu také ke zvýšení glykolytické kapacity buněk. Dochází k zvýšení exprese glukózového transportéru 1 (GLUT-1) zprostředkujícího vstup glukózy do buněk a dalších glykolytických genů (Van der Heiden a kol., 2010; Wenger, 2002). To umožňuje zvýšení metabolismu glukózy. Metabolismus mastných kyselin, primárního energetického substrátu myokardu, je přitom snížen. Zvyšuje se také biogeneze mitochondrií. Díky tomu se v hypoxickém myokardu posiluje účinnost produkce energie a zesiluje se jeho mitochondriální bioenergetická kapacita, což umožňuje zachování dostatečné srdeční kontraktility i během hypoxického stavu (Essop, 2007). Změna metabolismu způsobená adaptací na chronickou hypoxii je na systémové úrovni doprovázena také snížením příjmu potravy a s tím souvisejícím poklesem váhy, což bylo potvrzeno jak u člověka, tak na zvířecích modelech (Raff, 2003; Tschop a Morrison, 2001). Za tímto jevem může stát hypoxií stimulované zvýšení exprese anorexigeního hormonu leptinu, způsobené aktivitou transkripčního faktoru HIF (Grosfeld a kol., 2002; Chaiban a kol., 2008). Leptin je sice produkován především bílou tukovou tkání, nicméně v menší míře je exprimován také v dalších tkáních včetně srdce (Purdham a kol., 2004). Leptin tedy na orgánové úrovni pravděpodobně působí také na myokard a hraje zde roli v hypoxií zprostředkované kardioprotekci (Bouhidel a kol., 2008; Smith a kol., 2006).

Chronická hypoxie tedy na buněčné úrovni vyvolává změnu exprese určitých proteinů, které buňce dále pomáhají vypořádat se s nedostatkem kyslíku, například změnou buněčného metabolismu. Jedním z možných mechanismů, kterými lze ovlivnit expresi těchto cílových proteinů je zvýšení stability jejich „messenger“ RNA (mRNA). Bylo zjištěno, že přítomnost N<sup>6</sup>-metyladenosinu (m<sup>6</sup>A) v mRNA vede k jejímu rozpadu (Wang a kol., 2014). Regulace této epigenetické modifikace mRNA tak může mít klíčovou roli v adaptaci buněčného metabolismu na chronickou hypoxii a s ní spojené kardioprotekci.

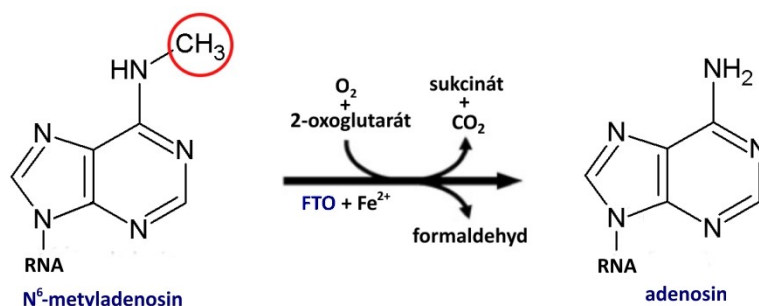
## 2.2. FTO

Gen pro FTO (z angl. *fat mass and obesity associated*) byl objeven již v roce 1999 jako jeden z 6 deletovaných genů u myši s tzv. *Ft* (z angl. *fused toes* – „srůstání prstů“) fenotypem. Pro svou velikost byl tehdy pojmenován jako *Fatso* („tlustoch“). Právě odtud pak pochází zkrácený název tohoto genu, respektive proteinu (Larder a kol., 2011; Peters a kol., 1999). Kromě myši se FTO vyskytuje i u dalších obratlovců, včetně člověka. Jeho vysoce konzervované homology byly objeveny také u řas. Oproti tomu nebyly doposud nalezeny u rostlin, hub ani u bezobratlých živočichů (Robbens a kol., 2008).

### 2.2.1. Biochemická funkce FTO

Produktem FTO genu je 58 kDa protein (Peters a kol., 1999) ze skupiny dioxygenáz, jejichž funkce je závislá na přítomnosti 2-oxoglutarátu a železnatých iontů. Tyto enzymy patřící do rodiny ABH (AlkB homolog; eukaryotické homology DNA-reparačního enzymu bakterie *Escherichia coli*) odstraňují pomocí oxidativní dealkylace z dusíkatých bází nukleových kyselin alkylové skupiny, přičemž jako vedlejší produkt vzniká sukcinát, formaldehyd a oxid uhličitý (Gerken a kol., 2007; Gulati a Yeo, 2013).

*In vitro* experimenty odhalily, že biochemická funkce FTO spočívá zejména v demetylací ribonukleových kyselin. Hlavním substrátem pro FTO je především m<sup>6</sup>A z mRNA, jež je přeměňován na adenosin (obrázek 1). Možná je však také demetylace 3-metyluridinu z ribosomální RNA (rRNA) na uridin. S nižší afinitou byla pozorována i demetylace jednořetězcových DNA, a sice opět m<sup>6</sup>A na adenosin nebo 3-methylthymidinu na thymidin (Jia a kol., 2008; Jia a kol., 2011).



**Obrázek 1: Biochemická funkce FTO – demetylace ribonukleových kyselin, zejména N<sup>6</sup>-metyladenosinu**

Převzato a upraveno z (Gulati a Yeo, 2013).

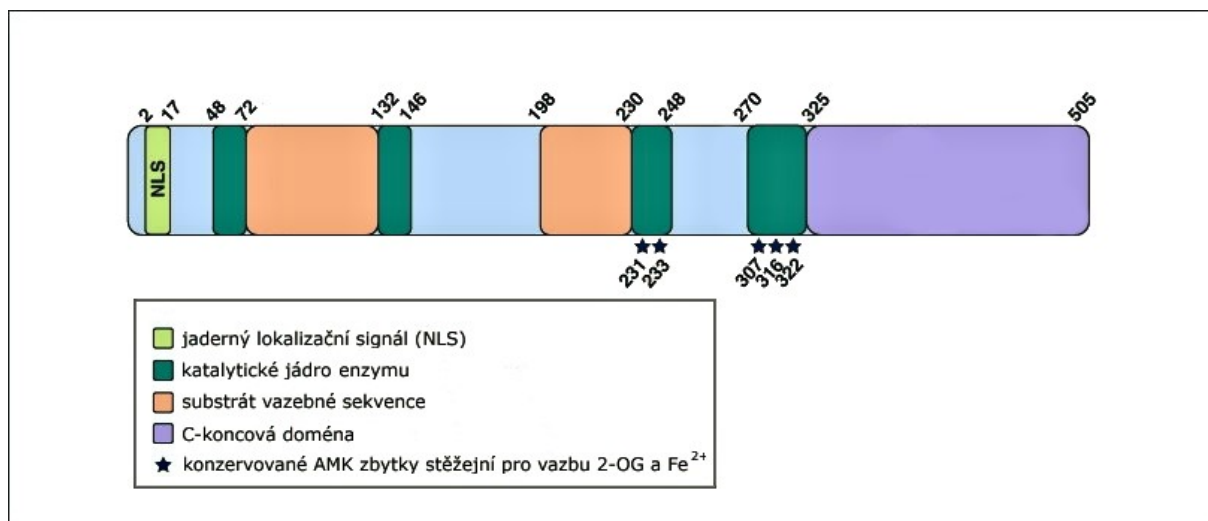
Metylace adenosinu je nejčastější modifikací buněčné mRNA (Desrosiers a kol., 1974). Je zprostředkovávána metyltransferázovým komplexem s katalytickou podjednotkou METTL3 (z angl. *methyltransferase like 3*) a hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech, od gametogeneze až po karcinogenezi (shrnutu Wu a kol., 2016). Přítomnost m<sup>6</sup>A v mRNA totiž vede k jejímu rozpadu a tím významně reguluje syntézu proteinů (Wang a kol., 2014). Aktivita demetylázy FTO tak může regulací této epigenetické modifikace měnit syntézu cílových proteinů a tím ovlivňovat celou řadu buněčných procesů. FTO však není jedinou známou demetylázou m<sup>6</sup>A. Byla objevena také demetyláza ALKBH5 (AlkB homolog 5), která však narozdíl od FTO demetyluje m<sup>6</sup>A bez tvorby vedlejších produktů (Zheng a kol., 2013). Dalším podstatným rozdílem těchto dvou demetyláz je jejich distribuce v tkáních. Zatímco exprese FTO je nejvýraznější v mozku, ALKBH5 je nejvíce exprimován ve varlatech, což naznačuje

rozdílné fyziologické funkce obou demetyláz (Gerken a kol., 2007; Wu a kol., 2016; Zheng a kol., 2013).

Existují také indicie, že FTO může působit dokonce jako transkripční koaktivátor, protože zvyšuje vazbu transkripčních faktorů (konkrétně *CCAAT/enhancer binding proteins*) na DNA. Tyto faktory přitom hrají důležitou úlohu v procesu regulace adipogeneze (Wu a kol., 2010). Uvažuje se také o tom, že by FTO mohlo sloužit jako senzor cirkulujících aminokyselin skrze působení na mTORC1 (z angl. *mammalian target of rapamycin complex 1*) signalizaci (Gulati a kol., 2013). Tato signalizace koordinuje buněčný růst s nutričním stavem buněk (Dyachok a kol., 2016). Degradace FTO způsobená deprivací esenciálních aminokyselin vede k nižší aktivaci mTORC1 dráhy a tím ke zpomalení buněčného růstu (Gulati a kol., 2013; Cheung a kol., 2013).

### 2.2.2. Struktura FTO

Krystalografické studie ukázaly, že se FTO skládá ze dvou domén (obrázek 2). N-koncová doména (NTD) obsahuje katalytické jádro enzymu tvořené zejména beta-helixy. Alfa-helikální C-koncová doména (CTD) pak pravděpodobně pomáhá stabilizovat NTD. NTD obsahuje také jaderný lokalizační signál (NLS), důležitý pro transport enzymu do jádra buňky, kde se primárně lokalizuje (Gerken a kol., 2007, Han a kol., 2010, Chen a kol., 2016). Je však přítomný také v cytosolu (Gulati a kol., 2014).



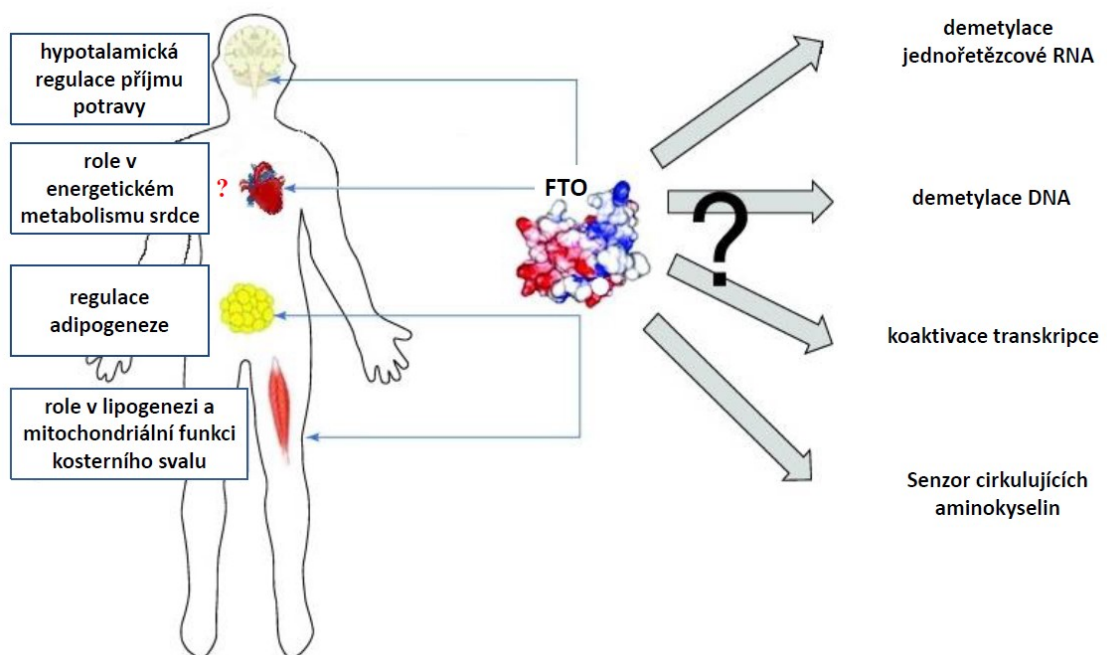
**Obrázek 2: Struktura lidského FTO**

AMK – aminokyseliny; 2-OG – 2-oxoglutarát. Převzato a upraveno z (Larder a kol., 2011).



### 2.2.3. Fyziologická funkce FTO

Exprese FTO je ubikvitní. Výrazná je v mozku, zejména v hypothalamických jádrech zodpovědných za regulaci příjmu potravy, jakými jsou *nucleus arcuatus*, *ncl. paraventricularis*, *ncl. dorsomedialis* a *ncl. ventromedialis*. V ostatních orgánech, včetně srdce, je pak exprese FTO podstatně nižší, nicméně přítomná, z čehož lze usuzovat o regulaci orgánově specifických funkcí (Gerken a kol., 2007). FTO zřejmě hraje důležitou roli v různých fyziologických i patofyziologických procesech (obrázek 3), např. v regulaci příjmu potravy, metabolismu nebo adipogenezi (Larder a kol., 2011).



**Obrázek 3: Funkce FTO**

Převzato a upraveno z (Larder a kol., 2011).

Globální delece FTO u myši vedla, přepočteno na váhu, ke zvýšenému příjmu potravy, ale také ke zvýšenému metabolickému výdeji. Fyzická aktivita byla oproti kontrolám nižší. Výsledkem bylo signifikantní snížení hmotnosti zvířat. Zvířata s delecí FTO prokazovala zvýšenou postnatální úmrtnost, přeživší jedinci potom trpěli celoživotními růstovými retardacemi (Fischer a kol., 2009). V experimentu s myši s nadměrnou ubikvitní expresí FTO byl pozorován taktéž zvýšený příjem potravy. V tomto případě ovšem nebyl zvýšen metabolický výdej a zvířata proto nabývala na váze (Church a kol., 2010).

Zvýšení exprese FTO v hypothalamickém jádru *ncl. arcuatus* vedla u potkanů ke snížení příjmu potravy, zatímco jeho potlačená exprese zde vedla k jejímu zvýšení. Hladiny mRNA *Agouti-related* proteinu (AGRP), proopiomelanokortinu (POMC) ani neuropeptidu Y, tedy proteinů klasicky spojovaných s kontrolou příjmu potravy, zde nebyly nijak ovlivněny. Došlo

ovšem ke změně exprese signálního transduktoru a aktivátoru transkripce 3 (STAT-3), molekuly důležité v leptinové signalizaci (Tung a kol., 2010). Leptin, anorexigenní adipokin snižující v hypothalamu chuť k jídlu, zde snižuje expresi FTO (Wang a kol., 2011).

Hladina FTO koreluje také s hladinami orexigenních látek. V buněčných liniích myších MGN3-1 (z angl. *mouse ghrelinoma 3-1*) a lidských HEK293T (z angl. *human embryonic kidney 2937*) buňkách zvýšená exprese FTO zvyšuje expresi a hladinu proteinu ghrelinu, hormonu vyvolávajícího chuť k jídlu. To se děje zřejmě díky demetylaci m<sup>6</sup>A jeho mRNA. Obdobný efekt byl prokázán u lidí s mutací v genu pro FTO, zodpovědné za vyšší expresi tohoto genu. V jejich krevních buňkách bylo pozorováno zvýšené množství ghrelinové mRNA a také snížená metylace m<sup>6</sup>A v této mRNA (Karra a kol., 2013).

