

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

**Úloha proteinkinasy C a jejích cílových
proteinů v mechanismu kardioprotekce**

**The role of protein kinase C and its targets
in cardioprotection**

Dizertační práce



Školitel: Mgr. Markéta Hlaváčková, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

RNDr. Kristýna Holzerová

2016

Prohlášení

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

V Praze dne

Kristýna Holzerová

Poděkování

Během svého doktorského studia jsem toho potřebovala mnoho. Pomoc při učení se nové metodiky, sepisování článků a abstraktů, tvorbě posterů, aplikování grantů či přípravě prezentací. Za toto všechno a navíc ještě za příjemnou pracovní atmosféru, kamarádské prostředí a povzbuzení a útěchu v těžkých chvílích vděčím: Mgr. Markétě Hlaváčkové, Ph.D., doc. RNDr. Olze Novákové, CSc., doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc., prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc., RNDr. Janu Neckářovi, Ph.D., Mgr. Petře Míčové, Mgr. Anně Svatoňové, Bc. Danielu Benákovi, Jarmile Ševčíkové a Bc. Janě Vašinové. A samozřejmě také celé své rodině, té zejména za více než časté hlídání Agátky. Bez Vás všech bych se až k psaní poděkování v dizertační práci nikdy nedostala. Mockrát děkuji!

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury ČR (303/12/1162 a 16-12420Y), Grantové agentury Univerzity Karlovy (66310, 161110 a 392615) a grantů UNCE-204013 a SVV-260313/2016.

OBSAH

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
Klíčová slova.....	3
Key words.....	3
Seznam zkratek.....	4
1 ÚVOD.....	6
1.1 Protekce myokardu.....	6
1.1.1 Ischemický preconditioning.....	7
1.1.2 Ischemický postconditioning.....	7
1.1.3 Ischemický conditioning na dálku.....	7
1.1.4 Adaptace na cvičení.....	8
1.1.5 Adaptace na chronickou hypoxii.....	8
1.1.5.1 Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie.....	9
1.1.5.2 Modely hypoxie.....	9
1.1.5.3 Molekulární mechanismy kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií.....	11
1.1.5.3.1 Transkripční faktory.....	11
1.1.5.3.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku a antioxidační systém.....	13
1.1.5.3.3 Iontová homeostáza.....	14
1.1.5.3.4 Energetický metabolismus.....	15
1.1.5.3.5 Metabolismus lipidů.....	16
1.1.5.3.6 Proteinkinasy.....	17
1.2 Proteinkinasa C.....	17
1.2.1 Struktura PKC.....	18
1.2.2 Regulace PKC.....	19
1.2.3 Chronická hypoxie a PKC v myokardu.....	21
1.2.4 PKC a její cílové proteiny uplatňující se v kardioprotekci.....	23
1.2.4.1 PKC a apoptosa.....	23
1.2.4.2 PKC a dynamika mitochondrií.....	26
1.2.4.3 PKC a autofagie.....	26
1.2.4.4 PKC a sfingolipidy.....	28
1.2.4.5 PKC a odstraňování toxických aldehydů.....	28
1.2.4.6 PKC a gap junctions.....	29

2 HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE	30
3 METODIKA	33
3.1 Laboratorní zvířata	33
3.2 Experimentální modely chronické hypoxie.....	33
3.3 Odběr tkáně	34
3.4 Frakcionace a homogenizace vzorků	34
3.5 Elektroforéza a Western blot.....	35
3.6 Izolace RNA a RT-PCR.....	39
3.7 Příprava histologických řezů pro metodu Tunel	40
3.8 Metoda Tunel	40
3.9 Stanovení buněčné viability a uvolnění laktátdehydrogenasy po simulované ischemii/reperfúzi a vliv inhibičního peptidu PKC ϵ KP-1633	41
4 VÝSLEDKY	42
4.1 CÍL 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)	42
4.1.1 Vliv IHH na PKC δ , PKC ϵ a PKC α	42
4.1.2 Vliv CNH na PKC δ a PKC ϵ	46
4.2 CÍL 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH	52
4.2.1 Vliv IHH na apoptosu	52
4.2.2 Vliv IHH na dynamiku mitochondrií	56
4.2.3 Vliv IHH na autofagii.....	57
4.2.4 Vliv IHH na další cílové proteiny PKC – SPHK1, SPHK2, ALDH2 a Cx43.....	58
5 DISKUZE	60
5.1 CÍL 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)	60
5.1.1 Vliv IHH na PKC δ , PKC ϵ a PKC α	60
5.1.2 Vliv CNH na PKC δ a PKC ϵ	62
5.2 CÍL 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH	64
5.2.1 Vliv IHH na apoptosu	64
5.2.2 Vliv IHH na dynamiku mitochondrií	67
5.2.3 Vliv IHH na autofagii.....	68
5.2.4 Vliv IHH na další cílové proteiny PKC – SPHK1, SPHK2, ALDH2 a Cx43.....	70
5.2.4.1 Vliv IHH na SPHK1, SPHK2	70
5.2.4.2 Vliv IHH na ALDH2.....	70

5.2.4.3 Vliv IHH na Cx43	71
6 ZÁVĚR	73
Seznam použité literatury.....	74
Přílohy.....	99

Abstrakt

Mortalita kardiovaskulárních onemocnění je stále vysoká a pravděpodobně bude mít v budoucnu tendenci se spíše zvyšovat. Přestože byla popsána řada způsobů, jak odolnost myokardu vůči ischemicko-reperfúznímu poškození zvýšit, minimum z nich bylo přeneseno do klinické praxe. Kardioprotektivní působení chronické hypoxie bylo popsáno již v 60. letech minulého století. Jeho detailní mechanismus nebyl doposud objasněn, ale byla identifikována řada komponent, které se zde uplatňují. Jednou z nich je proteinkinasa C (PKC). Úloha PKC byla podrobně popsána v mechanismu ischemického preconditioningu, její zapojení v mechanismu kardioprotekce vyvolané hypoxií však zůstává nejasné. Jedním z důvodů je množství isoform PKC, které mají mnohdy protichůdné účinky, a také různorodost používaných hypoxických modelů. V souvislosti s kardioprotekcí jsou nejčastěji zmiňovány isoformy PKC δ a PKC ϵ . Cílem mé práce bylo analyzovat změny těchto isoform PKC na dvou různých kardioprotektivních modelech hypoxie – intermitentní hypobarické (IHH) a kontinuální normobarické hypoxii (CNH). Zároveň jsme po adaptaci na IHH sledovali cílové proteiny PKC δ a PKC ϵ , které by mohly být do mechanismu kardioprotekce zapojeny. Jednalo se o proteiny spojené s apoptosou a autofagií, s dynamikou mitochondrií, odstraňováním toxických aldehydů, metabolismem sfingolipidů a signalizací přes gap junctions. Ukázali jsme, že zatímco adaptace na IHH vede k aktivaci PKC δ , adaptace na CNH vede naopak k aktivaci PKC ϵ . Použití inhibičního peptidu KP-1633 specifického pro PKC ϵ potvrdilo, že je tato isoforma pro kardioprotekci vyvolanou CNH klíčová. Analýza cílových proteinů PKC ukázala, že přestože vede IHH ke zvýšení proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2, počet apoptotických buněk je nižší. Zároveň došlo k aktivaci autofagie, díky které by mohlo docházet k rychlejšímu odstranění poškozených organel, a mohla by tak představovat mechanismus, kterým vede IHH ke kardioprotekci. Objasnění signálních drah spojených s kardioprotekcí vyvolanou adaptací na chronickou hypoxii by mohlo pomoci při léčbě ischemických stavů.

Abstract

The mortality of cardiovascular diseases remains high and it likely tends to increase in the future. Although many ways how to increase the resistance against myocardial ischemia-reperfusion damage have been described, few of them were transferred into clinical practice. Cardioprotective effect of chronic hypoxia has been described during 60s of the last century. Its detailed mechanism has not been elucidated, but a number of components has been identified. One of these components presents protein kinase C (PKC). The role of PKC was described in detail in the mechanism of ischemic preconditioning, but its involvement in the mechanism of cardioprotection induced by chronic hypoxia remains unclear. One reason is the amount of PKC isoforms, which have often contradictory effects, and the diversity of hypoxic models used. The most frequently mentioned isoforms in connection with cardioprotection are PKC δ and PKC ϵ . The aim of my thesis was to analyze changes in these PKC isoforms at two different cardioprotective models of hypoxia – intermittent hypobaric (IHH) and continuous normobaric hypoxia (CNH). We also examined the target proteins of PKC δ and PKC ϵ after the adaptation to IHH, which could be involved in the mechanism of cardioprotection. These included proteins associated with apoptosis and autophagy, mitochondrial dynamics, removal of toxic aldehydes, metabolism of sphingolipids and gap junctional communication. We have shown that while adaptation to IHH leads to PKC δ activation, the adaptation to CNH leads to activation of PKC ϵ . The use of PKC ϵ inhibitory peptide KP-1633 confirmed that PKC ϵ is a key isoform in cardioprotection induced by CNH. The analysis of PKC target proteins showed that although IHH led to an increase of proapoptotic proteins of Bcl-2 family, the number of apoptotic cells was lower. Simultaneously, the adaptation to IHH activated autophagy, through which it could lead to a faster removal of damaged organelles, and thus might contribute to of IHH-induced cardioprotection. Elucidation of signaling pathways associated with cardioprotection induced by adaptation to chronic hypoxia could help in the treatment of ischemic heart disease.

Klíčová slova

Chronická hypoxie, kardioprotekce, proteinkinasa C, apoptosa, autofagie, gap junctions.

Key words

Chronic hypoxia, cardioprotection, protein kinase C, apoptosis, autophagy, gap junctions.

Seznam zkratek

4-HNE	4-hydroxynonenal
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ATG	z angl. <i>autophagy-related genes</i>
Bcl-2	z angl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BH1-4	domény 1-4 s homologií Bcl-2
Birc2	z angl. <i>baculoviral IAP repeat-containing protein 2</i>
BK _{Ca} kanály	draslíkové kanály s vysokou vodivostí, řízené napětím a aktivované vápníkem
BNIP3	z angl. <i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
C1-C4	konzervativní domény C1-C4
CNH	kontinuální normobarická hypoxie
COX2	cyklooxygenasa 2
CS	citrátsyntasa
CT	z angl. <i>threshold cycle</i>
Cx43	konexin 43
cyto	cytosol
DAG	diacylglycerol
Drp1	z angl. <i>dynamin-related protein 1</i>
E	specifická efektivita
ERK1/2	z angl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FIO ₂	inspirační koncentrace kyslíku
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
HIF-1 α	z angl. <i>hypoxia-inducible factor-1α</i>
HL-1	buněčná linie atriálních kardiomyocytů
homo	homogenát
HPRT1	hypoxantinguaninfosforibosyltransferasa 1
IAP	z angl. <i>inhibitor of apoptotic proteins</i>
IHH	intermitentní hypobarická hypoxie
iNOS	inducibilní syntasa oxidu dusnatého
IR	ischemicko-reperfúzní
JNK	z angl. <i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
K _{ATP} kanály	draslíkové kanály závislé na ATP
Keap1	z angl. <i>Kelch-like erythroid cell-derived protein 1</i>
KP-1633	blokační peptid pro PKC ϵ
KP-1723	kontrolní peptid
LC3	z angl. <i>microtubule-associated protein B-light chain 3</i>
LDH	laktátdehydrogenasa
LK	levá komora
MAP	kinasa aktivovaná mitogeny
MDV	z angl. <i>mitochondria-derived vesicles</i>

Mfn1,2	mitofusin 1,2
MI	metabolická inhibice
mitoK _{ATP}	mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP
MnSOD	manganová superoxiddismutasa
MPTP	mitochondriální póry, z angl. <i>mitochondrial permeability transition pores</i>
N	normoxie
NFκB	z angl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NOS	syntasa oxidu dusnatého
Nrf2	z angl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
OPA1	z angl. <i>optic atrophy 1</i>
part	partikulární frakce
PB1	domény Phox a Bem 1
PDK1	kinasa závislá na fosfoinositidu 1
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PK	pravá komora
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PLA2	fosfolipasa A2
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
P-PKCδ	fosforylovaná proteinkinasa C δ
P-PKCε	fosforylovaná proteinkinasa C ε
R	re-energizace
RACK	receptory pro aktivovanou kinasu C
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
S1P	sfingosin-1-fosfát
sarkK _{ATP}	sarkolemální draslíkové kanály závislé na ATP
SDS	dodecylsulfát sodný
SPHK	sfingosinkinasa
TNFR2	receptor 2 pro TNFα
TNFα	z angl. <i>tumor necrosis factor α</i>
TUNEL	z angl. <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
V1-V5	variabilní domény V1-V5
XIAP	z angl. <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

1 ÚVOD

1.1 Protekce myokardu

Již desítky let zaujímají kardiovaskulární onemocnění přední příčky v příčinách mortality celosvětově, ve vyspělých zemích jsou dokonce na prvním místě. I přes velký pokrok ve výzkumu vedoucí ke snížení mortality a morbidit těchto chorob bude podle odhadů Světové zdravotnické organizace jejich výskyt v budoucnosti spíše růst, nikoliv se snižovat, a to jak ve vyspělých, tak v rozvojových zemích. Nejběžnější formou kardiovaskulárních onemocnění je ischemická choroba srdeční, na jejíž následky zemřelo v roce 2012 7,4 milionu lidí (WHO 2014).

Pro správnou funkci myokardu je nezbytný neustálý přísun kyslíku a živin. Během ischemických stavů však dochází k jeho poklesu či úplnému přerušení, tzv. ischemii. Klesá oxidativní fosforylace (Opie 1990), buněčný metabolismus přepíná na anaerobní glykolýzu, hromadí se laktát a klesá pH (Powers 2007). Již 30 min po začátku ischemie se pH pohybuje v rozmezí 5,5-6,0 (Borges 2015). Nastává intracelulární přetížení buněk Na^+ a Ca^{2+} (Avkiran 2002, Hausenloy 2013), dochází k nadprodukci reaktivních forem kyslíku (ROS), lipidovým peroxidacím, poškození kontraktálních proteinů, ztrátě buněčných funkcí a v konečném důsledku až k buněčné smrti (Golbidi 2011, Hausenloy 2013).

Pro přežití myokardu je nezbytné obnovení průtoku krve, tzv. reperfúze. Daní za obnovení průtoku je však ještě další poškození myokardu (Piper 1998). Během prvních okamžiků reperfúze dochází k nadměrné produkci ROS v mitochondriích (Zweier 1987). Zároveň narůstá již tak zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} , vyplavuje se laktát a rychle roste pH. Všechny tyto změny přispívají k otevření mitochondriálních pórů (MPTP, z angl. *mitochondrial permeability transition pores*) (Griffiths 1995, Halestrap 2004). Dochází ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu, odpojení oxidativní fosforylace a vyčerpání ATP. Během reperfúze vznikají v myokardu komorové arytmie, nastává kontraktální dysfunkce (srdeční stunning), mikrovaskulární obstrukce až letální srdeční reperfúzní poškození charakterizované smrtí kardiomyocytů (Hausenloy 2013). Odhaduje se, že reperfúzní poškození se na výsledné infarktové oblasti podílí zhruba 50% (Yellon 2007). Rozsah ischemicko-reperfúzního (IR) poškození myokardu není závislý jen na době trvání ischemie a na průběhu obnovení koronární cirkulace při reperfúzi (Budás 2007), ale také na vlastní odolnosti srdečního svalu vůči nedostatku kyslíku (Peart 2008).

Organismus je vybaven vrozenými adaptivními mechanismy, pomocí nichž je schopný zvýšit odolnost myokardu k akutnímu či chronickému nedostatku kyslíku (Kolář 2004). Existuje řada možností a přístupů, které tyto endogenní protektivní mechanismy aktivují. Řadíme mezi ně:

- **krátkodobou adaptaci na stresový podnět (tzv. conditioning)**, např. na sérii krátkých ischemických epizod – ischemický conditioning
- **dlouhodobou adaptaci na stresový podnět** – např. na hypoxii (Kolář 2004), cvičení (Powers 2008) nebo snížený kalorický příjem (Shinmura 2005)

1.1.1 Ischemický preconditioning

Ischemický preconditioning byl poprvé popsán Murrym a spol. v roce 1986, který na psím modelu ukázal, že 4 cykly 5-minutové ischemie (koronární okluze) a 5-minutové reperfúze snižují velikost infarktu myokardu vyvolaného následnou 40-minutovou letální okluzí s reperfúzí (Murry 1986). Výzkum ischemického preconditioningu přinesl řadu cenných poznatků k objasnění signálních drah endogenní protekce. Jeho využití v praxi je však limitováno nutností aplikace před vlastní letální ischemií a také poměrně krátkou dobou protekce trvající maximálně 72 hodin (Baxter 1997).

1.1.2 Ischemický postconditioning

Během ischemického postconditioningu je několik krátkých cyklů ischemie a reperfúze uskutečněno bezprostředně na počátku reperfúze po dlouhodobé ischemii (Zhao 2003), díky čemuž může být použit i u léčby pacientů s akutním infarktem myokardu (Laskey 2005). Pozorovaný pokles velikosti infarktu myokardu je srovnatelný jako u ischemického preconditioningu (Zhao 2003).

1.1.3 Ischemický conditioning na dálku

První experimentální studii popisující preconditioning na dálku byla práce Przyklenkové a spol. v roce 1993, která ukázala, že 45-minutové cykly okluze a reokluze aplikované na *arteria circumflexa* snižují velikost infarktu myokardu vyvolaného 45-minutovou okluzí a 3-hodinou reperfúzí přední sestupné větve levé věnčité tepny (Przyklenk 1993). Oproti ischemickému pre- a postconditioningu není u ischemického

conditioningu na dálku třeba intervence přímo na srdci. Může být aplikován dokonce neinvazivně, např. pomocí škrtidla umístěného na dolní končetině (Oxman 1997), nebo pouhým stlačením a povolením standardní manžety na měření tlaku umístěné nad loktem (Gunaydin 2000, Kharbanda 2002). Ischemický conditioning dělíme na pre-, per- či post- podle toho, je-li aplikován před letální ischemií, během ní, nebo až v době reperfúze.

1.1.4 Adaptace na cvičení

Nedostatek fyzické aktivity je považován za jeden z hlavních rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. Cvičení působí prospěšně, snižuje obezitu, obsah cholesterolu či vysoký krevní tlak a zároveň působí na srdce kardioprotektivně i svým přímým vlivem (Golbidi 2011, Powers 2002, Powers 2008). Snižuje počet ischemicko-reperfučních arytmií (Frasier 2013, Miller 2012), snižuje myokardiální stunning (French 2006, Taylor 2007) a velikost infarktu myokardu (Frasier 2013, Quindry 2007). Prospěšné účinky pravidelné fyzické zátěže byly popsány již v roce 1978 na myším modelu plavání (McElroy 1978). Výhodou kardioprotekce vyvolané fyzickou aktivitou je, že k jejímu vyvolání stačí pouze několik po sobě následujících dnů cvičení (French 2008, Hamilton 2003) a že přetrvává až několik týdnů po ukončení pravidelné fyzické aktivity (Esposito 2011).

1.1.5 Adaptace na chronickou hypoxii

Chronickou hypoxii chápeme jako nedostatečné zásobení tkáně nebo organismu kyslíkem. Na rozdíl od ischemie je zachován koronární průtok, a není tedy narušeno zásobení myokardu substráty, ani odstraňování odpadních produktů (Moret 1980). Hypoxie je nejčastěji způsobena sníženou transportní kapacitou krve pro kyslík (anemická hypoxie), sníženým průtokem krve (ischemická hypoxie) nebo sníženým parciálním tlakem kyslíku v arteriální krvi, ke kterému dochází např. při pobytu ve vysoké nadmořské výšce (hypoxie systémová; hypoxemická) (Ošťádal 2007). Termín „vysoká nadmořská výška“ není jasně definován, ukázalo se však, že typické projevy chronické hypoxie u potkana jsou patrné již při adaptaci na výšku 1350 m (Kolář 1988). Adaptace na chronickou hypoxii (na vysokou nadmořskou výšku) je spojena s řadou prospěšných, ale i negativních změn v organismu.

Chronická hypoxie ovlivňuje krevní cirkulaci. Zvyšuje počet erytrocytů, a tedy i koncentraci hemoglobinu, což vede k větší transportní kapacitě krve pro kyslík (Kasalický 1977, Scheel 1990). V systémové cirkulaci působí chronická hypoxie vazodilatačně

(Ošťádal 2007), v plicní cirkulaci působí naopak vazokonstrikčně (Canepa 1956). Důsledkem je plicní hypertenze vedoucí ke vzniku hypertrofie pravé srdeční komory (Hampl 2000, Kolář 1989), která může způsobit až srdeční selhání (Kolář 1991).

Dochází také k změnám v energetickém metabolismu (Essop 2007, Wang 2012). Zvyšuje se kapacita anaerobního metabolismu, využití glukosy (hexokinasa) a roste kapacita pro syntézu a degradaci laktátu (laktátdehydrogenasa). Na druhou stranu je snížena schopnost odbourávat mastné kyseliny (Deindl 2003). Zvyšuje se také plicní objem, aktivní povrch plic a difúzní kapacita pro výměnu plynů (Moret 1980).

1.1.5.1 Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie

Nižší výskyt infarktu myokardu a nižší mortalita na ischemickou chorobu srdeční byly u lidí žijících ve vysokých nadmořských výškách popsány již v padesátých letech minulého století (Hurtado 1960). Ke stejnému závěru došel ve své nedávné studii i Ezzati a spol. (Ezzati 2012). V souladu s výsledky epidemiologických pozorování byly studie Kopeckého, Poupy a Widimského, které ukázaly, že adaptace na experimentálně simulovanou hypoxii má kardioprotektivní účinky (Kopecký 1958, Poupa 1966, Widimský 1973). Bylo zjištěno, že po adaptaci na hypoxii se zvyšuje odolnost myokardu vůči všem škodlivým projevům nedostatku kyslíku – dochází ke zmenšení velikosti infarktu myokardu (Neckář 2005, Ravingerová 2007), k poklesu výskytu a závažnosti komorových arytmií (Asemu 2000) a zlepšení obnovy kontraktility myokardu během reperfúze (Neckář 2005, Rafiee 2002, Xie 2005). Zároveň se zpomaluje vyčerpání zásob ATP (Opie 1978) a snižuje se vyplavování laktátdehydrogenasy z buněk (Wang 2011). Z hlediska terapeutického využití má hypoxie oproti preconditioningu podstatnou výhodu, jelikož její kardioprotektivní účinky přetrvávají týdny až měsíce od hypoxické expozice (Cai 2003, Neckář 2004).

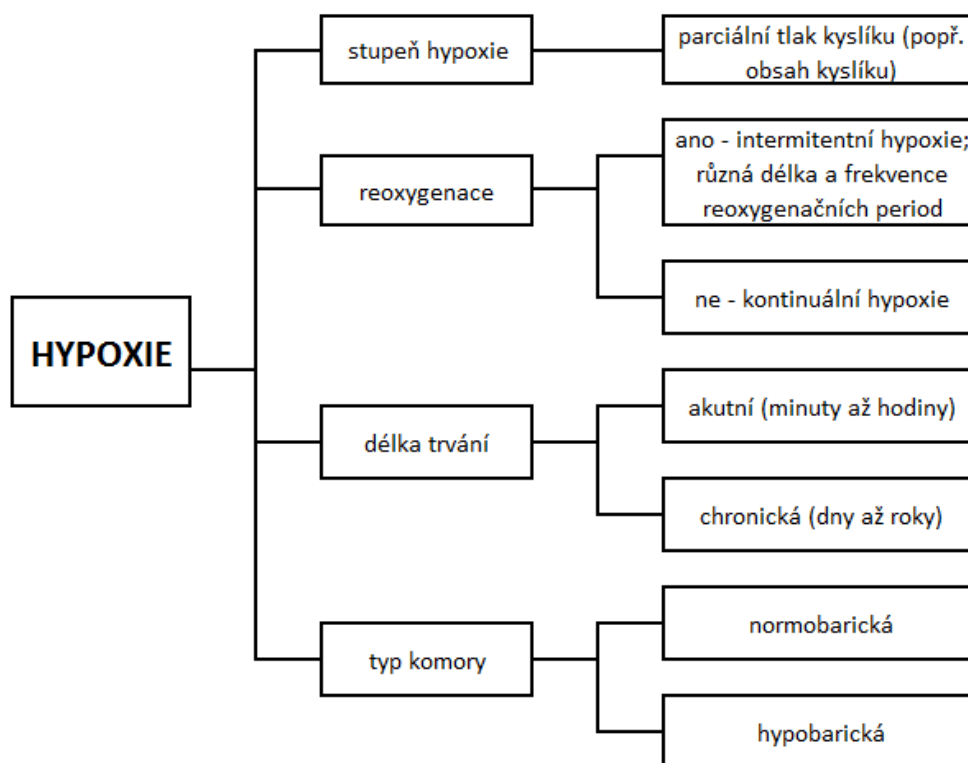
1.1.5.2 Modely hypoxie

Výsledný účinek hypoxie je závislý na daném hypoxickém modelu. Jednotlivé modely hypoxie se liší stupněm (obsah, popř. parciální tlak kyslíku), četností a délkou reoxygenačních period, délkou adaptace nebo typem komory (normobarická vs. hypobarická) (obr. 1). Studie Neckáře a spol. ukázala, že zatímco kontinuální normobarická hypoxie (CNH) (10% O₂ kontinuálně po dobu 3 týdnů) snižuje velikost infarktu, opakované 60-minutové přerušení hypoxické expozice (intermitentní normobarická hypoxie 23

hod/den) vede ke zrušení kardioprotekce (Neckář 2013). Oproti tomu jiný model intermitentní normobarické hypoxie stejného stupně s delší normoxickou periodou (8 hod/den, 5 dnů/týden, celkem 3 týdny) snižuje velikost infarktu myokardu (Kašparová 2015), stejně tak jako intermitentní hypobarická hypoxie (IHH) odpovídající nadmořské výšce 7000 m (8 hod/den, 5 dnů/týden, celkem 5 týdnů) (Neckář 2002a). Délka denní normoxické periody je tedy pro rozvoj kardioprotekce kritickým faktorem.

Účinky hypoxie jsou závislé také na druhu použitých experimentálních zvířat (Manukhina 2013, Wauthy 2004, Zong 2004), jejich věku (La Padula 2005, Ošťádalová 2002), pohlaví (Ošťádal 1984, Xue 2009) a dietě (Hlaváčková 2007).

Použití odlišných adaptačních protokolů komplikuje interpretaci výsledků získaných v jednotlivých studiích. Na druhou stranu má své opodstatnění, protože myokard může být vystaven řadě typů hypoxie, a to buď přirozeně (během intrauterinního vývoje nebo u lidí žijících ve vysoké nadmořské výšce) nebo během patofyziologických procesů (spánková apnoe, ischemická choroba srdeční apod.) (Ošťádal 2007).



Obr. 1: Typy hypoxie.

1.1.5.3 Molekulární mechanismy kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií

O příznivých účincích adaptace na chronickou hypoxii víme již desítky let. Byla popsána celá řada signálních drah a jejich komponent, detailní molekulární mechanismus kardioprotekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii však nebyl doposud objasněn.

Jednotlivé protektivní přístupy mnohdy sdílí společné signální dráhy. Studie Neckáře a spol. ukázala, že kombinace chronické hypoxie a ischemického preconditioningu nevede k prohloubení protektivního účinku (Neckář 2002a). K podobnému závěru došla i Alánová a spol. po podávání protektivního donoru NO molsidominu nebo inhibitoru fosfodiesterasy-5 sildenafilu v kombinaci s adaptací na chronickou hypoxii (Alánová 2015).

V signálních drahách kardioprotekce jsou zapojeny desítky spouštěcích faktorů, mediátorů a efektorů. V následujících odstavcích budou popsány nejčastěji zmiňované komponenty kardioprotektivní signalizace.

1.1.5.3.1 Transkripční faktory

Hypoxie ovlivňuje expresi řady transkripčních faktorů uplaňujících se v kardioprotektivní signalizaci. Nejčastěji zmiňovanými transkripčními faktory jsou HIF-1 α , Nrf2, TNF α a NF κ B.

HIF-1 α

HIF-1 α (z angl. *hypoxia-inducible factor-1 α*) je hlavním regulačním transkripčním faktorem řídícím buněčnou odpověď během hypoxie. Je zahrnut v regulaci genů zapojených v buněčném metabolismu (např. glykolytických enzymů), angiogenesi či reakci na stres (Semenza 2001, Wu 2013). Ukázalo se, že kardioprotekce vyvolaná hypoxií je zprostředkována HIF-1 α (Belaidi 2008) a že u myší s delecí HIF-1 α se kardioprotektivní účinek hypoxie nevyvine (Cai 2003). Vymizení protekce u myší s částečnou delecí HIF-1 α bylo pozorováno i u ischemického preconditioningu (Cai 2008).

Nrf2

Nrf2 (z angl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) je klíčovým transkripčním faktorem regulujícím expresi antioxidantních genů. Za standardních podmínek je vázaný

na cytosolický represorový protein Keap1 (z angl. *Kelch-like erythroid cell-derived protein 1*). Během aktivace však dochází k disociaci komplexu Keap1/Nrf2, translokaci Nrf2 do jádra a aktivaci antioxidantů jako hemoxygenasy-1, superoxiddismutasy, glutathionperoxidasy či thioredoxinu-1 (Kaspar 2009, Nguyen 2009), které chrání srdce před oxidačním poškozením (Li 2009). Nrf2 je regulován redoxním stavem (Leonard 2006), ale také fosforylací. Bylo zjištěno, že fosforylace Nrf2 na Ser40 pomocí proteinkinasy C (PKC) vede k disociaci inhibičního komplexu Keap1/Nrf2 (Huang 2002) a že je tato fosforylace zprostředkována PKC δ (Niture 2009). Zároveň byl po adaptaci na hypoxii pozorován nárůst exprese Nrf2 mRNA (Kašparová 2015).

TNF α

V protekci vyvolané chronickou hypoxií se uplatňuje i transkripční faktor a klíčový prozánětlivý cytokin TNF α (z angl. *tumor necrosis factor α*). TNF α je spojován s infarktem myokardu či rozvojem aterosklerózy (Kleinbongard 2011), ale zároveň se účastní i signalizace vedoucí k protekci (Lecour 2005, Skyschally 2007). Jeho výsledné působení je podobně jako u reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) závislé na jeho množství (Lecour 2011, Sack 2002), určitá míra zánětlivé odpovědi je však pro kardioprotekci nezbytná. Bylo zjištěno, že adaptace na CNH zvyšuje množství TNF α a jeho receptoru TNFR2 (Chytilová 2015). Vzrostlo také množství dalšího prozánětlivého cytokinu interleukinu 6 (Alánová nepublikovaná data) a kleslo množství protizánětlivého interleukinu 10 (Chytilová 2015). Podání inhibitoru TNF α infliximabu potlačilo snížení velikosti infarktu myokardu pozorované po adaptaci na chronickou hypoxii (Chytilová 2015).

NF κ B

Transkripční faktor NF κ B (z angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ovlivňuje pro- i protizánětlivé signální dráhy. Je aktivován pomocí TNF α a ROS (Dhingra 2009, Fitzpatrick 2011) a jeho exprese se zvyšuje během adaptace na hypoxii (Chytilová 2015). Bylo zjištěno, že podání inhibitoru TNF α infliximabu ruší nárůst NF κ B pozorovaný po hypoxii, stejně tak jako kardioprotekci (Chytilová 2015).

1.1.5.3.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku a antioxidační systém

Pro funkci myokardu je klíčová rovnováha mezi tvorbou ROS a antioxidační kapacitou. Nadměrná koncentrace ROS a RNS působí škodlivě. Zároveň je však určitá hladina oxidačního stresu nezbytná pro správné fungování organismu a je nedílnou součástí signálních drah kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií (Zhang 2013).

Chronická hypoxie vede k oxidačnímu stresu. Zvyšuje se produkce ROS (Wang 2011), snižuje se poměr redukovaný/oxidovaný glutathion (Kolář 2007), rostou lipidové peroxidace (Chen 2005, Wang 2011) a zvyšuje se tvorba 3-nitrotyrosinu (Hlaváčková 2010, příloha B, Chytilová 2015). Podání antioxidantu N-acetylcysteinu snižuje oxidační stres, ale zároveň zcela ruší kardioprotekci vyvolanou hypoxií (Kolář 2007). Bylo zjištěno, že adaptace na intermitentní hypoxii zvyšuje aktivitu manganové superoxiddismutasy (MnSOD) a také množství tohoto proteinu v mitochondriální frakci. Podání N-acetylcysteinu vedlo k potlačení těchto účinků. Zároveň se ukázalo, že aktivita MnSOD negativně koreluje s velikostí infarktu myokardu (Balková 2011).

Zvýšenou antioxidační kapacitu pozorovala na kardioprotektivním modelu kontinuální hypoxie také Kašparová a spol. (Kašparová 2015). Po hypoxii došlo ke zvýšení exprese antioxidačních enzymů zapojených do přímé degradace ROS (manganové superoxiddismutasy, glutathionperoxidasy 4, peroxiredoxinu 2 a 5), enzymů zapojených v udržování redoxní homeostázy uvnitř buněk (glutathionreduktasy, thioredoxinu 2 a thioredoxinreduktasy 2) i antioxidantů spojených s metabolismem železa (akonitasy 2 a hemoxygenasy 1) (Kašparová 2015). Aktivace MnSOD na tomto modelu hypoxie byla popsána i na proteinové úrovni (Chytilová 2015, Neckář 2013).

Svou roli v kardioprotekci hrají i RNS, zejména NO. Chronická hypoxie zvyšuje v srdci koncentrace markerů NO – cGMP, nitritů a nitrátů (Manukhina 2006, Zhong 2002). Zvyšuje se také exprese a aktivita syntasy oxidu dusnatého (NOS), ačkoli není zcela jasné jakých isoform. Řada studií ukázala, že se po adaptaci na hypoxii aktivuje indukibilní NOS (iNOS) (Grilli 2003, Chytilová 2015, Rouet-Benzineb 1999). Inhibitor iNOS aminoguanidin zrušil kardioprotekci vyvolanou chronickou hypoxií (Ding 2005), stejně tak jako obecný inhibitor NOS L-NAME (Baker 1999). NO aktivuje guanylátcyklastu, čímž zvyšuje tvorbu cGMP. V srdci je cGMP degradován pomocí fosfodiesterasy-5 (Giordano 2001). Alánová a spol. ukázali, že podání donoru NO molsidominu nebo inhibitoru

fosfodiesterasy-5 sildenafilu snižuje velikost infarktu myokardu u normoxických a ve stejné míře i u hypoxických potkanů (Alánová 2015).

1.1.5.3.3 Iontová homeostáza

Pro funkci myokardu je nezbytná optimální iontová rovnováha, na jejímž udržení se podílí celá řada kanálů a pórů v buněčných membránách. V souvislosti s kardioprotekcí jsou nejčastěji zmiňovány draslíkové kanály závislé na ATP (K_{ATP} kanály), mitochondriální póry (MPTP) a draslíkové kanály s vysokou vodivostí, řízené napětím a aktivované vápníkem (BK_{Ca} kanály).

K_{ATP} kanály

V srdci se vyskytují dva typy K_{ATP} kanálů – sarkolemální ($sarkK_{ATP}$) lokalizované na sarkolemě (Noma 1983) a mitochondriální ($mitoK_{ATP}$) nacházející se na vnitřní mitochondriální membráně (Inoue 1991). K_{ATP} kanály jsou za fyziologických podmínek uzavřené, snížená koncentrace ATP v buňkách však vede k jejich otevření (Noma 1983). Bylo popsáno, že obecný inhibitor K_{ATP} kanálů glibenklamid zrušil kardioprotektivní účinky chronické hypoxie (Bu 2015). Stejný vliv mělo i podání 5-hydroxydekanoátu, selektivního inhibitoru $mitoK_{ATP}$ kanálů (Bu 2015, Neckář 2002b). S použitím inhibitoru $mitoK_{ATP}$ kanálů a zároveň aktivátoru $sarkK_{ATP}$ kanálů MCC-134 ukázali i Kolář a spol., že v mechanismu kardioprotekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii se uplatňuje spíše mitochondriální typ K_{ATP} kanálů. Podání tohoto inhibitoru zcela potlačilo snížení počtu arytmí a snížení velikosti infarktu myokardu vyvolané hypoxií (Kolář 2005). U kontrolních normoxických skupin zvířat naopak obecný aktivátor K_{ATP} kanálů diazoxid snížil velikost infarktu, zlepšil obnovu kontraktility a snížil počet ischemických arytmí, a to na stejnou úroveň jako u hypoxické skupiny. Aditivní účinek na kardioprotekci však u hypoxické skupiny nebyl pozorován (Asemu 1999, Bu 2015, Neckář 2002a).

BK_{Ca} kanály

BK_{Ca} kanály jsou u komorových myocytů lokalizovány na vnitřní membráně mitochondrií (Balderas 2015). Protektivní vliv tohoto typu kanálů na srdeční ischemii byl popsán ve studii na morčatech, kde jejich aktivátory snížily velikost infarktu myokardu (Xu 2002). Borchert a spol. ukázali na izolovaných kardiomyocytech, že aktivátor otvírání BK_{Ca} kanálů snižuje uvolnění laktátdehydrogenasy a jejich inhibitor paxillin tento pokles

potlačuje (Borchert 2011). Úloha BK_{Ca} kanálů ve zvýšené ischemické odolnosti byla potvrzena i na myších s delecí genu pro tyto kanály (Singh 2013).

MPTP

MPTP jsou velké nespecifické póry lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně. Jejich přechodná aktivace se uplatňuje v homeostáze ROS a uvolnění Ca²⁺ (Heusch 2015) a během ischemického preconditioningu působí protektivně (Hausenloy 2004). Dlouhodobé otevření MPTP však umožní molekulám vody a ve vodě rozpustným látkám vstup do mitochondrií, dochází k narušení potenciálu vnitřní mitochondriální membrány, bobtnání mitochondriální matrix, narušení vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu *c* z intermembránového prostoru do cytosolu, kde jsou aktivovány proteolytické procesy a je zahájena buněčná desintegrace (Bernardi 2015, Heusch 2010).

Během ischemie a reperfúze dochází k depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány a k nárůstu koncentrace anorganického fosfátu, ROS a RNS, což podporuje otvírání MPTP (Heusch 2015). Na neonatálních potkanech bylo popsáno, že podání aktivátoru MPTP atraktylosidu potlačuje u neonatálních potkanů kardioprotektivní účinky chronické hypoxie. Inhibitor MPTP cyklosporin A naopak vedl ke vzniku protekce v normoxické skupině (Bu 2015).

1.1.5.3.4 Energetický metabolismus

Adaptace na chronickou hypoxii vede k řadě změn v energetickém metabolismu, které slouží k udržení energetické homeostázy za podmínek sníženého množství kyslíku. Zatímco za klidových podmínek jsou pro myokard hlavním zdrojem energie mastné kyseliny (Opie 1969), během hypoxie dochází k přepnutí na metabolismus cukrů (Essop 2007). Dochází ke snížení aktivity enzymu β -oxidace mastných kyselin β -hydroxy-acyl-CoA dehydrogenasy (Daneshrad 2000). Zároveň jsou aktivovány mitochondriální hexokinasy 1 a 2, které představují klíčové glykolytické enzymy (Wasková-Arnoštová 2014, Wasková-Arnoštová 2015). Adaptace na IHH vede k jejich translokaci na mitochondrie, kde pravděpodobně zvyšují dostupnost ADP pro komplex V dýchacího řetězce, čímž brání nadměrné produkci ROS (Wasková-Arnoštová 2015). Energetická homeostáza během hypoxie je udržována také pomocí zvýšené respirační kapacity mitochondrií (Essop 2007).

1.1.5.3.5 Metabolismus lipidů

Odolnost srdce vůči IR poškození ovlivňuje také složení mastných kyselin v dietě. Zatímco nasycené mastné kyseliny jsou považovány za škodlivé, dieta obohacená o n-3 nebo n-6 polynenasycené mastné kyseliny působí kardioprotektivně (Demaison 2002, Leaf 2003). Ukázalo se, že adaptace na IHH ovlivňuje v myokardu potkanů složení mastných kyselin ve fosfolipidech, snižuje poměr n-6/n-3 polynenasycených mastných kyselin a snižuje index nenасыcenosti (Ježková 2002). Změny v zastoupení mastných kyselin v srdečních fosfolipidech by mohly přispívat ke zvýšené toleranci hypoxických srdcí vůči IR poškození. Zároveň bylo zjištěno, že kombinace diety obohacené o n-3 polynenasycené mastné kyseliny a IHH snižuje výskyt arytmií ve větší míře než samotná dieta obohacená o n-3. U normoxické skupiny zvířat klesla velikost infarktu myokardu více u skupiny s dietou obohacenou o n-6, než o n-3 polynenasycené mastné kyseliny. Adaptace na IHH vedla ke snížení velikosti infarktu myokardu u zvířat s dietou obohacenou o nasycené a n-3 polynenasycené mastné kyseliny, ale ve skupině s n-6 neměla žádný efekt (Hlaváčková 2007).

Fosfolipasa A2

Dalším enzymem, který by se mohl uplatňovat v mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií, je fosfolipasa A2 (PLA2), která je zapojena do oprav a remodelace buněčných mebrán, a také do tvorby lipidových signálních molekul. Pomáhá tak udržovat membránovou integritu, která je pro správné fungování myokardu nezbytná. Aktivita PLA2 je regulována fosforylací pomocí PKC (Nemenoff 1993). Chronická hypoxie zvyšuje v myokardu levé komory potkanů množství cytosolické PLA2 α (Míčová nepublikovaná data, příloha C).

Cyklooxygenasa 2

Cyklooxygenasa 2 (COX2) je enzym uplatňující se při syntéze eikosanoidů. Je aktivován prozánětlivými stimuly a většinou je spojován s negativním působením na kardiovaskulární homeostázu (Oshima 2006, Saito 2004). Na modelu preconditioningu se však ukázalo, že dochází k jeho aktivaci, která je nezbytná pro pozdní fázi (tzv. druhé okno) protekce (Bolli 2000). Nárůst COX2 byl také pozorován na kardioprotektivních modelech chronické hypoxie (CNH a IHH) (Chytilová 2015, Míčová nepublikovaná data, příloha C).

1.1.5.3.6 Proteinkinasy

Proteinkinasy jsou dalšími důležitými mediátory účastníky se mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií (Kolář 2009). Zapojení fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) zkoumala Ravingerová a spol., která ukázala, že inhibitor PI3K/Akt LY294002 částečně ruší pokles velikosti infarktu vyvolaný adaptací na IHH (Ravingerová 2007). Podobně inhibitor Akt wortmannin potlačil zlepšení obnovy kontraktility funkce myokardu pozorované po hypoxii (Wang 2011). Rafiee a spol. ukázali, že chronická hypoxie aktivuje v myokardu králíků kinasu aktivovanou mitogeny (MAP) p38 and JNK (z angl. *c-Jun NH2-terminal kinase*) a že inhibice těchto kinas vede ke zrušení protekce (Rafiee 2002). Dalšími kinasami, které by se kardioprotekce mohly účastnit, jsou ERK1/2 (z angl. extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Morel 2006, Míčová nepublikovaná data, příloha C), proteinkinasa A (PKA) (Yeung 2007) a v neposlední řadě PKC.

1.2 Proteinkinasa C

Proteinkinasa C (EC 2.7.11.13) byla objevena Nishizukou a jeho spolupracovníky již v roce 1977 (Inoue 1977, Takai 1977). Nový typ kinasy tehdy stanovili v potkaních játrech a hovězím mozku a cytosolu z potkaního mozku. Vzhledem k tomu, že tato kinas dosahovala maximální enzymatické aktivity v přítomnosti milimolárních koncentrací Mg^{2+} , byla nazvána proteinkinasa M (Inoue 1977). Teprve o dva roky později se ukázalo, že Nishizuka a spol. nevyizoloval proenzym, ale katalytickou podjednotku, která pro svou aktivitu potřebuje právě Mg^{2+} , nikoli druhé posly. Právě tehdy byla proteinkinasa C poprvé nazvána proteinkinasa C (Takai 1979).



Obr. 2: Objevitel PKC Yasutomi Nishizuka.

Převzato z Nakamura 2010.

Zároveň se ukázalo, že k její aktivaci je třeba diacylglycerol (DAG) (Takai 1979). Velký posun ve výzkumu PKC znamenal zjištění, že PKC je intracelulárním receptorem pro forbolové estery (Castagna 1982), díky čemuž se tento enzym na dlouhou dobu dostal do popředí vědeckého zájmu.

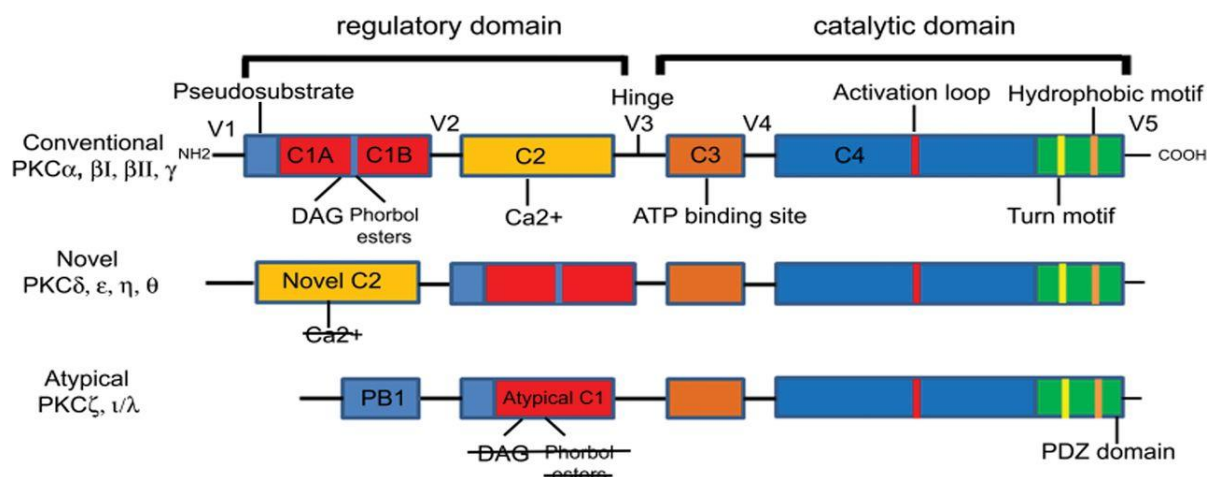
1.2.1 Struktura PKC

PKC tvoří rodinu příbuzných serin/threoninových kinas a je zahrnuta v mnoha signálních drahách. Nishizuka a spol. popsali u savců 10 isoform PKC již v osmdesátých letech minulého století (Nishizuka 1988). Současné publikace uvádějí existenci 10 až 12 isoform PKC. Důvodem rozdílných počtů jsou PKC ν /PKC λ a PKC μ . PKC ν /PKC λ představují lidské a myší ortology (Nishizuka 1995) a někdy jsou proto počítány jako dvě isoformy. Naproti tomu PKC μ byla dříve řazena do rodiny kinas proteinkinasy D (Parker 2004), v dnešní době ji však chápeme jako jednu z isoform PKC.

Jednotlivé isoformy PKC sdílejí společné strukturní znaky (obr. 3). Jsou tvořeny jediným polypeptidovým řetězcem složeným z regulační oblasti (20-40 kDa) na N-konci a katalytické oblasti (~45 kDa) na C-konci enzymu (Newton 2010, Steinberg 2008). V molekule PKC můžeme rozlišit až 4 konzervativní domény (C1-C4), mezi kterými jsou oblasti s menší homologií – variabilní domény (V1-V5) (Kikkawa 1989, Newton 2010, Nishizuka 1988, Steinberg 2008). Regulační a katalytická oblast enzymu je oddělena variabilní doménou 3 (V3) (Steinberg 2008). Regulační oblast obsahuje pseudosubstrátovou sekvenci, která blízce připomíná rozpoznávací motiv pro substrát. Při nepřítomnosti aktivátorů interaguje tato sekvence s vazebným místem pro substrát v katalytické oblasti enzymu a brání tak jeho aktivaci (House 1987).

V regulační oblasti se zároveň nacházejí místa potřebná pro navázání enzymu na membránu (Steinberg 2008). Katalytická oblast obsahuje domény nezbytné pro vazbu ATP a substrátů (Newton 1995, Steinberg 2008, Webb 2000). Pro funkci PKC je podstatná také variabilní doména 5 (V5). Ta obsahuje tzv. „turn“ motiv a hydrofobní motiv, na kterých dochází k fosforylacím enzymu, které jsou důležitým prvkem regulace PKC (Steinberg 2008).

Rodinu PKC dělíme na základě rozdílné struktury N-koncové regulační oblasti enzymu, a tedy i na základě rozdílných požadavků na aktivátory, do tří skupin – na klasické (PKC α , β , γ), nové (PKC δ , ϵ , η , θ) a atypické (PKC ξ , τ , λ) (Barnett 2007, Duquesnes 2011, Steinberg 2008).



Obr. 3: Struktura PKC.

Převzato z Poli 2014.

Všechny isoformy PKC potřebují ke své aktivaci fosfatidylserin, který je součástí fosfolipidové membrány. V požadavcích na další aktivátory se však liší. Klasické PKC potřebují ke své aktivaci Ca^{2+} a také DAG či forbolové estery (Kazanietz 1993). Anionické fosfolipidy váže doména C2 v závislosti na Ca^{2+} . DAG a forbolové estery jsou vázány pomocí motivů C1A/C1B (Steinberg 2012). Nové PKC jsou maximálně aktivovány lipidovými kofaktory (DAG a forbolovými estery). Obsahují tandemové motivy C1A/C1B a doménu C2, oproti klasickým PKC jsou však jejich pozice obrácené a doména C2 neváže Ca^{2+} (Steinberg 2012). Atypickým PKC stačí k dosažení maximální aktivity pouze fosfatidylserin (Chauhan 1990). Obsahují atypickou doménu C1, která váže fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát a ceramid, ale neváže DAG či forbolové estery a obsahuje protein-protein interakční doménu PB1 (Phox a Bem 1), která váže kotvící proteiny obsahující PB1. Aktivace atypických PKC je tak přičítaná protein-protein interakcím a fosforylaci aktivační smyčky pomocí kinasy závislé na fosfoinositidu 1 (PDK1) (Steinberg 2012).

1.2.2 Regulace PKC

Funkce PKC podléhá přísné regulaci řadou mechanismů. Nejdůležitější z nich jsou:

1) translokace na membrány

Translokace PKC z cytosolu na membrány je považována za hlavní znak aktivace enzymu již od začátku 80. let. Molekulární podstata je založena na interakci PKC

s fosfolipidy, které slouží jako molekulární lepidlo držící PKC na membránách (Breitkreutz 2007, Newton 2003).

2) fosforylace/defosforylace

PKC je regulována fosforylacemi na Ser/Thr, ale i Tyr zbytcích, které ovlivňují stabilitu enzymu, jeho odolnost vůči proteasám a fosfatasám, protein-proteinové interakce, subcelulární lokalizaci a aktivitu (včetně substrátové specifity) (Steinberg 2008). PKC je syntetizována v neaktivní defosforylované formě (Newton 1995). Pro maturaci enzymu je nezbytná série tří po sobě jdoucích fosforylací na Ser/Thr. Nejdříve dochází k fosforylaci v aktivační smyčce pomocí PDK1 (Le Good 1998). Následně je PDK1 uvolněna a dochází k odkrytí a fosforylaci dvou dalších fosforylačních míst na karboxylovém konci enzymu – tzv. turn motivu a hydrofóbním motivu.

PKC mohou být fosforylovány také na tyrosinových zbytcích (Konishi 1997). Tyto fosforylace jsou významné zejména pro PKC δ , u které tyrosinová fosforylace v katalytické doméně zvyšuje její katalytickou aktivitu (Steinberg 2004).

3) kotvící proteiny

Klíčovou rolí ve specifitě signálních drah jednotlivých isoform PKC hraje jejich různá subcelulární lokalizace (buněčná membrána, jádro, Golgiho aparát, mitochondrie nebo cytosol) (Disatnik 1994, Gallegos 2006), která je zprostředkována kotvícími proteiny. Pro PKC bylo identifikováno mnoho kotvících proteinů, díky kterým se PKC přemisťuje do blízkosti svých substrátů, regulátorů aktivity (jako jsou fosfatasy či kinasy) nebo do specifických intracelulárních kompartmentů. Některé kotvící proteiny regulují celou řadu isoform PKC, některé jsou specifické pro určitou isoformu (Newton 2003). Jedny z nejdůležitějších kotvících proteinů tvoří rodina receptorů pro aktivované kinasy C (RACK). Pro PKC β byl identifikován RACK1 a pro PKC ϵ RACK2 (β -COP) (Mackay 2001). Na základě objevu RACK pro konkrétní isoformy PKC byly vytvořeny krátké inhibiční či aktivační peptidy, které specificky váží a tudíž inhibují, resp. aktivují dané PKC (Dorn 1999, Souroujon 1998), což významně přispělo k pochopení funkcí jednotlivých isoform PKC. Pro PKC δ a PKC ϵ byly popsány inhibiční peptidy δ V1-1 a ϵ V1-2 (Inagaki 2003, Johnson 1996). Do translokace PKC je zapojena řada dalších substrátů či adaptorových proteinů (Kheifets 2006, Mochly-Rosen 1998).

4) ostatní mechanismy - redoxní regulace, regulace štěpením kaspasami

PKC ve své struktuře obsahují zinkové prsty, které jsou citlivé k redoxní regulaci. Oxidanty poškozují konformaci zinkových prstů v regulační doméně, čímž dochází k uvolnění autoinhibice a k tvorbě katalyticky aktivní formy PKC i bez přítomnosti Ca^{2+} nebo fosfolipidů (Gopalakrishna 2008, Knock 2011). Oproti tomu poškození cysteinových zbytků v katalytické doméně PKC vede ke ztrátě katalytické aktivity enzymu (Knock 2011).

Další možností regulace funkce PKC je štěpení kaspasami ve V3 oblasti enzymu. Dochází tak k uvolnění konstitutivně aktivní katalytické podjednotky a regulační domény enzymu (Steinberg 2008).

1.2.3 Chronická hypoxie a PKC v myokardu

Zatímco úloha PKC v různých typech preconditioningu byla nesčetněkrát potvrzena, její zapojení v mechanismu kardioprotekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii zůstává poněkud kontroverzní, a to zejména z hlediska uplatnění konkrétních isoform PKC. Velký posun ve výzkumu přinesl objev inhibitorů a blokačních peptidů PKC. V srdci jsou exprimovány isoformy α , δ , ϵ a ζ (Rybin 1994). V souvislosti s kardioprotekcí jsou nejčastěji zmiňovány isoformy δ , ϵ a v menší míře také α .

Vliv adaptace na IHH na PKC zkoumali Neckář a spol., kteří ukázali, že po hypoxii dochází v myokardu levé komory ke zvýšení exprese PKC δ v cytosolu a v jaderné, mitochondriální a mikrosomální frakci. Zároveň došlo k redistribuci PKC δ z cytosolu do nukleárně-cytoskeletární a mitochondriální frakce. Expres PKC ϵ se nezměnila v žádné z analyzovaných frakcí (Neckář 2005). Ukázalo se, že obecný inhibitor PKC chelerytrin kompletně ruší kardioprotekci vyvolanou chronickou hypoxií, zatímco selektivní inhibitor PKC δ rottlerin vede k jejímu snížení (Neckář 2005). Na stejném modelu bylo popsáno, že nárůst PKC δ v homogenátu a partikulární frakci v myokardu levé komory potkanů po adaptaci na IHH je závislý na oxidačním stresu, protože podání antioxidantu N-acetylcysteinu tento efekt potlačilo, stejně tak jako snížení velikosti infarktu vyvolané hypoxií. U PKC ϵ byla po adaptaci na IHH patrná tendence k poklesu (Kolář 2007). Hlaváčková a spol. ukázali, že množství PKC δ v partikulární frakci negativně koreluje s velikostí infarktu myokardu (Hlaváčková 2007). Zároveň bylo zjištěno, že exprese PKC δ , stejně tak jako velikost infarktu myokardu a počet arytmií, je po adaptaci na IHH ovlivněna složením mastných kyselin v dietě (Hlaváčková 2007).

Wang a spol. ukázali, že adaptace na IHH (5000 m, 4 hod/den, 4 týdny) zvyšuje fosforylaci PKC ϵ v homogenátu a že inhibice PKC ϵ pomocí ϵ V1-2 ruší kardioprotektivní účinky hypoxie (Wang 2011). Uenoyama a spol. zjistili, že adaptace na kontinuální hypobarickou hypoxii (10% O₂, 5500 m, 21 dnů) snižuje množství PKC ϵ v cytosolu. V membránové frakci byl patrný pouze náznak poklesu. Množství PKC δ v cytosolu a membránové frakci se nezměnilo (Uenoyama 2010). Ding a spol. ukázali, že IHH (5000 m, 6 hod/den, 42 dnů) zvyšuje hladinu PKC δ , PKC ϵ a PKC α v partikulární frakci, ale neovlivňuje jejich množství v cytosolu (Ding 2004). Zlepšení obnovy kontraktility po hypoxii potlačil inhibitor PKC chelerytrin, což naznačilo možné zapojení PKC v mechanismu takto vyvolané protekce (Ding 2004).

Rouet-Benzineb a spol. ukázali, že adaptace na intermitentní normobarickou hypoxii (23 hod/den, 8, 15, 21 dnů, 10% O₂) nevede v homogenátu myokardu levé komory potkanů k žádným změnám v celkové aktivitě PKC, ani v expresi katalytického fragmentu obsaženého ve všech isoformách PKC (Rouet-Benzineb 1999). Morel a spol. adaptovali potkany na IHH (23 hod/den, 5500 m, 2 týdny) a nepozorovali v levé komoře potkanů žádné změny v aktivitě ani proteinovém množství PKC δ , PKC ϵ , PKC α nebo PKC ζ v cytosolu ani v partikulární frakci (Morel 2003). Cataldi a spol. ukázali, že intermitentní normobarická hypoxie (12 hod/den, 10% O₂, 12 dnů) vede ke zvýšené fosforylaci PKC α v levé komoře potkanů (Cataldi 2004). Adaptace na CNH (10,5% O₂) u březích samic 15. až 21. den gestace vedla u dospělých potomků takto adaptovaných zvířat ke snížení množství celkové (Li 2004a), ale i fosforylované PKC ϵ v homogenátu myokardu levé komory. Zároveň došlo k poklesu celkové PKC δ (Xue 2009). Naopak Rafiee a spol. adaptovali neonatální králíky na kontinuální normobarickou hypoxii (10% O₂, 10 dnů) a pozorovali zvýšené množství fosforylované PKC ϵ a také její translokaci z cytosolu do partikulární frakce, což je znakem aktivace enzymu. Podání inhibitoru PKC chelerytrinu vedlo k potlačení těchto účinků a zároveň zrušilo kardioprotektivní působení hypoxie ve smyslu zlepšení obnovy kontraktility (Rafiee 2002).

Z výše zmíněných prací vyplývá, že s kardioprotektivními signálními drahami aktivovanými chronickou hypoxií jsou nejčastěji spojovány isoformy PKC δ a ϵ . Zároveň bylo zjištěno, že jsou obě tyto isoformy schopné se vzájemně zastupovat, protože inhibice PKC ϵ vedla k aktivaci PKC δ (Mayr 2009).

1.2.4 PKC a její cílové proteiny uplatňující se v kardioprotekci

Ve své práci jsem se proto zaměřila na cílové proteiny isoform PKC δ a ϵ , které by se mohly v mechanismu kardioprotekce uplatňovat. Jednalo se o proteiny zapojené v apoptose a autofagii, fúzi a štěpení mitochondrií, metabolismu sfingolipidů, odstraňování toxických aldehydů a komunikaci přes gap junctions.