Je známo, že FTO ovlivňuje také metabolismus kosterní svaloviny. Na lidských myocytech bylo pozorováno, že zvýšení exprese FTO vede ke zvýšené expresi genů klíčových pro lipogenezi, což zde způsobuje signifikantní zvýšení lipogeneze a akumulaci tukových zásob. Ruku v ruce s tím FTO v těchto buňkách navozuje také pokles oxidativní funkce mitochondrií (Bravard a kol., 2011).

Mutace vedoucí ke ztrátě funkce FTO pozorovaná u devíti příbuzných jedinců jedné palestinské rodiny vedla u postižených k postnatálním růstovým retardacím, mikrocefaliím, opožděním psychomotorického vývoje a obličejovým dysmorfiiím. V některých případech se objevily také mozkové malformace, rozštěpy patra a srdeční defekty. Rozsáhlá poškození vedla ke smrti během 3 let života (Boissel a kol., 2009). Ukázalo se také, že lidé trpící diabetem 2. typu mají ve svých svalech významně zvýšené množství FTO. Svalové defekty charakteristické pro tuto nemoc tak mohou být částečně zprostředkovány právě FTO (Bravard a kol., 2011).

#### 2.2.3.1. Fyziologická funkce FTO v srdci

FTO je kromě ostatních tkání exprimováno i v srdci, kde se pravděpodobně také účastní určitých fyziologických a patofyziologických procesů. U myší s globální delecí genu pro FTO byla pozorována proarytmogenní remodelace myokardu (Carnevali a kol., 2014). V srdci také dochází k interakcím FTO s významným anorexigenním adipokinem leptinem. V kardiomyocytech leptin signifikantně zvyšuje expresi FTO (působí zde tedy opačně než v mozku). Tato buněčná signalizace vede pravděpodobně přes dlouhou isoformu leptinového receptoru (Ob-Rb) na plazmatické membráně kardiomyocytů a dále pokračuje aktivací STAT-3, transkripčního faktoru umožňujícího přepis FTO genu. Není proto překvapivé, že protilátka proti leptinovému receptoru Ob-Rb u kardiomyocytů expresi FTO snižuje. Leptin způsobuje v srdci hypertrofii kardiomyocytů. Downregulace FTO pomocí small interfering RNA (siRNA)

tomuto jevu zabraňuje. FTO se tedy v myokardu podílí na hypertrofii kardiomyocytů zprostředkované leptinem (Gan a kol., 2013).

Je již dobře známo, že FTO reguluje metabolismus kosterní svaloviny. Role FTO v regulaci metabolismu srdce však nebyla doposud studována. Objasnit tuto roli by mohla pomoci právě adaptace na chronickou hypoxii, během které dochází ke změně buněčného metabolismu srdce.

#### 2.2.4. Jednonukleotidové polymorfismy v genu pro FTO

Celogenomové asociační studie v roce 2007 prokázaly, že určité jednonukleotidové polymorfismy (SNP; z angl. *single nucleotide polymorphism*) v intronu 1 lidského FTO genu (chromozom 16) jsou spojeny se zvýšeným rizikem obezity (Frayling a kol., 2007; Hinney a kol., 2007). Od té doby bylo v genu pro FTO objeveno mnoho různých, v populaci rozšířených SNP, které mají negativní vliv na zdraví člověka. Tyto SNP jsou v literatuře označovány identifikačním číslem, kterým předchází písmena „rs“ (z angl. *reference SNP*).

Různé genetické varianty FTO jsou spojovány také s rizikem KVO. V roce 2009 bylo zjištěno, že FTO rs9939609 je asociováno s vysokými hladinami C-reaktivního proteinu (CRP) v plazmě (Fisher a kol., 2009). CRP je přitom rizikovým faktorem KVO (Pearson a kol., 2003). Zvýšená frekvence KVO u lidí s rs9939609 byla následně skutečně pozorována (Aijala a kol., 2015; Lappalainen a kol., 2011; Liu a kol., 2013). Byla také zjištěna spojitost tohoto SNP se zvýšeným krevním tlakem a s rizikem aortální stenózy (Pausova a kol., 2009; Thron a kol., 2015). FTO rs17817449 je zase spojováno s rizikem vzniku akutního koronárního syndromu (Hubáček a kol., 2010). Všechny tyto klinické studie ukazují, že fyziologická role FTO v myokardu je významná.

### 2.3. Adipokiny

V roce 1987 bylo zjištěno, že bílá tuková tkáň neslouží pouze jako zásobárna energie, tepelná izolace a mechanická ochrana pro vnitřní orgány, ale že funguje také jako endokrinní orgán (Siiteri, 1987; Kershaw a Flier, 2004). Chemické mediátory produkované adipocyty začaly být později souhrnně označovány jako adipokiny či adipocytokiny. Významným milníkem ve studiu adipokinů byl objev leptinu v roce 1994. Kromě leptinu se mezi adipokiny řadí také adiponektin, resistin, visfatin, apelin, omentin, ale například také cytokiny jako TNF- $\alpha$ , interleukin 6 (IL-6) a mnoho dalších (shrnuto v Blüher a Mantzoros, 2015; Fasshauer a Blüher, 2015; Mattu a Randeve, 2013). Adipokiny jsou však v určitém množství tvořeny i v jiných tkáních včetně srdce, kde mohou lokálně ovlivňovat fyziologické procesy (Mattu a Randeve, 2013).

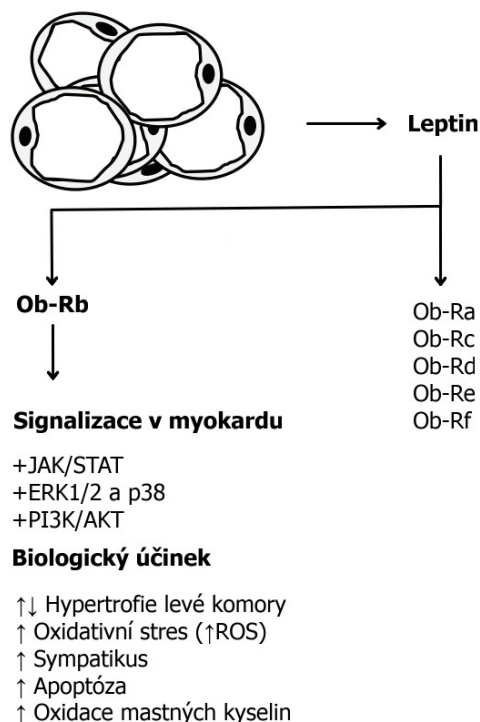
### 2.3.1. Leptin

Leptin, první popsáný adipokin, je 16 kDa protein kódovaný *obese (ob)* genem (Zhang a kol., 1994). Produkce leptinu je výrazná zejména v bílé tukové tkáni a primárně ovlivňuje příjem potravy a výdej energie skrze signalizaci v hypothalamu (Ashima, 2005). Signalizace zprostředkovaná leptinem probíhá přes vazbu na receptory v plazmatické membráně cílových buněk. Bylo popsáno 6 isoform leptinového receptoru Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re a Ob-Rf. Hlavní roli v leptinové signalizaci hraje dlouhá isoforma leptinového receptoru Ob-Rb (Lee a kol., 1996). Navázáním leptinu na Ob-Rb dochází k aktivaci tzv. Janusovy kinázy 2 (JAK2), která dále fosforyluje transkripční faktor STAT-3, ten dimerizuje a translokuje do jádra, kde umožňuje expresi specifických genů, včetně FTO (Gan a kol., 2013; Zabeau a kol., 2003). Tato buněčná signalizace bývá označována jako tzv. JAK/STAT dráha. Kromě této hlavní signální dráhy leptin aktivuje také 5'-AMP aktivovanou proteinkinázu (AMPK). Bylo prokázáno, že leptin skrze AMPK dráhu ovlivňuje metabolismus kosterního svalu zvýšením oxidace mastných kyselin (Minokoshi a kol., 2002). Leptin dále dokáže aktivovat MAPK (mitogeny aktivovaná proteinkináza) a PI3K (fosfoinositid-3-kináza) dráhy (Frühbeck, 2006).

#### 2.3.1.1. Fyziologická funkce leptinu v srdci

Leptin a jeho receptory jsou přítomny v srdeční tkáni a jejich produkce byla potvrzena také přímo v kardiomyocytech. Může se zde tak účastnit lokálních fyziologických i patofyziologických procesů (Karmazyn a kol., 2008; Purdham a kol., 2004). Hlavní funkcí leptinu v srdci je snížení srdečního výdeje (Nickola a kol., 2000). Leptin však ovlivňuje také srdeční metabolismus. Bylo zjištěno, že v srdci aktivuje oxidaci mastných kyselin a lipolýzu triacylglycerolů, a to, na rozdíl od kosterního svalu, zejména nezávisle na AMPK (Atkinson a kol., 2002; Sharma a kol., 2009). Zde se tak zřejmě děje skrze aktivaci JAK/STAT dráhy stimulující produkci oxidu dusnatého (NO), který spouští MAPK dráhu vedoucí ke zvýšené oxidaci mastných kyselin (Sharma a kol., 2009). Je však nutné zmínit, že u izolovaných kardiomyocytů byla role AMPK v tomto procesu pozorována (Palanivel a kol., 2006), což může být vysvětleno odlišnou signalizací v kardiomyocytech a dalších typech buněk myokardu. Leptin taktéž zvyšuje translokaci transportérů mastných kyselin do plazmatických membrán kardiomyocytů, čímž přispívá ke zvýšené oxidaci mastných kyselin v srdečních buňkách (Palanivel a kol., 2006). V souvislosti s metabolismem lipidů se dále ukázalo, že leptin ochraňuje myokard před myopatiemi způsobenými lipotoxicitou, tedy hromaděním lipidů v srdci (Lee a kol., 2004). Leptin také zřejmě způsobuje hypertrofii kardiomyocytů (Rajapurohitam a kol., 2003). Role leptinu v hypertrofii je však kontroverzní. Existují studie prokazující jeho úlohu v hypertrofii levé komory, zatímco jiné ukazují, že zde leptin hypertrofii

naopak potlačuje (Ghantous a kol., 2015). Podle studie autorů Gan a kol. na nižších úrovních leptinové signalizace vedoucí k hypertrofii hraje významnou úlohu právě FTO. Prokázali totiž, že snížení exprese FTO pomocí siRNA hypertrofickému efektu zabraňuje (Gan a kol., 2013). V neposlední řadě je o leptinu známo, že zvyšuje toleranci myokardu k ischemicko-reperfučnímu (I/R) poškození (Smith a kol., 2010). Skrze známou kardioprotektivní dráhu RISK (z angl. *reperfusion injury salvage kinase pathway*) totiž aktivuje kinázy Akt (proteinkináza B) a Erk1/2 (z angl. *extra-cellular signal-regulated kinase*), které fosforylují a tím inhibují kaspázy (kaspázy 3 a 9 účastní se v apoptotické kaskádě) a proapoptotické proteiny BIM, BAX, BAD. Tím zabraňují uvolnění cytochromu c z mitochondrií, jehož přítomnost v cytosolu je signálem pro zahájení apoptózy. Dále fosforylují a tím aktivují endoteliální syntázu oxidu dusnatého (eNOS), což vede k inhibici mitochondriálního permeabilního tranzitního póru (mPTP), důležitému kroku v ochraně buněk před buněčnou smrtí (Hausenloy a Yellon, 2004; Smith a kol., 2010). K inhibici mPTP vede též JAK/STAT dráha, která tak také zprostředkovává leptinem indukovanou protekci vůči I/R poškození (Smith a kol., 2010). Bylo pozorováno, že v hypoxickém prostředí stoupá exprese leptinu, což je umožněno aktivitou transkripčního faktoru HIF (Ambrosini a kol., 2002; Grosfeld a kol., 2002; Chaiban a kol., 2008).



#### **Obrázek 4: Funkce leptinu v srdci**

AKT – proteinkináza B; ERK1/2 – proteinkináza (z angl. *extra-cellular signal-regulated kinase 1/2*); JAK – Janusova kináza; Ob-R – leptinový receptor; p38 – proteinkináza (z angl. p38 mitogen-activated protein kinase); PI3K – proteinkináza (z angl. *phosphoinositide 3-kinase*); ROS – reaktivní formy kyslíku; STAT – signální transduktor a aktivátor transkripce. Symboly (+) a (↑) reprezentují aktivaci, (↓) reprezentuje inhibici. Převzato a upraveno z (Ghantous a kol., 2015).

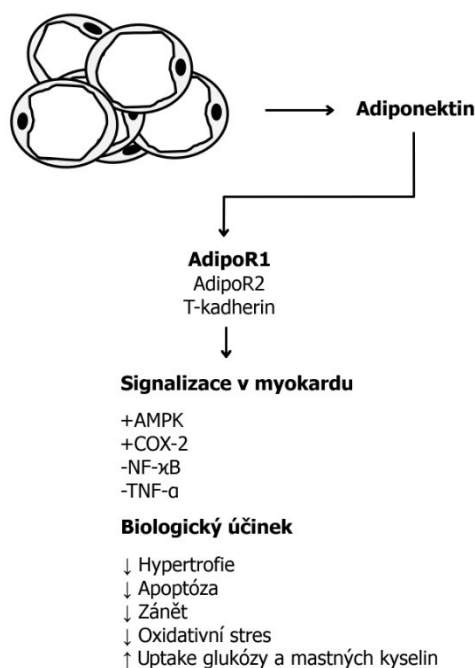
### 2.3.2. Adiponektin

Adiponektin je protein syntetizovaný kromě adipocytů také kosterní svalovinou nebo kardiomyocyty (Mattu a Randeve, 2013). V hojném množství se nachází v cirkulaci, jedná se o jeden z nejhojnějších proteinů krevní plazmy (Park & Sweeney, 2013). Na rozdíl od leptinu zde množství adiponektinu negativně koreluje s množstvím tukové tkáně (Mattu a Randeve, 2013). Adiponektin je 30 kDa protein, biologickou aktivitu však nesou i jeho globulární fragmenty (Scherer a kol., 1995; Waiki a kol., 2005). V organismu se adiponektin nachází ve třech formách: jako nízkomolekulární trimer, hexamer a vysokomolekulární polymer složený z 12-18 monomerů (Ghantous a kol., 2015). Fyziologické funkce adiponektinu, zprostředkované zejména jeho vysokomolekulární formou, spočívají v antidiabetických, protizánětlivých, antiaterosklerotických a kardioprotektivních účincích na organismus (Hui a kol., 2012; Park a Sweeney, 2013). Adiponektin silně potlačuje glukoneogenezi v játrech a svým lokálním působením v metabolicky aktivních tkáních zesiluje senzitivitu buněk k inzulínu, čímž přispívá k udržování tělesné homeostázy (Wang a Scherer, 2016). Signalizace zprostředkovaná adiponektinem probíhá skrze stimulaci tří typů receptorů AdipoR1, AdipoR2 a T-kadherinu (Kadowaki a Yamauchi, 2005; Hug a kol., 2004) a dále zahrnuje aktivaci zejména AMPK dráhy vedoucí například k zvyšování senzitivity inzulínu nebo zvýšené oxidaci mastných kyselin v tkáních. Kromě AMPK však adiponektin spouští dráhy PI3K, MAPK a také aktivuje cyklooxygenázu 2 (Mattu a Randeve, 2013). Bylo prokázáno, že během adaptace na chronickou hypoxii dochází ke snížení exprese adiponektinu (Chaiban a kol., 2008).