1.2.4.1 PKC a apoptosa

V srdci byly popsány tři hlavní morfologicky a biochemicky odlišné způsoby smrti buněk - nekrosa, apoptosa a autofagie. V posledních letech se však ukazuje, že se nejedná o izolované procesy, ale že jsou tyto děje regulovány podobnými drahami a dokonce sdílejí některé iniciátorové a efektorové molekuly (Nikoletopoulou 2013). Apoptosu a nekrosu dnes chápeme spíše jako krajní typy buněčné smrti s celou řadou variant a modifikací nacházejících se mezi nimi (nekroptosa či smrt spojená se stresem endoplasmatického retikula).

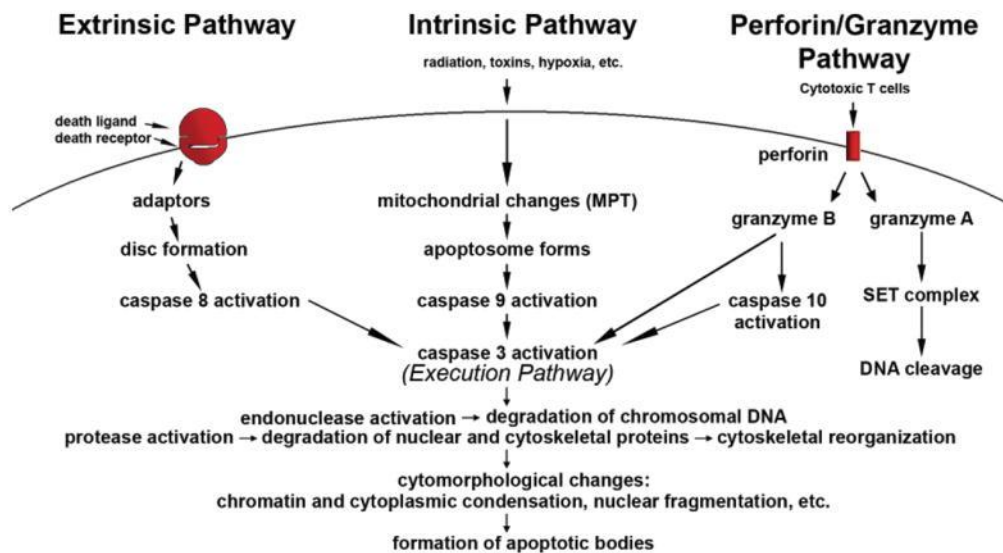
Apoptosu popsali Kerr a spol. již v roce 1972 (Kerr 1972). V dnešní době je považována za hlavní mechanismus regulace buněčné smrti, který se uplatňuje nejen při buněčném poškození či stresu, ale také během normálního vývoje a morfogeneze (Nikoletopoulou 2013). Odhaduje se, že k udržení buněčné homeostázy u dospělého člověka je každý den odstraněno pomocí apoptosy kolem 10 biliónů buněk (Elmore 2007). Apoptosa bývá označována také jako typ I buněčné smrti (Nikoletopoulou 2013) a představuje programovanou buněčnou smrt, která je závislá na dodávce energie ve formě ATP. Buňky jsou během apoptosy odstraněny aniž by došlo k zánětlivé odpovědi okolí (Lee 2009). Apoptotické signální dráhy můžeme rozdělit na vnější a vnitřní (a třetí minoritní cestu přes perforin/granzym), které se sbíhají do společné exekuční cesty (obr. 4).

Vnější apoptotická dráha je aktivovaná vnějším stimulem (TNF α , FasL, Apo3L, Apo2L a Apo2L/DR5) a vazbou na receptory smrti nacházejícími se na buněčném povrchu (Elmore 2007, Mukhopadhyay 2014). Následuje série dalších kroků, jejímž výsledkem je aktivace iniciátorových kaspas 8 a 10 (Mukhopadhyay 2014).

Vnitřní cesta apoptosy je spuštěna vnitřními stimuly (oxidačním stresem, poškozením DNA, hypoxií, nedostatkem růstových faktorů, toxiny, virovou infekcí anebo volnými radikály) (Elmore 2007, Mukhopadhyay 2014). Dochází ke změnám ve vnitřní mitochondriální membráně, otevírají se MPTP, klesá mitochondriální transmembránový potenciál a z intermembránového prostoru do cytosolu se uvolňují proapoptotické proteiny

(cytochrom *c*, Smac/DIABLO, HrtA2/Omi). Výsledkem je opět aktivace kaspas (Elmore 2007).

Vnější i vnitřní apoptotická dráha se sbíhá do společné exekuční cesty, která je zahájena aktivací exekučních kaspas (3, 6 a 7), které jsou nakonec příčinou morfologických a biochemických změn typických pro apoptotické buňky. Za nejdůležitější exekuční kaspasu je považovaná kaspasa 3. Dochází ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA (Nikoletopoulou 2013). Dalším biochemickým znakem je exprese markerů buněčného povrchu (např. exprese fosfatidylserinu na vnější straně plasmatické membrány), která vede k rychlé fagocytose apoptotických buněk (Elmore 2007, Lee 2009).



Obr. 4: Jednotlivé dráhy apoptosy.

Převzato z Elmore 2007.

Regulace apoptosy

Apoptosa ovlivňuje osud buněk a její nedostatečná, stejně tak jako nadměrná aktivace je podstatou řady vývojových defektů, autoimunních a neurodegenerativních onemocnění či rakovinného bujení (Elmore 2007). Apoptosa hraje podstatnou roli také v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění (Lee 2009). Pro organismus je proto klíčová regulace apoptosy. Ta je zabezpečena pomocí řady mechanismů – nejdůležitější představuje rodina pro- a antiapoptotických proteinů Bcl-2 (z angl. *B-cell lymphoma 2*) a také regulace

činnosti kaspas pomocí specifických buněčných inhibitorů apoptosy, tzv. IAP (z angl. *inhibitor of apoptotic proteins*).

Regulace apoptosy pomocí Bcl-2

Proteiny patřící do rodiny Bcl-2 obsahují alespoň jeden ze čtyř konzervovaných α -helikálních motivů, které jsou známé jako Bcl-2 homology (BH) domény 1-4 (BH1-BH4). Dělí se na základě schopnosti ovlivňovat apoptosu na antiapoptotické (Bcl-2, Bcl-xL či Mcl-1) a proapoptotické (Bax, Bad, Bid, Bim, Noxa a PUMA) (Mukhopadhyay 2014). Nejpodstatnější a nejvíce stanovované proteiny rodiny Bcl-2 v souvislosti s apoptosou představují proapoptotické proteiny Bad a Bax a antiapoptotický protein Bcl-2.

Bax tvoří kanály ve vnější mitochondriální membráně, způsobuje tak její permeabilizaci, uvolnění cytochromu *c* a aktivaci apoptosy. Jeho funkci inhibuje Bcl-2, který se na něj váže a působí tak proti apoptose. Funkce Bcl-2 je naopak inhibována proteinem Bad (Elmore 2007). Kromě heterodimerizace jsou proteiny rodiny Bcl-2 regulovány fosforylací a proteolytickým štěpením. Fosforylace Bad vede k jeho asociaci s 14-3-3 proteiny, které brání jeho translokaci na mitochondrie a interakci s antiapoptotickým Bcl-2 a Bcl-XL, čímž dochází k deaktivaci apoptosy. Bad může být také štěpen pomocí kaspas, vzniká tak jeho zkrácená forma, která je v aktivaci apoptosy vysoce účinná. Bylo zjištěno, že aktivace Bad pomocí kaspas je regulována PKC δ (Cieslak 2007).

PKC je spojována s regulací apoptosy právě díky fosforylací proteinů rodiny Bcl-2. Bylo zjištěno, PKC α fosforyluje antiapoptotický protein Bcl-2 na Ser70 (Ruvolo 1998), což vede k jeho stabilizaci a aktivaci (Deng 1998). PKC ϵ fosforyluje Bad na Ser112, dochází k jeho asociaci s 14-3-3 proteiny, translokaci do cytosolu a následně deaktivaci apoptosy (Bertolotto 2000). PKC δ je naopak spojována s redistribucí proteinu Bax na mitochondrie a aktivací jeho apoptotické funkce (Sitailo 2004).

Regulace apoptosy kaspasami

Kaspasy jsou enzymy s proteolytickou aktivitou štěpící proteiny na zbytcích kyseliny asparagové. Dělí se na iniciátorové (2, 8, 9, 10), efektorové neboli exekuční (3, 6, 7) a zánětlivé (1, 4, 5) (Elmore 2007). Kaspasy jsou exprimovány ve formě prokaspas, které podléhají proteolytickému štěpení za vzniku aktivních forem. Iniciátorové kaspasy aktivují

kaspasy efektorové, které jsou konečnými vykonavateli apoptosy (Pop 2009, Thornberry 1998).

Funkce kaspas je regulována specifickými buněčnými inhibitory IAP. Řadíme mezi ně např. XIAP, cIAP₁ a cIAP₂, které inhibují kaspasy 3, 7 a 9 (Riedl 2001). Účinek IAP je naopak regulován pomocí Smac/DIABLO a HtrA2/Omi uvolňovaných z mitochondrií (Mukhopadhyay 2014).

1.2.4.2 PKC a dynamika mitochondrií

Mitochondrie jsou klíčovými organelami zabezpečujícími pomocí oxidativní fosforylace dostatečný přísun energie nezbytný pro fungování kardiomyocytů. Jejich morfologie úzce souvisí s odolností vůči buněčným signálům smrti (Suen 2008). Kvalita mitochondrií proto musí být přísně kontrolována a je zabezpečena pomocí proteolytického aparátu, proteasomální degradace, pučení a tvorby tzv. MDV (z angl. *mitochondria-derived vesicles*) a mitochondriálních sféroidů a v neposlední řadě také fúzí a štěpením mitochondrií (Ni 2015). Mitochondrie jsou dynamické organely, jejichž neustálá fúze a štěpení jsou nezbytné pro buněčné přežití a adaptaci na měnící se podmínky potřebné pro buněčný růst, dělení a distribuci mitochondrií během diferenciaci (Ni 2015). Fúze vnější mitochondriální membrány je regulována mitofusinem 1 a 2 (Mfn 1 a Mfn 2) (Koshiba 2004, Santel 2001), zatímco fúzi vnitřní mitochondriální membrány zprostředkovává protein OPA1 (z angl. *optic atrophy 1*) (Olichon 2003). Štěpení mitochondrií je regulováno cytosolickým *dynamin-related proteinem 1* (Drp1) (Roux 2006, Smirnova 2001), který se musí nacházet v komplexu s malým proteinem vnější mitochondriální membrány Fis 1 (James 2003, Yoon 2003). Rovnováha mezi mitochondriální fúzí a štěpením může být narušena např. oxidačním stresem nebo ischemií (Ong 2010b). Bylo zjištěno, že PKC δ fosforyluje Drp1 na Ser579, čímž aktivuje mitochondriální štěpení (Qi 2011), a že inhibice Drp1 chrání myší srdce před IR poškozením (Ong 2010a). Kim a spol. pozorovali během hypoxie nárůst fragmentace mitochondrií v závislosti na expresi Drp1 (Kim 2011).

1.2.4.3 PKC a autofagie

Autofagie byla oficiálně identifikovaná a pojmenovaná Christianem de Duven v roce 1963 a je formálně klasifikovaná jako forma buněčné smrti (Benbrook 2012). Za standardních podmínek je v srdci hladina autofagie nízká a působí protektivně, protože degraduje a recykluje cytoplasmatické složky jako proteiny s dlouhou dobou života

a organely a selektivně odstraňuje poškozené mitochondrie (Kim 2007). Tak vlastně působí antiapoptoticky, protože zabraňuje uvolnění proapoptotických faktorů jako cytochromu *c* z mitochondrií (Hamacher-Brady 2007). Nadměrná autofagie buněčných složek či selektivní trávení faktorů podporujících buněčné přežití však vede k buněčné smrti (Benbrook 2012). Byly popsány tři typy autofagie – makroautofagie, chaperony zprostředkovaná autofagie a mikroautofagie. Všechny tři formy jsou ve zvýšené míře aktivované při nedostatku živin či kyslíku, mitochondriální dysfunkci nebo poškození způsobeném radiací (Benbrook 2012, Gustafsson 2008). Většina literatury označuje pojmem autofagie makroautofagii (Benbrook 2012). Makroautofagie představuje proces, kdy se část cytoplasmy obsahující proteiny a organely s dlouhou dobou života sekvstruje dovnitř vesikulů obalených dvojitou membránou, zvaných autofagosomy. Ty mohou dále fúzovat s lysosomy za vzniku autofagolysosomů, kde dojde ke strávení jejich obsahu pomocí lysosomálních proteas. Jednotlivé komponenty jsou uvolněny k recyklaci. Produkce a zpracování autofagických vesikul je možno rozdělit do čtyř kroků: 1) iniciace, 2) nukleace, 3) maturace a 4) fúze s lysosomy (Benbrook 2012).

Regulace autofagie

Autofagie hraje stěžejní roli v udržování buněčné homeostázy, a podléhá proto přísné regulaci. Významnou úlohu zde mají evolučně konzervované proteiny kódované *autophagy-related genes* (ATG) (Benbrook 2012). Patří sem např. savčí ortolog kvasinkového Atg6 Beclin 1. Účastní se počáteční fáze tvorby autofagosomů a zároveň představuje spojovací bod v regulaci autofagie a apoptosy, protože interaguje s proteiny Bcl-2 a Bcl-XL, které snižují kapacitu Beclinu 1 k aktivaci autofagie (Liang 1998, Pattingre 2005). Komplex Bcl-2/Beclin 1 však může být fosforylován pomocí PKC δ /JNK1, čímž dojde k jeho disociaci a aktivaci autofagie (Chen 2008b). Zároveň může např. při nedostatku růstových faktorů docházet ke štěpení Beclinu 1 kaspasami, deaktivaci autofagie a naopak aktivaci apoptosy pomocí vzniklého C-terminálního fragmentu Beclinu 1 (Elmore 2007).

Dalším proteinem regulujícím autofagii je BNIP3 (z angl. *BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*). Patří do podrodiny BH3-only proteinů rodiny Bcl-2 a původně byl popsán jako proapoptotický protein potlačující aktivitu proteinů buněčného přežití Bcl-2 a Bcl-XL. Následně se však ukázalo, že je BNIP3 jedním z centrálních mediátorů autofagie a je nezbytný pro přežití buněk (Bellot 2009). Jeho atypické domény

BH3 totiž narušují interakci mezi Bcl-2 a Beclinem-1, čímž dochází k aktivaci autofagie (Mukhopadhyay 2014).

Protein LC3 (z angl. *microtubule-associated protein B-light chain 3*) je homolog kvasinkového Atg8 nacházející se ve dvou formách LC3-A a LC3-B. LC3-A je solubilní forma vznikající štěpením LC3 na jeho C-konci. Modifikací LC3-A vzniká membránově vázaná forma LC3-B, která je součástí autofagosomů (Tanida 2005). Bylo zjištěno, že množství LC3-B lze korelovat s počtem autofagosomů, a používá se proto jako marker autofagie (Mizushima 2007).

V regulaci autofagie se uplatňuje také protein Parkin. Jedná se o cytosolickou E3 ubiquitinligasu, která je aktivovaná Ser/Thr kinasou Pink1, a jejíž aktivace vede k degradaci mitochondrií pomocí mitofagie (Ni 2015).

Funkce BNIP3, LC3 a Parkinu podléhá regulaci pomocí PKC. Bylo zjištěno, že PKC fosforyluje BNIP3 a vede k jeho aktivaci (Graham 2007). Fosforylace proteinu LC3 na Thr6 a Thr29 je také zprostředkována PKC. Zdá se však, že pro aktivaci autofagie není klíčová (Jiang 2010). Dalším cílovým proteinem PKC je Parkin, jehož fosforylace vede ke snížení jeho aktivity (Sato 2006).

1.2.4.4 PKC a sfingolipidy

Sfingolipidy, jejichž typickým představitelem je sfingosin-1-fosfát (S1P), jsou bioaktivní látky regulující celou řadu důležitých buněčných procesů. Klíčovými enzymy zodpovědnými za tvorbu S1P jsou sfingosinkinasy (SPHK), které se v myokardu vyskytují ve dvou formách označovaných jako SPHK1 a SPHK2. Metabolismus sfingolipidů je v poslední době často spojován s IR poškozením (Levade 2001). Bylo zjištěno, že ischemický preconditioning zvyšuje tvorbu S1P a že selektivní inhibitor SPHK ruší kardioprotekci vyvolanou ischemickým preconditioningem (Jin 2004). Důležitým prvkem regulace funkce SPHK, a tedy i množství S1P, je fosforylace. Bylo zjištěno, že aktivátor PKC PMA vede k aktivaci ERK1, který následně fosforyluje, a tedy aktivuje SPHK1 i SPHK2 (Hait 2007, Johnson 2002).

1.2.4.5 PKC a odstraňování toxických aldehydů

Aldehydy jsou v organismu přirozeně produkovány např. během metabolismu lipidů (Esterbauer 1991) a cukrů (Marchitti 2008). V nízkých koncentracích mohou sloužit jako

druzí poslové spouštějící antioxidační ochranu aktivovanou stresem (Poli 2008), ale ve vysokých koncentracích jsou pro organismus škodlivé.

V souvislosti s kardiovaskulárními onemocněními jsou nejčastěji zmiňovanými aldehydy 4-hydroxynonenal (4-HNE) a malondialdehyd. 4-HNE vzniká v myokardu během IR (Sayre 2006). Inhibuje klíčové metabolické enzymy (Uchida 1993), poškozuje schopnost mitochondrií tvořit ATP (Yan 1998) a vede k otevírání MPTP (Kristal 1996). Optimální hladinu aldehydů, a tedy i 4-HNE, zabezpečují aldehyddehydrogenasy (ALDH) (Chen 2010). Zdá se, že v mechanismu kardioprotekce se uplatňuje mitochondriální isoforma aldehyddehydrogenasy ALDH2. Bylo zjištěno, že ALDH2 je fosforylována pomocí PKC ϵ a že je tato fosforylace spojená se zvýšením její aktivity (Chen 2008a).

1.2.4.6 PKC a gap junctions

Konexiny jsou transmembránové proteiny oligomerizující do hexamerů (konexonů), které tvoří vodivé spoje mezi kardiomyocyty tzv. gap junctions (Rodriguez-Sinovas 2009). Gap junctions přímo spojují sousední buňky a jsou nezbytné pro šíření akčního potenciálu v myokardu (Severs 2008). Zároveň umožňují difúzi malých molekul včetně iontů, aminokyselin, nukleotidů a druhých posílů (Ca²⁺, cAMP, cGMP a IP3) s molekulovou hmotností do 1 kDa (Lampe 2000). V kardiomyocytech se vyskytuje zejména konexin 43 (Cx43) (Fontes 2012), ale je zde zastoupen také Cx37, Cx40 a Cx45 (van Kempen 1995).

Patofyziologie kardiovaskulárních onemocnění je spojena se změnami exprese, distribuce a fosforylace Cx43. Během IR dochází k poškození šíření elektrických impulzů a vzniku arytmií (Sato 2008). Kromě arytmogeneze však mohou gap junctions hrát důležitou roli i v šíření poškození vyvolaného IR (Garcia-Dorado 1997). Zároveň bylo zjištěno, že se Cx43 uplatňuje jako nezbytná složka signálních drah kardioprotekce (Li 2004b).

Klíčovým mechanismem regulace Cx43 je fosforylace (Lampe 2000), která ovlivňuje jeho funkci, uspořádání, syntézu a degradaci (Ruiz-Meana 2008). Cx43 je cílovým proteinem řady kinas, kromě jiného PKA, PKC, PKG či MAPkinas (Schulz 2007). Některé mají aktivační, jiné deaktivující roli (Schulz 2007). PKC ϵ fosforyluje Cx43 na Ser368 a snižuje buněčnou komunikaci přes gap junctions (Lampe 2000). Zároveň bylo zjištěno, že kardioprotektivní stimuly vedou k translokaci Cx43 společně s PKC ϵ na mitochondrie (Jeyaraman 2012, Rottlaender 2010).

2 HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Obečný inhibitor PKC chelerytrin kompletně ruší kardioprotekci vyvolanou adaptací na IHH, zatímco selektivní inhibitor PKC δ rottlerin vede k jejímu snížení (Neckář 2005). Není proto možné vyloučit uplatnění ostatních isoform PKC (PKC α a PKC ϵ) běžně spojovaných s kardioprotekcí vyvolanou ischemickým preconditioningem. Kardioprotektivní účinky byly pozorovány i na modelu CNH (Neckář 2013, Kašparová 2015). PKC doposud nebyla po adaptaci na CNH analyzována, výsledky ostatních studií však naznačují, že konkrétní model hypoxie může mít na expresi jednotlivých isoform PKC podstatný vliv. Je známo, že aktivita PKC je ovlivněna nejen změnami v proteinovém množství, ale také fosforylací enzymu a jeho translokací do konkrétních buněčných kompartmentů. PKC fosforyluje a tedy reguluje řadu cílových proteinů zapojených v apoptose a autofagii, dynamice mitochondrií, metabolismu sfingolipidů, odstraňování toxických aldehydů, nebo komunikaci přes gap junctions. Bylo zjištěno, že mnoho z nich se uplatňuje v mechanismu kardioprotekce vyvolané ischemickým preconditioningem. Jejich zapojení v mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií však doposud nebylo objasněno. Zdá se však, že oba tyto protektivní přístupy sdílejí podobné signální dráhy, jelikož kombinace chronické hypoxie a ischemického preconditioningu nevede k prohloubení kardioprotekce (Neckář 2002a).

Na základě výše uvedených údajů předpokládáme, že:

- exprese jednotlivých isoform PKC v myokardu je ovlivněna konkrétním modelem chronické hypoxie a u adaptace na IHH a CNH se proto může lišit
- aktivita PKC není závislá jen na změnách proteinového množství, ale i na fosforylaci či translokaci enzymu do jednotlivých kompartmentů
- v kardioprotekci vyvolané adaptací na CNH hraje klíčovou roli PKC ϵ
- cílovými proteiny PKC v chronicky hypoxickém myokardu by mohly být proteiny regulující apoptosu a autofagii, dynamiku mitochondrií,

metabolismus sfingolipidů, odstraňování toxických aldehydů, nebo komunikaci přes gap junctions, které jsou spojovány s mechanismem kardioprotekce vyvolané ischemickým preconditioningem

Ve své práci jsem si proto stanovila tyto cíle:

Cíl 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)

■ po adaptaci na IHH stanovit

- PKC α , PKC δ , PKC ϵ a jejich fosforylované formy na úrovni proteinu
- PKC α , PKC δ , PKC ϵ na úrovni mRNA

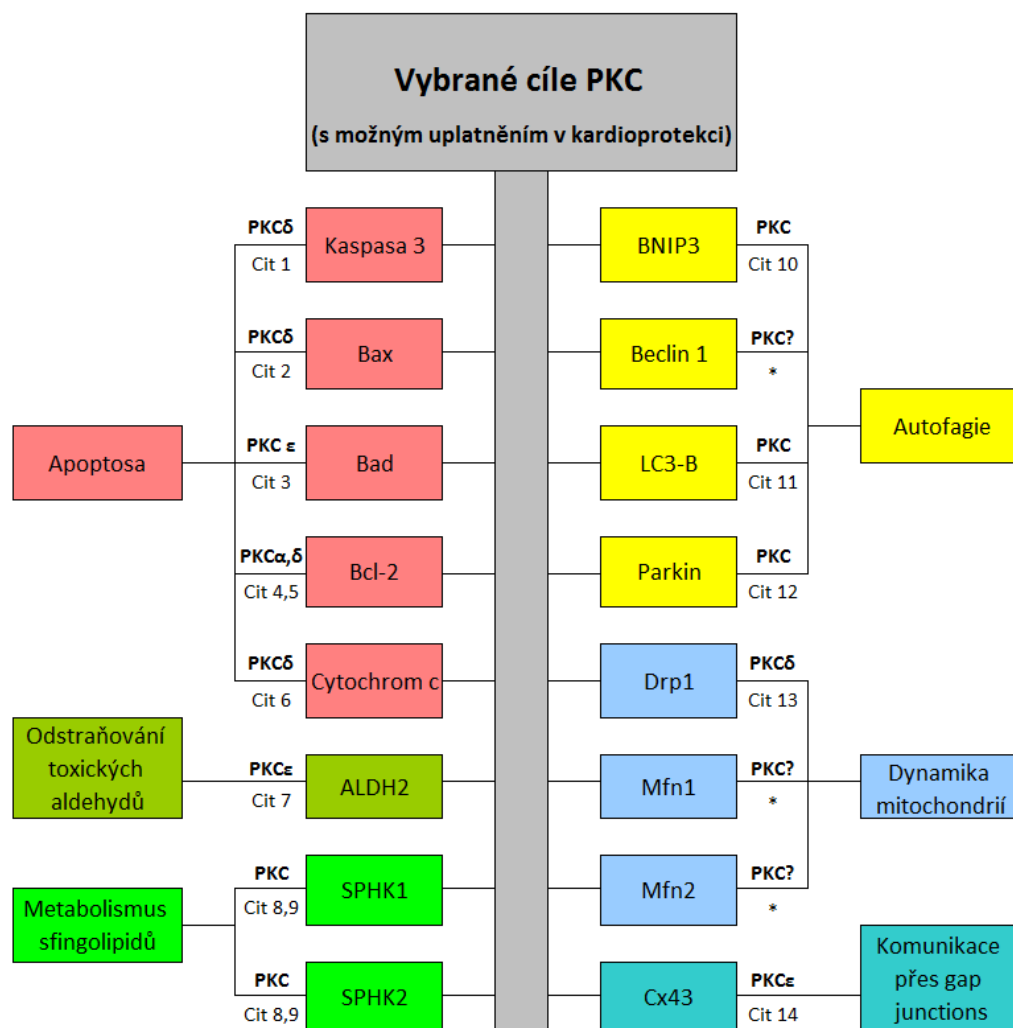
■ po adaptaci na CNH stanovit

- PKC δ , PKC ϵ a jejich fosforylované formy na úrovni proteinu
- PKC δ a PKC ϵ na úrovni mRNA
- vliv inhibičního peptidu PKC ϵ KP-1633 na viabilitu a uvolnění LDH na kardiomyocytech izolovaných z myokardu levé komory

Cíl 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH

■ po adaptaci na IHH stanovit

- cílové proteiny PKC δ a PKC ϵ (shrnuto na obr. 5) v souvislosti s:
 - apoptosou – Bad, Bax, Bcl-2, kaspasa 3, cytochrom *c*
 - dynamikou mitochondrií – Drp1, Mfn1, Mfn2
 - autofagií – Beclin 1, LC3-B, BNIP3, Parkin
 - metabolismem sfingolipidů – SPHK1, SPHK2
 - odstraňováním toxických aldehydů – ALDH2
 - komunikací přes gap junctions – Cx43
- apoptosu metodou TUNEL



Obr. 5: Vybrané cílové proteiny PKC uplatňující se v kardioprotekci.

U cílových proteinů jsou uvedeny konkrétní isoformy PKC, které daný protein fosforylují. * – tyto proteiny nebyly dosud identifikovány jako cílové proteiny PKC. ALDH2 – aldehyddehydrogenasa 2, Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*, BNIP3 – *BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*, Cx43 – konexin 43, Drp1 – *dynamamin-related protein 1*, LC3-B – *microtubule-associated protein B-light chain 3*, Mfn1 – mitofusin 1, Mfn2 – mitofusin 2, SPHK1 – sfingosinkinasa 1, SPHK2 – sfingosinkinasa 2, XIAP – *X-linked inhibitor of apoptosis protein*.

Použité citace: cit 1 – Voss 2005, cit 2 – Bertolotto 2000, cit 3 – Sitailo 2004, cit 4 – Chen 2009, cit 5 – Ruvolo 1998, cit 6 – Majumder 2000, cit 7 – Chen 2008a, cit 8 – Hait 2007, cit 9 – Johnson 2002, cit 10 – Graham 2007, cit 11 – Jiang 2010, cit 12 – Sato 2006, cit 13 – Qi 2011, cit 14 – Lampe 2000.

3 METODIKA

3.1 Laboratorní zvířata

K experimentům byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar pocházející z chovu firmy Velaz, popř. Charles River. Průměrná hmotnost zvířat na počátku pokusu se pohybovala v rozmezí od 270 do 370 g. Zvířata měla volný přístup k vodě a ke standardní laboratorní dietě a byla chována v režimu 12 hod světlo/12 hod tma. Studie byla vedena ve shodě se zákonem na ochranu zvířat proti týrání „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publikovaným *US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996)* a byla schválena příslušnou komisí Fyziologického ústavu AV ČR.

3.2 Experimentální modely chronické hypoxie

K pokusům byly použity dva základní modely chronické hypoxie – intermitentní hypobarická hypoxie a kontinuální normobarická hypoxie.

Intermitentní hypobarická hypoxie (IHH)

Potkani byli vystaveni výškové hypoxii v hypobarické komoře. Adaptace probíhala 8 hod denně, 5 dnů v týdnu, celkem 25 dnů. Barometrický tlak byl snižován postupně tak, aby po 13 expozicích odpovídal nadmořské výšce 7000 m. V této výšce má barometrický tlak hodnotu 40,9 kPa a parciální tlak kyslíku je 8,6 kPa. Během adaptace byla v komoře zajištěna cirkulace vzduchu a teplota byla udržována v rozmezí 21-23 °C.

Kontinuální normobarická hypoxie (CNH)

Zvířata byla vystavena nepřetržitému působení hypoxie za normobarických podmínek po dobu 3 týdnů. Obsah kyslíku byl snížen z normoxické hodnoty 21% ($FIO_2=0,21$) na 10% ($FIO_2=0,1$) pomocí generátorů hypoxie Everest Summit (Hypoxico Inc., N.Y., USA). Tento stupeň hypoxie odpovídá nadmořské výšce 5500 m. Během adaptace byla v komoře zajištěna cirkulace vzduchu a teplota byla udržována v rozmezí 21-23 °C.

Normoxie (N)

Zvířata kontrolních skupin byla chována v normoxických podmínkách odpovídajících nadmořské výšce 200 m při teplotě 21-23 °C. Barometrický tlak zde byl 99 kPa a parciální tlak kyslíku 20,7 kPa ($FIO_2 = 0,21$).

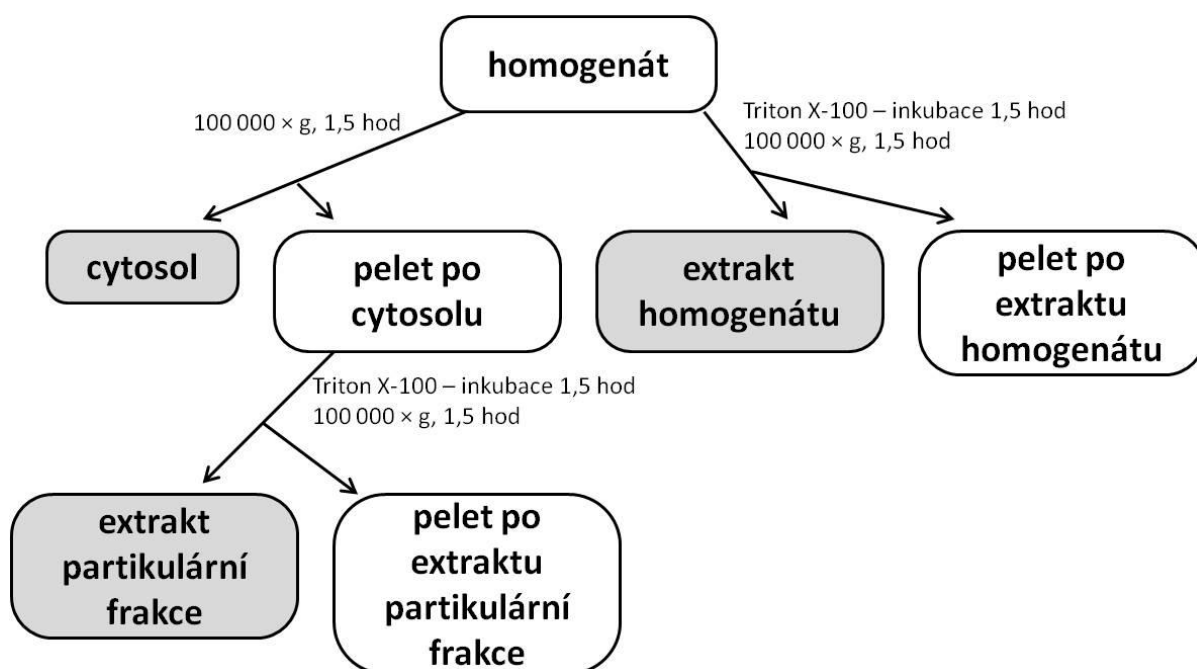
3.3 Odběr tkáně

Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací. Srdce bylo vystřiženo z hrudníku, propláchnuto ledovým fyziologickým roztokem a byly odstraněny síně a velké cévy. Pro analýzy pomocí metody Western blot a PCR bylo srdce rozděleno na septum, pravou komoru a levou komoru. Jednotlivé srdeční oddíly byly zváženy a zmrazeny v kapalném dusíku, kde byly uchovávány do dalšího zpracování. Pro analýzu metodou Tunel bylo srdce perfundováno roztokem 20 mM KCl, aby došlo k jeho zastavení v diastole.

3.4 Frakcionace a homogenizace vzorků

Myokard levé komory byl homogenizován pod kapalným dusíkem. K rozdrčené tkáni byl přidán homogenizační pufr v poměru 8 ml pufru na 1 g srdeční tkáně. Složení homogenizačního pufru bylo: 12,5 mM Tris-HCl (pH 7,4), 250 mM sacharosa, 2,5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 0,3 mM fenylmethylsulfonylfluorid, 6 mM β -merkaptoetanol, 10 mM glycerol-2-fosfát, 0,2 mM leupeptin, 0,02 mM aprotinin a 0,1 mM ortovanadát sodný.

1) Pro analýzu isoform PKC po adaptaci na IHH a CNH byly vzorky homogenizovány pomocí Potter-Elvehjemova homogenizátoru za současného chlazení v ledové tříšti 15 tahy nahoru a dolů během 1 min. Vlastní postup frakcionace je uveden na obr. 6. Homogenát byl pro účel frakcionace rozdělen na dvě části. První část homogenátu byla centrifugována při 100 000 g (Beckman L7) po dobu 90 min. Výsledný supernatant reprezentoval cytosolickou frakci (do které byl přidán Triton X-100 tak, aby koncentrace byla 1%). Pelet po cytosolické frakci byl rozsuspendován v homogenizačním pufru s přídatkem 1% Tritonu X-100, ponechán 90 min na ledu a následně znovu centrifugován při 100 000 g po dobu 90 min. Vzniklý supernatant reprezentoval extrakt partikulární frakce. K druhé části homogenátu byl přidán Triton X-100 tak, aby výsledná koncentrace byla 1%, homogenát byl ponechán 90 min na ledu a následně centrifugován při 100 000 g po dobu 90 min. Vzniklý supernatant reprezentoval extrakt homogenátu.



Obr. 6: Postup frakcionace.

2) Cílové proteiny PKC δ a PKC ϵ byly stanoveny po adaptaci na IHH na neextrahovaných homogenátech, které byly homogenizovány pomocí kuličkového homogenizátoru (30 Hz, 10 min).

K analýzám pomocí metody Western blot byly použity homogenáty a partikulární a cytosolická frakce. Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byly analyzovány metodou podle Bradfordové (Bradford 1976). Mezi koncentracemi proteinů v jednotlivých experimentálních skupinách nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly.

3.5 Elektroforéza a Western blot

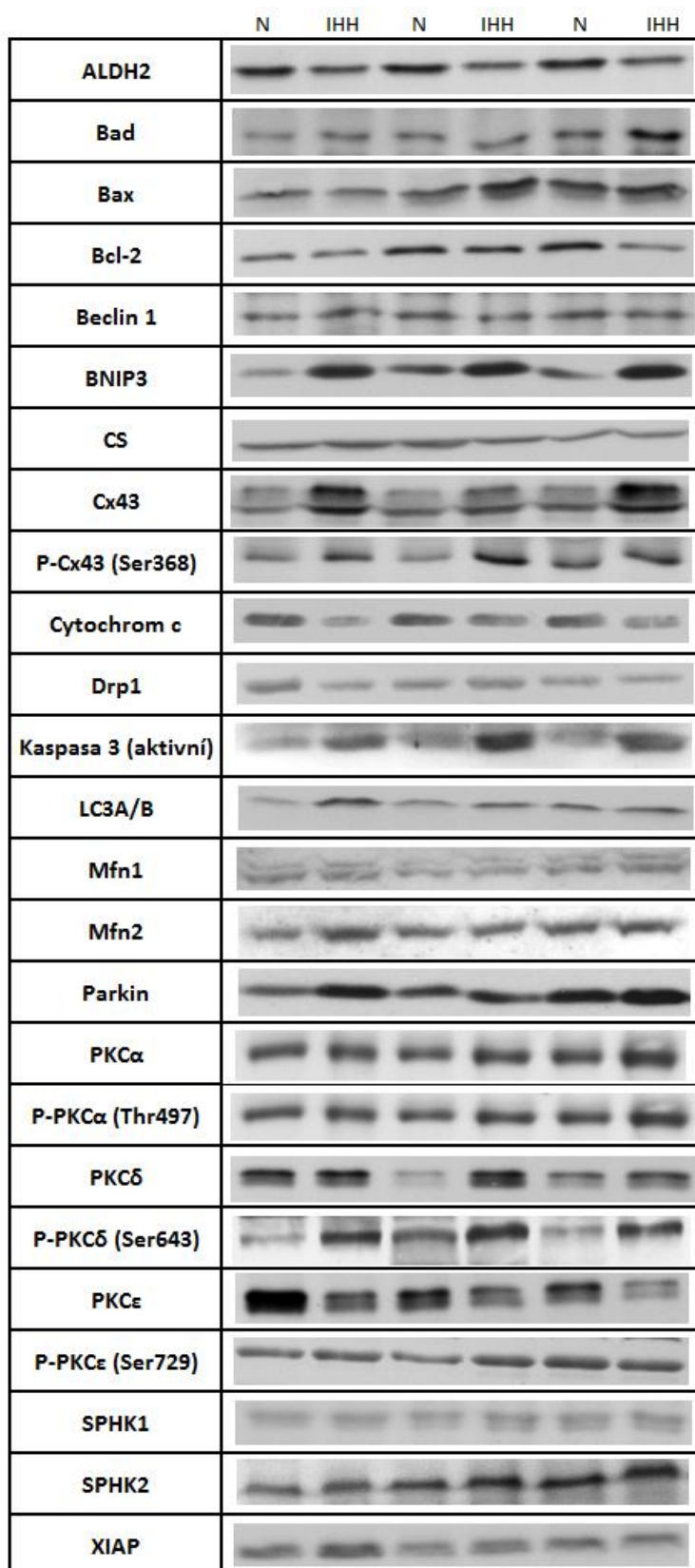
Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo prováděno na 10% bis-akrylamidových gelech v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) v elektroforetické soustavě Mini-Protean III apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) při 20 mA/gel po dobu 90-150 min v závislosti na analyzovaném proteinu. V rámci všech experimentálních skupin bylo nanášeno vždy stejné množství proteinu. Množství nanášeného proteinu se lišilo podle druhu analyzovaného proteinu a je uvedeno v tabulce 1.

Po skončení elektroforézy byly proteiny přeneseny na nitrocelulosové membrány (Amersham Biosciences, Freiburg, Německo). Pro kontrolu správného přenosu proteinů byly membrány obarveny pomocí Ponceau S. Membrány byly následně blokovány v roztoku 5% nízkotučného mléka v TTBS (pufrovaný roztok NaCl – 0,1 M Tris, 2,5 M NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20; pH 7,5) po dobu 60 min. Membrány byly dále inkubované s příslušnými primárními a sekundárními protilátkami. Konkrétní druhy protilátek, doba inkubace a ředění jsou uvedeny v tabulce 1 a obrázky reprezentativních proužků („bandů“) v tabulce 2.

Primární protilátka	Katalogové číslo	Výrobce	Ředění	Doba inkubace	Hmotnost (kDa)	Pozitivní kontrola	Nanáška (μg)	Sekundární protilátka	Katalogové číslo	Výrobce	Ředění	Doba inkubace
ALDH2	sc-48837	Santa-Cruz	1 000	1,5 h	53	játra	15	anti-goat	a5420	Sigma	80 000	1 h
Bad	sab4300341	Sigma	1 000	1,5 h	23		40	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
Bax	av02020	Sigma	1 333	1,5 h	15		40	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
Bcl-2	sab4500003	Sigma	1 000	1,5 h	26		10	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
Beclin 1	NB500-249	Novus Biotechnologicas	2 000	1,5 h	60		30	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
BNIP3	ab10433	Abcam	2 000	přes noc	30	mozek	20	anti-mouse	31432	Thermo Fischer	10 000	1 h
CS	ab96600	Abcam	2 000	1,5 h	52		5	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
Cx43	c6219	Sigma	8 000	1,5 h	43	mozek	20	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
P-Cx43 (Ser368)	3511S	Cell Signaling	1 000	přes noc	43	mozek	40	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
Cytochrom c	c5723	Sigma	3 333	1,5 h	43		3	anti-sheep	a3415	Sigma	6 000	1 h
Drp1	611739	BD Transduction Laboratories	667	přes noc	72		20	anti-mouse	sc-2371	Santa-Cruz	20 000	1 h
Kaspasa 3 (aktivní)	NB-100-56708	Novus Biotechnologicas	1 000	1,5 h	14	Jurkat	40	anti-mouse	31432	Thermo Fischer	10 000	1 h
LC3A/B	ab128025	Abcam	1 000	přes noc	15	mozek	40	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
Mfn1	ab57602	Abcam	1 000	1,5 h	84		30	anti-mouse	sc-2371	Santa-Cruz	20 000	1 h
Mfn2	ab56889	Abcam	1 000	1,5 h	86		30	anti-mouse	sc-2371	Santa-Cruz	20 000	1 h
Parkin	ab77924	Abcam	2 000	přes noc	55	mozek	20	anti-mouse	31432	Thermo Fischer	10 000	1 h
PKCα	P4334	Sigma	5 000	1,5 h	80	mozek	10	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
P-PKCα (Thr497)	ab76016	Abcam	6 667	přes noc	77	mozek	15	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
PKCδ	P8333	Sigma	8 000	1,5 h	77	mozek	15	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
P-PKCδ (Ser643)	9376S	Cell Signaling	1 000	přes noc	78	mozek	40	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
PKCε	P8458	Sigma	8 000	1,5 h	83	mozek	25	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
P-PKCε (Ser729)	sc-12355	Santa-Cruz	1 000	přes noc	90	mozek	40	anti-goat	a5420	Sigma	80 000	1 h
SPHK1	ab71700	Abcam	500	1,5 h	51	ledviny	20	anti-rabbit	a9169	Sigma	6 000	1 h
SPHK2	sc-22702	Abcam	1 000	1,5 h	70	mozek	40	anti-goat	a5420	Sigma	80 000	1 h
XIAP	sc-55551	Santa-Cruz	1 000	1,5 h	55	ledviny	20	anti-mouse	31432	Thermo Fischer	10 000	1 h

Tabulka 1: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek pro Western blot analýzu.

Vysvětlení zkratk viz Seznam zkratk.



Tabulka 2: Obrázky reprezentativních proužků.

Jednotlivé proužky odpovídají třem vzorkům homogenátů z normoxické a třem vzorkům z hypoxické skupiny. N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Vysvětlení zkratk analyzovaných proteinů viz Seznam zkratk.

Následně byly membrány uchovány v TTBS přes noc a další den byly proužky vizualizovány na autoradiografickém filmu (AGFA, CP-BU NEW, ČR) pomocí metody zesílené chemiluminiscence. Relativní zastoupení analyzovaných proteinů bylo vyhodnoceno pomocí programu ImageQuant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Ke správné identifikaci jednotlivých stanovovaných proteinů byly využity standardy molekulových hmotností, blokační peptidy a pozitivní kontroly. Z každé experimentální skupiny byl na stejný gel nanesen vzorek, který byl kvantifikován na stejné membráně. Množství proteinů nanášených na gel se lišilo v závislosti na stanovovaném proteinu a frakci s cílem dosáhnout linearity mezi intenzitou a objemem. Každý vzorek byl analyzován v duplikátu v minimálně 3 nezávislých stanoveních. Výsledky byly normalizovány na množství proteinu a na housekeeping protein. V případě CNH jsme jako housekeeping protein použili glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH) (pro homogenát a cytosol) a aktin (pro partikulární frakci). U modelu IHH se nejprve nedařilo najít vhodný housekeeping protein. Bylo publikováno, že po adaptaci IHH dochází k nárůstu množství běžně používaných housekeeping proteinů (aktin, kalsequestrin, GAPDH, β -tubulin) (Balková 2011). Nově jsme však zjistili, že po adaptaci na IHH se nemění množství citrátsyntasy (CS). Použili jsme ji proto jako housekeeping protein u analýzy cílových proteinů PKC po adaptaci na IHH. Pro přepočítání výsledků jsme použili směsný vzorek nanesený na každý gel, na který byly vztaženy hodnoty jednotlivých denzitometrických objemů. Získané hodnoty pak mohly být vzájemně porovnávány nezávisle na daném pokusu či délce expozice.

3.6 Izolace RNA a RT-PCR

Celková buněčná RNA byla z myokardu levých komor izolována Trizolem (Invitrogen, CA, USA). Čistota a koncentrace extrahované RNA byla kvantifikována za použití NanoDropu. Před vlastní syntézou cDNA byla RNA čištěna DNA-free DNase (Ambion, CA, USA). Následně byl jeden mikrogram celkové RNA reverzně transkribován do cDNA pomocí RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas UAB, Vilnius, Litva) za pomoci oligo(dT) primerů podle pokynů výrobce. Real-time PCR bylo měřeno na přístroji Light Cycler 480 (Roche Applied Sciences, Penzberg, Německo) metodou dual hydrolysis probe (Universal Probe – Roche Applied Sciences) s příslušnými Probe Master kit (Roche Applied Sciences) podle pokynů výrobce. Specifické proby

a primery byly navrženy pomocí softwaru UPL (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>) a PCR bylo měřeno v teplotním profilu popsáném v publikaci Frolíkové a spol. (Frolíková 2012). Data použitá k výpočtům jsou průměry hodnot CT (z angl. *threshold cycle*) získaných z qPCR provedených v tripletech. Bylo ověřeno, že odchylky hodnot v tripletech nepřesáhly hodnotu 0,5 CT. Standardní křivky byly vytvořeny pro každý pár primerů s použitím trojnásobku sériového ředění cDNA. Byla provedena také analýza křivek tání za účelem zjištění přítomnosti jednoho amplikonu na konci standardního běhu křivky. K zajištění přesného stanovení relativní exprese byla ze standardních křivek vypočtena efektivita amplifikace PCR každého páru primerů. Hodnota analyzovaných transkriptů byla normalizována na hladinu referenčního genu hypoxantinguanosyltransferasy 1 (Hprt1) (Bohuslavová 2010) s ohledem na specifickou efektivitu (E) PCR pro každý gen (Pfaffl 2001) podle rovnice:

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

Non-templátové a non-RT reakce byly analyzovány jako kontroly.

3.7 Příprava histologických řezů pro metodu Tunel

Srdce byla promyta v roztoku PBS a etanolovou řadou (25% (v/v), 50% (v/v) a 70% (v/v) etanol) převedena do 70% (v/v) etanolu. Převedení vzorků do xylenů a prosycení parafinem bylo provedeno pomocí odvodňovacího tkáňového automatu Leica ASP 200 (Leica, Wetzlar, DE). Následně byly vzorky zality do parafinu v zalévacím automatu Leica EG 1150. Pomocí Microtomu Leica RM2255 byly připraveny řezy o tloušťce 7 μm . Následovalo přenesení řezů do vodní lázně (N-Biotek, Bucheon, KR) o teplotě 39 $^{\circ}\text{C}$ a zachycení na podložní skla (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Konečná fixace řezů na sklech byla provedena inkubací při 42 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 hod.

3.8 Metoda Tunel

Metoda Tunel (z angl. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) byla provedena dle pokynů výrobce pomocí komerční soupravy In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, Indianapolis, USA). Nejprve bylo třeba z řezů odstranit parafin, k čemuž byla použita řada: xylen (15 min), 100% etanol (5 min), 96%

etanol (5 min), 90% etanol (2,5 min), 80% etanol (3 min), 70% etanol (3 min) a PBS (3x5 min). Následně byly řezy inkubovány 20 min s proteinkinasou K (20 µg/ml-Tris-HCl, pH 8,0) při 37 °C ve vlhké komůrce a promyty 3x5 min v PBS. Proteinkinasa K slouží k narušení struktury tkáně. Kromě vlastních vzorků bylo nutné analyzovat také pozitivní a negativní kontrolu. Řez sloužící jako pozitivní kontrola byl vystaven působení DNasyI (3 U/µl) po 12 min při laboratorní teplotě, čímž došlo k vyvolání zlomů vláken DNA. Řezy byly následně promyty 3x5 min v PBS. Po promytí byly řezy inkubovány se směsí roztoků komerční soupravy (terminální deoxynukleotidyltransferasy a fluorescenčně značeného dUTP v poměru 1:9). Jako negativní kontrola sloužil řez inkubovaný pouze s roztokem fluorescenčně značeného dUTP bez přidání terminální deoxynukleotidyltransferasy. Řezy byly inkubovány ve vlhké komůrce ve tmě při teplotě 37 °C po dobu 60 min. Následovalo promytí 3x5 min v PBS. Dále byly řezy inkubovány po dobu 2 min s fluorescenčním barvivem Hoechst 33258, čímž došlo k obarvení jader. Po promytí 3x5 min v PBS byly překrytím řezů krycím sklíčkem s naneseným zalévacím médiem DPX vytvořeny trvalé preparáty.

Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu (mikroskop Nikon Eclipse TE 2000-S, fluorescenční lampa Olympus-U-RFL-T, Tokyo, Japonsko). Výsledný počet Tunel-pozitivních buněk byl vztažen k celkové ploše myokardu levé komory (případně pravé komory či septa).

3.9 Stanovení buněčné viability a uvolnění laktátdehydrogenasy po simulované ischemii/reperfúzi a vliv inhibičního peptidu PKC ϵ KP-1633

Kardiomyocyty izolované z myokardu levé komory byly inkubovány po dobu 15 min s 5 µM kontrolním peptidem KP-1723 nebo inhibičním peptidem PKC ϵ KP-1633. Následně byly vystaveny 25 min metabolické inhibici (MI) a 30 min re-energizaci (MI/R). Během MI byly buňky inkubovány s modifikovaným Krebsovým roztokem obsahujícím 1,5 mM NaCN a 20 mM 2-deoxyglukosu místo glukosy. Během re-energizace byly metabolické inhibitory odstraněny a nahrazeny standardním buněčným médiem. Buněčná viabilita a uvolnění laktátdehydrogenasy (LDH) byly měřeny na začátku experimentu, po MI a po re-energizaci. Podrobný popis metodiky je uveden ve článku Holzerové a spol. (Holzerová 2015, příloha A). Toto stanovení bylo provedeno Dr. Hlaváčkovou.

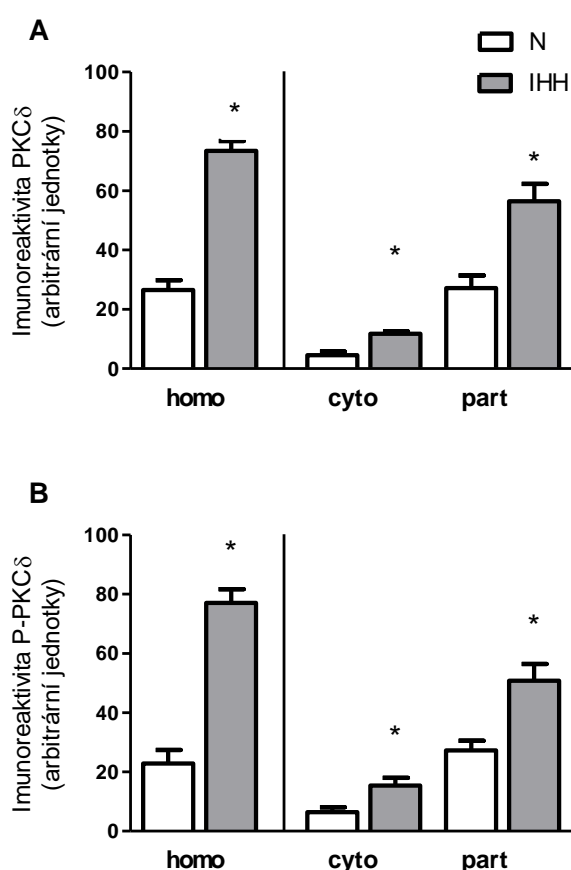
4 VÝSLEDKY

4.1 CÍL 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)

4.1.1 Vliv IHH na PKC δ , PKC ϵ a PKC α

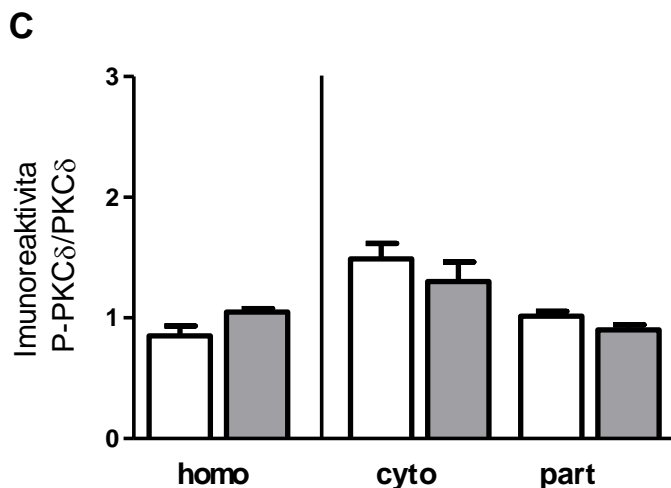
IHH aktivuje celkovou i fosforylovanou PKC δ .

Adaptace na IHH zvýšila množství celkové i fosforylované PKC δ (Ser643) v homogenátu (o 177, resp. 226%), v cytosolu (o 160, resp. 139%) i partikulární frakci (o 108, resp. 86%) (obr. 7A, resp. 7B). Poměr fosforylovaná vs. celková PKC δ vyjadřující míru aktivace PKC δ se nezměnil (obr. 7C). U exprese PKC δ mRNA byl po IHH patrný trend nárůstu, nedosáhl však statistické významnosti (obr. 8).



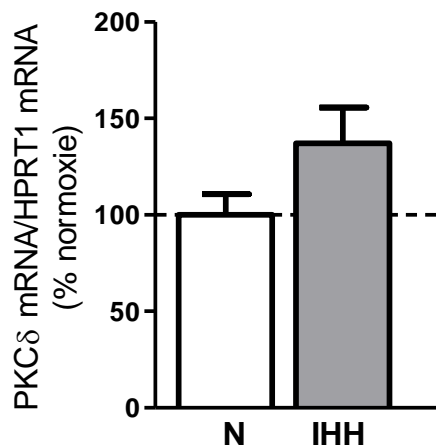
Obr. 7: Vliv IHH na relativní zastoupení celkové PKC δ (A) a fosforylované PKC δ (B) v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie, cyto – cytosol, homo – homogenát, part – partikulární frakce. Nanáška pro PKC δ : cytosol – 15 μ g, homogenát – 10 μ g, partikulární frakce – 5 μ g, nanáška pro P-PKC δ : cytosol – 50 μ g, homogenát – 40 μ g, partikulární frakce – 40 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).



Obr. 7 pokračování: Vliv IHH na poměr P-PKC δ vs. celková PKC δ (C) v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie, cyto – cytosol, homo – homogenát, part – partikulární frakce. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6.

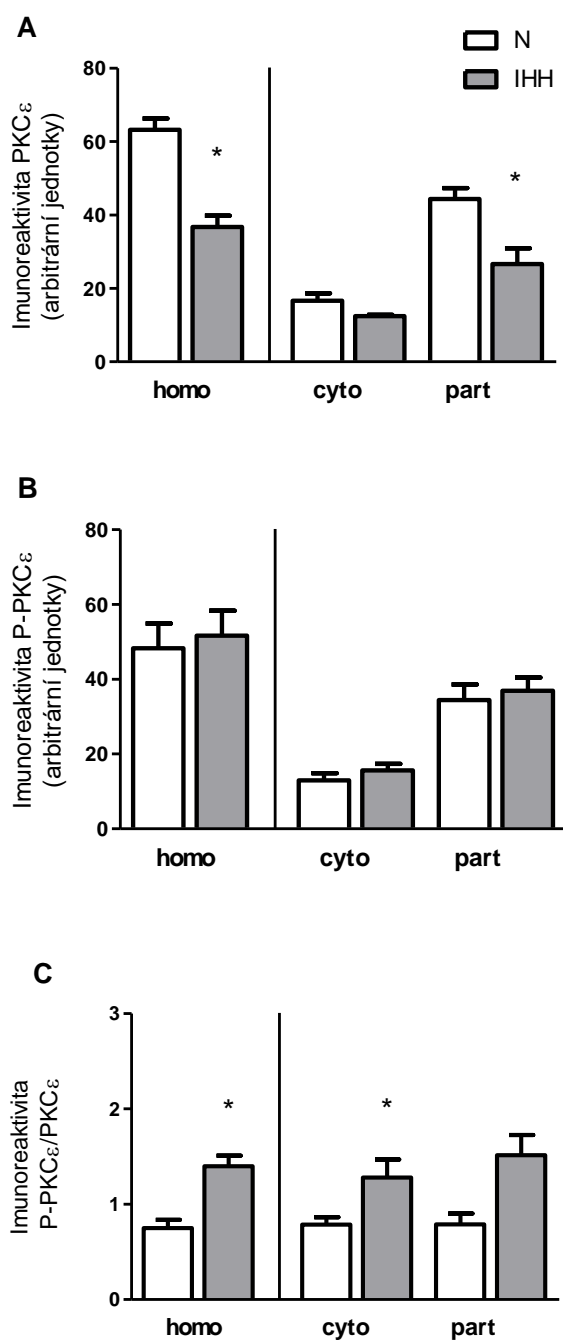


Obr. 8: Vliv IHH na expresi PKC δ mRNA v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Množství PKC δ mRNA je normalizováno na referenční gen hypoxantinguaninfosforibosyltransferasu 1 (HPRT1). Počet zvířat ve skupině – 7.

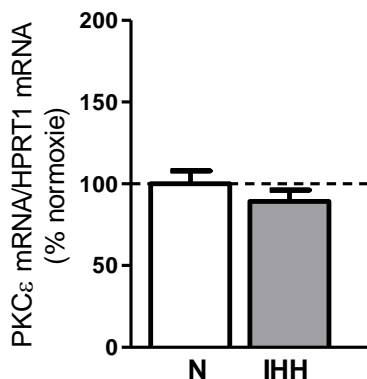
IHH snižuje PKC ϵ , roste však zastoupení fosforylované (aktivní) vůči celkové PKC ϵ

Po adaptaci na IHH došlo ke snížení celkového množství PKC ϵ v homogenátu a partikulární frakci (v obou o 40%, obr. 9A). Množství fosforylované PKC ϵ (Ser729) se nezměnilo (obr. 9B), vzrostl však poměr fosforylovaná vs. celková PKC ϵ v homogenátu (o 86%) a v cytosolu (o 63%) (obr. 9C). IHH neměla vliv na expresi PKC ϵ mRNA (obr. 10).