#### 2.3.2.1. Fyziologická funkce adiponektinu v srdci

Srdce produkuje adiponektin a jsou zde přítomny i všechny jeho receptory, v největší míře pak AdipoR1 (Doyle a kol., 1998; Fujioka a kol., 2006; Palanivel a kol., 2007). O adiponektinu, stejně jako o leptinu, je známo, že ovlivňuje srdeční metabolismus. Adiponektin zvyšuje příjem glukózy a mastných kyselin do kardiomyocytů a zároveň zvyšuje jejich oxidaci (Palanivel a kol., 2007). Dále ochraňuje myokard před lipotoxicitou a zvyšuje zde inzulínovou senzitivitu (Park a Sweeney, 2013). V klinických studiích bylo zjištěno, že vysoké hladiny adiponektinu v lidské plazmě korelují se snížením rizika infarktu myokardu (Pischon a kol., 2004). Tato pozorování podporují také experimenty na zvířatech (Shibata a kol., 2005). Myši s inaktivovaným genem pro adiponektin měly oproti kontrolám po aplikaci ischemie a následné reperfuze rozsáhlejší infarktová ložiska. Naopak podávání rekombinantního adiponektinu zvířatům před, během nebo po ischemii vedlo ve všech případech ke snížení velikosti infarktu myokardu, a to u obou skupin zvířat (Shibata a kol., 2005). Adiponektin pravděpodobně zvyšuje viabilitu kardiomyocytů skrze aktivaci AMPK (Shibata a kol., 2005). Kardioprotekce zprostředkovaná

adiponektinem je však také umožněna jeho protizánětlivými účinky. Bylo zjištěno, že adiponektin snižuje srdeční produkci prozánětlivého TNF- $\alpha$  jak *in vitro*, tak *in vivo*. Tento efekt adiponektinu je umožněn díky aktivaci cyklooxygenázy 2, jež umožňuje v srdečních buňkách přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), který vede ke snížení TNF- $\alpha$  (Shibata a kol., 2005). U samotného PGE<sub>2</sub> už byl kardioprotektivní účinek také prokázán (Xiao a kol., 2004). Jeho hladina v srdci se po adaptaci na chronickou hypoxii zvyšuje (Míčová a kol., 2016).



### **Obrázek 5: Funkce adiponektinu v srdci**

AdipoR – adiponektinový receptor; AMPK – 5'-AMP aktivovaná proteinkináza; COX-2 – cyklooxygenáza 2; NF- $\kappa$ B – nukleární faktor kappa B; TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ . Symboly (+) a (↑) reprezentují aktivaci, (-) a (↓) reprezentují inhibici. Převzato a upraveno z (Ghantous a kol., 2015).

### **2.3.3. Poměr leptinu k adiponektinu jako marker kardiovaskulárních onemocnění**

Plazmatické hladiny leptinu a adiponektinu mohou sloužit jako markery některých závažných chorob. Vysoké hladiny leptinu, stejně jako nízké hladiny adiponektinu v plazmě korelují např. se vznikem inzulinové rezistence, metabolického syndromu nebo KVO (Blüher a Mantzoros, 2015; Fasshauer a Blüher, 2015; Finucane a kol., 2009). Z tohoto důvodu se v poslední době začíná studovat také poměr těchto dvou adipokinů, který k predikci vzniku nebo přítomnosti onemocnění může být vhodnější. To se u srdečních chorob potvrzuje (Kappelle a kol., 2012; Lekva a kol., 2017; Liao a kol., 2013). Na izolovaných kardiomyocytech bylo také pozorováno, že nízký poměr leptinu k adiponektinu potlačuje buněčnou hypertrofii. Pravděpodobně se tak

děje skrze aktivaci AMPK dráhy adiponektinem. Jejich vysoký poměr ji naopak podporuje hypertrofickým působením leptinu (Bairwa a kol., 2016).



### 3. CÍLE PRÁCE

- Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje odolnost srdce k I/R poškození, což se projevuje zmenšením rozsahu infarktu myokardu (Ošťádal a Kolář, 2007). Kontinuální normobarická hypoxie (CNH; 10 % O<sub>2</sub>) je klasický kardioprotektivní model chronické hypoxie využívaný naší laboratoří (Chytilová a kol., 2015). V poslední době však testujeme také mírnější formu adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>). Zvířata takovouto adaptaci lépe snáší a lze jí proto kombinovat s jinými kardioprotektivními modely – např. adaptací na fyzickou zátěž (Alánová a kol., 2017).
  - **Cílem bylo porovnat míru kardioprotekce obou modelů chronické hypoxie stanovením rozsahu infarktu myokardu na potkanech kmene Sprague Dawley.**
- FTO ovlivňuje metabolismus (Larder a kol., 2010). Myokard levé a pravé komory vykazuje značné metabolické odlišnosti (Phillips a kol., 2011; Wasková-Arnostová a kol., 2013). Předpokládáme tedy, že se hladina FTO bude mezi oběma komorami lišit.
  - **Cílem bylo porovnat distribuci FTO v levé a pravé komoře srdce, která byla dále porovnána s metabolicky vysoce aktivními tkáněmi jater a koncového mozku.**
- Během adaptace na chronickou hypoxii dochází k řadě fyziologických změn vedoucích ke zvýšené toleranci myokardu k I/R poškození (Ošťádal a Kolář, 2007). Jednou z nich je transformace srdečního metabolismu (Essop, 2007). Na základě toho předpokládáme, že FTO může hrát roli v této kardioprotektivní změně buněčného metabolismu. Jeho hladiny by v tom případě měly být adaptací na chronickou hypoxii ovlivněny. Otázkou také je, zda tento efekt bude ovlivněn mírou hypoxie.
  - **Cílem bylo analyzovat efekt CNH (12 % O<sub>2</sub>) na hladinu proteinu FTO v levé a pravé komoře a zároveň v játrech a koncovém mozku.**
  - **Cílem bylo porovnat vliv obou modelů chronické hypoxie – CNH (12 % O<sub>2</sub>) a CNH (10 % O<sub>2</sub>) – a to na hladině proteinu FTO v levé komoře.**
- Regulace metabolismu, jedna z hlavních fyziologických funkcí FTO, je úzce spjata s denní dobou (Shi a Zheng, 2013). FTO navíc ovlivňuje expresi hodinových genů (Wang a kol., 2015).
  - **Cílem bylo stanovit, zda FTO v srdci vykazuje cirkadiánní rytmicitu.**
- Metabolismus srdce ovlivňují také adipokiny – leptin a adiponektin (Palanivel a kol., 2006; Palanivel a kol., 2007). Oba adipokiny dokáží pozitivně regulovat rozsah ischemického poškození myokardu (Shibata a kol., 2005; Smith a kol., 2010). Leptin

navíc v srdci zvyšuje expresi FTO (Gan a kol., 2013). Na základě toho předpokládáme, že hladiny těchto adipokinů se budou vlivem adaptace na chronickou hypoxii měnit.

- **Cílem bylo analyzovat efekt CNH (12 % O<sub>2</sub>) na koncentrace adipokinů leptinu a adiponektinu v levých srdečních komorách a plazmě.**

## 4. METODIKA

### 4.1. Laboratorní zvířata a adaptace na chronickou hypoxii

K experimentům byli použiti dospělí samci potkanů kmene Sprague Dawley. Zvířata byla adaptována po dobu 3 týdnů na podmínky CNH. Obsah kyslíku byl snížen z normoxické hodnoty 21 % ( $FiO_2 = 0,21$ ) na 12 % ( $FiO_2 = 0,12$ ) respektive na 10 % ( $FiO_2 = 0,1$ ) pomocí generátorů hypoxie Everest Summit (Hypoxico Inc., NY, USA). Kontrolní skupina zvířat byla po stejnou dobu chována ve standardních normoxických podmínkách. V tomto pokusu byly použity dvě skupiny zvířat. Z první skupiny o celkovém počtu 16 zvířat starých 3 měsíce bylo 8 potkanů adaptováno na CNH (12 %  $O_2$ ) a 8 zvířat bylo kontrolních. Z druhé skupiny o celkovém počtu 11 zvířat starých 4 měsíce byli 4 potkani adaptováni na CNH (10 %  $O_2$ ), zatím co zbylých 7 zvířat bylo kontrolních.

### 4.2. Odběr tkáně

Usmrcení zvířat bylo provedeno v hypoxickém prostředí pomocí cervikální dislokace. Srdce byla vystřižena z dutiny hrudní, omyta ve studeném fyziologickém roztoku a na ledu rozdělena na levou komoru (LV), pravou komoru (RV) a septum. Odebrány byly také vzorky jater a koncového mozku. Všechny vzorky byly ihned zmrazeny v kapalném dusíku a zváženy. Zvířatům byla odebrána také krev, z které byla následně připravena plazma (centrifugace 15 min při  $2000 \times g$  ve  $4^\circ C$ ). Vzorky byly následně uchovávány v tekutém dusíku. Srdce pro stanovení cirkadiánní rytmicity FTO byla odebírána po 3 hodinách od 8:00 do 8:00 dalšího dne, přičemž na každý časový bod byla odebrána srdce ze 3 zvířat (vzorky byly poskytnuty doc. RNDr. Zdeňkou Bendovou, Ph.D. z Katedry fyziologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy).

### 4.3. Homogenizace vzorků

Vzorky byly rozdrčeny v třecích miskách naplněných kapalným dusíkem. Vzniklý jemný prášek byl přenesen do Potter-Elvehjemova homogenizátoru a smíchán v poměru 1:8 s homogenizačním puřrem o složení: 12.5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 mM EGTA, 250 mM sacharóza, 6 mM  $\beta$ -merkapt ethanol, inhibitory fosfatáz (PhosSTOP; Roche) a inhibitory proteáz (cOMplete Protease Inhibitor Cocktail; Roche). Homogenizace byla uskutečněna 15 pohyby pístu nahoru a dolů. Ve vzorcích byla změřena koncentrace celkového proteinu dle Bradforda. Homogenáty byly posléze v mikrozkuvkách uskladněny při teplotě  $-80^\circ C$ .

### 4.4. SDS-PAGE, Western blot a imunodetekce

Homogenáty určené pro elektroforézu byly naředěny v poměru 1:6 vzorkovým puřrem (2x koncentrovaným) s  $\beta$ -merkapt ethanolom (1 díl  $\beta$ -merkapt ethanolu na 49 dílů

vzorkového pufru) a inkubovány při teplotě 100 °C po dobu 3 minut. Nanáška tvořila v každém vzorku 20 µg proteinu. Dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo provedeno v 10% BIS-akrylamidových gelech za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) v elektroforetické soupravě Mini-Protean III apparatus (Bio-Rad) při konstantním proudu 25 mA/gel po dobu 85 minut. Po skončení elektroforézy byly proteiny přeneseny na PVDF membrány (Bio-Rad). Pro kontrolu úspěšnosti přenosu byly membrány obarveny v roztoku Ponceau S. Následně byly blokovány v 5% roztoku nízkotučného mléka v TTBS (Affymetrix) s 0,1% zastoupení Tweenu 20 (Sigma) po dobu 80 minut. Poté byly použity primární a sekundární protilátky (tabulka 2). Vizualizace imunoblotu byla provedena pomocí metody zesílené chemiluminiscence na autoradiografickém filmu (AGFA) či pomocí přístroje Fuji LAS-1000. Relativní zastoupení analyzovaného proteinu bylo denzitometricky vyhodnoceno v programu ImageJ. Pro správnou identifikaci FTO byly použity standardy molekulových hmotností (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; Bio-RAD; #161-0374), rekombinantní protein (FTO Recombinant Human Protein, N-His Tag; ThermoFisher; 12125H07E25) a pozitivní kontrola (mozková tkáň). Použit byl také blokační peptid (FTO, Blocking Peptide; MyBioSource; MBS822680), který byl přidán k primární protilátce (rabbit polyclonal anti-FTO antibody; MyBioSource; MBS820687) v molárním poměru 1:2 ve prospěch blokačního peptidu. K analýze vzorků z více membrán byl na každou membránu nanesen stejný vzorek, který sloužil k přepočtu jako vnitřní kontrola. Pro zpřesnění analýzy byly hodnoty relativního zastoupení FTO vztaženy na hodnoty proteinů, které se vlivem adaptace na CNH nemění, tzv. referenční proteiny. K tomuto účelu byl využit aktin, citrátsyntáza a  $\alpha$ -tubulin.

**Tabulka 2: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek**

Primární protilátka	Výrobce	Ředění	Inkubace	Hmotnost	Sekundární protilátka	Výrobce	Ředění	Doba inkubace
<b>FTO</b> ab92821	Abcam	1:1200	přes noc 4 °C	58 kDa	anti- mouse 31432	Thermo Fischer	1:10000	1 hod 20 °C
<b>FTO</b> MBS820687	MBS	1:1000	přes noc 4 °C	58 kDa	anti-rabbit 170-6515	BioRad	1:20000	1 hod 20 °C
<b>aktin</b> A2066	Sigma	1:10000	1 hod 20 °C	42 kDa	anti-rabbit 170-6515	BioRad	1:10000	1 hod 20 °C
<b>citrátsyntáza</b> ab96600	Abcam	1:10000	1 hod 20 °C	52 kDa	anti-rabbit 170-6515	BioRad	1:10000	1 hod 20 °C
<b>α-tubulin</b> T5168	Sigma	1:10000	1 hod 20 °C	50 kDa	anti-rabbit 170-6515	BioRad	1:10000	1 hod 20 °C

#### 4.5. ELISA

Koncentrace proteinů pomocí metody ELISA byly měřeny v plazmě a tkáni LV. Byly k tomu využity komerční kity (Leptin rat ELISA kit; Enzo; ADI-900-015A) a (Adiponectin Rat ELISA kit; Abcam; ab108784). Plazma byla naředěna v poměru 1:1 pro analýzu leptinu a 1:400 pro analýzu adiponektinu. Homogenáty LV byly pro analýzu leptinu zředěny v poměru 1:4 a pro analýzu adiponektinu pak 1:240. K ředění byl použit pufr z příslušných komerčních kitů. Postupy analýzy dále probíhaly dle protokolů od výrobce. Koncentrace proteinů v tkáni byla přepočtena na mg celkového proteinu.

#### 4.6. qPCR

Nejprve byla vyizolována totální RNA. Vzorky tkání byly rozdrceny v třecích miskách naplněných kapalným dusíkem. Přibližně 100 mg vzniklého prášku bylo přeneseno do mikrozkuvek s 1 ml RNAzolu (RNAzol® RT; RN 190). K takto vytvořenému homogenátu bylo přidáno 0,4 ml vody a po 15 minutách byl stočen při 12000 × g po dobu 15 minut. Supernatant s RNA byl odebrán od peletu obsahujícího DNA a proteiny a byl k němu přidán isopropanol v poměru 1:1. Po patnácti minutách byla směs opět stočena při 12000 × g po dobu 10 minut. Takto precipitovaná RNA byla dvakrát promyta v 0,4 ml 75% ethanolu. Během promývání byla pokaždé stočena při 3000 × g po dobu 3 minut. Čistá RNA byla poté rozpuštěna ve vodě. Čistota a koncentrace extrahované RNA byla kvantifikována za použití NanoDropu.