Obr. 9: Vliv IHH na relativní zastoupení celkové PKC ϵ (A), fosforylované PKC ϵ (B) a poměr P-PKC ϵ vs. celková PKC ϵ (C) v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie, cyto – cytosol, homo – homogenát, part – partikulární frakce. Nanáška pro PKC ϵ : cytosol – 15 μ g, homogenát – 10 μ g, partikulární frakce – 5 μ g, nanáška pro P-PKC ϵ : cytosol – 50 μ g, homogenát – 40 μ g, partikulární frakce – 40 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie (p < 0,05).

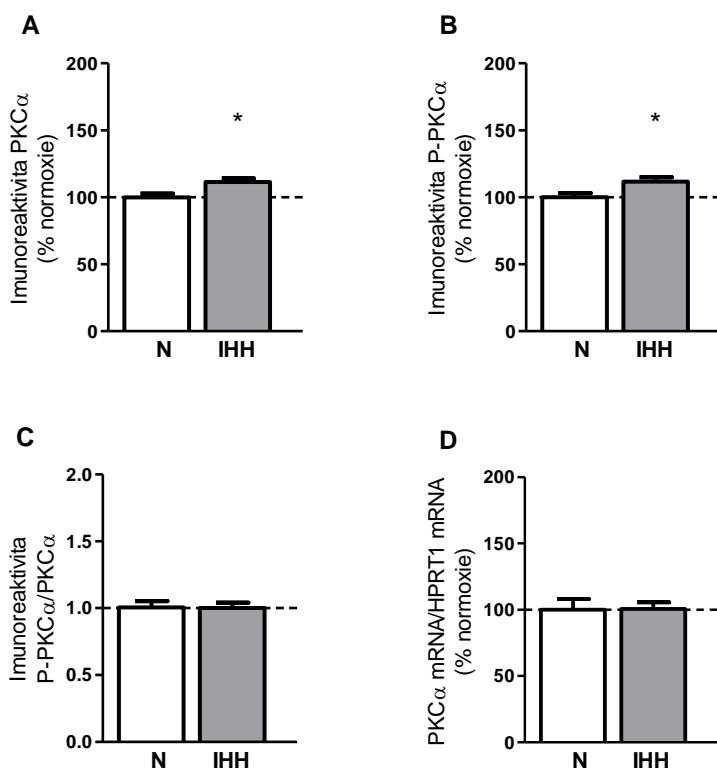


Obr. 10: Vliv IHH na expresi PKC ϵ mRNA v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Množství PKC ϵ mRNA je normalizováno na referenční gen hypoxantinguaninfosforibosyltransferasu 1 (HPRT1). Počet zvířat ve skupině – 7.

IHH aktivuje PKC α .

IHH zvýšila množství celkové i fosforylované PKC α (Thr497) v homogenátu (o 11 a 12%) (obr. 11A a 11B), ale nezměnila poměr fosforylovaná vs. celková PKC α (obr. 11C) a množství PKC α mRNA (obr. 11D).



Obr. 11: Vliv IHH na relativní zastoupení celkové PKC α (A), fosforylované PKC α (B), poměr P-PKC α vs. celková PKC α (C) a expresi PKC α mRNA (D) v homogenátu.

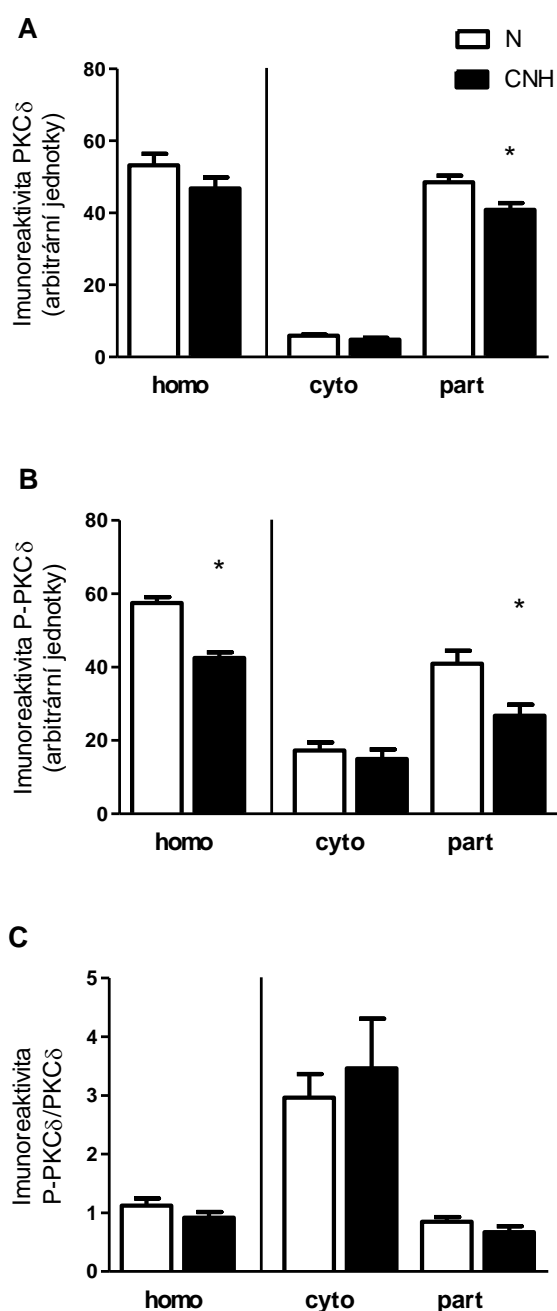
N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nánáška pro PKC α – 10 μ g a pro P-PKC α – 15 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

Množství PKC α mRNA je normalizováno na referenční gen hypoxantinguaninfosforibosyltransferasu 1 (HPRT1). Počet zvířat ve skupině – 7. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

4.1.2 Vliv CNH na PKC δ a PKC ϵ

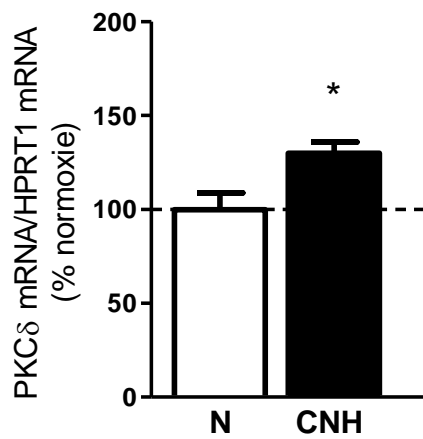
CNH snižuje proteinové množství PKC δ , ale zvyšuje expresi PKC δ mRNA.

Adaptace na CNH snížila relativní zastoupení celkové PKC δ v partikulární frakci (o 16%, obr. 12A) a fosforylované PKC δ v homogenátu (o 26%) a partikulární frakci (o 35%, obr. 12B). Poměr fosforylovaná vs. celková PKC δ nebyl hypoxií ovlivněn v žádné ze sledovaných frakcí (obr. 12C). Zároveň došlo k nárůstu exprese PKC δ mRNA (o 30%, obr. 13). Zdá se proto, že za podmínek CNH se zvyšuje turnover/degradace PKC δ .



Obr. 12: Vliv CNH na relativní zastoupení celkové PKC δ (A), fosforylované PKC δ (B) a poměr P-PKC δ vs. celková PKC δ (C) v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci.

N – normoxie, CNH – kontinuální normobarická hypoxie, cyto – cytosol, homo – homogenát, part – partikulární frakce. Nanáška pro PKC δ : cytosol – 15 μ g, homogenát – 10 μ g, partikulární frakce – 5 μ g, nanáška pro P-PKC δ : cytosol – 50 μ g, homogenát – 40 μ g, partikulární frakce – 40 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie (p < 0,05).

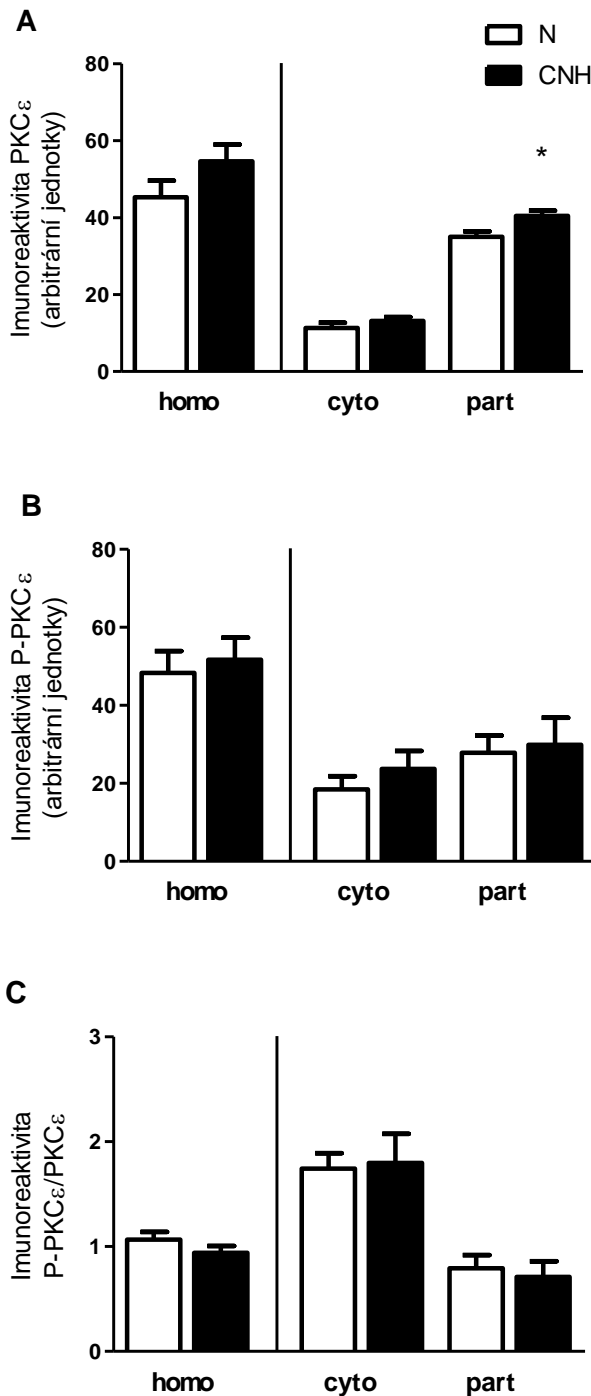


Obr. 13: Vliv CNH na expresi PKC δ mRNA v homogenátu.

N – normoxie, CNH – kontinuální normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Množství PKCδ mRNA je normalizováno na referenční gen hypoxantinguaninfosforibosyltransferasu 1 (HPRT1). Počet zvířat ve skupině – 7. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie (p < 0,05).

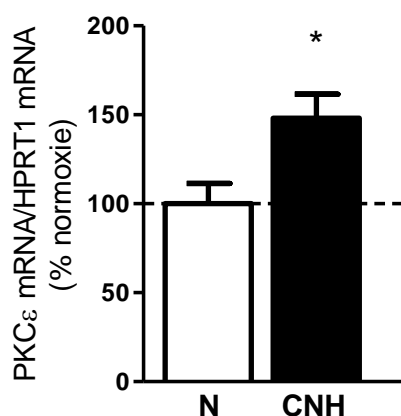
CNH zvyšuje PKC ϵ na úrovni proteinu i mRNA.

Adaptace na CNH zvýšila relativní zastoupení celkové PKC ϵ v partikulární frakci (o 16%) (obr. 14A), u fosforylované PKC ϵ nebo u poměru fosforylovaná vs. celková PKC ϵ nedošlo k žádným změnám (obr. 14B a 14C). Po adaptaci na CNH se zvýšila exprese PKC ϵ mRNA (o 48%, obr. 15).



Obr. 14: Vliv CNH na relativní zastoupení celkové PKC ϵ (A), fosforylované PKC ϵ (B) a poměr P-PKC ϵ vs. celková PKC ϵ (C) v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci.

N – normoxie, CNH – kontinuální normobarická hypoxie, cyto – cytosol, homo – homogenát, part – partikulární frakce. Nanáška pro PKC ϵ : cytosol – 15 μ g, homogenát – 10 μ g, partikulární frakce – 5 μ g, nanáška pro P-PKC ϵ : cytosol – 50 μ g, homogenát – 40 μ g, partikulární frakce – 40 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).



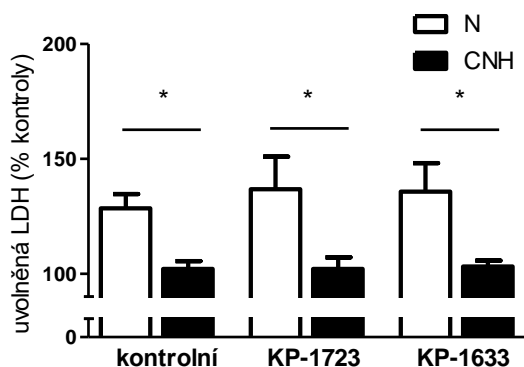
Obr. 15: Vliv CNH na expresi PKCε mRNA v homogenátu.

N – normoxie, CNH – kontinuální normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Množství PKCε mRNA je normalizováno na referenční gen hypoxantinguaninfosforibosyltransferasu 1 (HPRT1). Počet zvířat ve skupině – 7. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

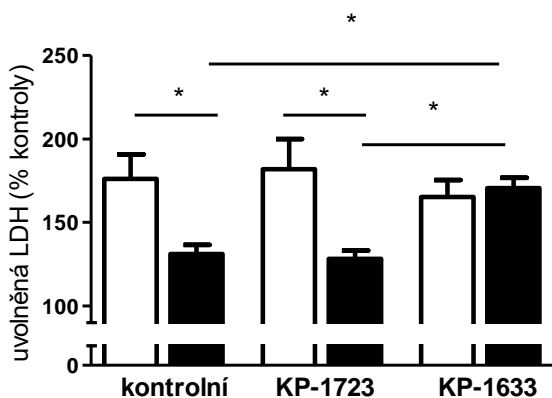
Inhibitor PKCε KP-1633 potlačuje kardioprotektivní účinky vyvolané CNH.

Podání specifického inhibitoru PKCε KP-1633 potlačilo pokles LDH uvolněné z kardiomyocytů během re-energizace po metabolické inhibici (obr. 16B) a pokles celkové LDH uvolněné během MI/R, pozorovaný po adaptaci na CNH oproti normoxickým kontrolám (obr. 16C). Kontrolní peptid KP-1723 neměl na uvolnění LDH žádný vliv (obr. 16A-C). Inhibitor PKCε KP-1633 zároveň zrušil nárůst viability buněk vystavených MI/R, vyvolaný CNH (obr. 17).

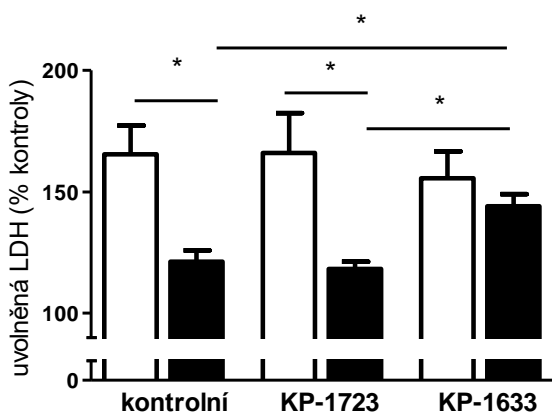
A LDH uvolněná během metabolické inhibice



B LDH uvolněná během re-energizace

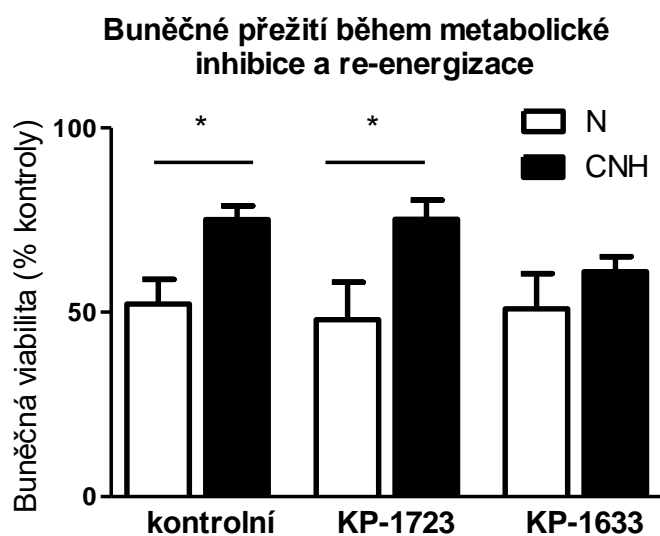


C celková uvolněná LDH



Obr. 16: Vliv CNH, kontrolního peptidu KP-1723 nebo inhibitoru PKC ϵ KP-1633 na uvolnění laktátdehydrogenasy (LDH) z kardiomyocytů během metabolické inhibice (MI) (A), re-energizace (R) (B) a celkové uvolnění během MI/R (C) vyjádřeno jako procento LDH uvolněné z kontrolních buněk izolovaných z levé komory nevystavené MI/R.

N – normoxie, CNH – kontinuální normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 10. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$), popř. KP-1633 vs. odpovídající kontrola.



Obr. 17: Vliv CNH, kontrolního peptidu KP-1723 nebo inhibitoru PKC ϵ KP-1633 na viabilitu kardiomyocytů po akutní metabolické inhibici/re-energizaci vyjádřeno jako procento kontrol.

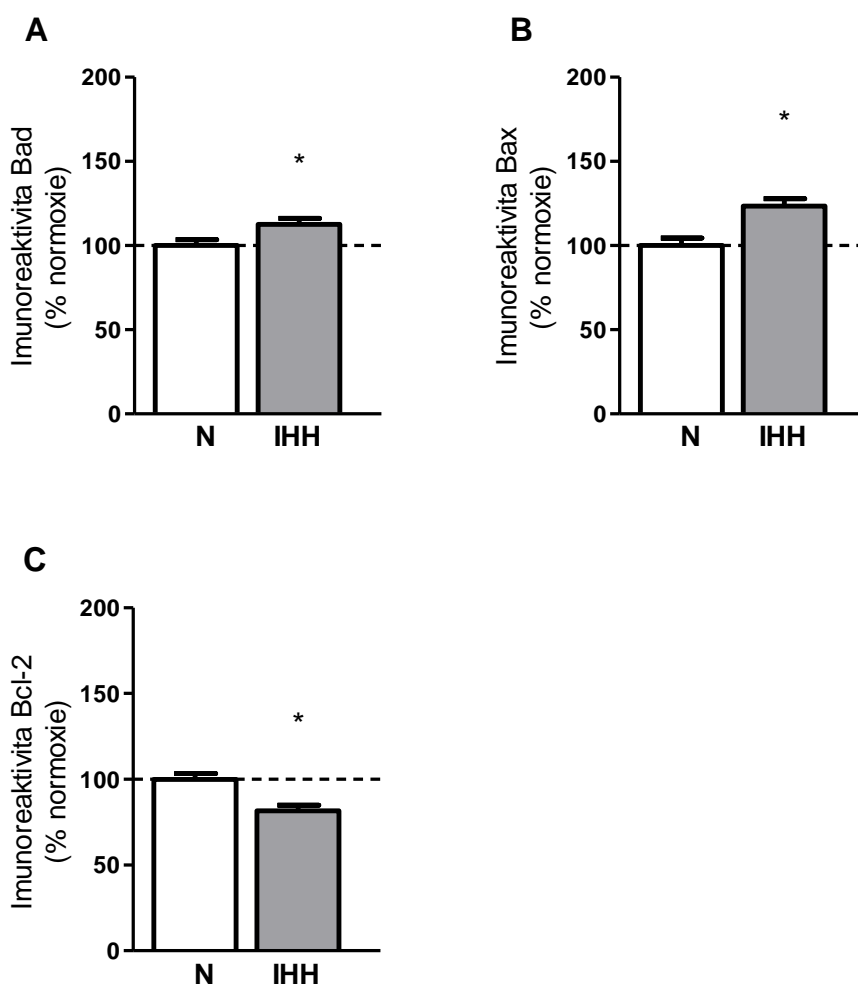
N – normoxie, CNH – kontinuální normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 10. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

4.2 CÍL 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH

4.2.1 Vliv IHH na apoptosu

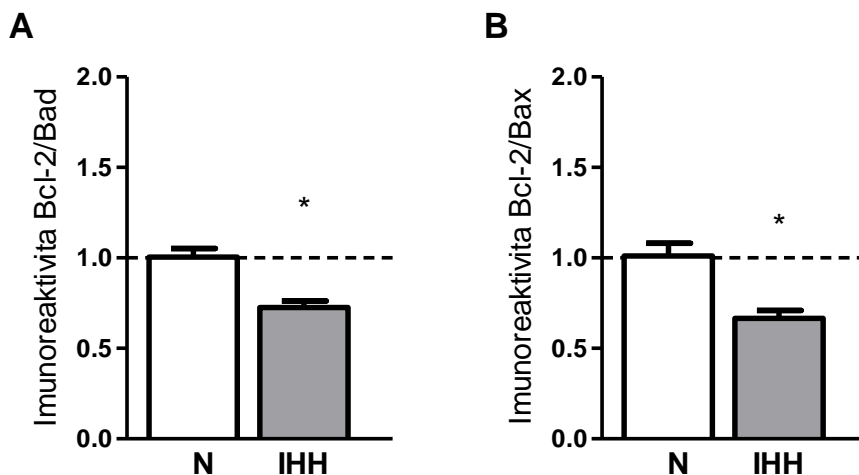
IHH aktivuje proapoptotické a deaktivuje antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2.

Adaptace na IHH zvýšila relativní zastoupení proapoptotických proteinů Bad (o 13%, obr. 18A) a Bax (o 23%, obr. 18B) a snížila relativní zastoupení antiapoptotického proteinu Bcl-2 (o 18%, obr. 18C). Zároveň došlo po adaptaci na IHH k poklesu poměru proteinů Bcl-2/Bad (o 28%, obr. 19A) a Bcl-2/Bax (34%, obr. 19B). Apoptosa je ovlivněna rovnováhou mezi pro- a antiapoptotickými faktory, proto se tyto poměry běžně využívají pro kvantifikaci apoptosy.



Obr. 18: Vliv IHH na relativní zastoupení Bad (A), Bax (B) a Bcl-2 (C) v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nanáška pro Bad – 40 μ g, Bax – 40 μ g a Bcl-2 – 10 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

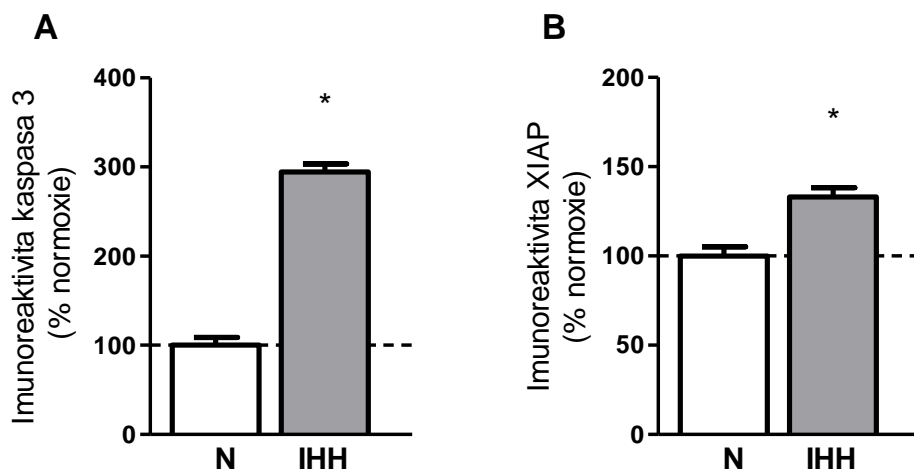


Obr. 19: Vliv IHH na poměr Bcl-2/Bad (A) a Bcl-2/Bax (B) v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

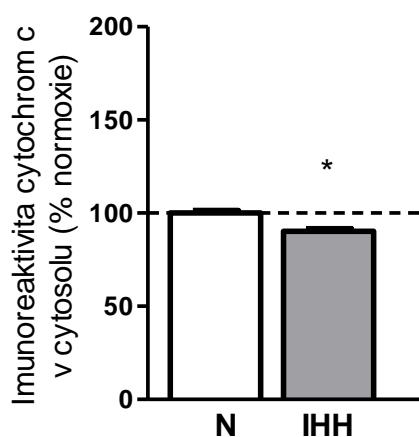
IHH aktivuje kaspasu 3, ale zároveň zvyšuje množství jejího inhibitoru XIAP a snižuje počet Tunel-pozitivních buněk v myokardu levé komory.

IHH zvýšila množství aktivní kaspasy 3 (o 194%, obr. 20A), ale zároveň i množství jejího inhibitoru XIAP (o 33%, obr. 20B). Došlo také ke sníženému uvolnění cytochromu *c* do cytosolu (o 10%, obr. 21). Analýza Tunel-pozitivních buněk ukázala, že adaptace na IHH snižuje počet těchto buněk v myokardu levé komory (obr. 22). V septu po hypoxii nedošlo k žádným změnám a v pravé komoře byla patrná tendence ke vzrůstu (obr. 22). Průměrné množství Tunel-pozitivních buněk bylo u kontrolních skupin 100 na cm^2 .



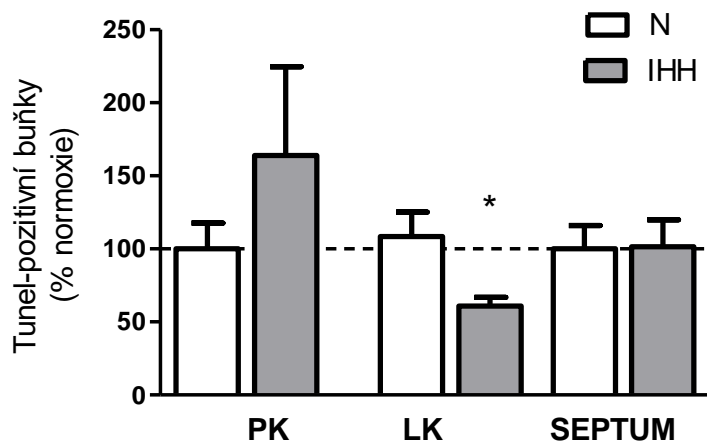
Obr. 20: Vliv IHH na relativní zastoupení kaspasy 3 (A) a jejího inhibitoru XIAP (B) v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nanáška pro kaspasu 3 – 40 μg a XIAP – 20 μg . Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).



Obr. 21: Vliv IHH na relativní zastoupení cytochromu c v cytosolu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nanáška pro cytochrom c – 3 μg . Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).



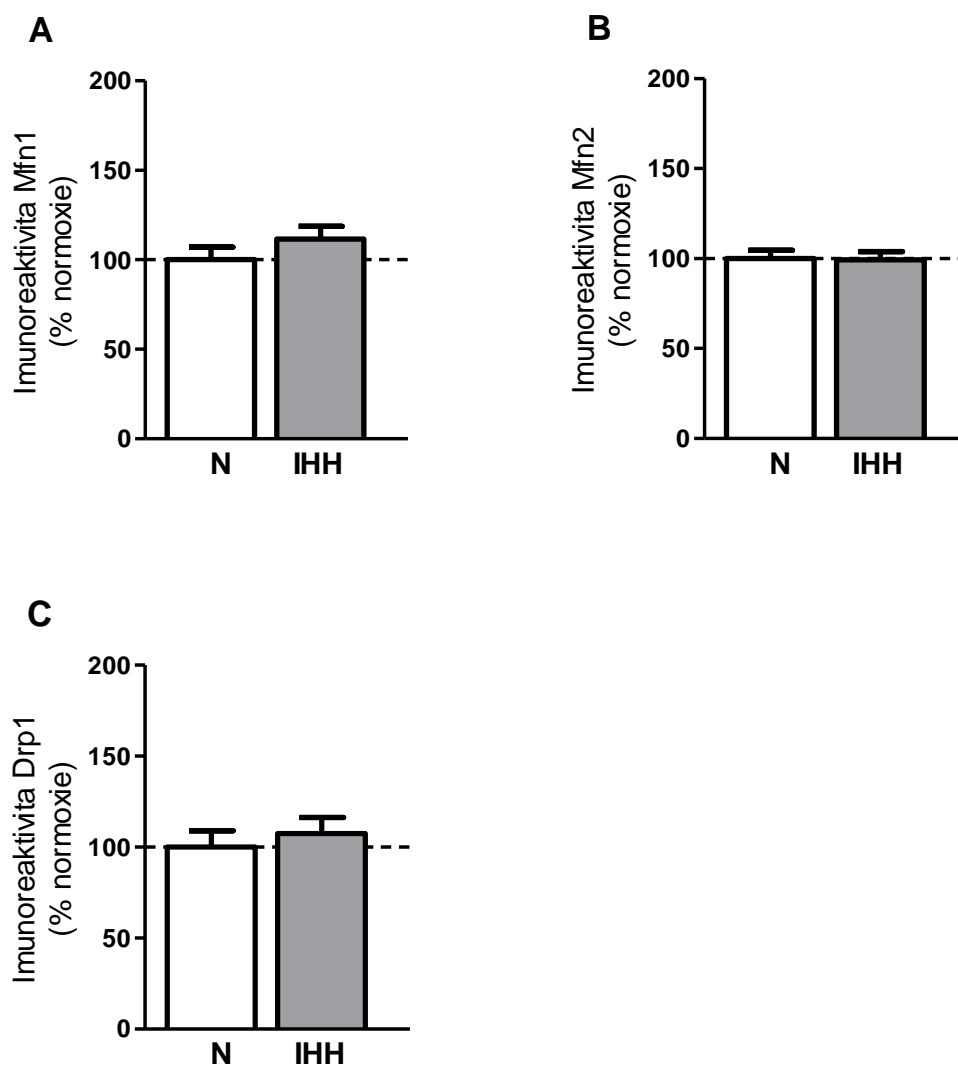
Obr. 22: Vliv IHH na počet Tunnel-pozitivních buněk vztažených na plochu v pravé komoře, levé komoře a septu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie, LK – levá komora, PK – pravá komora. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Počet zvířat ve skupině – 8. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

4.2.2 Vliv IHH na dynamiku mitochondrií

IHH neovlivňuje proteiny mitochondriální fúze a štěpení.

Adaptace IHH nevedla v porovnání s kontrolní skupinou k žádným změnám v relativním zastoupení proteinů mitochondriální fúze Mfn1 a Mfn2 (obr. 23A a 23B), ani proteinu mitochondriálního štěpení Drp1 (obr. 23C). Množství CS, běžně používané jako marker mitochondriální hmoty, se po IHH také nezměnilo (nepublikovaná data).



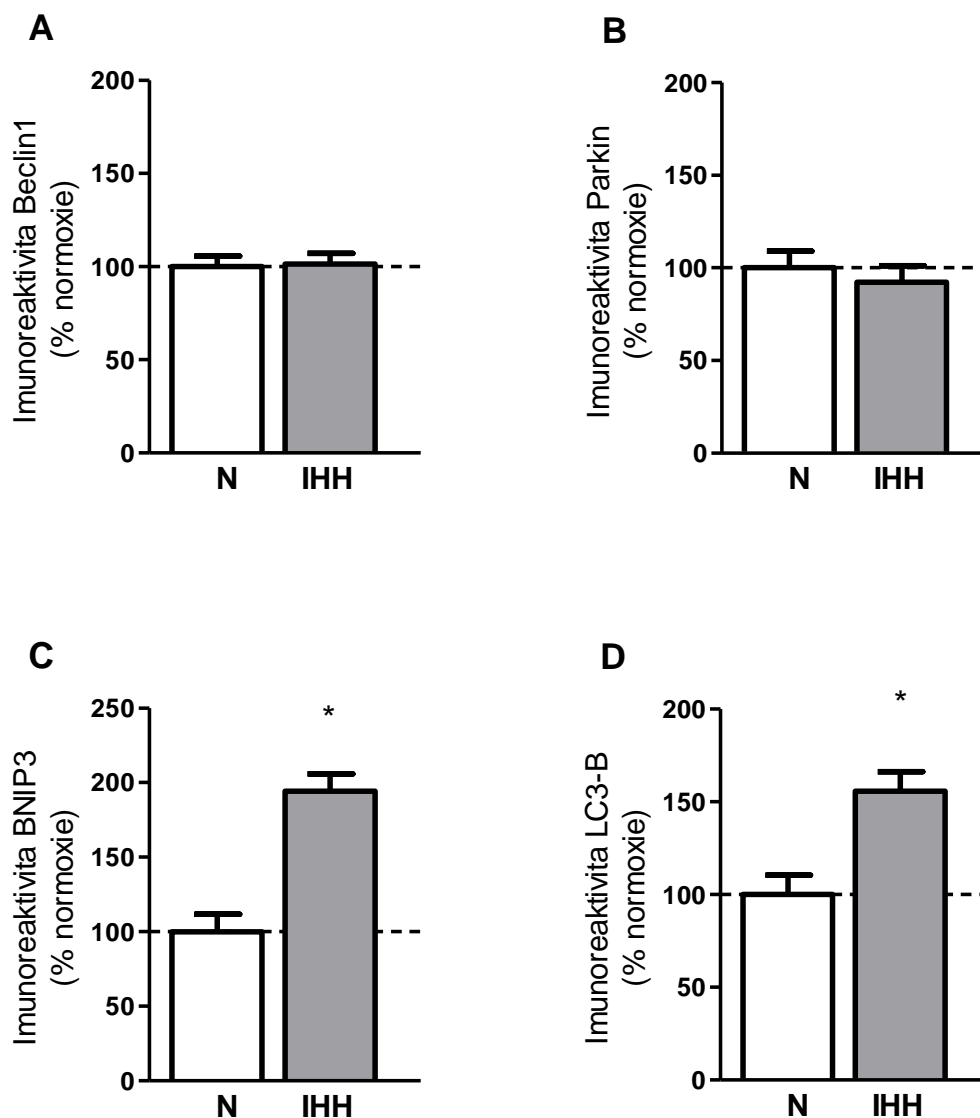
Obr. 23: Vliv IHH na relativní zastoupení Mfn1 (A), Mfn2 (B) a Drp1 (C) v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nanáška pro Mfn1 – 30 μ g, Mfn2 – 30 μ g a Drp1 – 20 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6.

4.2.3 Vliv IHH na autofagii

IHH aktivuje autofagické proteiny.

IHH neovlivnila množství Beclinu 1 a Parkinu (obr. 24A a 24B), ale zvýšila zastoupení BNIP3 (o 94%, obr. 24C) a LC3-B (o 56%, obr. 24D).



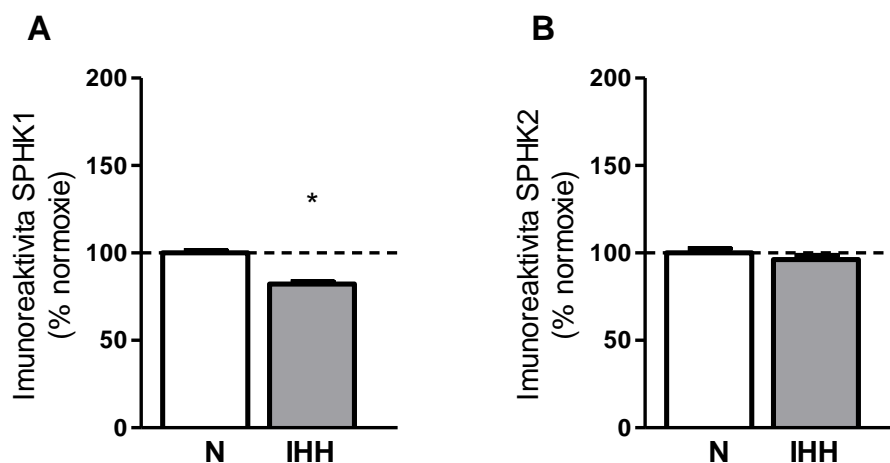
Obr. 24: Vliv IHH na relativní zastoupení Beclinu 1 (A), Parkinu (B), BNIP3 (C) a LC3-B (D) v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nanáška pro Beclin 1 – 30 μg , Parkin – 20 μg , BNIP3 – 20 μg a LC3-B – 40 μg . Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

4.2.4 Vliv IHH na další cílové proteiny PKC – SPHK1, SPHK2, ALDH2 a Cx43

IHH snižuje množství SPHK1.

Adaptace na IHH vedla ke snížení množství SPHK1 v homogenátu (o 18%, obr. 25A) a neměla vliv na množství SPHK2 (obr. 25B).

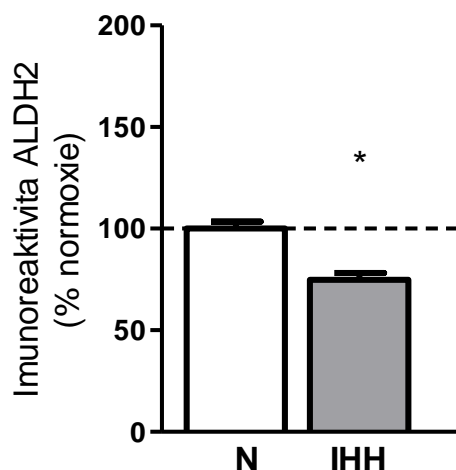


Obr. 25: Vliv IHH na relativní zastoupení SPHK1 (A) a SPHK2 (B) v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nanáška pro SPHK1 – 20 μ g a SPHK2 – 20 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

IHH snižuje množství ALDH2.

Adaptace na IHH vedla k poklesu ALDH2 o 25% (obr. 26).

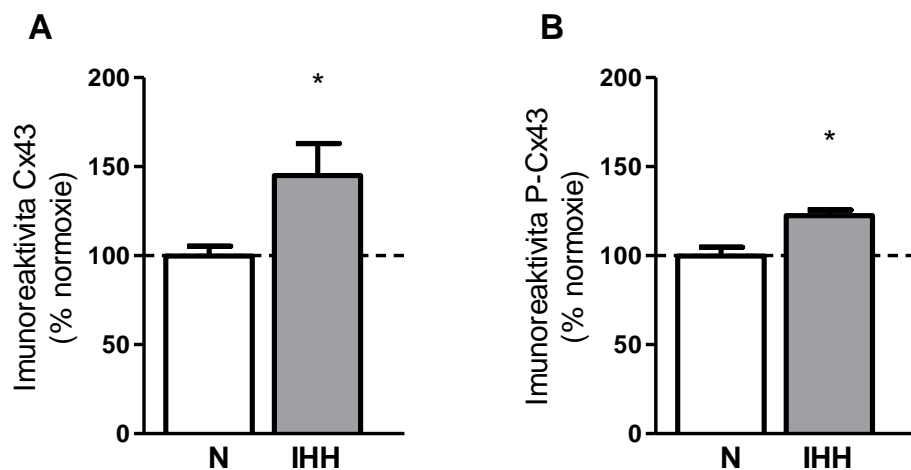


Obr. 26: Vliv IHH na relativní zastoupení ALDH2 v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nanáška pro ALDH2 – 15 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

IHH zvyšuje celkový i fosforylovaný Cx43.

IHH zvýšila množství celkového Cx43 (o 45%, obr. 27A) a fosforylovaného Cx43 (Ser368) (o 22%, obr. 27B) v homogenátu.



Obr. 27: Vliv IHH na relativní zastoupení celkového (A) a fosforylovaného Cx43 (B) v homogenátu.

N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie. Nanáška pro Cx43 – 20 μ g a P-Cx43 – 40 μ g. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Počet zvířat ve skupině – 6. * – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

5 DISKUZE

5.1 CÍL 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)

5.1.1 Vliv IHH na PKC δ , PKC ϵ a PKC α

IHH aktivuje celkovou i fosforylovanou PKC δ

Adaptace na IHH zvýšila množství celkové i fosforylované PKC δ (Ser643) v homogenátu, cytosolu i partikulární frakci. U exprese PKC δ mRNA byl po hypoxii patrný trend nárůstu, který však z důvodu vyšší odchylky nedosáhl statistické významnosti. Nárůst celkové PKC δ je v souladu s našimi předchozími studiemi, kde jsme ukázali, že IHH zvyšuje expresi PKC δ v jednotlivých buněčných frakcích (nukleárně-cytoskeletární, mitochondriální a mikrosomální) (Neckář 2005), i v celkové partikulární frakci a v homogenátu (Kolář 2007). Zvýšenou expresi PKC δ v partikulární frakci pozorovali i Ding a spol. na podobném modelu intermitentní hypoxie (5000 m, 6 hod/den) (Ding 2004). Zároveň bylo zjištěno, že množství PKC δ v partikulární frakci negativně koreluje s velikostí infarktu myokardu (Hlaváčková 2007). Nově jsme ukázali, že roste i fosforylace PKC δ na Ser643 a pomocí imunofluorescenční analýzy zjistili, že IHH vede k translokaci PKC δ na mitochondriální a sarkolemální membrány (Hlaváčková 2010, příloha B), což je považováno za znaky aktivace enzymu.

Zapojení PKC δ v mechanismu kardioprotekce bylo zkoumáno pomocí inhibitoru PKC δ rottlerinu. Již dříve jsme zjistili, že rottlerin částečně ruší sníženou velikost infarktu myokardu pozorovanou po adaptaci na IHH (Neckář 2005). Současná studie ukázala, že rottlerin potlačil i translokaci PKC δ na sarkolemální a mitochondriální membrány (Hlaváčková 2010, příloha B). Zároveň bylo zjištěno, že po adaptaci na IHH dochází ke zvýšené tvorbě nitrotyrosinu (Hlaváčková 2010, příloha B). To je v souladu s našimi předchozími studiemi, které ukázaly, že adaptace na IHH vede ke zvýšené tvorbě ROS (Kolář 2007). Podání antioxidantu N-acetylcysteinu zrušilo nárůst PKC δ v homogenátu a partikulární frakci a zároveň i kardioprotektivní účinky hypoxie (Kolář 2007). Je známo, že PKC δ podléhá redoxní regulaci (Konishi 2001); zdá se tedy, že exprese PKC δ je stejně jako kardioprotekce závislá na určité hladině oxidačního stresu (Kolář 2007).

Výsledky analýz ukazují, že pro kardioprotekci vyvolanou IHH má PKC δ klíčovou roli. Zapojení PKC δ potvrdily i některé studie na ischemickém (Mayr 2004) či farmakologickém preconditioningu (Fryer 2001). Přesto je úloha PKC δ v kardioprotekci kontroverzní: některé studie ukazují její pozitivní, jiné negativní vliv na IR poškození. Podstatnou roli ve výsledném účinku hraje pravděpodobně načasování aktivace enzymu. Bylo zjištěno, že aktivace PKC δ během reperfúze aktivuje apoptosu (Murriel 2004) a je škodlivá (Inagaki 2003), zatímco aktivace PKC δ před ischemií vede k protekci (Inagaki 2005).

Mechanismů, pomocí kterých by PKC δ mohla přispívat ke kardioprotekci, je celá řada. PKC δ je zapojena v regulaci energetického metabolismu. Ovlivňuje např. funkci pyruvátdehydrogenasy (Acin-Perez 2010), F₁F₀ATPasy (Nguyen 2008) a uplatňuje se během přepnutí z aerobního na anaerobní metabolismus, pozorovaného po adaptaci na hypoxii (Bass 1989). Má vliv také na činnost Na⁺/Ca²⁺ výměníku (Bouwman 2006). Dalším důležitým cílem PKC δ jsou proteiny spojené s autofagií a apoptosou, na které jsme se v této práci soustředili. Zapojení PKC δ do regulace apoptosy a autofagie v souvislosti s kardioprotekcí je blíže popsáno v samostatných kapitolách (viz dále).

IHH snižuje množství celkové PKC ϵ , zvyšuje ale zastoupení fosforylované (aktivní) vůči celkové PKC ϵ .

Adaptace na IHH snížila množství PKC ϵ v homogenátu a partikulární frakci, což je v souladu s naší předchozí studií (Kolář 2007), a neovlivnila množství PKC ϵ mRNA. Pokles PKC ϵ pozorovali i Li a spol. u dospělých potomků samic potkanů, které byly během březosti vystaveny hypoxii (10,5% O₂, 15. až 21. den gestace) (Li 2004a). Nově jsme ukázali, že IHH neovlivnila množství fosforylované PKC ϵ (Ser729). Došlo však k nárůstu poměru fosforylová vs. celková PKC ϵ v homogenátu a cytosolu. V partikulární frakci byla patrná tendence k nárůstu, která však z důvodu vyšší odchylky nedosáhla statistické významnosti. Zdá se tedy, že po adaptaci na IHH je v srdci zvýšené zastoupení fosforylované, tedy aktivní PKC ϵ . Nárůst fosforylace PKC ϵ pozorovali i Raffie a spol. u neonatálních králíků po adaptaci na CNH (10% O₂, 10 dnů) (Raffie 2002). V souladu s našimi výsledky je i studie Wang a spol., kde byl po adaptaci na IHH (PO₂=11,2 kPa, 4 hod/den, 4 týdny) zjištěn zvýšený poměr fosforylované vs. celkové PKC ϵ (Wang 2011).

Úlohu PKC ϵ ve zvýšené odolnosti vůči IR poškození vyvolané IHH jsme zkoumali také na izolovaných kardiomyocytech pomocí inhibitoru KP-1633 specifického pro PKC ϵ .

Inhibitor KP-1633 poskytla firma KAI Pharmaceuticals Inc. Získané výsledky ukázaly, že podání KP-1633 neovlivnilo kardioprotektivní účinek hypoxie na izolovaných kardiomyocytech, pozorovaný jako nárůst viability (Hlaváčková nepublikovaná data).

Přestože byla potvrzena úloha PKC ϵ v kardioprotekci vyvolané různými formami preconditioningu (Budás 2007), výsledky našich dřívějších studií (Hlaváčková 2007, Kolář 2007), stejně tak jako současných, naznačují, že v mechanismu kardioprotekce vyvolané adaptací na IHH nehraje PKC ϵ klíčovou roli.

IHH aktivuje celkovou i fosforylovanou PKC α .

Adaptace na IHH zvýšila množství celkové i fosforylované PKC α , neovlivnila však množství PKC α mRNA. Aktivaci PKC α pozorovala na jednotlivých buněčných frakcích po IHH také Lacinová (Lacinová 2002). Přestože jsou v souvislosti se signálními drahami kardioprotekce nejčastěji zmiňovány isoformy δ a ϵ , své uplatnění by zde mohla mít i isoforma α . PKC α hraje roli v rozvoji hypertrofie (Braz 2002), ale také fosforyluje řadu proteinů potenciálně zapojených v signálních drahách vedoucích k protekci. Jedním z nich je cytosolická PLA2 α , jejíž fosforylace má aktivační charakter (Li 2007). Bylo zjištěno, že stimulace signální dráhy cytosolická PLA2 α /COX2/prostaglandin E2 by mohla přispívat ke kardioprotekci vyvolané IHH (Míčová nepublikovaná data, příloha C). Dalším z cílů PKC α je např. antiapoptotický protein Bcl-2. PKC α zprostředkovává jeho fosforylaci na Ser70 (Ruvolo 1998), což vede k jeho stabilizaci a aktivaci antiapoptotické funkce (Deng 1998).

5.1.2 Vliv CNH na PKC δ a PKC ϵ

CNH snižuje celkovou i fosforylovanou PKC δ a zároveň zvyšuje expresi PKC δ mRNA.

Adaptace na CNH snížila množství celkové PKC δ v partikulární frakci a také množství fosforylované PKC δ v homogenátu a partikulární frakci, což naznačuje deaktivaci enzymu. Na druhou stranu však došlo k nárůstu exprese PKC δ mRNA. Zdá se proto, že za podmínek CNH se zvyšuje turnover/degradace PKC δ . Bylo zjištěno, že v nepřítomnosti chronické stimulace mají isoformy PKC relativně krátký poločas života. Během prodloužené aktivace však dochází k defosforylaci, ubiquitylaci a degradaci PKC navázané na membrány (Newton 2010). Pokles proteinového množství PKC δ v této studii

by tak mohl znamenat rychlejší degradaci enzymu poté, co vykonal svou funkci. Zapojení PKC δ v signálních drahách kardioprotekce vyvolané CNH proto nelze zcela vyloučit.

Pozorované změny proteinového množství PKC δ mají zcela opačný trend než v případě IHH, kde je aktivace PKC δ pro kardioprotekci klíčová (Neckář 2005). Přestože zapojení PKC δ potvrdily i některé studie na ischemickém (Mayr 2004) či farmakologickém preconditioningu (Fryer 2001), řada publikací spojuje aktivaci PKC δ spíše s negativním působením na IR, a to většinou v souvislosti s nadměrnou produkcí ROS a aktivací apoptotické buněčné smrti (Murriel 2004, Sivaraman 2009).

CNH aktivuje PKC ϵ na úrovni proteinu a mRNA. Specifický inhibitor PKC ϵ KP-1633 potlačuje kardioprotektivní účinek CNH.

Adaptace na CNH zvýšila množství PKC ϵ v partikulární frakci a expresi PKC ϵ mRNA v homogenátu. Aplikace specifického inhibičního peptidu pro PKC ϵ KP-1633, který brání asociaci PKC ϵ se svým kotvicím proteinem RACK2 (Mackay 2001, Mochly-Rosen 1995, Souroujon 1998) ukázala, že KP-1633 zcela ruší zvýšenou viabilitu kardiomyocytů a pokles uvolnění LDH během re-energizace, pozorovaný po adaptaci na CNH. Získané výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi, které poukazují na zapojení PKC ϵ do kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií. Wang a spol. adaptovali potkany na IHH ($PO_2=11,2$ kPa, 4 hod/den, 4 týdny) a zjistili, že podání inhibitoru ϵ V1-2 specifického pro PKC ϵ ruší translokaci PKC ϵ z cytosolu do partikulární frakce a také zlepšení obnovy srdeční kontraktility pozorované u adaptovaných zvířat (Wang 2011). Podání obecného inhibitoru PKC chelerytrinu potlačilo aktivaci PKC ϵ a zrušilo snížení velikosti infarktu myokardu pozorované u mláďat králíků po adaptaci na CNH (10% O_2 , 10 dnů) (Rafiee 2002). Xue a spol. adaptovali březí potkany na kontinuální hypoxii (10,5% O_2) a zjistili, že je u jejich potomků v dospělosti snižená hladina PKC ϵ a její fosforylované formy a že dochází ke zvětšení velikosti infarktu myokardu a zhoršení postischemické srdeční kontraktility (Xue 2009).

Byla navržena řada mechanismů, kterými by aktivace PKC ϵ mohla vést ke zvýšené odolnosti myokardu k IR poškození. Cílem PKC ϵ je např. protein Bcl-2 zapojený v regulaci apoptosy a autofagie (Baines 2002). PKC ϵ ovlivňuje také funkci Cx43, který je základní složkou gap junctions, a tudíž i buněčnou komunikaci (Lampe 2000). Dalším cílem PKC ϵ je ALDH2 spojená s metabolismem toxických aldehydů (Chen 2008a). PKC ϵ ovlivňuje

činnost pyruvátdehydrogenasy zahrnuté v udržování energetické homeostázy (Gong 2012) nebo kinasy glykogensyntázy 3β , jejíž fosforylace vede ke sníženému otevření MPTP a vyšší odolnosti vůči IR poškození (Juhászova 2004, 2009) a jejíž zapojení v kardioprotekci vyvolané chronickou hypoxií ($PO_2=11,2$ kPa, 4 h/den, 4 týdny) popsali Wang a spol. (Wang 2011).

Pozorovaný nárůst množství $PKC\epsilon$ v partikulární frakci společně se zrušením protektivního účinku CNH na kardiomyocyty po aplikaci specifického inhibitoru $PKC\epsilon$ KP-1633 podporují představu, že se $PKC\epsilon$ uplatňuje v signálních drahách vedoucích ke zvýšené odolnosti myokardu vůči IR poškození.

Přestože adaptace na CNH stejně jako na IHH snižuje velikost infarktu (Neckář 2013), snižuje uvolnění LDH a zvyšuje viabilitu kardiomyocytů vystavených simulované IR (Borchert 2011, Neckář 2013), účinky obou modelů na expresi PKC jsou protichůdné. V kardiomyocytech však byla opakovaně popsána vzájemná regulace mezi $PKC\delta$ a $PKC\epsilon$ (Mayr 2009, Rybin 2003, 2007), takže snížená funkce jedné isoformy se může kompenzovat zvýšenou funkcí druhé.

Výsledky získané na modelech IHH a CNH podporují představu, že $PKC\delta$ či $PKC\epsilon$ (popř. obě) jsou důležitými hráči v mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií. Dalším cílem mé práce proto bylo stanovit cílové proteiny těchto isoform, a to v souvislosti s apoptosou a autofagií, dynamikou mitochondrií, metabolismem sfingolipidů, odstraňováním toxických aldehydů a komunikací přes gap junctions.

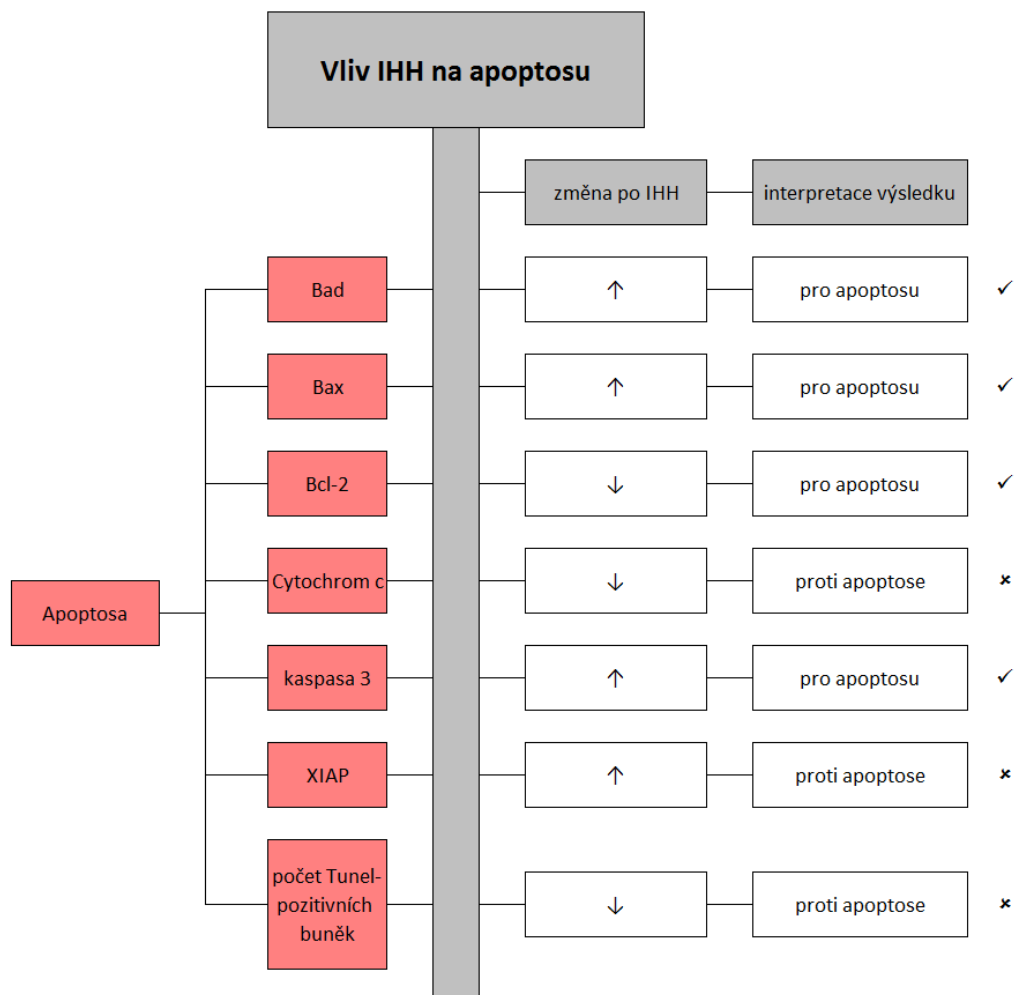
5.2 CÍL 2: Analýza cílových proteinů $PKC\delta$ a $PKC\epsilon$ po adaptaci na IHH

5.2.1 Vliv IHH na apoptosu

IHH aktivuje proapoptotické a deaktivuje antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2. Zároveň dochází ke zvýšení množství kaspasy 3, ale i jejího inhibitoru XIAP. Počet Tunel-pozitivních buněk v myokardu levé komory se po adaptaci na IHH snižuje.

Apoptosa představuje klíčový mechanismus ovlivnění osudu buněk a její nedostatek, ale i nadměrná aktivace, škodí. Apoptosa je definovaná jako typ buněčné smrti, a tudíž je vnímána převážně v negativním slova smyslu, může však představovat i způsob, jakým organismus odstraňuje poškozené buňky. V regulaci apoptosy se významně uplatňují proteiny rodiny Bcl-2, které jsou fosforylovány pomocí PKC, čímž je ovlivněna jejich

funkce. PKC však reguluje funkci i ostatních proteinů zapojených v apoptose, jako je kaspasa 3 či cytochrom *c*. Jedním z cílů mé práce proto bylo stanovit míru apoptosy po adaptaci na IHH. Získané výsledky jsou shrnuty na obr. 28.



Obr. 28: Vliv IHH na proteiny spojené s apoptosou.

Pomocí metody Western blot jsme analyzovali proteiny rodiny Bcl-2 (Bad, Bax a Bcl-2). Ukázalo se, že hypoxie zvyšuje množství proapoptotických proteinů Bad a Bax a zároveň snižuje množství antiapoptotického proteinu Bcl-2. Významně klesly i poměry Bcl-2/Bad a Bcl-2/Bax, které se běžně používají ke kvantifikaci apoptosy, protože její aktivace/deaktivace je závislá na rovnováze mezi pro- a antiapoptotickými členy rodiny Bcl-2. Nárůst Bad a pokles Bcl-2 po hypoxii (12% O₂, 2 týdny) pozorovali i Lee a spol. (Lee 2006). Stejně tak Aliparasti a spol. zaznamenali na podobném modelu hypoxie (11%

O₂, 2 týdny) zvýšení poměru Bax/Bcl-2 (Aliparasti 2015). Získané výsledky naznačují, že dochází k aktivaci apoptosy. Na druhou stranu je třeba brát v úvahu, že samotné změny v množství proteinů rodiny Bcl-2 nemusí dostatečně vypovídat o jejich aktivitě, která je regulována např. fosforylací či buněčnou lokalizací (Elmore 2007). Fosforylaci proteinů rodiny Bcl-2 jsme se pokusili stanovit, ale z důvodu nedostupnosti specifických primárních protilátek se analýza nezdařila.

Pro stanovení úrovně apoptosy se standardně používá kombinace alespoň dvou metod, ideálně biochemické s mikroskopickou. Dalším cílem mé práce proto byla analýza množství apoptotických buněk metodou Tunel. Výsledky ukázaly, že po adaptaci na IHH se v myokardu levé komory snižuje množství apoptotických buněk. Snížení apoptosy měřeno počtem Tunel-positivních buněk po hypoxii (5000 m, 6 hod/den, 42 dnů) pozorovali i Dong a spol. (Dong 2003). Na rozdíl od levé komory jsme v pravé komoře zaznamenali trend nárůstu počtu apoptotických buněk, což je v souladu s pozorováním, že za podmínek IHH dochází k hypertrofii myokardu pravé komory (Kolář 1989). V septu, které je z morfologického hlediska na rozhraní mezi pravou a levou komorou, se počet apoptotických buněk nezměnil.