K 1 µg totální RNA z předchozí izolace byl přidán 1 µl oligo (dT)<sub>18</sub> primeru. Směs byla doplněna vodou prostou nukleáz do objemu 8 µl a inkubována 5 minut při 65 °C a následně zchlazena po dobu 10 minut při 4 °C. Dále byl ke směsi přidán předem připravený roztok obsahující 4 µl vody (prosté nukleáz), 4 µl 5x koncentrovaného reakčního pufru, 1 µl RiboLock RNase inhibitoru (20 U/µl), 2 µl 10nM dNTP mixu a 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV reverzní transkriptázy (200 U/µl). Výsledný objem tedy činil 20 µl. Takto připravená směs byla jemně promíchána špičkou. Syntéza cDNA probíhala po dobu 60 minut při 42 °C. Nakonec byla inaktivována transkriptáza při 70 °C po dobu 5 minut.

Nejprve byla připravena směs obsahující (na jeden vzorek) 14,1 µl vody, 4 µl master mixu (5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX); Solis BioDyne), 0,6 µl fluorescenčně značeného (VIC) HPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza) primeru (ThermoScientific) a 0,3 µl fluorescenčně značeného (FAM) FTO primeru (ThermoScientific). Tato směs byla spolu s 1 µl roztoku cDNA nanášena na destičku. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) probíhala v termocykleru (ViiA 7; ThermoScientific), kde byla nejprve během 15 minut při teplotě 95 °C aktivována polymeráza. Po této fázi následovalo 40 opakujících se cyklů, které se

skládaly z 20s intervalu o teplotě 95 °C, během kterého docházelo k denaturaci cDNA, a z 60s intervalu o teplotě 60 °C, který sloužil k nasednutí primerů a následné elongaci. Relativní koncentrace byly určeny použitím metody standardní křivky. Následně byl stanoven poměr koncentrace cílového genu FTO ku referenčnímu HPRT.

#### 4.7. Experimentální model infarktu myokardu

Anestezovaným potkanům (pentobarbital sodný, 60 mg/kg intraperitoneálně; Sigma-Aldrich) byla provedena tracheostomie a pomocí endotracheální kanyly byli udržováni na umělé plicní ventilaci (Rodent Ventilator 7026; Ugo Basile). Dechový objem činil 1,2 ml na 100 g tělesné váhy zvířete a frekvence byla nastavena na 68 nádechů za minutu. Potkanům byla během celého procesu udržována stálá tělesná teplota mezi 36,5 a 37,5 °C pomocí vyhřívaného operačního stolku. Po celou dobu byl také zaznamenáván krevní tlak v levé karotidě a jednosvodový elektrokardiogram (EKG). Zvířatům byla provedena levostranná torakotomie. Po následné desetiminutové stabilizaci byla indukována regionální ischemie myokardu ligaturou přední sestupné větve levé koronární arterie, která se projevuje poklesem krevního tlaku a charakteristickými změnami EKG křivky. Po 20 minutách byla okluze povolena a krevní průtok obnoven. Reperfuze trvala 3 hodiny. Po této fázi byla srdce vystřižena a promyta 20 ml fyziologického roztoku vpraveného do srdce retrogradně skrz aortu. Následně byla perfundovaná část myokardu obarvena roztokem 5% manganistanu draselného (Pliva-Lachema, Brno, Česká republika) a pro determinaci živé tkáně z ischemií ohrožené oblasti (AAR; z angl. *area at risk*) bylo srdce obarveno také 1% roztokem 2,3,5-trifenylnitrazolium chloridu (Sigma-Aldrich). Pak bylo srdce horizontálně rozřezáno na přibližně 1 mm silné řezy, které byly přes noc uchovány v roztoku 10% formaldehydu. Další den byly z řezů odstraněny RV a obě strany řezů LV byly vyfotografovány. Operace zvířat byla provedena RNDr. Janem Neckářem, Ph.D. Velikost LV, ischemií ohrožené oblasti a infarktu byla měřena počítačovou planimetrickou metodou pomocí softwaru Ellipse (ViDiTo).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Hmotnostní parametry zvířat

Hmotnostní parametry zvířat adaptovaných na CNH (12 % O<sub>2</sub>) a CNH (10 % O<sub>2</sub>) včetně zvířat kontrolních jsou uvedeny v tabulce 3 a 4. Hmotnosti hypoxických zvířat oproti zvířatům normoxickým vykazují klesající trend, který však není signifikantní. Rozdíly v hmotnostech zvířat adaptovaných na CNH (12 % O<sub>2</sub>) a na CNH (10 % O<sub>2</sub>), včetně odpovídajících kontrol, jsou způsobeny odlišným stářím skupin (3 a 4 měsíce). Hmotnostní index srdce (HW/BW; poměr hmotnosti srdce v miligramech proti hmotnosti těla zvířete v gramech) vykazuje u hypoxických zvířat signifikantní nárůst (pro obě skupiny  $P < 0,0001$ ) v důsledku vzniku srdeční hypertrofie během adaptace. Hmotnostní indexy pro levé (LV/BW) a pro pravé (RV/BW) komory ukazují, že nárůst HW/BW u adaptovaných zvířat je způsoben hypertrofií pravé komory. Zatímco poměr LV/BW se během adaptace výrazněji nemění, poměr RV/BW signifikantně roste (pro obě skupiny  $P < 0,0001$ ). Tento jev se projevuje více u zvířat adaptovaných na silnější CNH (10 % O<sub>2</sub>), kde je nárůst RV/BW o 124 %, než u zvířat adaptovaných na slabší CNH (12 % O<sub>2</sub>), kde nárůst činí 89 %. U hypoxických potkanů dochází také k signifikantnímu zvýšení hodnot hematokritu (pro obě skupiny  $P < 0,0001$ ). I v tomto parametru je nárůst patrnější u CNH (10 % O<sub>2</sub>).

**Tabulka 3: Hmotnostní parametry zvířat adaptovaných na CNH (12 % O<sub>2</sub>)**

<u>vzorek</u>	<u>BW (g)</u>	<u>HW/BW</u>	<u>LV/BW</u>	<u>RV/BW</u>	<u>hematokrit</u>
<b>N</b> <i>n = 8</i>	480 ± 8	2,59 ± 0,03	1,41 ± 0,03	0,58 ± 0,01	47 ± 1
<b>CNH (12 % O<sub>2</sub>)</b> <i>n = 8</i>	464 ± 8	3,01 ± 0,01 ***	1,45 ± 0,04	1,09 ± 0,05 ***	58 ± 1 ***

BW – hmotnost zvířat; CNH – kontinuální normobarická hypoxie; HW/BW – hmotnostní index srdce; LV/BW – hmotnostní index levé komory; N – normoxie; RV/BW – hmotnostní index pravé komory. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. \*\*\* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,0001$ ).



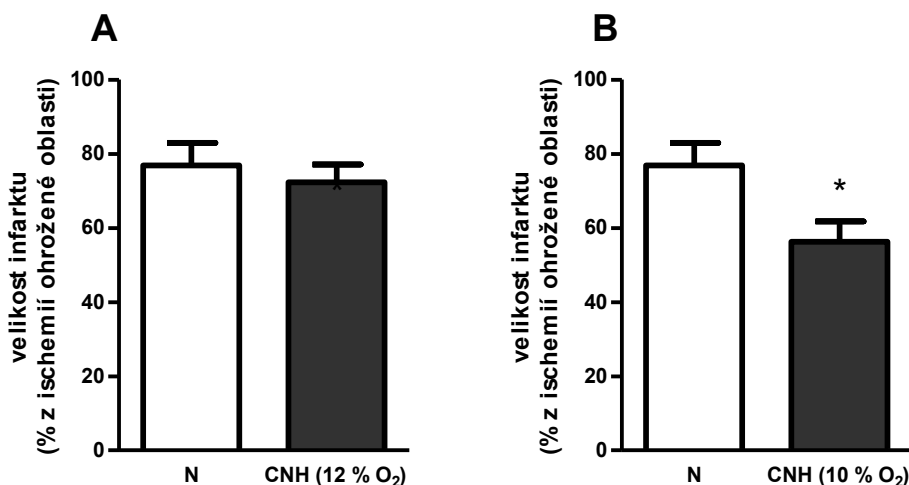
**Tabulka 4: Hmotnostní parametry zvířat adaptovaných na CNH (10 % O<sub>2</sub>)**

vzorek	BW (g)	HW/BW	LV/BW	RV/BW	hematokrit
N n = 7	577 ± 19	2,35 ± 0,04	1,29 ± 0,03	0,50 ± 0,02	46 ± 1
CNH (10 % O <sub>2</sub> ) n = 4	548 ± 18	3,16 ± 0,08 ***	1,41 ± 0,06	1,13 ± 0,03 ***	74 ± 1 ***

BW – hmotnost zvířat; CNH – kontinuální normobarická hypoxie; HW/BW – hmotnostní index srdce; LV/BW – hmotnostní index levé komory; N – normoxie; RV/BW – hmotnostní index pravé komory. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. \*\*\* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,0001$ ).

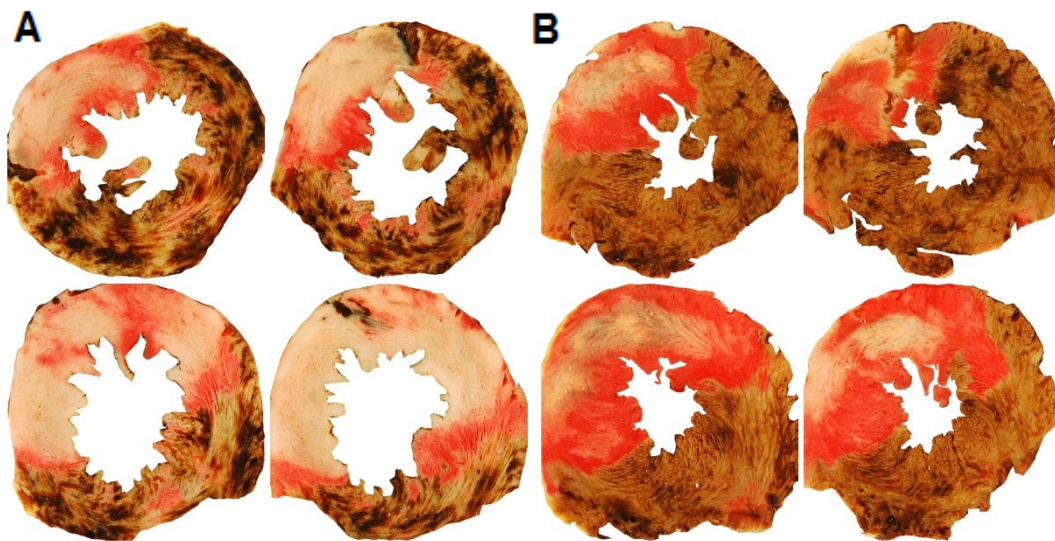
## 5.2. Velikost infarktu myokardu: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) a (10 % O<sub>2</sub>)

Zvířata adaptovaná na CNH (12 % O<sub>2</sub>) neprojevovala známky kardioprotektivního fenotypu (graf 1). V případě adaptace na silnější CNH (10 % O<sub>2</sub>) již činil rozdíl ve velikosti infarktu myokardu mezi kontrolními a adaptovanými potkany 20 % ( $P = 0,023$ ) (graf 1; obrázek 6). Velikost AAR byla ve všech skupinách stejná – přibližně 40 % LV. Velikosti LV, AAR a infarktu byla měřena počítačovou planimetrickou metodou pomocí softwaru Ellipse (ViDiTo).



**Graf 1: Velikost infarktu myokardu: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) (A) a (10 % O<sub>2</sub>) (B)**

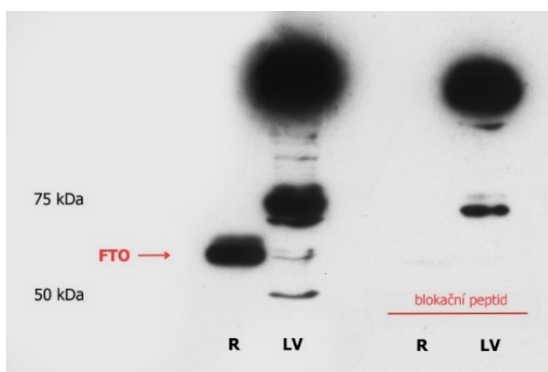
CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n (N) = 10; n (CNH; 12 % O<sub>2</sub>) = 10; n (CNH; 10 % O<sub>2</sub>) = 9. \* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,05$ ).



**Obrázek 6: Kardioprotektivní účinek CNH (10 % O<sub>2</sub>): typický příklad infarktu myokardu normoxické (A) a hypoxické (B) skupiny zvířat**

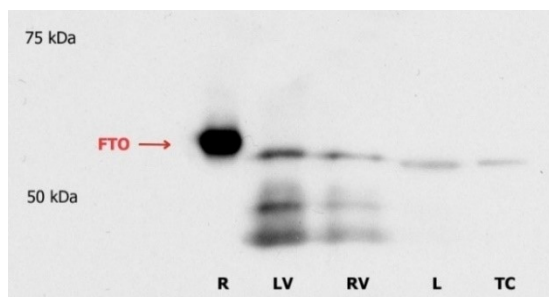
### 5.3. Detekce FTO v tkáních

Pro potvrzení správné identifikace proteinu FTO v tkáních metodou Western blot byl použit standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; Bio-RAD; #161-0374) a rekombinantní protein (FTO Recombinant Human Protein, N-His Tag; ThermoFisher; 12125H07E25). Bylo využito také blokačního peptidu k protilátce (rabbit polyclonal anti-FTO antibody; MyBioSource; MBS820687). Jeho inkubace s primární protilátkou proti FTO vedla k vymizení signálu v oblasti přibližně 60 kDa u vzorků LV i u nanášky s rekombinantním proteinem, zatímco nespecifické zóny o jiných molekulových hmotnostech byly u nanášek LV zachovány (obrázek 7). Tento výsledek prokazuje správnost identifikace signálu FTO na imunoblotu. Pro další experimenty byla používána již protilátka (mouse monoclonal anti-FTO antibody; Abcam; ab92821) z důvodu větší specifiity barvení (obrázek 8).



**Obrázek 7: Ověření detekce FTO - použití blokačního peptidu**

LV – levá komora; R – rekombinantní protein. Nanáška: rekombinantní protein – 0,3 ng; levá komora – 30 µg proteinu.



**Obázek 8: Detekce FTO v tkáních – primární protilátka (mouse monoclonal anti-FTO antibody; Abcam; ab92821)**

L – játra; LV – levá komora; R – rekombinantní protein; RV – pravá komora; TC – koncový mozek. Nanáška: rekombinantní protein – 0,5 ng; levá komora – 40 µg proteinu; pravá komora – 40 µg proteinu; játra – 20 µg proteinu; koncový mozek – 10 µg proteinu.

### 5.3.1. Celkový protein v tkáních

V případě zastoupení FTO v tkáních byla hladina FTO normalizována na celkové množství proteinu. Hladina celkového proteinu se během adaptace na chronickou hypoxii v jednotlivých tkáních nemění (tabulka 5).