Protichůdné výsledky mezi analýzou proteinů Bcl-2 a metodou Tunel jsou v rozporu s ostatními studii (Dong 2003, Lee 2006). Nebyly ovšem provedeny na totožném modelu hypoxie, takže výsledky nejsou zcela srovnatelné. Za účelem objasnění vlivu IHH na apoptosu jsme se proto rozhodli stanovit další markery apoptosy – uvolnění cytochromu *c* do cytosolu, aktivní kaspasy 3 a její inhibitor XIAP. Ukázalo se, že po IHH dochází ke sníženému uvolnění cytochromu *c* do cytosolu, což je znakem snížené apoptosy. Analýza aktivní kaspasy 3 byla problematická z důvodu nedostatku specifických primárních protilátek určených pro potkana. Vyzkoušeli jsme dvě polyklonální protilátky, které však byly silně nespecifické a ukazovaly množství proužků. Vzhledem k absenci fungující pozitivní kontroly či inhibičního peptidu jsme jednotlivé proužky analyzovali metodou HPLC-MS, ukázalo se však, že kaspase 3 neodpovídá žádný z nich. Nakonec jsme se přiklonili k použití monoklonální protilátky, která sice také nebyla zcela specifická, nicméně v molekulové hmotnosti odpovídající aktivní kaspase 3 byl pouze jeden proužek, který vykazoval po IHH stejný trend jako ostatní proužky, které by mohly odpovídat různým štěpům kaspasy 3.

Zjistili jsme, že po adaptaci na IHH roste množství aktivní kaspasy 3, která je považována za nejdůležitější exekuční kaspasu. Bylo publikováno, že PKC δ (která po IHH

taktéž roste) kaspasu 3 aktivuje (Voss 2005). Zároveň se však ukázalo, že po IHH dochází i k nárůstu inhibitoru aktivní kaspasy 3 XIAP. Yuan a spol. ukázali, že nárůst exprese XIAP vedoucí ke snížení aktivity kaspasy 3 je zprostředkován ERK (Yuan 2012), k jejíž aktivaci (zvýšené fosforylaci) dochází za podmínek IHH (Míčová nepublikovaná data, příloha C). Kašparová zároveň zjistila, že adaptace na IHH vede i k nárůstu exprese Birc2 mRNA (z angl. *baculoviral IAP repeat-containing protein 2*), genu kódujícího protein cIAP1, který je také inhibitorem kaspas (Kašparová nepublikovaná data).

Získané výsledky naznačují, že adaptace na IHH vede k aktivaci počáteční fáze apoptosy v myokardu levé komory na úrovni proteinů rodiny Bcl-2, v konečném důsledku však dochází ke sníženému uvolnění cytochromu *c* do cytosolu, deaktivaci kaspasy 3 a nižšímu počtu Tunel-pozitivních buněk, což je znakem deaktivace apoptosy. Snížení apoptosy je v souladu s kardioprotektivním působením IHH.

5.2.2 Vliv IHH na dynamiku mitochondrií

IHH neovlivňuje proteiny mitochondriální fúze a štěpení.

Ve své práci jsem v rámci analýzy cílových proteinů PKC stanovila hladinu proteinu Drp1 po adaptaci na IHH. Ukázalo se, že po hypoxii nedochází k žádným změnám v jeho proteinovém množství. Přesto nemůžeme vyloučit, že IHH dynamiku mitochondrií ovlivňuje a je třeba dalších podrobnějších analýz. Funkce Drp1 je posttranslačně regulována sumoylací, ubiquitinylací, S-nitrosylací a v neposlední řadě fosforylací (Ong 2010b). Právě fosforylace Drp1 by mohla být za podmínek IHH ovlivněna, protože Drp1 je jedním z cílových proteinů PKC δ . Bylo zjištěno, že oxidační stres vede v neuronech k jeho fosforylaci na Ser579 pomocí PKC δ , což vede k jeho translokaci na mitochondrie a aktivaci štěpení mitochondrií. Peptidový inhibitor PKC δ δ V1-1 naopak fragmentaci mitochondrií snižuje (Qi 2011). Fosforylaci Drp1 na Ser579 jsme se pokusili stanovit, ale byla neúspěšná z důvodu nedostatku fungujících protilátek proti tomuto fosforylačnímu místu.

Zároveň není možné vyloučit, že je Drp1 fosforylován i na jiných místech než je Ser579. Bylo zjištěno, že Drp1 může být fosforylován např. pomocí PKA na Ser656. Tato fosforylace však vede k deaktivaci mitochondriálního štěpení (Chang 2007).

Dynamika mitochondrií je ovlivněna rovnováhou mezi proteiny podporujícími buněčné štěpení i fúzi. Po adaptaci na IHH jsme proto stanovili i Mfn1 a Mfn2, které nejsou cílovými proteiny PKC, ale hrají důležitou roli v regulaci fúze mitochondrií. Zároveň bylo zjištěno, že Mfn2 je nezávisle na své funkci v mitochondriální fúzi zapojen v apoptotické

smrti neonatálních kardiomyocytů vyvolané oxidačním stresem (Shen 2007). Ukázalo se však, že adaptace na IHH neovlivňuje množství Mfn1, ani Mfn2.

Optimální rovnováha mezi mitochondriální fúzí a štěpením je nezbytná pro správnou funkci myokardu a její porušení může vést k buněčné smrti a snížené odolnosti vůči IR poškození. Bylo zjištěno, že inhibice mitochondriálního štěpení nebo naopak aktivace mitochondriální fúze vede u buněčné linie atriálních kardiomyocytů HL-1 k elongaci mitochondrií a nižší buněčné smrti po simulované IR (Ong 2010a). Fragmentované mitochondrie bývají naopak znakem aktivace apoptotické buněčné smrti (Ong 2010b). Studie Onga a spol. ukázala, že farmakologická inhibice proteinu mitochondriální fúze Drp1 chrání myší srdce před simulovaným IR poškozením díky inhibici otevírání MPTP a snížení velikosti infarktu myokardu (Ong 2010a). Zároveň bylo zjištěno, že zvýšená exprese dominantně negativní formy Drp1 Drp1K38A (inhibovaná GTPasová aktivita) chrání buňky před uvolněním cytochromu *c* a apoptotickou buněčnou smrtí (Frank 2001).

5.2.3 Vliv IHH na autofagii

IHH aktivuje autofagické proteiny.

Autofagie s apoptosou úzce souvisí a řada proteinů uplatňujících se v regulaci apoptosy má svou roli i v autofagii. Dalším cílem mé práce proto bylo stanovit po adaptaci na IHH proteiny zapojené v mechanismu autofagie. Získané výsledky jsou shrnuty na obr. 29.

Adaptace na IHH neovlivnila množství Beclinu 1. Klesl však protein Bcl-2, který se na Beclin 1 váže, a deaktivuje tak jeho proautofagickou funkci. Mohlo tak dojít ke snížení množství Beclinu 1 navázaného na Bcl-2, tj. ke zvýšení volného Beclinu 1 schopného aktivovat autofagii. Zároveň pravděpodobně dochází ke zvýšené disociaci komplexu Bcl-2/Beclin 1. IHH totiž aktivuje PKC δ , která přes JNK1 zprostředkovává fosforylaci Bcl-2 na Ser70 v komplexu Beclin 1/Bcl-2, která vede k jeho disociaci (Chen 2008b).

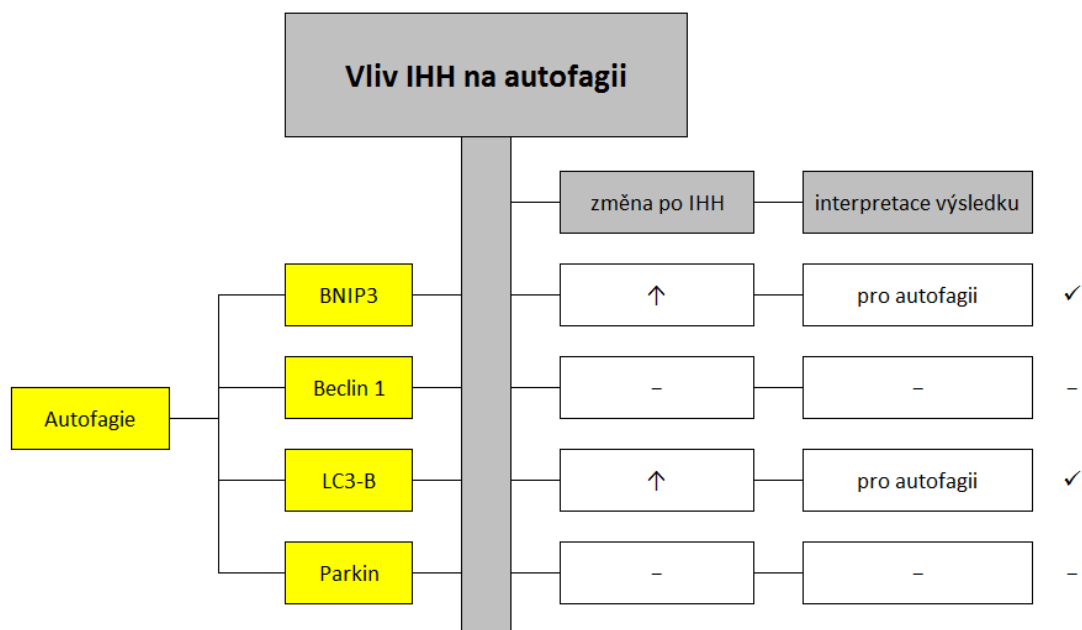
Ukázali jsme, že hypoxie zvyšuje množství proteinů BNIP3 a LC3-B. Bylo zjištěno, že zvýšená exprese BNIP3 vede k autofagii a že působí protektivně, protože snižuje produkci ROS (Zhang 2008). Zároveň také zabraňuje interakci mezi Bcl-2 a Beclinem-1, a aktivuje tak autofagii (Belot 2009). Nárůst BNIP3 po chronické hypoxii (12% O₂, 16hod/den, 4 a 8 týdnů) pozorovali i Lee a spol. (Lee 2007).

Adaptace na IHH vedla k nárůstu markeru autofagosomů LC3-B. Nárůst LC3-B po hypoxii na modelu spánkové apnoe pozorovali i Maeda a spol. (Maeda 2013).

IHH nevedla k změnám Parkinu, zapojeného do aktivace mitofagie, což je v souladu s naším pozorováním, že IHH neovlivňuje dynamiku mitochondrií.

Bylo zjištěno, že autofagie je podobně jako apoptosa aktivována různými buněčnými stresovými faktory jako jsou ROS (Scherz-Shouval 2007) či zvýšená koncentrace Ca^{2+} v cytosolu (Hoyer-Hansen 2007). K její aktivaci tak dochází např. během IR nebo při srdečním selhání (Nishida 2009). Zdá se však, že aktivace autofagie v těchto případech nemusí nutně znamenat odsouzení k buněčné smrti, ale že by se mohlo jednat o mechanismus vedoucí k opravě kardiomyocytů. Kontrolovaná degradace buněčných komponent představuje důležitý zdroj ATP (Matsui 2008), jehož hladina za podmínek snížené dostupnosti kyslíku rychle klesá. Zároveň jsou pomocí autofagie selektivně odstraněny poškozené mitochondrie (Kim 2007), čímž se zabrání uvolnění proapoptotických faktorů jako je cytochrom *c* (Hamacher-Brady 2007). Bylo zjištěno, že podání inhibitoru autofagie Tat-Atg5 (K130R) vede k vymizení kardioprotekce (Huang 2010).

Získané výsledky naznačují, že za podmínek IHH dochází k aktivaci autofagie, která by mohla představovat jeden z mechanismů zvýšené tolerance hypoxických srdcí vůči IR poškození.



Obr. 29: Vliv IHH na proteiny spojené s autofagií.

5.2.4 Vliv IHH na další cílové proteiny PKC – SPHK1, SPHK2, ALDH2 a Cx43

5.2.4.1 Vliv IHH na SPHK1, SPHK2

IHH snižuje množství SPHK1.

Adaptace na IHH snížila množství SPHK1 a neovlivnila množství SPHK2. SPHK jsou enzymy zodpovědné za tvorbu S1P. Bylo zjištěno, že poměr S1P a ceramidu ovlivňuje buněčné přežití a jeho zvýšení působí proti apoptose (Cuvillier 1996). Jin a spol. ukázali, že ischemický preconditioning zvyšuje tvorbu S1P a že inhibitor SPHK ruší kardioprotekci vyvolanou ischemickým preconditioningem (Jin 2004).

SPHK1 je obecně vnímána jako protektivní. Bylo zjištěno, že její aktivace zvyšuje obsah S1P a následně buněčnou viabilitu díky aktivaci dráhy buněčného přežití PI3K/Akt, zvýšené expresi Bcl-2, sníženému uvolnění cytochromu *c* a deaktivaci kaspas (Taha 2006). Deaktivace SPHK1 zvýšila syntézu ceramidu a vedla k apoptose (Taha 2006). Námi pozorovaný pokles SPHK1 je v rozporu s těmito studiemi, na druhou stranu funkce SPHK1 mohla být vyvážena SPHK2.

SPHK2 byla až donedávna považována za proapoptotickou (Maceyka 2005). Tento pohled byl však vyvrácen studiemi na izolovaných myších srdcích s delecí genu pro SPHK2, kde se ukázalo, že SPHK2 je nezbytná pro vyvolání ischemického pre- i postconditioningu (Vessey 2011, 2013). Ke shodným výsledkům došli i Gomez a spol. (Gomez 2011). Zároveň bylo zjištěno, že genetická delece obou isoform SPHK vede ke smrti (Mizugishi 2005), zatímco myši postrádající pouze SPHK1 či SPHK2 nevykazují žádné známky narušeného vývoje (Allende 2004, Michaud 2006).

Přestože adaptace na IHH snížila množství SPHK1, neovlivnila množství SPHK2, a tudíž nedošlo k negativním projevům tohoto poklesu.

5.2.4.2 Vliv IHH na ALDH2

IHH snižuje množství ALDH2.

Adaptace na IHH vedla ke snížení množství ALDH2. Tento výsledek je v rozporu s představou o kardioprotektivním působení ALDH2. Bylo zjištěno, že ALDH2 odstraňuje 4-HNE, který se v buňkách hromadí během srdeční ischemie, a chrání tak srdce před IR poškozením. Podání inhibitoru ALDH2 cyanamidu vedlo ke zvýšení rozsahu infarktu myokardu (Chen 2008a). Zároveň se ukázalo, že ALDH2 metabolizuje nitroglycerin na účinný vazodilatátor NO (Chen 2008a) a uplatňuje se také v regulaci autofagie (Ma

2011). Zapojení ALDH2 v protekci naznačuje i negativní korelace nalezená mezi aktivitou ALDH2 a srdečním poškozením (Chen 2008a).

Naproti tomu se ukázalo, že koncentrace 4-HNE ovlivňuje aktivitu PKC, která je pro kardioprotekci klíčová. Zatímco nízká koncentrace (0,1 μM) 4-HNE deaktivovala PKC δ , vyšší koncentrace (1-10 μM) vedla k její aktivaci (Poli 2008). Zdá se proto, že určitá hladina aldehydů může fungovat jako druhý posel a může vyvolávat antioxidační obrannou odpověď aktivovanou stresem, podobně jako je tomu v případě ROS (Poli 2008). Zároveň bylo zjištěno, že ALDH2 je fosforylována pomocí PKC ϵ a že tato fosforylace vede k nárůstu katalytické aktivity ALDH2 (Chen 2008a, Churchill 2009). U zvířat s delecí PKC ϵ vedla přímá aktivace ALDH2 ke stejné míře ochrany před IR poškozením jako farmakologický preconditioning etanolem u kontrolních zvířat (Budás 2010). Pokles PKC ϵ a ALDH2 pozorovaný po IHH by mohl prostřednictvím 4-HNE hrát roli v aktivaci PKC δ , která je pro kardioprotekci u tohoto typu hypoxie nezbytná.

Na změny množství ALDH2 má také podstatný vliv konkrétní model chronické hypoxie. Bylo zjištěno, že adaptace na CNH, která působí stejně jako IHH kardioprotektivně, hladinu ALDH2 neovlivňuje (Chytilová 2015).

5.2.4.3 Vliv IHH na Cx43

IHH zvyšuje celkový i fosforylovaný Cx43.

Dalším z analyzovaných cílových proteinů PKC byl Cx43. Ukázalo se, že po adaptaci na IHH dochází k nárůstu jeho celkové i fosforylované formy (Ser368). Waza a spol. na modelu akutní hypoxie (1% O₂, 12 hod) ukázali zvýšenou fosforylací Cx43 na Ser262, která má na Cx43 obdobný vliv jako fosforylace na Ser368 (Waza 2014). Na ischemickém (Miura 2004, Srisakuldee 2009) a hypoxickém preconditioningu (Jeyaraman 2012) byl zjištěn pozitivní účinek fosforylace Cx43 na srdeční funkci. Byla popsána také pozitivní korelace mezi defosforylovaným Cx43 a poklesem srdeční funkce (Beardslee 2000).

Fosforylace na Ser368 (popř. Ser262) zprostředkovaná PKC ϵ vede ke snížené komunikaci přes gap junctions (Ek-Vitorin 2006, Lampe 2000). Přestože např. u infarktu myokardu zhoršuje snížená komunikace přes gap junctions vedení elektrických impulzů a zvyšuje tak riziko výskytu arytmií (Dhein 2006), za určitých podmínek působí protektivně. Uzavření gap junctions může bránit šíření škodlivých metabolitů (H₂O₂, superoxidový anion) a také přetížení Ca²⁺, ke kterým běžně dochází během IR. Sníží se tak

poškození okolních buněk, buňky jsou chráněny před tzv. polibkem smrti (Andrade-Rozental 2000). Za patofyziologických podmínek mohou naopak gap junctions šířit buněčné poškození na sousední dosud přežívající buňky (Garcia-Dorado 2004).

Cx43 zároveň funguje nezávisle na své roli v buněčné komunikaci jako podstatná složka signálních drah kardioprotekce. Bylo zjištěno, že kardioprotektivní účinek ischemického preconditioningu je potlačen na izolovaných kardiomyocytech myši s delecí genu pro Cx43 (Li 2004b, Rodriguez-Sinovas 2010). Ukázalo se, že u ischemického preconditioningu dochází k translokaci Cx43 na mitochondrie (Boengler 2005), kde se nacházejí cílové proteiny Cx43 uplatňující se v kardioprotekci. Jedním z nich jsou patrně mitoK_{ATP} kanály (Rottlaender 2010). Waza a spol. ukázali, že Cx43 fosforylovaný pomocí PKC ϵ interaguje s podjednotkou Kir6.1 K_{ATP} kanálů a že tato interakce snižuje buněčnou smrt (Waza 2014). Signální dráha PKC ϵ -Cx43- Kir6.1 K_{ATP} kanály by tak mohla představovat mechanismus, kterým hypoxie vede ke zvýšené odolnosti srdcí vůči IR poškození. Zároveň bylo zjištěno, že mitochondriální Cx43 ovlivňuje buněčné dýchání (Ruiz-Meana 2008) a také tvorbu ROS, jejichž určitá hladina je pro kardioprotekci nezbytná (Heinzel 2005).

6 ZÁVĚR

Cíl 1: Analýza isoform PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou (IHH) a kontinuální normobarickou hypoxii (CNH)

Analýza isoform PKC po adaptaci na dva různé modely chronické hypoxie potvrdila, že konkrétní model hypoxie má na změny v množství PKC podstatný vliv. Ukázalo se, že adaptace na IHH vede k nárůstu celkové i fosforylované PKC δ a PKC α a k poklesu PKC ϵ . IHH představuje výrazně větší zátěž než CNH a je spojena s mechanismy poslední záchrany a aktivací PKC δ . Získané výsledky potvrdily naše dřívější studie poukazující na význam PKC δ v kardioprotekci vyvolané IHH.

Adaptace na mírnější model CNH vedla naopak k nárůstu PKC ϵ v partikulární frakci a nárůstu PKC ϵ mRNA. Podání inhibičního peptidu PKC ϵ KP-1633 zrušilo kardioprotekci a potvrdilo tak hypotézu, že PKC ϵ hraje u tohoto modelu hypoxie klíčovou roli.

Cíl 2: Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH

Analýza cílových proteinů PKC δ a PKC ϵ po adaptaci na IHH ukázala, že se zvyšují proapoptotické a snižují antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2, ale zároveň se snižuje počet apoptotických buněk v myokardu levé komory. Snížená apoptosa je v souladu s kardioprotektivním působením IHH. Zároveň jsme zjistili, že dochází k aktivaci autofagie přes BNIP3 a LC3-B. Zvýšená autofagie by mohla přispívat ke kardioprotekci díky rychlejšímu odstraňování poškozených organel. Přestože byla v mechanismu ischemického preconditioningu popsána úloha řady cílových proteinů PKC spojených s metabolismem sfingolipidů, dynamikou mitochondrií či odstraňováním toxických aldehydů, zdá se, že v mechanismu kardioprotekce vyvolané adaptací na IHH se tyto proteiny neuplatňují.

Seznam použité literatury

- Acin-Perez R, Hoyos B, Gong J, Vinogradov V, Fischman DA, Leitges M, Borhan B, Starkov A, Manfredi G & Hammerling U. (2010). Regulation of intermediary metabolism by the PKCdelta signalosome in mitochondria. *FASEB J* **24**, 5033-5042.
- Aliparasti MR, Alipour MR, Almasi S & Feizi H. (2015). Ghrelin Administration Increases the Bax/Bcl-2 Gene Expression Ratio in the Heart of Chronic Hypoxic Rats. *Adv Pharm Bull* **5**, 195-199.
- Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, van Echten-Deckert G, Hajdu R, Rosenbach M, Keohane CA, Mandala S, Spiegel S & Proia RL. (2004). Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem* **279**, 52487-52492.
- Alánová P, Kolář F, Ošťádal B & Neckář J. (2015). Role of NO/cGMP signaling pathway in cardiac ischemic tolerance of chronically hypoxic rats. *Physiol Res* **64**, 783-787.
- Andrade-Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, Wu JK, Vrionis FD & Spray DC. (2000). Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life". *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 308-315.
- Asemu G, Neckář J, Szárszoi O, Papoušek F, Ošťádal B & Kolář F. (2000). Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res* **49**, 597-606.
- Asemu G, Papoušek F, Ošťádal B & Kolář F. (1999). Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 1821-1831.
- Avkiran M & Marber MS. (2002). Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol* **39**, 747-753.
- Baines CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX, Cardwell EM, Bolli R & Ping P. (2002). Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ Res* **90**, 390-397.
- Baker JE, Holman P, Kalyanaraman B, Griffith OW & Pritchard KA. (1999). Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann N Y Acad Sci* **874**, 236-253.
- Balderas E, Zhang J, Stefani E & Toro L. (2015). Mitochondrial BKCa channel. *Front Physiol* **6**, 104.

- Balková P, Hlaváčková M, Milerová M, Neckář J, Kolář F, Novák F & Nováková O. (2011). N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiol Res* **60**, 467-474.
- Barnett ME, Madgwick DK & Takemoto DJ. (2007). Protein kinase C as a stress sensor. *Cell Signal* **19**, 1820-1829.
- Bass A, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Samánek M & Stejskalová M. (1989). Intermittent high altitude-induced changes in energy metabolism in the rat myocardium and their reversibility. *Physiol Bohemoslov* **38**, 155-161.
- Baxter GF, Goma FM & Yellon DM. (1997). Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol* **92**, 159-167.
- Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kléber AG, Schuessler RB & Saffitz JE. (2000). Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* **87**, 656-662.
- Belaidi E, Beguin PC, Levy P, Ribuot C & Godin-Ribuot D. (2008). Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H901-908.
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouysségur J & Mazure NM. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **29**, 2570-2581.
- Benbrook DM & Long A. (2012). Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol* **34**, 286-297.
- Bernardi P & Di Lisa F. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **78**, 100-106.
- Bertolotto C, Maulon L, Filippa N, Baier G & Auberger P. (2000). Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *J Biol Chem* **275**, 37246-37250.
- Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G & Schulz R. (2005). Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* **67**, 234-244.
- Bohuslavová R, Kolář F, Kuthanová L, Neckář J, Tichopád A & Pavlínková G. (2010). Gene expression profiling of sex differences in HIF1-dependent adaptive cardiac responses to chronic hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **109**, 1195-1202.

- Bolli R. (2000). The late phase of preconditioning. *Circ Res* **87**, 972-983.
- Borchert GH, Yang C & Kolář F. (2011). Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H507-513.
- Borges JP & Lessa MA. (2015). Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. *Arq Bras Cardiol* **105**, 71-81.
- Bouwman RA, Salic K, Padding FG, Eringa EC, van Beek-Harmsen BJ, Matsuda T, Baba A, Musters RJ, Paulus WJ, de Lange JJ & Boer C. (2006). Cardioprotection via activation of protein kinase C-delta depends on modulation of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Circulation* **114**, I226-232.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ & Molkenin JD. (2002). PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol* **156**, 905-919.
- Breitkreutz D, Braiman-Wiksmann L, Daum N, Denning MF & Tennenbaum T. (2007). Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol* **133**, 793-808.
- Bu HM, Yang CY, Wang ML, Ma HJ, Sun H & Zhang Y. (2015). K(ATP) channels and MPTP are involved in the cardioprotection bestowed by chronic intermittent hypobaric hypoxia in the developing rat. *J Physiol Sci* **65**, 367-376.
- Budas GR, Churchill EN & Mochly-Rosen D. (2007). Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res* **55**, 523-536.
- Budas GR, Disatnik MH, Chen CH & Mochly-Rosen D. (2010). Activation of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) confers cardioprotection in protein kinase C epsilon (PKCvarepsilon) knockout mice. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 757-764.
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL & Semenza GL. (2003). Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **108**, 79-85.
- Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA & Semenza GL. (2008). Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res* **77**, 463-470.
- Canepa A, Chavez R, Hurtado A, Rotta A & Velasquez T. (1956). Pulmonary circulation at sea level and at high altitudes. *J Appl Physiol* **9**, 328-336.

- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U & Nishizuka Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**, 7847-7851.
- Cataldi A, Bianchi G, Rapino C, Sabatini N, Centurione L, Di Giulio C, Bosco D & Antonucci A. (2004). Molecular and morphological modifications occurring in rat heart exposed to intermittent hypoxia: role for protein kinase C alpha. *Exp Gerontol* **39**, 395-405.
- Chang CR & Blackstone C. (2007). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* **282**, 21583-21587.
- Chauhan VP, Chauhan A, Deshmukh DS & Brockerhoff H. (1990). Lipid activators of protein kinase C. *Life Sci* **47**, 981-986.
- Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD & Mochly-Rosen D. (2008a). Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* **321**, 1493-1495.
- Chen CH, Sun L & Mochly-Rosen D. (2010). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc Res* **88**, 51-57.
- Chen JL, Lin HH, Kim KJ, Lin A, Ou JH & Ann DK. (2009). PKC delta signaling: a dual role in regulating hypoxic stress-induced autophagy and apoptosis. *Autophagy* **5**, 244-246.
- Chen JL, Lin HH, Kim KJ, Lin A, Forman HJ & Ann DK. (2008b). Novel roles for protein kinase Cdelta-dependent signaling pathways in acute hypoxic stress-induced autophagy. *J Biol Chem* **283**, 34432-34444.
- Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW & Scharf SM. (2005). Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 915-920.
- Churchill EN, Disatnik MH & Mochly-Rosen D. (2009). Time-dependent and ethanol-induced cardiac protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of varepsilonPKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 278-284.
- Chytilová A, Borchert GH, Mandíková-Alánová P, Hlaváčková M, Kopkan L, Khan MA, Imig JD, Kolář F & Neckář J. (2015). Tumour necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* **214**, 97-108.
- Cieslak D & Lazou A. (2007). Regulation of BAD protein by PKA, PKCdelta and phosphatases in adult rat cardiac myocytes subjected to oxidative stress. *Mol Cells* **24**, 224-231.

- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S & Spiegel S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**, 800-803.
- Daneshrad Z, Garcia-Riera MP, Verdys M & Rossi A. (2000). Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium. *Mol Cell Biochem* **210**, 159-166.
- Deindl E, Kolář F, Neubauer E, Vogel S, Schaper W & Ošťádal B. (2003). Effect of intermittent high altitude hypoxia on gene expression in rat heart and lung. *Physiol Res* **52**, 147-157.
- Demaison L & Moreau D. (2002). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality: a possible mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* **59**, 463-477.
- Deng X, Ito T, Carr B, Mumby M & May WS. (1998). Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **273**, 34157-34163.
- Dhein S. (2006). Cardiac ischemia and uncoupling: gap junctions in ischemia and infarction. *Adv Cardiol* **42**, 198-212.
- Dhingra S, Sharma AK, Arora RC, Slezak J & Singal PK. (2009). IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc Res* **82**, 59-66.
- Ding HL, Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Yang WW, Yang HT & Zhou ZN. (2005). Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 315-322.
- Ding HL, Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ & Zhou ZN. (2004). Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. *Life Sci* **75**, 2587-2603.
- Disatnik MH, Buraggi G & Mochly-Rosen D. (1994). Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res* **210**, 287-297.
- Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM & Zhou ZN. (2003). Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res* **13**, 385-391.
- Dorn GW, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, Wu G, Lorenz JN & Mochly-Rosen D. (1999). Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12798-12803.
- Duquesnes N, Lezoualc'h F & Crozatier B. (2011). PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers? *J Mol Cell Cardiol* **51**, 665-673.

- Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, Lampe PD & Burt JM. (2006). Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res* **98**, 1498-1505.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516.
- Esposito F, Reese V, Shabetai R, Wagner PD & Richardson RS. (2011). Isolated quadriceps training increases maximal exercise capacity in chronic heart failure: the role of skeletal muscle convective and diffusive oxygen transport. *J Am Coll Cardiol* **58**, 1353-1362.
- Essop MF. (2007). Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol* **584**, 715-726.
- Esterbauer H, Schaur RJ & Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81-128.
- Fitzpatrick SF, Tambuwala MM, Bruning U, Schaible B, Scholz CC, Byrne A, O'Connor A, Gallagher WM, Lenihan CR, Garvey JF, Howell K, Fallon PG, Cummins EP & Taylor CT. (2011). An intact canonical NF- κ B pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia. *J Immunol* **186**, 1091-1096.
- Fontes MS, van Veen TA, de Bakker JM & van Rijen HV. (2012). Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2020-2029.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL & Youle RJ. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515-525.
- Frasier CR, Moukdar F, Patel HD, Sloan RC, Stewart LM, Alleman RJ, La Favor JD & Brown DA. (2013). Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovasc Res* **98**, 47-55.
- French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA & Powers SK. (2008). Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J* **22**, 2862-2871.
- French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK & Powers SK. (2006). Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H128-136.
- Frolíková M, Stopková R, Antalíková J, Johnson PM, Stopka P & Dvořáková-Hortová K. (2012). Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction. *Folia Zool* **61**, 84-94.