**Tabulka 5: Množství celkového proteinu v tkáních: vliv CNH (12 % O<sub>2</sub>)**

Tkáň	Normoxie / Hypoxie	Celkový protein µg/µl
levá komora	N	14,67 ± 0,43
	CNH (12 % O <sub>2</sub> )	13,79 ± 0,52
pravá komora	N	14,18 ± 0,63
	CNH (12 % O <sub>2</sub> )	15,02 ± 0,4
játra	N	17,53 ± 0,84
	CNH (12 % O <sub>2</sub> )	16,24 ± 0,44
koncový mozek	N	11,77 ± 0,1
	CNH (12 % O <sub>2</sub> )	11,82 ± 0,22

CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n = 8.

### 5.3.2. Referenční proteiny pro hypoxii

Kvantifikace FTO v normoxických a hypoxických tkáních byla zpřesněna vztahem na tzv. referenční proteiny, které se během adaptace na chronickou hypoxii nemění, a tudíž by jejich hodnoty v normoxických i hypoxických tkáních měly být stejné. Za tímto účelem byly testovány tři různé proteiny – aktin, citrát syntáza a α-tubulin. Vhodnost jejich použití pro jednotlivé tkáně je shrnuta v tabulce 6. Ukázky reprezentativních imunoblotů vybraných referenčních proteinů pro jednotlivé tkáně jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 6: Referenční proteiny pro CNH (12 % O<sub>2</sub>)**

Tkáň	Referenční protein	N	CNH (12 % O <sub>2</sub> )	Vhodnost
levá komora	aktin	1 ± 0,02	0,82 ± 0,04 **	✗
	citrátsyntáza	1 ± 0,03	0,94 ± 0,03	✓
pravá komora	citrátsyntáza	1 ± 0,04	0,93 ± 0,06	✓
	α-tubulin	1 ± 0,06	1,27 ± 0,07 **	✗
játra	citrátsyntáza	1 ± 0,05	0,88 ± 0,06	✗
	α-tubulin	1 ± 0,05	1,03 ± 0,04	✓
koncový mozek	citrátsyntáza	1 ± 0,06	0,99 ± 0,05	✓

CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n = 8. \*\* – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ( $P < 0,01$ ).

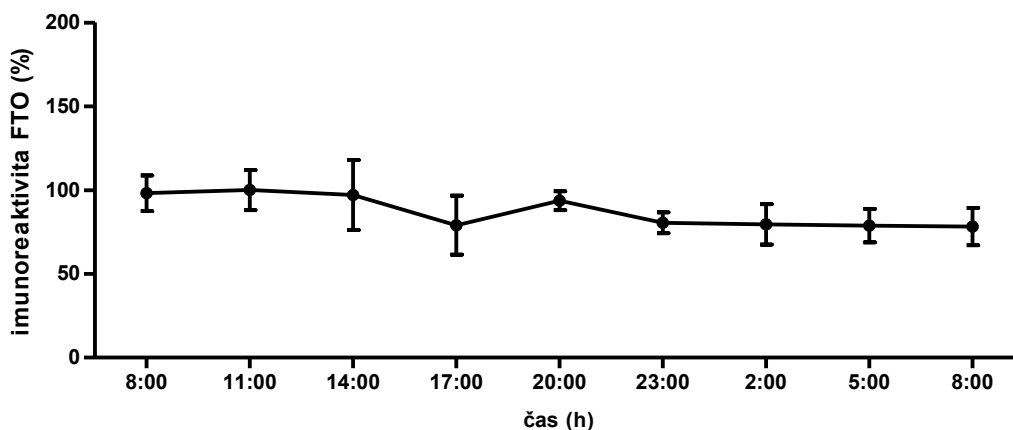
**Tabulka 7: Reprezentativní imunoblotty vybraných referenčních proteinů pro jednotlivé tkáně**

Tkáň	Referenční protein	Reprezentativní vzorek imunoblotty					
		N	CNH	N	CNH	N	CNH
levá komora	citrátsyntáza						
pravá komora	citrátsyntáza						
játra	α-tubulin						
koncový mozek	citrátsyntáza						

CNH – kontinuální normobarická hypoxie (12 % O<sub>2</sub>); N – normoxie. Nanáška: levá komora – 20 µg proteinu; pravá komora – 20 µg; játra – 20 µg proteinu; koncový mozek – 10 µg proteinu.

#### 5.4. Cirkadiánní rytmicita FTO v srdci

Analýza cirkadiánní rytmicity FTO v myokardu potkanů chovaných za standardních normoxických podmínek byla provedena pomocí metody Western blot. Vzorky pro měření cirkadiánní rytmicity FTO v myokardu byly odebírány od 8:00 po 3 hodinách až do 8:00 následujícího dne. Výsledky ukázaly (graf 2), že hladina FTO v srdeční tkáni během dne nevykazuje žádné rytmické výkyvy.

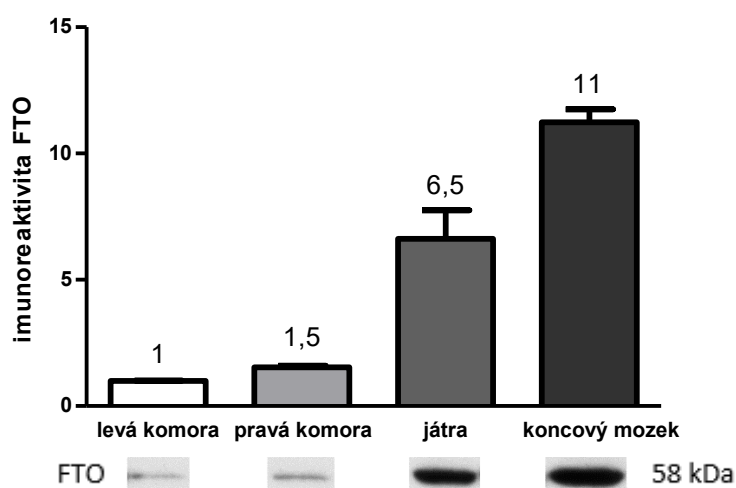


**Graf 2: Cirkadiánní rytmicita FTO v myokardu**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n = 8.

### 5.5. Zastoupení FTO v tkáních

Analýza hladiny FTO v tkáních potkanů chovaných za standardních normoxických podmínek byla provedena pomocí metody Western blot. Hladina FTO byla vztažena na celkové množství proteinu. Výsledky ukázaly (graf 3), že v RV je hladina proteinu FTO 1,5x vyšší než v LV ( $P < 0,0001$ ). Množství FTO v játrech převyšuje hladinu proteinu v LV přibližně 6,5x ( $P < 0,0001$ ). Nejvyšší zastoupení proteinu FTO je pak v koncovém mozku, kde převyšuje LV cca 11x ( $P < 0,0001$ ).



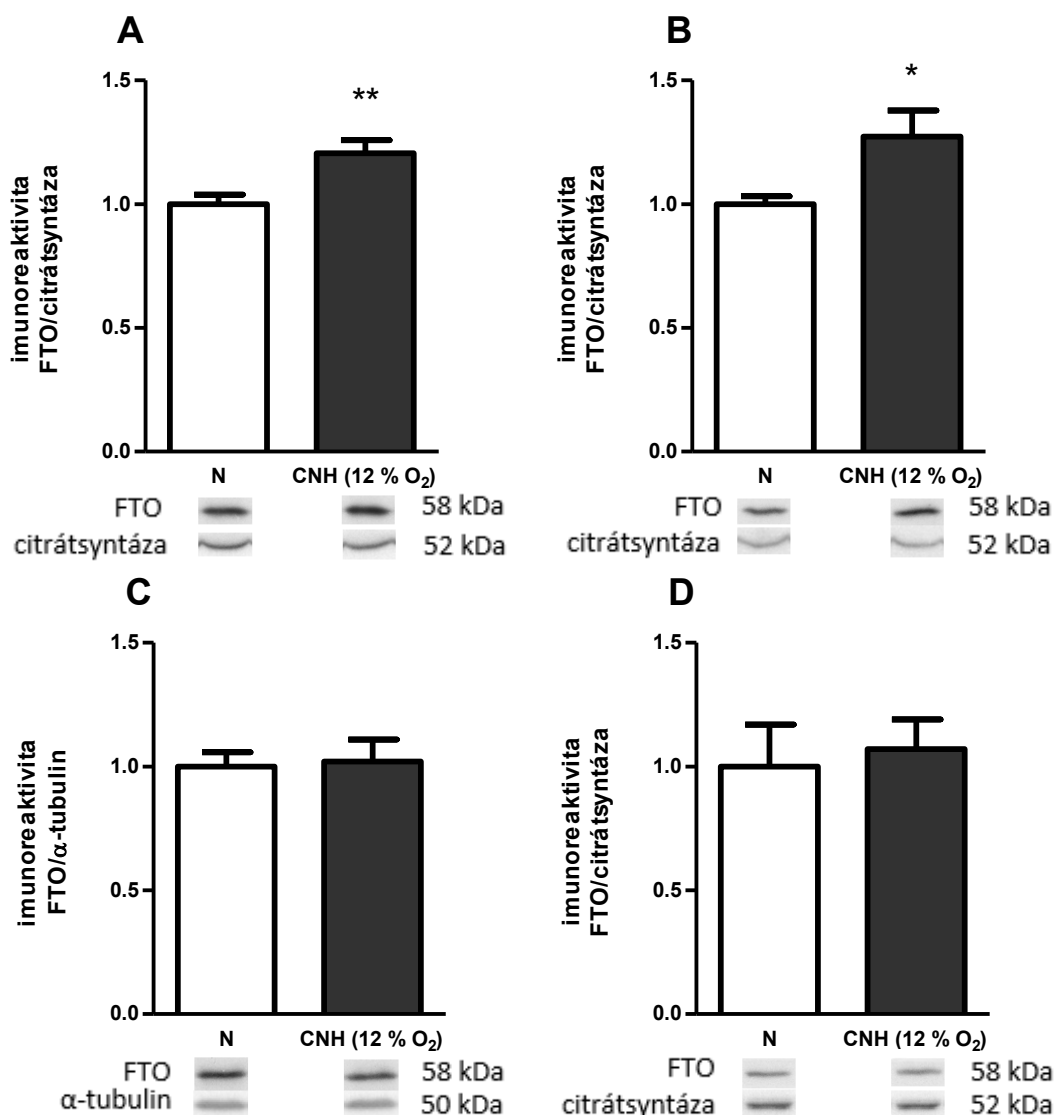
**Graf 3: Hladina FTO v normoxických tkáních**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n = 3. Nanáška: 20 µg proteinu.

## 5.6. Hladina FTO v tkáních: efekt adaptace na CNH

### 5.6.1. Hladina FTO v tkáních: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)

Jedním z hlavních cílů práce bylo stanovit vliv chronické hypoxie na hladinu FTO v jednotlivých tkáních potkanů, zejména pak v srdci. Použitím metody Western blot bylo zjištěno, že adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) vede v LV k signifikantnímu nárůstu hladin FTO o 21 % ( $P = 0,007$ ) a v pravé komoře o 27 % ( $P = 0,027$ ). Hladina v játrech ani koncovém mozku není CNH (12 % O<sub>2</sub>) ovlivněna (graf 4). Kvantifikace hladiny proteinu FTO byla vztažena na hladiny citrát syntázy, která se vlivem adaptace na CNH v LV, RV, ani koncovém mozku nemění. V játrech však dochází k jejímu lehkému poklesu, v tomto případě byla proto nahrazena jiným referenčním proteinem  $\alpha$ -tubulinem.

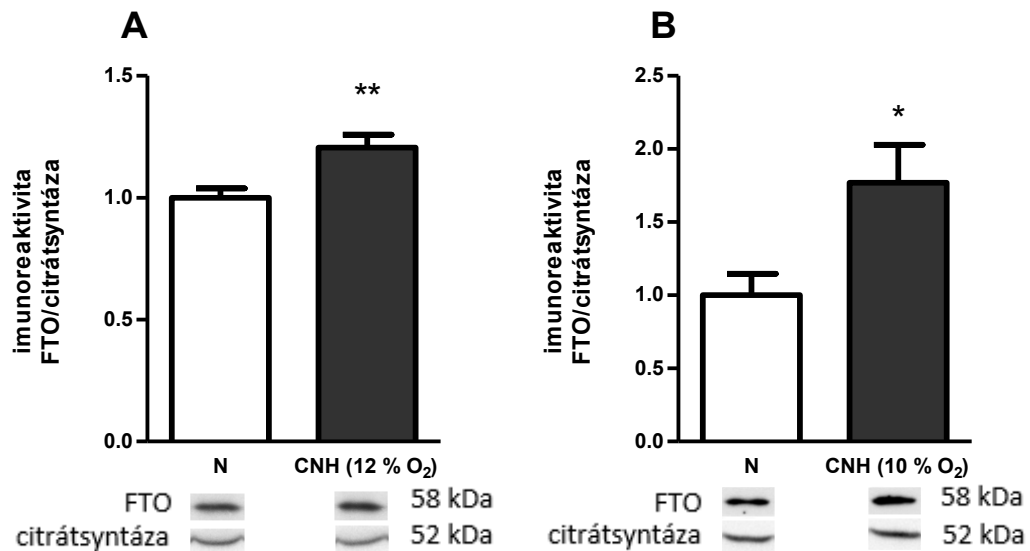


**Graf 4: Hladina FTO v levé komoře (A), pravé komoře (B), játrech (C) a koncovém mozku (D): efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)**

CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM.  $n = 8$ . Nanáška: levá komora – 20  $\mu$ g proteinu; pravá komora – 20  $\mu$ g proteinu; játra – 20  $\mu$ g proteinu; koncový mozek – 10  $\mu$ g proteinu. \* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,05$ ). \*\* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,01$ ).

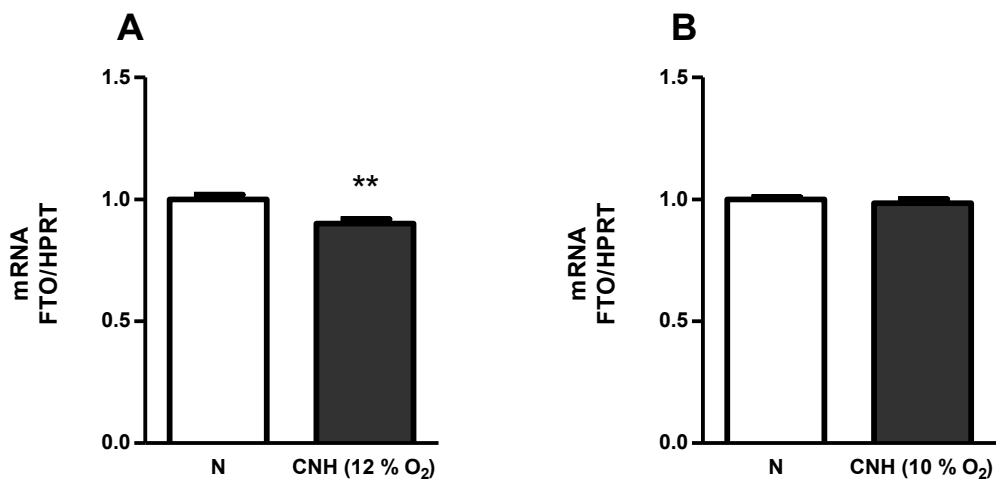
### 5.6.2. Hladina mRNA a proteinu FTO v levé komoře: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) a (10 % O<sub>2</sub>)

Adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) vede ke zvýšení hladiny FTO v LV potkanů o 21 % ( $P = 0,007$ ). Silnější CNH (10 % O<sub>2</sub>) zvyšuje hladinu daleko výrazněji o 77 % ( $P = 0,043$ ) (graf 5). Na hladině mRNA jsme žádné rozdíly prakticky nepozorovali. Pouze u zvířat adaptovaných na CNH (12 % O<sub>2</sub>) jsme zaznamenali mírný, ale statisticky významný pokles (graf 6).



**Graf 5: Hladina proteinu FTO v levé komoře: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) (A) a (10 % O<sub>2</sub>) (B)**

CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n (CNH; 12 % O<sub>2</sub>; včetně kontrol) = 8; CNH (10 % O<sub>2</sub>; včetně kontrol) = 4. \* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,05$ ). \*\* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,01$ ).



**Graf 6: Hladina FTO mRNA v levé komoře: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) (A) a (10 % O<sub>2</sub>) (B)**

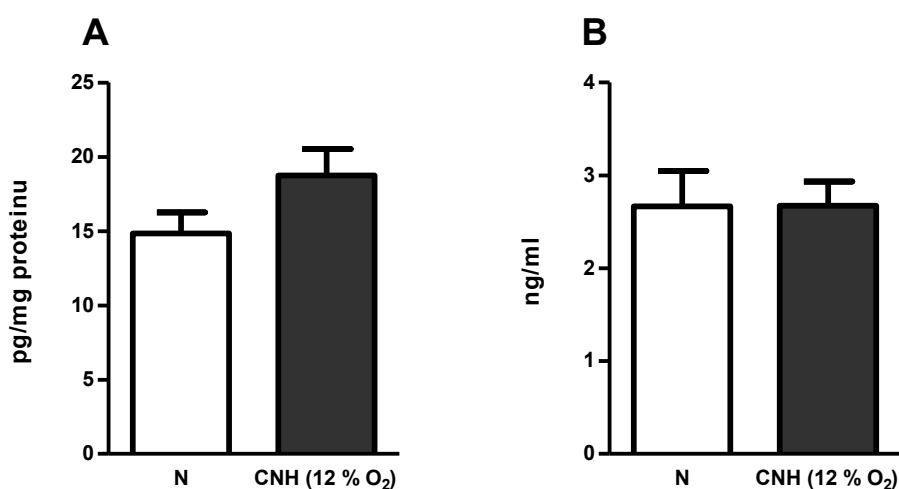
CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n (CNH; 12 % O<sub>2</sub>; včetně kontrol) = 8; n (CNH; 10 % O<sub>2</sub>) = 4 (kontrol 7). \*\* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,01$ ).

## 5.7. Hladina adipokinů v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)

Koncentrace adipokinů leptinu a adiponektinu v homogenátech LV a plazmě byla měřena pomocí metody ELISA.

### 5.7.1. Hladina leptinu v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)

U zvířat adaptovaných na CNH (12 % O<sub>2</sub>) byla naměřena zvýšená koncentrace leptinu v tkáni LV přibližně o čtvrtinu, nejednalo se však o signifikantní rozdíl ( $P = 0,116$ ). V plazmě jsou hodnoty adaptací na tento model hypoxie nezměněny (graf 7).



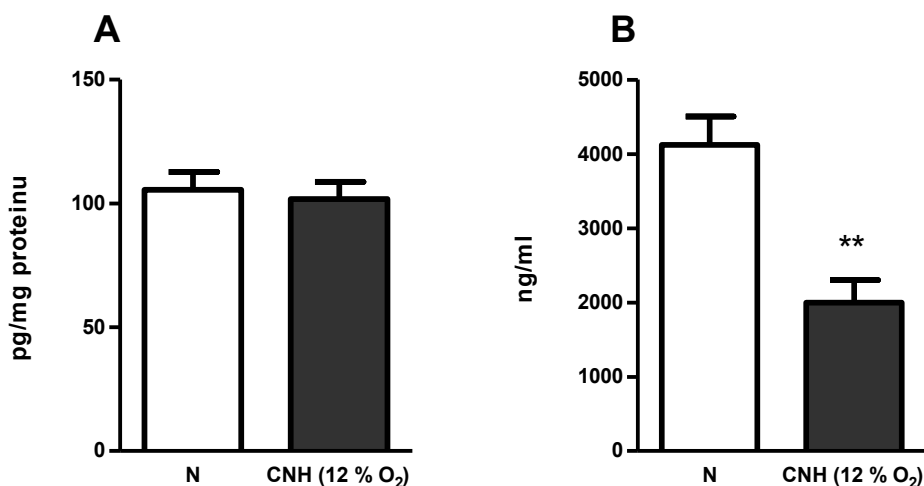
**Graf 7: Hladina leptinu v levé komoře (A) a plazmě (B): efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)**

CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n = 6.

### 5.7.2. Hladina adiponektinu v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)

U zvířat adaptovaných na CNH (12 % O<sub>2</sub>) dochází k signifikantnímu snížení koncentrace adiponektinu v plazmě přibližně o 52 % ( $P = 0,0017$ ). Na koncentraci adiponektinu v tkáni LV nemá CNH (12 % O<sub>2</sub>) žádný efekt (graf 8).



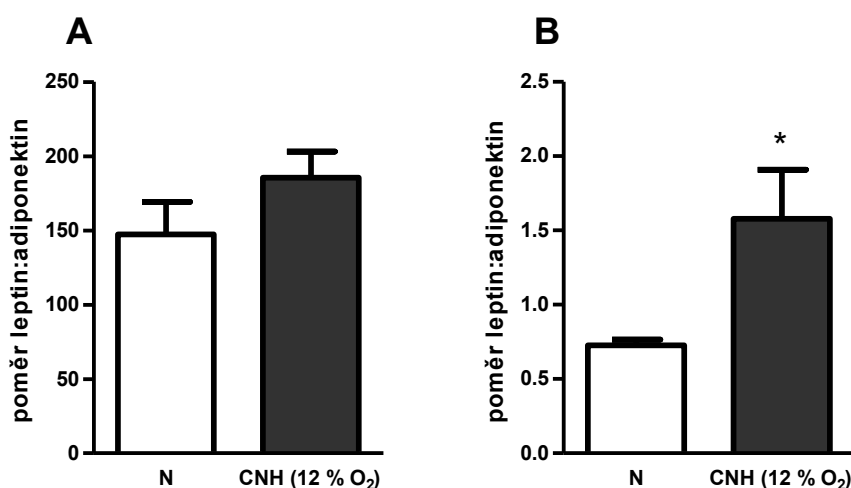


**Graf 8: Hladina adiponektinu v levé komoře (A) a plazmě (B): efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)**

CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. n (LV) = 6; n (plazma, N) = 5; n (plazma, CNH) = 6 \*\* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,01$ ).

### 5.7.3. Poměr hladin leptinu a adiponektinu v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)

Zvířata adaptovaná na CNH (12 % O<sub>2</sub>) mají v tkáni LV přibližně o 26 % zvýšený poměr leptinu k adiponektinu (graf 9). Tyto změny však nejsou signifikantně významné ( $P = 0,2$ ). Signifikantní nárůst poměru těchto dvou adipokinů se však objevuje v plazmě, kde se zvyšuje přibližně o 117 % ( $P = 0,0458$ ).



**Graf 9: Poměr hladin leptinu a adiponektinu v levé komoře (A) a plazmě (B): efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)**

CNH – kontinuální normobarická hypoxie; N – normoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako tisícnásobek průměru ± SEM. n (LV) = 6; n (plazma, N) = 5; n (plazma, CNH) = 6. \* – statisticky významný rozdíl CNH vs. N ( $P < 0,05$ ).

## 6. DISKUZE

### 6.1. Hmotnostní parametry zvířat

V této práci bylo využito dvou modelů CNH. V klasickém modelu využívaném naší laboratoří je parciální tlak kyslíku snížen z 21 % ( $FiO_2 = 0,21$ ) na 10 % ( $FiO_2 = 0,1$ ). V poslední době však testujeme také mírnější formu adaptace na chronickou hypoxii, kde je parciální tlak kyslíku snížen pouze na 12 % ( $FiO_2 = 0,12$ ). Zvířata takovouto adaptací lépe snáší a je možné ji proto kombinovat s jinými kardioprotektivními modely, např. s adaptací na fyzickou zátěž (Alánová a kol., 2017). Z tohoto důvodu je práce zaměřena zejména na tento mírnější model chronické hypoxie. V porovnání s klasickým modelem CNH (10 %  $O_2$ ) zde docházelo k menšímu nárůstu hematokritu. Zatímco u zvířat adaptovaných na CNH (10 %  $O_2$ ) dosahoval hematokrit 78 %, v případě adaptace na CNH (12 %  $O_2$ ) činil pouze 58 %. Mírněji se také rozvíjela hypertrofie pravé komory. Hmotnostní indexy pravých komor u zvířat adaptovaných na CNH (10 %  $O_2$ ) byly oproti kontrolám zvýšeny o 124 %, zatímco nárůst u CNH (12 %  $O_2$ ) byl pouze 89 %. Tyto výsledky se shodují s efekty CNH o dané síle v jiných experimentech (Alánová a kol., 2017; Chytilová a kol., 2015; Maslov a kol., 2013). Naměřené hmotnostní parametry zvířat ukazují, že rozdíl mezi 10 a 12 % parciálního tlaku  $O_2$  ve vdechovaném vzduchu je dostatečně velký na to, aby se významně projevil na míře fyziologické odpovědi.

### 6.2. Velikost infarktu myokardu: efekt adaptace na CNH (12 % $O_2$ ) a (10 % $O_2$ )

U zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii dochází k redukci velikosti infarktu myokardu oproti zvířatům kontrolním (Kolář a Ošťádal, 2004). Tento známý fenomén jsme potvrdili u potkanů kmene Sprague Dawley adaptovaných na CNH (10 %  $O_2$ ), kde rozdíl v rozsahu infarktu u kontrolních a adaptovaných zvířat dosahoval 20 %, což odpovídá klasické míře kardioprotekce zprostředkované adaptací na chronickou hypoxii (Chytilová a kol., 2015; Maslov a kol., 2013; Neckář a kol., 2004). Zvířata adaptovaná na mírnější formu hypoxie – CNH (12 %  $O_2$ ) – však už v našem případě nevykazovala známky kardioprotekce a velikost infarktu u nich byla téměř stejná jako u zvířat normoxických. Kardioprotektivní účinek této formy hypoxie však v naší laboratoři byl již v minulosti prokázán, kdy dospělí samci potkanů kmene Wistar vykazovali po adaptaci na CNH (12 %  $O_2$ ) zvýšenou toleranci k I/R poškození (Alánová a kol., 2017). Důvodem kontroverzních výsledků může být využití různých kmenů potkanů v obou experimentech. Je známo, že různé kmeny potkanů a myši jsou různě citlivé k I/R poškození (Baker a kol., 2000; Reichelt a kol., 2009). Je tedy možné, že na hypoxii reagují kmeny Wistar a Sprague Dawley odlišně, což se také odráží v prahové hodnotě  $FiO_2$  nutné k projevení kardioprotektivních účinků. V případě potkanů Sprague Dawley tedy tato prahová hodnota

pravděpodobně leží někde mezi hodnotami 0,1 a 0,12. Toto zjištění také podporují pozorované významně rozdílné hodnoty hematokritu, hypertrofie pravé komory a hladiny FTO mezi zvířaty adaptovanými na CNH (10 % O<sub>2</sub>) a (12 % O<sub>2</sub>).

### 6.3. Zastoupení FTO v tkáních

FTO, demetyláza účastnící se regulace metabolismu, byla objevena také v srdci (Gerken a kol., 2007). V této práci byla analyzována hladina FTO v normoxické srdeční tkáni LV a RV, neboť je známo, že myokard pravé a levé komory vykazuje významné metabolické odlišnosti (Phillips a kol., 2011; Wasková-Arnostová a kol., 2013). Hladiny v srdečních komorách byly také porovnávány s hladinami v metabolicky aktivních tkáních jater a koncového mozku. Relativní zastoupení FTO v tkáních bylo vztaženo na celkové množství proteinu. Výsledky ukazují, že protein FTO je u potkanů přítomen ve všech čtyřech typech tkání. Nejmenší množství je ho v LV. Jeho hladina v RV je pak 1,5x, v játrech 6,5x a v koncovém mozku dokonce 11x vyšší. Gao a kol. sledovali distribuci FTO v myších tkáních, kterou stejně jako my normalizovali na množství celkového proteinu (Gao a kol., 2010). Jejich výsledky se shodují s našimi. Chen a kol. detekovali protein FTO v srdci prasat, ale překvapivě ho vůbec nedetekovali v prasečích játrech (Chen a kol., 2016).

V analýze distribuce proteinů je problematické rozdílné množství celkového proteinu v jednotlivých tkáních. V identicky připravených tkáňových homogenátech jater a koncového mozku jsme například naměřili o 50 % vyšší koncentraci celkového proteinu ve prospěch jater (viz. kapitola 6.3.). Někteří autoři proto normalizují množství FTO například na hladinu  $\beta$ -aktinu (Chen a kol., 2016). Rozhodnutí vztahovat množství FTO k celkovému proteinu, spíše než ke konkrétnímu referenčnímu proteinu, však umožňuje lepší orientaci při volbě vhodného množství homogenátu dané tkáně k analýze metodou Western blot.

### 6.4. Cirkadiánní rytmicita FTO v srdci

FTO ovlivňuje také expresi hodinových genů a hraje tak určitou roli v cirkadiánní rytmicitě organismu (Wang a kol., 2015). Je též známo, že regulace metabolismu je úzce spjata s denní dobou (Shi a Zheng, 2013). Naše výsledky ukazují, že hladiny proteinu FTO v srdci nevykazují žádnou cirkadiánní rytmicitu. Tuto analýzu bylo nutné provést pro plánované experimenty s inhibitorem FTO *in vivo* vzhledem k době jeho aplikace a pro samotný odběr tkání.

### 6.5. Hladina FTO v tkáních: efekt adaptace na CNH

Během adaptace na chronickou hypoxii dochází v srdci ke změně energetického metabolismu. Tato změna umožňuje myokardu lépe se vypořádat s případným akutním nedostatkem kyslíku

(Essop, 2007). Důležitou roli v adaptaci metabolismu srdce by přitom mohl hrát protein FTO, který je schopný epigeneticky regulovat expresi proteinů, a tím ovlivňovat různé buněčné procesy. Cílem této práce bylo proto stanovit, zda adaptace na chronickou hypoxii ovlivňuje hladinu proteinu FTO v srdeční tkáni. Podle předpokladů se skutečně ukázalo, že hladiny proteinu FTO v srdci během adaptace na CNH rostou. V LV potkanů rozdíl činil přibližně 21 %, v RV pak zhruba 27 %. Hladiny v játrech i v koncovém mozku přitom zůstaly na původní úrovni.

Rozdíly v obou modelech hypoxie jsou kromě hmotnostních parametrů patrné také na hladině proteinu FTO v tkáni adaptovaných zvířat. Pro porovnání obou modelů jsme se zaměřili na hladinu FTO v LV. Zatímco během CNH (12 % O<sub>2</sub>) zde dochází k zvýšení hladiny FTO o 21 %, u CNH (10 % O<sub>2</sub>) je toto zvýšení 77%. Zajímavé je, že přestože hladiny proteinu FTO v LV během adaptace na chronickou hypoxii stoupají, tak nebyl pozorován žádný nárůst mRNA FTO v této tkáni. V případě CNH (10 % O<sub>2</sub>) byly hladiny mRNA nezměněny a u CNH (12 % O<sub>2</sub>) se překvapivě objevil dokonce 10% pokles.

Tyto výsledky podpořily teorii, že FTO může epigeneticky ovlivňovat buněčné procesy navozené adaptací na chronickou hypoxii a potenciálně tak přispívat ke zvýšené toleranci myokardu k I/R poškození. Cílem do budoucna je proto testovat roli FTO v odolnosti izolovaných kardiomyocytů vůči simulované ischemii/reperfuzi a také *in vivo* v ischemické odolnosti srdce pomocí nedávno připraveného inhibitoru FTO (Zheng a kol., 2014).

## 6.6. Hladina adipokinů v levé komoře a plazmě: efekt adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>)

Dalším cílem této práce bylo vyhodnotit efekt CNH (12 % O<sub>2</sub>) na hladinu leptinu a adiponektinu v plazmě i tkáni LV. O obou těchto adipokinech je totiž známo, že dokáží reagovat na změny v parciálním tlaku kyslíku (Chaiban a kol., 2008). Mimo to ovlivňují buněčný metabolismus a zřejmě také existuje určitá spojitost mezi jejich hladinami a aktivitou FTO (Duicu a kol., 2016). Oba adipokiny navíc dokáží ovlivňovat toleranci myokardu k I/R poškození (Shibata a kol., 2005; Smith a kol., 2010).

V případě leptinu jsme po adaptaci pozorovali zvýšení jeho hladin v LV o 25 %, které však nebylo statisticky významné. O leptinu je známo, že v kardiomyocytech zvyšuje hladinu FTO (Gan a kol., 2013). Jeho nárůst v LV by tak odpovídal námi pozorovanému nárůstu FTO v této tkáni. V plazmě nebyly v případě leptinu pozorovány žádné změny. Chaiban a kol. však zaznamenali u neonatálních potkanů adaptovaných na CNH (10 % O<sub>2</sub>; 8 týdnů) signifikantní nárůst hladin leptinu v plazmě, který se ale objevil až po vztažení na hmotnost zvířat (Chaiban a kol., 2008). V našem případě k nárůstu leptinu v plazmě nepomohl ani tento přepočít.

V případě adiponektinu jsme po adaptaci pozorovali pokles jeho hladin v plazmě o 52 %. Tento pokles byl statisticky signifikantní. Pokles koncentrací adiponektinu v plazmě u hypoxických zvířat pozorovali také Chaiban a kol., kteří studovali vliv adaptace CNH (10 % O<sub>2</sub>; 8 týdnů) na hladinu adiponektinu u neonatálních potkanů (Chaiban a kol., 2008). V tkáni LV byla hladina adiponektinu nezměněna.

V poslední době se ukazuje, že spíše než hladiny těchto adipokinů samy o sobě, je zajímavější jejich poměr, který může být markerem různých onemocnění, včetně onemocnění kardiovaskulárních (Kappelle a kol., 2012). Poměr leptinu k adiponektinu po adaptaci na CNH (12 % O<sub>2</sub>) v našem experimentu vykazoval nárůst jak v plazmě, tak v tkáni LV. V plazmě nárůst činil přibližně 117 % a byl statisticky signifikantní. V LV rostl nesignifikantně o 25 %. Vysoký poměr leptinu k adiponektinu je pro zdraví považován za škodlivý (Kappelle a kol., 2012). Je však možné, že jeho mírné zvýšení může být naopak protektivní, stejně jako je tomu například u koncentrací prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$  (Chytilová a kol., 2015; Lecour a James, 2011).

## 7. ZÁVĚR

Adaptace na chronickou hypoxii je známý fenomén, který zvyšuje toleranci srdce k ischemii i následné reperfuzi. Tato adaptace je umožněna řadou fyziologických změn na buněčné i tkáňové úrovni. Jednou z nich je změna v buněčném energetickém metabolismu. Zde může hrát svou roli i nedávno objevený protein FTO, který metabolismus ovlivňuje. Funkce FTO spočívá zejména v demethylaci m<sup>6</sup>A v mRNA, jehož přítomnost v této ribonukleové kyselině vede k jejímu rozpadu. Demethyláza FTO tak touto modifikací ovlivňuje stabilitu mRNA a může tak modulovat syntézu proteinů účastnících se metabolické remodelace myokardu navozené adaptací na chronickou hypoxii. Metabolismus srdeční tkáně také ovlivňuje leptin a adiponektin. U těchto dvou adipokinů již byly objeveny jejich protektivní účinky na myokard.

Cílem této práce bylo porovnat míru kardioprotekce dvou modelů chronické hypoxie u potkanů kmene Sprague Dawley. Dále pak zjistit, zda u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii dochází ke změně hladiny FTO v myokardu levé a pravé komory. Zároveň bylo naším cílem analyzovat vliv chronické hypoxie na hladiny leptinu a adiponektinu v tkáni levé komory a plazmě.

Naše výsledky ukázaly, že:

- adaptace na CNH (10 % O<sub>2</sub>) vede u potkanů kmene Sprague Dawley k signifikantnímu snížení rozsahu infarktu myokardu, zatímco adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) nemá na velikost infarktu myokardu vliv
- hladina FTO je vyšší v pravé komoře, než v komoře levé; proti játrům a koncovému mozku je však v obou komorách nízká
- FTO v srdci nevykazuje cirkadiánní rytmicitu
- množství demethylázy FTO v hypoxickém myokardu je vyšší než v myokardu normoxickém, a to závisle na míře hypoxie
- adaptace na CNH (12 % O<sub>2</sub>) vede u potkanů kmene Sprague Dawley k signifikantnímu snížení plazmatických hladin adiponektinu a zvýšení poměru leptinu k adiponektinu v plazmě

FTO tak může během adaptace na chronickou hypoxii svým epigenetickým působením na mRNA cílových proteinů přispívat k regulaci energetického metabolismu a tím ke zvýšené toleranci myokardu vůči I/R poškození. K tomu může pravděpodobně přispívat také leptin, jehož hladiny naznačovaly v hypoxických srdcích rostoucí, i když statisticky nesignifikantní, trend. Kardioprotekce zprostředkované adaptací na chronickou hypoxii se naopak

pravděpodobně nepodílí adiponektin, jehož hladiny v srdci zůstávají nezměněny a v plazmě dokonce naopak klesají.

## CITOVANÁ LITERATURA

- Aijala, M., Ronkainen, J., Huusko, T., Malo, E., Savolainen, E.R., Savolainen, M.J., Salonurmi, T., Bloigu, R., Kesaniemi, Y.A., and Ukkola, O. (2015). The fat mass and obesity-associated (FTO) gene variant rs9939609 predicts long-term incidence of cardiovascular disease and related death independent of the traditional risk factors. *Ann. Med.* 47(8): 665-663.
- 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.* (in press)
- Ambrosini, G., Nath, A., Sierra-Honigmann, M., and Flores-Riveros, J. (2002). Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 277(37): 34601-34609.
- Ashima, R.S. (2005). Central actions of adipocyte hormones. *Trends. Endocrinol. Metab.* 16(7): 307-313.
- Atkinson, L., Fischer, M., and Lopaschuk, G. (2002). Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *J. Biol. Chem.* 277(33): 29424-29430.
- Bairwa, S.C., Rajapurohitam, V., Gan, X.T., Mantat, R., Proctor, S.D., Karmazyn, M. (2016). Cardiomyocyte antihypertrophic effect of adipose tissue conditioned medium from rats and its abrogation by obesity is mediated by the leptin to adiponectin ratio? *PLoS One.* 11(1): e0145992.
- Baker, J.E., Konorev, E.A., Gross, G.J., Chilian, W.M., and Jacob, H.J. (2000). Resistance to myocardial ischemia in five rat strains: is there a genetic component of cardioprotection? *Am. J. Heart. Circ. Physiol.* 278(4): H1395-H1400.
- Blüher, M., and Mantzoros, C.S. (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism.* 64(1): 131-145.
- Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G.S., Meyere, D., Golzio, C., Molinari, F., Kadhom, N., Etchevers, H.C., Saudek, V., Farooqi, I.S., Froquel, P., Lindahl, T., O'Rahilly, S., Munnich, A., and Colleaux, L. (2009). Loss-of-function



- mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am. J. Hum. Genet.* 85(1): 106-111.
- Bolli, R. (2000). The late phase of preconditioning. *Circ. Res.* 87(11): 972-983.
- Bouhidel, O., Pons, S., Souktani, R., Zini, R., Berdeaux, A., and Ghaleh, B. (2008). Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 295(4): H1580-H1586.
- Bravard, A., Lefai, E., Meunier, E., Pesenti, S., Disse, E., Vouillarmet, J., Peretti, N., Rabasa-Lhoret, R., Laville, M., Vidal, H., and Rieusset, J. (2011). FTO is increased in muscle during type 2 diabetes, and its overexpression in myotubes alters insulin signaling, enhances lipogenesis and ROS production, and induces mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 60(1): 258-268.
- Burtscher, M. (2013). Effects of living at higher altitudes on mortality: a narrative review. *Aging. Dis.* 5(4): 274-280.
- Carnevali, L., Graiani, G., Rossi, S., Al Banachabouchi, M., Quaini, F., Rosenthal, N., and Sqofio, A. (2014). Signs of cardiac autonomic imbalance and proarrhythmic remodeling in FTO deficient mice. *PLoS One* 9(4): e95499.
- Desrosiers, R., Friderici, K., and Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71(10): 3971-3975.
- Doyle, D., Goings, G., Upshaw-Earley, J., Page, E., Ranscht, B., and Palfrey, H. (1998). T-cadherin is a major glycoposphoinositol-anchored protein associated with noncaveolar detergent-insoluble domains of the cardiac sarcolemma. *J. Biol. Chem.* 273(13): 6937-6943.
- Duicu, C., Mărginean, C., Vodăzan, S., Tripon, F., and Bănescu, C. (2016). FTO rs 9939609 SNP Is Associated With Adiponectin and Leptin Levels and the Risk of Obesity in a Cohort of Romanian Children Population. *Medicine (Baltimore)* 95(20): e3709.
- Dyachok, J., Earnest, S., Iturraran, E.N., Cobb, M.H., and Ross, E.M. (2016). Amino acids regulate mTORC1 by an obligate two-step mechanism. *J. Biol. Chem.* 291(43): 22414-22426.
- Essop, M. (2007). Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J. Physiol.* 584(3): 715-726.

- Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* 36(7): 461-470.
- Finucane, F.M., Luan, J., Wareham, N.J., Sharp, S.J., O'Rahilly, S., Balkau, B., Flyvbjerg, A., Walker, M., Hojlund, K., Nolan, JJ and European Group for the Study of Insulin Resistance: Relationship between insulin sensitivity and cardiovascular disease risk study group ), Savge DB. (2009). Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia.* 52(11): 2345-2349.
- Fisher, E., Schulze, M.B., Stefan, N., Haring, H., Doring, F., Joost, H., Al-Hasani, H., Boeing, H., and Pischon, T. (2009). Association of the *FTO* rs9939609 single nucleotide polymorphism with C-reactive protein levels. *Obesity (Silver Spring).* 17(2): 330-334.
- Fischer, J.K., Vierkotten, J., and Peters, T. (2009). Inactivation of the *Fto* gene protects from obesity. *Nature.* 458(7240): 894-898.
- Formenti, F., Constantin-Teodosiu, D., Emmanuel, Y., Cheeseman, J., Dorrington, K., Edwards, L.M., Humphreys, S.M., Lappin, T.R., McMullin, M.F., McNamara, C.J., Mills, W., Murphy, J.A., O'Connory, D.F., Percy, M.J., Ratcliffe, P.J., Smith, T.G., Treacy, M., Frayn, K.N., Greenhaff, P.L., Karpe, F., Clarke, K., and Robbins, P.A. (2010). Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(28): 12722-12727.
- Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., Shields, B., Harries, L.W., Barrett, J.C., Ellard, S., Groves, C.J., Knight, B., Parch, A.M., Ness, A.R., Ebrahim, S., Lawlor, D.A., Ring, S.M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M.R., Sovio, U., Bennett, A.J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R.J., Barroso, I., Wareham, N.J., Karpe, F., Owen, K.R., Cardoon, L.R., Walker, M., Hutman, G.A., Palmer, C.N., Doney, A.S., Morris, A.D., Smith, G.D., Hattersley, A.T., and McCarthy M.I. (2007). A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 316(5826):889-894.
- Frühbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* 393(Pt 1): 7-20.
- Fujioka, D., Kawabata, K., Saito, Y., Kobayashi, T., Nakamura, T., Kodama, Y., Takano, H., Obata, J.E., Kitta, Y., Umetani, K., and Kuqiyama, K. (2006). Role of adiponectin receptors in

- endothelin-induced cellular hypertrophy in cultured cardiomyocytes and their expression in infarcted heart. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 290(6): H2409-H2416.
- Gan, X., Zhao, G., Huang, C., Rowe, A., Purdham, D.M., and Karmazyn, M. (2013). Identification of fat mass and obesity associated (FTO) protein expression in cardiomyocytes: regulation by leptin and its contribution to leptin-induced hypertrophy. *PLoS One* 8(9): e74235.
- Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.C., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S., McDonough, M.A., Cunliffe, S., McNeill, L.A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A.P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I.S., Sedgwick, B., Barroso, I., Lindahl, T., Ponting, C.P., Ashcroft, F.M., O'Rahilly, S., and Schofield, C.J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 318(5855): 1469-1472.
- Ghantous, C.M., Azrak, Z., Hanache, S., Abou-Kheir, W., and Zeidan, A. (2015). Differential role of leptin and adiponectin in cardiovascular system. *Int. J. Endocrinol.*: 534320.
- Grosfeld, A., Andre, J., Hauquel-De Mouzon, S., Berra, E., Pouysseur, J., and Guerre-Millo, M. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 277(45): 42953-42957.
- Gulati, P., and Yeo, G.S.H. (2013). The biology of FTO: from nucleic acid demethylase to amino acid sensor. *Diabetologia* 56(10): 2113-2121.
- Gulati, P., Cheung, M.K., Antrobus, R., Church, C.D., Harding, P.H., Tung, Y.L., Rimmington, D., Ma, M., Ron, D., Lehner, P.J., Ashcroft, F.M., Cox, R.D., Coll, A.P., O'Rahilly, S., and Yeo, G.S.H. (2013). Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110(7): 2557-2562.
- Gulati, P., Avezov, E., Ma, M., Antrobus, R., Lehner, P., O'Rahilly, S., and Yeo, G.S.H. (2014). Fat mass and obesity-related (FTO) shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Biosci. Rep.* 34(5): e00144.
- Haddad, J.J., and Harb, H.L. (2005). Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . *Int. Immunopharmacol.* 5(3): 461-483.
- Han, Z., Niu, T., Chang, J., Lei, X., Zhao, M., Wang, Q., Cheng, M., Wang, J., Feng, Y., and Chai, J. (2010). Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature.* 464(7292): 1205-1209.

- Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2004). New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 61(3): 448-460.
- Hinney, A., Nguyen, T.T., Scherag, A., Friedel, S., Bronner, G., Muller, T.D., Graller, H., Illig, T., Wichmann, H.E., Rief, W., Schafer, H., and Hebebrand, J. (2007). Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One.* 2(12): e1361.
- Hubáček, J., Staněk, V., Gebauerová, M., Pilipincová, A., Dlouhá, D., Poledne, R., Achermann, M., Skalická, H., Matoušková, J., Kruger, A., Pěnička, M., Hrabálková, H., Veselka, J., Hájek, P., Lánská, V., Adámková, V., and Pitha, J. (2010). A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. *Clin. Chim. Acta.* 411(15-16): 1069-1072.
- Hug, C., Wang, J., Ahmad, N.S., Bogan, J.S., Tsao, T.S., and Lodish, H.F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(28): 10308-10313.
- Hui, X., Lam, K.S., Vanhoutte, P.M., and Xu, A. (2012). Adiponectin and cardiovascular health: an update. *Br. J. Pharmacol.* 165(3): 574-590.
- Hurtado, A. (1960). Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann. Intern. Med.* 53: 247-258.
- Chaiban, J.T., Bitar, F.F., and Azar, S.T. (2008). Effect of chronic hypoxia on leptin, insulin, adiponectin, and ghrelin. *Metabolism* 57(8): 1019-1022.
- Chen, X., Zhou, B., Luo, Y., Huang, Z., Jia, G., Liu, G., Zhao, H. (2016). Tissue distribution of porcine FTO and its effect on porcine intramuscular preadipocytes proliferation and differentiation. *PLoS One.* 11(3): 1019-1022.
- Cheung, M.K., Gulati, P., O'Rahilly, S., and Yeo G.S.H. (2013). FTO expression is regulated by availability of essential amino acids. *Int. J. Obes. (Lond.).* 37(5): 744-747.
- Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G.T., Teboul, L., Wells, S., Bruning, J.C., Nolan, P.M., Ashcroft, F.M., and Cox, R. (2010). Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat. Genet.* 42(12): 1086-1092.
- Chytilová, A., Borchert, G.H., Mandíková-Alánová, P., Hlaváčková, M., Kopkan, L., Khan, M.A., Imiq, J.D., Kolář, F., Neckář, J. (2015). Tumor necrosis factor- $\alpha$  contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia. *Acta Physiol.* 214(1): 97-108.

- Jia, G., Yang, C.G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., and He, C. (2008). Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett.* 582(23-24): 3313-3319.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.G., and He, C. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* 7(12): 885-887.
- Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26(3): 439-451.
- Kappelle, P.J., Dullaart, R.P, van Beek, A.P., Hillege, H.L., and Wolffenbuttel, B. (2012). The plasma leptin/adiponectin ratio predicts first cardiovascular event in men: a prospective nested case-control study. *Eur. J. Intern. Med.* 23(8): 755-759.
- Karmazyn, M., Purdham, D.M, Rajapurohitam, V., and Zeidan, A. (2008). Signalling mechanisms underlying the metabolic and other effects of adipokines on the heart. *Cardiovasc. Res.* 79(2): 279-286.
- Karra, E., O'Daly, O.G., Choudhury, A.I., Yousseif, A., Millership, S., Neary, M.T., Scott, W.R., Chandarana, K., Manning, S., Hess, M.E., Iwakura, H., Akamizu, T., Millet, Q., Gelegen, C., Drew, M.E., Rahman, S., Emmanuel, J.J., Williams, S.C., Ruther, U.U., Bruning, J.C., Withers, D.J., Zelaya, F.O., and Batterham, R.L. (2013). A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J. Clin. Invest.* 123(8): 3539-3551.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(6): 2548-2556.
- Kolář, F., and Ošťádal, B. (2004). Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol. Res.* 53: S3-S13.
- Lappalainen, T., Kolehmainen, M., Schwab, U.S., Tolppanen, A.M., Stančáková, A., Lindstrom, J., Eriksson, J.G., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Aunola, S., Ilanne-Parikka, P., Herder, C., Koenig, W., Gylling, H., Kolb, H., Tuomilehto, J., Kuusisto, J., Uusitupa, M., and Finnish Diabetes Prevention Study Group. (2011). Association of the FTO gene variant (rs9939609) with cardiovascular disease in men with abnormal glucose metabolism—the Finnish Diabetes Prevention Study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 21(9): 691-698.
- Larder, R., Cheung, M.K., Tung, Y.C., Yeo, G.S., and Coll, A.P. (2011). Where to go with FTO? *Trends. Endocrinol. Metab.* 22(2): 53-59.

- Lecour, S., and James, R.W. (2011). When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *Eur. Heart J.* 32(6): 680-685.
- Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, L., and Friedman, J. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 379(6566): 632-635.
- Lee, Y., Naseem, R.H., Duplomb, L., Park, B.H., Garry, D.J, Richardson, J.A., Schaffer, J.E. and Unger, R. (2004). Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(37): 13624-13629.
- Lekva, T., Michelsen, A.E., Aukrus, P., Henriksen, T., Bollerslev, J., and Ueland, T. (2017). Leptin and adiponectin as predictors of cardiovascular risk after gestational diabetes mellitus *Cardiovasc. Diabetol.* 16(1): 5.
- Lennon, S.L., Quindry, J., Hamilton, K.L., French, J., Staib, J., Mehta, J.L., and Powers, S.K. (2004). Loss of exercise-induces cardioprotection after cessation of exercise. *J. Appl. Physiol.* 96(4): 1299-1305.
- Liao, Y.C., Liang, K.W., Lee, W.J., Lee, W.L., Lee, I.T., Wang, J.S., Ting, C.T., and Sheu, W.H. (2013). Leptin to adiponectin ratio as a useful predictor for cardiac syndrome X. *Biomarkers.* 18(1): 44-50.
- Liu, C., Mou, S., and Pan, C. (2013). The FTO gene rs9939609 polymorphism predicts risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 8(8): e71901.
- Maslov, L.N., Naryzhnaia, N.V., Tsubulnikov, 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(9-11): 373-379.
- Mattu, H.S., and Randeve, H.S. (2013). Role of adipokines in cardiovascular disease. *J. Endocrinol.* 216(1): T17-36.
- Míčová, P., Hahnová, K., Hlaváčková, M., Elsnicová, B., Chytilová, A., Holzerová, K., Žurmanová, J., Neckář, J., Kolář, F., Nováková, O., and Novotný, J. (2016). Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ /cyclooxygenase 2 pathway via  $\beta$ -2-adrenoreceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Mol. Cell. Biochem.* 423(1-2): 151-163.
- Michiels, C., Minet, E., Mottet, D., and Raes, M. (2002). Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic. Biol. Med.* 33(9): 1231-1242.

- Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Muller, C., Carling, D., and Kahn, B.D. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 415(6869): 339-343.
- Neckář, J., Papoušek, F., Nováková, O., Ošťádal, B. and Kolář, F. (2002). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic. Res. Cardiol.* 36(4): 501-505.
- Neckář, J., Ošťádal, B. and Kolář, F. (2004). Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol. Res.* 53(6): 621-628.
- Nickola, M.W., Wold, L.E., Colligan, P.B., Wang, G.J., Samson, W.K., and Ren, J. (2000). Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes. Role of NO. *Hypertension*. 36(4): 501-505.
- Ošťádal, B., and Kolář, F. (2007). Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158(2-3): 224-236.
- Palanivel, R., Equchi, M., Shuralyova, I., Coe, I., and Sweeney, G. (2006). Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes. *Metabolism*. 55(8): 1067-1075.
- Palanivel, R., Fanq, X., Park, M., Equchi, M., Pallan, S., De Girolamo, S., Liu, Y., Wang, Y., Xu, A., and Sweeney, G. (2007). Globular and full-length forms of adiponectin mediate specific changes in glucose and fatty acid uptake and metabolism in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 75(1): 148-157.
- Park, M., and Sweeney, G. (2013). Direct effects of adipokines on the heart: focus on adiponectin. *Heart Fail. Rev.* 18(5): 631-644.
- Pausova, Z., Syme, C., Abrahamowicz, M., Xiao, Y., Leonard, G.T., Perron, M., Richer, L., Veillette, S., Smith, G.D., Seda, O., Tremblay, J., Hamet, P., Gaudet, D., and Paus, T. (2009). A common variant of the FTO gene is associated with not only increased adiposity but also elevated blood pressure in French Canadians. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2(3): 260-269.
- Pearson, T.A., Mensah, G.A., Alexander, R.W., Anderson, J.L., Cannon, R.O. 3rd., Criqui, M., Fadl, Y.Y., Fortmann, S.P., Hong, Y., Myers, G.L., Rifai, N., Smith, S.C. Jr., Taubert, K., Tracy, R.P., Vinicor, F., Centers of Disease Control and Prevention, and American Heart Association. (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease: application

- to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 107(3): 499-511.
- Peters, T., Ausmeier, K., and Ruther, U. (1999). Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm. Genome*. 10(10): 983-986.
- Phillips, D., Aponte, A.M., Covian, R., Neufeld, E., Yu, Z.X., and Balaban, R.S. (2011). Homogenous protein programming in the mammalian left and right ventricle free walls. *Physiol. Genomics*. 43(21): 1198-1206.
- Pischon, T., Girman, C.J., Hotamisliqil, G.S., Rifai, N., Hu, F.B., and Rimm, E. (2004). Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*. 291(14): 1730-1737.
- Poupa, O., Krofta, K., Prochazka, J., and Turek, Z. (1966). Acclimatization to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed. Proc*. 25(4): 1243-1246.
- Purdham, D.M, Zou, M.X., Rajapurohitam, V., and Karmazyn, M. (2004). Rat heart is a site of leptin production and action. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 287(6): H2877-H2884.
- Raff, H. (2003). Total and active ghrelin in developing rats during hypoxia. *Endocrine*. 21(2): 159-161.
- Rajapurohitam, V., Gan, X.T, Kirshenbaum, L.A., and Karmazyn, M. (2003). The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ. Res*. 93(4): 277-279.
- Reichelt, M.E., Willems, L., Hack, B.A., Peart, J.N., and Headrick, J.P. (2009). Cardiac and coronary function in the Langendorff-perfused mouse heart model. *Exp. Physiol*. 94(1): 54-70.
- Robbens, S., Rouzé, P., Cock, J., Spring, J., Worden, A.Z., and Van der Peer, Y. (2008). The FTO gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae. *J. Mol. Evol*. 66(1): 80-84.
- Sharma, V., Mustafa, S., Patel, N., Wambolt, R., Allard, M.F., and McNeill, J.H. (2009). Stimulation of cardiac fatty acid oxidation by leptin is mediated by a nitric oxide-p38 MAPK-dependent mechanism. *Eur. J. Pharmacol.*: 617(1-3): 113-117.
- Shi, M., and Zheng, X. (2013). Interactions between the circadian clock and metabolism: there are good times and bad times. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 45(1): 61-69.



- Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D.R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., and Walsh, K. (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat. Med.* *11(10)*: 1096-1103.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.E. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* *270(45)*: 26746-26749.
- Siiteri, P.K (1987). Adipose tissue as a source of hormones. *Am. J. Clin. Nutr.* *45(1)*: 277-82.
- Smith, C.C., Mocanu, M.M., Davidson, S.M., Wynne, A.M., Simpkin, J.C., and Yellon, D. (2006). Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects. *Br. J. Pharmacol.* *149(1)*: 5-13.
- Smith, C.C., Dixon, R.A., Wynne, A.M., Theodorou, L., Ong, S.G., Subrayan, S., Davidson, S.M., Hausenloy, D.J., and Yellon, D. (2010). Leptin-induced cardioprotection involves JAK/STAT signaling that may be linked to the mitochondrial permeability transition pore. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *299(4)*: H1265-H1270.
- Světová zdravotnická organizace. (2017). The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, staženo dne 17. 4. 2017.
- Thron, C., Akhyari, P., Godehardt, E., Lichtenberg, A., Ruther, U., and Seehaus, S. (2015). FTO is associated with aortic valve stenosis in a gender specific manner of heterozygote advantage: A population-based case-control study. *PLoS One.* *10(10)*: e0139419.
- Tschop, M., and Morrison, K.M. (2001). Weight loss at high altitude. *Adv. Exp. Med. Biol.* *502*: 237-247.
- Tung, Y.C., Ayuso, E., Shan, X., Bosch, F., O'Rahilly, S., Coll, A.P., and Yeo, G. (2010). Hypothalamic-specific manipulation of Fto, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. *PLoS One.* *5(1)*: e8771.
- Van der Heiden, K., Cuhlmann, S., Luong, A., Zakkar, M., and Evans, P.C. (2010). Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin. Sci. (Lond).* *118(10)*: 593-605.
- Waiki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Kita, S., Ito, Y., Hada, Y., Uchida, S., Tsuchida, A., Takekawa, S., and Kadowaki, T. (2005). Generation of globular fragment of adiponectin by

- leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology*. 146(2): 790-796.
- Wang, C.Y., Shie, S.S., Hsieh, I.C., Tsai, M.L., and Wen, M.S. (2015). FTO modulates circadian rhythms and inhibits the CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464(3): 826-832.
- Wang, P., Yang, F.J, Du, H., Guan, Y.F., Xu, T., Xu, X.W., Su, D.F., and Miao, C. (2011). Involvement of leptin receptor long isoform (LepRb)-STAT3 signaling pathway in brain fat mass- and obesity-associated (FTO) downregulation during energy restriction. *Mol. Med.* 17(5-6): 523-532.
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G.C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., and He, C. (2014). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*. 505(7481): 117-120.
- Wang, Z.V, and Scherer, P.E. (2016). Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol* 8(2): 93-100.
- Wasková-Arnostová, P., Elsnicová, B., Kašparova, D., Šebesta, O., Novotný, J., Neckář, J., Kolář, F. and Žurmanová, J. (2013). Right-to-left ventricular differences in the expression of mitochondrial hexokinase and phosphorylation of Akt. *Cell Physiol. Biochem.* 31(1): 66-79.
- Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 16(10): 1151-1162.
- Wu, Q., Saunders, R.A., Szkudlarek-Mikho, M., Serna Ide, L., and Chin, K.V. (2010). The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 401(3): 390-395.
- Wu, R., Jiang, D., Wang, Y., and Wang, X. (2016). N<sup>6</sup>-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A) methylation in mRNA with a dynamic and reversible epigenetic modification. *Mol. Biotechnol.* 58(7): 450-459.
- Xiao, C.Y., Yuhki, K., Hara, A., Fujino, T., Kuriyama, S., Yamada, T., Takayama, K., Takahata, O., Karibe, H., Taniguchi, T., Narumiya, S., and Ushikubi, F. (2004). Prostaglandin E<sub>2</sub> protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP4. *Circulation*. 109(20): 2462-2468.

- Zabeau, L., Lavens, D., Peelman, F., Eyckerman, S., Vandekerckhove, J., and Tavernier, J. (2003). The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett.* 546(1): 45-50.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372(6505): 425-432.
- Zheng, G., Dahl, J.A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.M., Li, C.J., Vagbo, C.B., Shi, Y., Wang, W.L., Song, S.H., Lu, Z., Bosmans, R.P., Dai, Q., Hao, Y.J., Yang, X., Zhao, W.M., Tong, W.M., Wang, X.J., Bogdan, F., Furu, K., Fu, Y., Jia, G., Zhao, X., Liu, J., Krokan, H.E., Klungland, A., Yang, Y.G., and He, C. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol. Cell.* 49(1): 18-29.
- Zheng, G., Cox, T., Tribbey, L., Wang, G.Z., Iacoban, P., Booher, M., Gabriel, G.J., Zhou, L., Bae, N., Rowles, J., He, C., and Olsen, M.J. (2014). Synthesis of a FTO inhibitor with anticonvulsant activity. *ACS Chem. Neurosci.* 5(8): 658-665.