- Fryer RM, Wang Y, Hsu AK & Gross GJ. (2001). Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1346-1353.
- Gallegos LL, Kunkel MT & Newton AC. (2006). Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J Biol Chem* **281**, 30947-30956.
- Garcia-Dorado D, Inseste J, Ruiz-Meana M, González MA, Solares J, Juliá M, Barrabés JA & Soler-Soler J. (1997). Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* **96**, 3579-3586.
- García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A & Ruiz-Meana M. (2004). Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* **61**, 386-401.
- Giordano D, De Stefano ME, Citro G, Modica A & Giorgi M. (2001). Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* **1539**, 16-27.
- Golbidi S & Laher I. (2011). Molecular mechanisms in exercise-induced cardioprotection. *Cardiol Res Pract* **2011**, 972807.
- Gomez L, Paillard M, Price M, Chen Q, Teixeira G, Spiegel S & Lesnefsky EJ. (2011). A novel role for mitochondrial sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase-2 in PTP-mediated cell survival during cardioprotection. *Basic Res Cardiol* **106**, 1341-1353.
- Gong J, Hoyos B, Acin-Perez R, Vinogradov V, Shabrova E, Zhao F, Leitges M, Fischman D, Manfredi G & Hammerling U. (2012). Two protein kinase C isoforms, δ and ϵ , regulate energy homeostasis in mitochondria by transmitting opposing signals to the pyruvate dehydrogenase complex. *FASEB J* **26**, 3537-3549.
- Gopalakrishna R, Gundimeda U, Schiffman JE & McNeill TH. (2008). A direct redox regulation of protein kinase C isoenzymes mediates oxidant-induced neuritogenesis in PC12 cells. *J Biol Chem* **283**, 14430-14444.
- Graham RM, Thompson JW, Wei J, Bishopric NH & Webster KA. (2007). Regulation of Bnip3 death pathways by calcium, phosphorylation, and hypoxia-reoxygenation. *Antioxid Redox Signal* **9**, 1309-1315.
- Griffiths EJ & Halestrap AP. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* **307** (Pt 1), 93-98.

- Grilli A, De Lutiis MA, Patruno A, Speranza L, Cataldi A, Centurione L, Taccardi AA, Di Napoli P, De Caterina R, Barbacane R, Conti P & Felaco M. (2003). Effect of chronic hypoxia on inducible nitric oxide synthase expression in rat myocardial tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 935-942.
- Gustafsson AB & Gottlieb RA. (2008). Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 654-661.
- Günaydin B, Cakici I, Soncul H, Kalaycioglu S, Cevik C, Sancak B, Kanzik I & Karadenizli Y. (2000). Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol Res* **41**, 493-496.
- Hait NC, Bellamy A, Milstien S, Kordula T & Spiegel S. (2007). Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **282**, 12058-12065.
- Halestrap AP, Clarke SJ & Javadov SA. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**, 372-385.
- Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, Gottlieb RA & Gustafsson AB. (2007). Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* **14**, 146-157.
- Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL & Powers SK. (2003). Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* **34**, 800-809.
- Hampl V & Herget J. (2000). Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* **80**, 1337-1372.
- Hausenloy D, Wynne A, Duchon M & Yellon D. (2004). Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* **109**, 1714-1717.
- Hausenloy DJ & Yellon DM. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* **123**, 92-100.
- Heinzel FR, Luo Y, Li X, Boengler K, Buechert A, García-Dorado D, Di Lisa F, Schulz R & Heusch G. (2005). Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice. *Circ Res* **97**, 583-586.
- Heusch G. (2015). Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* **116**, 674-699.
- Heusch G, Boengler K & Schulz R. (2010). Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* **105**, 151-154.

- Hlaváčková M, Neckář J, Ježková J, Balková P, Staňková B, Nováková O, Kolář F & Novák F. (2007). Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**, 823-832.
- Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F & Nováková O. (2010). Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem* **345**, 271-282.
- Holzerová K, Hlaváčková M, Žurmanová J, Borchert G, Neckář J, Kolář F, Novák F & Nováková O. (2015). Involvement of PKCepsilon in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. *Physiol Res* **64**, 191-201.
- House C & Kemp BE. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* **238**, 1726-1728.
- Huang C, Liu W, Perry CN, Yitzhaki S, Lee Y, Yuan H, Tsukada YT, Hamacher-Brady A, Mentzer RM & Gottlieb RA. (2010). Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H570-579.
- Huang HC, Nguyen T & Pickett CB. (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* **277**, 42769-42774.
- Huratodi A. (1960). Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med* **53**, 247-258.
- Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS & Jäättelä M. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* **25**, 193-205.
- Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E & Mochly-Rosen D. (2003). Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* **108**, 2304-2307.
- Inagaki K & Mochly-Rosen D. (2005). DeltaPKC-mediated activation of epsilonPKC in ethanol-induced cardiac protection from ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 203-211.
- Inoue I, Nagase H, Kishi K & Higuti T. (1991). ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**, 244-247.
- Inoue M, Kishimoto A, Takai Y & Nishizuka Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* **252**, 7610-7616.

- James DI, Parone PA, Mattenberger Y & Martinou JC. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373-36379.
- Jeyaraman MM, Srisakuldee W, Nickel BE & Kardami E. (2012). Connexin43 phosphorylation and cytoprotection in the heart. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2009-2013.
- Ježková J, Nováková O, Kolář F, Tvrzická E, Neckář J & Novák F. (2002). Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem* **232**, 49-56.
- Jiang H, Cheng D, Liu W, Peng J & Feng J. (2010). Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. *Biochem Biophys Res Commun* **395**, 471-476.
- Jin ZQ, Goetzl EJ & Karliner JS. (2004). Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation* **110**, 1980-1989.
- Johnson JA, Gray MO, Chen CH & Mochly-Rosen D. (1996). A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J Biol Chem* **271**, 24962-24966.
- Johnson KR, Becker KP, Facchinetti MM, Hannun YA & Obeid LM. (2002). PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J Biol Chem* **277**, 35257-35262.
- Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN & Sollott SJ. (2004). Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* **113**, 1535-1549.
- Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S & Sollott SJ. (2009). Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection. *Circ Res* **104**, 1240-1252.
- Kasalický J, Ressler J, Urbanová D, Widimský J, Ošťádal B, Pelouch V, Vizek M & Procházka J. (1977). Relative organ blood flow in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia. *Pflugers Arch* **368**, 111-115.
- Kaspar JW, Nitire SK & Jaiswal AK. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **47**, 1304-1309.
- Kašparová D, Neckář J, Dabrowská L, Novotný J, Mráz J, Kolář F & Žurmanová J. (2015). Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol Genomics* **47**, 612-620.
- Kazanietz MG, Areces LB, Bahador A, Mischak H, Goodnight J, Mushinski JF & Blumberg PM. (1993). Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol Pharmacol* **44**, 298-307.

- Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN & MacAllister R. (2002). Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* **106**, 2881-2883.
- Kheifets V, Bright R, Inagaki K, Schechtman D & Mochly-Rosen D. (2006). Protein kinase C delta (deltaPKC)-annexin V interaction: a required step in deltaPKC translocation and function. *J Biol Chem* **281**, 23218-23226.
- Kikkawa U, Kishimoto A & Nishizuka Y. (1989). The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu Rev Biochem* **58**, 31-44.
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S & Lemasters JJ. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**, 245-253.
- Kim H, Scimia MC, Wilkinson D, Trelles RD, Wood MR, Bowtell D, Dillin A, Mercola M & Ronai ZA. (2011). Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia. *Mol Cell* **44**, 532-544.
- Kleinbongard P, Schulz R & Heusch G. (2011). TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail Rev* **16**, 49-69.
- Knock GA & Ward JP. (2011). Redox regulation of protein kinases as a modulator of vascular function. *Antioxid Redox Signal* **15**, 1531-1547.
- Kolář F, Ježková J, Balková P, Břeh J, Neckář J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ošťádal B, Wilhelm J & Herget J. (2007). Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H224-230.
- Kolář F, Neckář J & Ošťádal B. (2005). MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. *Physiol Res* **54**, 467-471.
- Kolář F, Novák F, Neckář J, Nováková O, Ošťádal B & Musters RJP. (2009). Role of protein kinases in chronic intermittent hypoxia-induced cardioprotection. V knize: Intermittent hypoxia. Editor: Xi L, Serebrovskaya TV. Nova Science Publishers, Inc., New York, 175-191.
- Kolář F & Ošťádal B. (1991). Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Pflugers Arch* **419**, 121-126.
- Kolář F & Ošťádal B. (2004). Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* **53 Suppl 1**, S3-13.

- Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Rajecová O, Strec V & Bárta E. (1988). Age-dependent influence of a moderate altitude (1,350 m) on the rat cardiopulmonary system. *Physiol Bohemoslov* **37**, 443-450.
- Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V & Widimský J. (1989). Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration* **56**, 57-62.
- Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U & Nishizuka Y. (1997). Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11233-11237.
- Konishi H, Yamauchi E, Taniguchi H, Yamamoto T, Matsuzaki H, Takemura Y, Ohmae K, Kikkawa U & Nishizuka Y. (2001). Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H₂O₂-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6587-6592.
- Kopecký M & Daum S. (1958). [Adaptation of the myocardium to altitude anoxia]. *Cesk Fysiol* **7**, 218-219.
- Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM & Chan DC. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858-862.
- Kristal BS, Park BK & Yu BP. (1996). 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **271**, 6033-6038.
- La Padula P & Costa LE. (2005). Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. I. Mechanical activity. *J Appl Physiol (1985)* **98**, 2363-2369.
- Lacinová V. (2002). Vliv akutní ischemie na expresi proteinkinasy C v myokardu potkana adaptovaného na chronickou hypoxii. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG & Lau AF. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* **149**, 1503-1512.
- Laskey WK. (2005). Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv* **65**, 361-367.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P & Parker PJ. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-2045.
- Leaf A, Xiao YF, Kang JX & Billman GE. (2003). Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Ther* **98**, 355-377.

- Lecour S & James RW. (2011). When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *Eur Heart J* **32**, 680-685.
- Lecour S, Rochette L & Opie L. (2005). Free radicals trigger TNF alpha-induced cardioprotection. *Cardiovasc Res* **65**, 239-243.
- Lee SD, Kuo WW, Lin JA, Chu YF, Wang CK, Yeh YL, Wang SG, Liu JY, Chang MH & Huang CY. (2007). Effects of long-term intermittent hypoxia on mitochondrial and Fas death receptor dependent apoptotic pathways in rat hearts. *Int J Cardiol* **116**, 348-356.
- Lee SD, Kuo WW, Wu CH, Lin YM, Lin JA, Lu MC, Yang AL, Liu JY, Wang SG, Liu CJ, Chen LM & Huang CY. (2006). Effects of short- and long-term hypobaric hypoxia on Bcl2 family in rat heart. *Int J Cardiol* **108**, 376-384.
- Lee Y & Gustafsson AB. (2009). Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* **14**, 536-548.
- Leonard MO, Kieran NE, Howell K, Burne MJ, Varadarajan R, Dhakshinamoorthy S, Porter AG, O'Farrelly C, Rabb H & Taylor CT. (2006). Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* **20**, 2624-2626.
- Levade T, Augé N, Veldman RJ, Cuvillier O, Nègre-Salvayre A & Salvayre R. (2001). Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ Res* **89**, 957-968.
- Li G, Bae S & Zhang L. (2004a). Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H1712-1719.
- Li J, Ichikawa T, Janicki JS & Cui T. (2009). Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets* **13**, 785-794.
- Li Q, Subbulakshmi V, Oldfield CM, Aamir R, Weyman CM, Wolfman A & Cathcart MK. (2007). PKCalpha regulates phosphorylation and enzymatic activity of cPLA2 in vitro and in activated human monocytes. *Cell Signal* **19**, 359-366.
- Li X, Heinzl FR, Boengler K, Schulz R & Heusch G. (2004b). Role of connexin 43 in ischemic preconditioning does not involve intercellular communication through gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* **36**, 161-163.
- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B & Levine B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* **72**, 8586-8596.
- Ma H, Guo R, Yu L, Zhang Y & Ren J. (2011). Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. *Eur Heart J* **32**, 1025-1038.

- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH, Milstien S & Spiegel S. (2005). SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* **280**, 37118-37129.
- Mackay K & Mochly-Rosen D. (2001). Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1301-1307.
- Maeda H, Nagai H, Takemura G, Shintani-Ishida K, Komatsu M, Ogura S, Aki T, Shirai M, Kuwahira I & Yoshida K. (2013). Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 1159-1166.
- Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, Saxena S, Kharbanda S & Kufe D. (2000). Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 21793-21796.
- Manukhina EB, Belkina LM, Terekhina OL, Abramochkin DV, Smirnova EA, Budanova OP, Mallet RT & Downey HF. (2013). Normobaric, intermittent hypoxia conditioning is cardio- and vasoprotective in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **238**, 1413-1420.
- Manukhina EB, Downey HF & Mallet RT. (2006). Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 343-365.
- Marchitti SA, Brocker C, Stagos D & Vasiliou V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 697-720.
- Matsui Y, Kyoj S, Takagi H, Hsu CP, Hariharan N, Ago T, Vatner SF & Sadoshima J. (2008). Molecular mechanisms and physiological significance of autophagy during myocardial ischemia and reperfusion. *Autophagy* **4**, 409-415.
- Mayr M, Liem D, Zhang J, Li X, Avliyakov NK, Yang JI, Young G, Vondriska TM, Ladroue C, Madhu B, Griffiths JR, Gomes A, Xu Q & Ping P. (2009). Proteomic and metabolomic analysis of cardioprotection: Interplay between protein kinase C epsilon and delta in regulating glucose metabolism of murine hearts. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 268-277.
- Mayr M, Metzler B, Chung YL, McGregor E, Mayr U, Troy H, Hu Y, Leitges M, Pachinger O, Griffiths JR, Dunn MJ & Xu Q. (2004). Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H946-956.
- McElroy CL, Gissen SA & Fishbein MC. (1978). Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation* **57**, 958-962.

- Michaud J, Kohno M, Proia RL & Hla T. (2006). Normal acute and chronic inflammatory responses in sphingosine kinase 1 knockout mice. *FEBS Lett* **580**, 4607-4612.
- Miller LE, Hosick PA, Wrieden J, Hoyt E & Quindry JC. (2012). Evaluation of arrhythmia scoring systems and exercise-induced cardioprotection. *Med Sci Sports Exerc* **44**, 435-441.
- Miura T, Ohnuma Y, Kuno A, Tanno M, Ichikawa Y, Nakamura Y, Yano T, Miki T, Sakamoto J & Shimamoto K. (2004). Protective role of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H214-221.
- Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S & Proia RL. (2005). Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol* **25**, 11113-11121.
- Mizushima N & Yoshimori T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542-545.
- Mochly-Rosen D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**, 247-251.
- Mochly-Rosen D & Gordon AS. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* **12**, 35-42.
- Morel OE, Buvry A, Le Corvoisier P, Tual L, Favret F, León-Velarde F, Crozatier B & Richalet JP. (2003). Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rat. *Pflugers Arch* **446**, 356-364.
- Morel S, Milano G, Ludunge KM, Corno AF, Samaja M, Fleury S, Bonny C, Kappenberger L, von Segesser LK & Vassalli G. (2006). Brief reoxygenation episodes during chronic hypoxia enhance posthypoxic recovery of LV function: role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Basic Res Cardiol* **101**, 336-345.
- Moret PR. (1980). Hypoxia and the heart. V knize: Hearts and Heart-like Organs. Editor: Bourne GH. Academic Press, New York, 333-87.
- Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN & Bhutia SK. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis* **19**, 555-566.
- Murriel CL, Churchill E, Inagaki K, Szweda LI & Mochly-Rosen D. (2004). Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 47985-47991.
- Murry CE, Jennings RB & Reimer KA. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136.

- Nakamura S & Yamamura H. (2010). Yasutomi Nishizuka: father of protein kinase C. *J Biochem* **148**, 125-130.
- Neckář J, Borchert GH, Hloušková P, Míčová P, Nováková O, Novák F, Hroch M, Papoušek F, Ošťádal B & Kolář F. (2013). Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels. *Curr Pharm Des* **19**, 6880-6889.
- Neckář J, Marková I, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ošťádal B & Kolář F. (2005). Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H1566-1572.
- Neckář J, Ošťádal B & Kolář F. (2004). Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res* **53**, 621-628.
- Neckář J, Papoušek F, Nováková O, Ošťádal B & Kolář F. (2002a). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol* **97**, 161-167.
- Neckář J, Szárszoi O, Koten L, Papoušek F, Ošťádal B, Grover GJ & Kolář F. (2002b). Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* **55**, 567-575.
- Nemenoff RA, Winitz S, Qian NX, Van Putten V, Johnson GL & Heasley LE. (1993). Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* **268**, 1960-1964.
- Newton A. (2003). Protein kinase C: Relaying signals from lipid hydrolysis to protein phosphorylation. V knize: Handbook of Cell Signaling. Editor: Bradshaw RA, Dennis EA, A., Edward A. Elsevier Inc., Atlanta, 1123-1130.
- Newton AC. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **270**, 28495-28498.
- Newton AC. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E395-402.
- Nguyen T, Nioi P & Pickett CB. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**, 13291-13295.
- Nguyen T, Ogbi M & Johnson JA. (2008). Delta protein kinase C interacts with the d subunit of the F1F0 ATPase in neonatal cardiac myocytes exposed to hypoxia or phorbol ester. Implications for F1F0 ATPase regulation. *J Biol Chem* **283**, 29831-29840.
- Ni HM, Williams JA & Ding WX. (2015). Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* **4**, 6-13.

- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K & Tavernarakis N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3448-3459.
- Nishida K, Kyoji S, Yamaguchi O, Sadoshima J & Otsu K. (2009). The role of autophagy in the heart. *Cell Death Differ* **16**, 31-38.
- Nishizuka Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665.
- Nishizuka Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* **9**, 484-496.
- Niture SK, Jain AK & Jaiswal AK. (2009). Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci* **122**, 4452-4464.
- Noma A. (1983). ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-148.
- Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P & Lenaers G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 7743-7746.
- Ong SB & Hausenloy DJ. (2010a). Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* **88**, 16-29.
- Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM & Hausenloy DJ. (2010b). Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **121**, 2012-2022.
- Opie LH. (1969). Metabolism of the heart in health and disease. II. *Am Heart J* **77**, 100-122 contd.
- Opie LH. (1978). Myocardial metabolism and heart disease. *Jpn Circ J* **42**, 1223-1247.
- Opie LH. (1990). What is new in myocardial ischemia? *Cardiovasc Drugs Ther* **4 Suppl 4**, 765-766.
- Oshima K, Takeyoshi I, Tsutsumi H, Mohara J, Ohki S, Koike N, Nameki T, Matsumoto K & Morishita Y. (2006). Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function following long-term preservation. *J Surg Res* **135**, 380-384.
- Ošřádal B & Kolář F. (2007). Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol* **158**, 224-236.
- Ošřádal B, Procházka J, Pelouch V, Urbanová D & Widimský J. (1984). Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov* **33**, 129-138.

- Ošťádalová I, Ošťádal B, Jarkovská D & Kolář F. (2002). Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res* **52**, 561-567.
- Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N & Rabinowitz B. (1997). Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol* **273**, H1707-1712.
- Parker PJ & Murray-Rust J. (2004). PKC at a glance. *J Cell Sci* **117**, 131-132.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD & Levine B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939.
- Peart JN & Headrick JP. (2008). Sustained cardioprotection: exploring unconventional modalities. *Vascul Pharmacol* **49**, 63-70.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Piper HM, García-Dorado D & Ovize M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **38**, 291-300.
- Poli A, Mongiorgi S, Cocco L & Follo MY. (2014). Protein kinase C involvement in cell cycle modulation. *Biochem Soc Trans* **42**, 1471-1476.
- Poli G, Schaur RJ, Siems WG & Leonarduzzi G. (2008). 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* **28**, 569-631.
- Pop C & Salvesen GS. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* **284**, 21777-21781.
- Poupa O, Krofta K, Procházka J & Turek Z. (1966). Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc* **25**, 1243-1246.
- Powers SK, Lennon SL, Quindry J & Mehta JL. (2002). Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol* **17**, 495-502.
- Powers SK, Murlasits Z, Wu M & Kavazis AN. (2007). Ischemia-reperfusion-induced cardiac injury: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 1529-1536.
- Powers SK, Quindry JC & Kavazis AN. (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* **44**, 193-201.
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA & Whittaker P. (1993). Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* **87**, 893-899.

- Qi X, Disatnik MH, Shen N, Sobel RA & Mochly-Rosen D. (2011). Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C $\{\delta\}$ under oxidative stress conditions in vivo. *Mol Biol Cell* **22**, 256-265.
- Quindry JC, Hamilton KL, French JP, Lee Y, Murlasits Z, Tumer N & Powers SK. (2007). Exercise-induced HSP-72 elevation and cardioprotection against infarct and apoptosis. *J Appl Physiol (1985)* **103**, 1056-1062.
- Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard KA, Tweddell JS, Litwin SB, Mussatto K, Jaquiss RD, Su J & Baker JE. (2002). Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation* **106**, 239-245.
- Ravingerová T, Matějíková J, Neckář J, Andělová E & Kolář F. (2007). Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol Cell Biochem* **297**, 111-120.
- Riedl SJ, Rénatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC & Salvesen GS. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**, 791-800.
- Rodríguez-Sinovas A. (2009). Cx43 phosphorylation and cardioprotection. *Cardiovasc Res* **83**, 613-614.
- Rodríguez-Sinovas A, Sánchez JA, González-Loyola A, Barba I, Morente M, Aguilar R, Agulló E, Miró-Casas E, Esquerda N, Ruiz-Meana M & García-Dorado D. (2010). Effects of substitution of Cx43 by Cx32 on myocardial energy metabolism, tolerance to ischaemia and preconditioning protection. *J Physiol* **588**, 1139-1151.
- Rottlaender D, Boengler K, Wolny M, Michels G, Endres-Becker J, Motloch LJ, Schwaiger A, Buechert A, Schulz R, Heusch G & Hoppe UC. (2010). Connexin 43 acts as a cytoprotective mediator of signal transduction by stimulating mitochondrial KATP channels in mouse cardiomyocytes. *J Clin Invest* **120**, 1441-1453.
- Rouet-Benzineb P, Eddahibi S, Raffestin B, Laplace M, Depond S, Adnot S & Crozatier B. (1999). Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 1697-1708.
- Roux A, Uyhazi K, Frost A & De Camilli P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* **441**, 528-531.
- Ruiz-Meana M, Rodríguez-Sinovas A, Cabestrero A, Boengler K, Heusch G & Garcia-Dorado D. (2008). Mitochondrial connexin43 as a new player in the pathophysiology of myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **77**, 325-333.
- Ruvolo PP, Deng X, Carr BK & May WS. (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 25436-25442.

- Rybin VO, Guo J, Gertsberg Z, Elouardighi H & Steinberg SF. (2007). Protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) and Src control PKCdelta activation loop phosphorylation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **282**, 23631-23638.
- Rybin VO, Sabri A, Short J, Braz JC, Molkentin JD & Steinberg SF. (2003). Cross-regulation of novel protein kinase C (PKC) isoform function in cardiomyocytes. Role of PKC epsilon in activation loop phosphorylations and PKC delta in hydrophobic motif phosphorylations. *J Biol Chem* **278**, 14555-14564.
- Rybin VO & Steinberg SF. (1994). Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ Res* **74**, 299-309.
- Sack M. (2002). Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease. *Pharmacol Ther* **94**, 123-135.
- Saito T, Rodger IW, Hu F, Robinson R, Huynh T & Giaid A. (2004). Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 71-77.
- Santel A & Fuller MT. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* **114**, 867-874.
- Sato A, Arimura Y, Manago Y, Nishikawa K, Aoki K, Wada E, Suzuki Y, Osaka H, Setsuie R, Sakurai M, Amano T, Aoki S, Wada K & Noda M. (2006). Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. *J Cell Physiol* **209**, 172-182.
- Sato T, Ohkusa T, Honjo H, Suzuki S, Yoshida MA, Ishiguro YS, Nakagawa H, Yamazaki M, Yano M, Kodama I & Matsuzaki M. (2008). Altered expression of connexin43 contributes to the arrhythmogenic substrate during the development of heart failure in cardiomyopathic hamster. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H1164-1173.
- Sayre LM, Lin D, Yuan Q, Zhu X & Tang X. (2006). Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab Rev* **38**, 651-675.
- Scheel KW, Seavey E, Gaugl JF & Williams SE. (1990). Coronary and myocardial adaptations to high altitude in dogs. *Am J Physiol* **259**, H1667-1673.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L & Elazar Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **26**, 1749-1760.
- Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D & Heusch G. (2007). Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev* **12**, 261-266.
- Semenza GL. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* **7**, 345-350.

- Severs NJ, Bruce AF, Dupont E & Rothery S. (2008). Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* **80**, 9-19.
- Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, Zhang W, Cheng H, Chen KH & Xiao RP. (2007). Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem* **282**, 23354-23361.
- Shinmura K, Tamaki K & Bolli R. (2005). Short-term caloric restriction improves ischemic tolerance independent of opening of ATP-sensitive K⁺ channels in both young and aged hearts. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 285-296.
- Singh H, Lu R, Bopassa JC, Meredith AL, Stefani E & Toro L. (2013). MitoBK(Ca) is encoded by the *Kcnma1* gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10836-10841.
- Sitailo LA, Tibudan SS & Denning MF. (2004). Bax activation and induction of apoptosis in human keratinocytes by the protein kinase C delta catalytic domain. *J Invest Dermatol* **123**, 434-443.
- Sivaraman V, Hausenloy DJ, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Lawrence D, Di Salvo C & Yellon DM. (2009). The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 758-764.
- Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R & Heusch G. (2007). Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res* **100**, 140-146.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & van der Blik AM. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245-2256.
- Souroujon MC & Mochly-Rosen D. (1998). Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat Biotechnol* **16**, 919-924.
- Srisakuldee W, Jeyaraman MM, Nickel BE, Tanguy S, Jiang ZS & Kardami E. (2009). Phosphorylation of connexin-43 at serine 262 promotes a cardiac injury-resistant state. *Cardiovasc Res* **83**, 672-681.
- Steinberg SF. (2004). Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J* **384**, 449-459.
- Steinberg SF. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* **88**, 1341-1378.
- Steinberg SF. (2012). Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology (Bethesda)* **27**, 130-139.

- Suen DF, Norris KL & Youle RJ. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* **22**, 1577-1590.
- Taha TA, Kitatani K, El-Alwani M, Bielawski J, Hannun YA & Obeid LM. (2006). Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. *FASEB J* **20**, 482-484.
- Takai Y, Kishimoto A, Inoue M & Nishizuka Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* **252**, 7603-7609.
- Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T & Nishizuka Y. (1979). Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* **91**, 1218-1224.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T & Kominami E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84-91.
- Taylor RP, Olsen ME & Starnes JW. (2007). Improved postischemic function following acute exercise is not mediated by nitric oxide synthase in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H601-607.
- Thornberry NA & Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Uchida K & Stadtman ER. (1993). Covalent attachment of 4-hydroxynonanal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem* **268**, 6388-6393.
- Uenoyama M, Ogata S, Nakanishi K, Kanazawa F, Hiroi S, Tominaga S, Seo A, Matsui T, Kawai T & Suzuki S. (2010). Protein kinase C mRNA and protein expressions in hypobaric hypoxia-induced cardiac hypertrophy in rats. *Acta Physiol (Oxf)* **198**, 431-440.
- van Kempen MJ, ten Velde I, Wessels A, Oosthoek PW, Gros D, Jongsma HJ, Moorman AF & Lamers WH. (1995). Differential connexin distribution accommodates cardiac function in different species. *Microsc Res Tech* **31**, 420-436.
- Vessey DA, Li L, Imhof I, Honbo N & Karliner JS. (2013). FTY720 postconditions isolated perfused heart by a mechanism independent of sphingosine kinase 2 and different from S1P or ischemic postconditioning. *Med Sci Monit Basic Res* **19**, 126-132.

- Vessey DA, Li L, Jin ZQ, Kelley M, Honbo N, Zhang J & Karliner JS. (2011). A sphingosine kinase form 2 knockout sensitizes mouse myocardium to ischemia/reoxygenation injury and diminishes responsiveness to ischemic preconditioning. *Oxid Med Cell Longev* **2011**, 961059.
- Voss OH, Kim S, Wewers MD & Doseff AI. (2005). Regulation of monocyte apoptosis by the protein kinase C-dependent phosphorylation of caspase-3. *J Biol Chem* **280**, 17371-17379.
- Wang ZH, Cai XL, Wu L, Yu Z, Liu JL, Zhou ZN, Liu J & Yang HT. (2012). Mitochondrial energy metabolism plays a critical role in the cardioprotection afforded by intermittent hypobaric hypoxia. *Exp Physiol* **97**, 1105-1118.
- Wang ZH, Chen YX, Zhang CM, Wu L, Yu Z, Cai XL, Guan Y, Zhou ZN & Yang HT. (2011). Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1695-1705.
- Wasková-Arnoštová P, Elsnicová B, Kašparová D, Horníková D, Kolář F, Novotný J & Žurmanová J. (2015). Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. *J Appl Physiol (1985)* **119**, 1487-1493.
- Wasková-Arnoštová P, Kašparová D, Elsnicová B, Novotný J, Neckář J, Kolář F & Žurmanová J. (2014). Chronic hypoxia enhances expression and activity of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in the rat ventricular myocardium. *Cell Physiol Biochem* **33**, 310-320.
- Wauthy P, Pagnamenta A, Vassalli F, Naeije R & Brimiouille S. (2004). Right ventricular adaptation to pulmonary hypertension: an interspecies comparison. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H1441-1447.
- Waza AA, Andrabi K & Hussain MU. (2014). Protein kinase C (PKC) mediated interaction between connexin43 (Cx43) and K(+)(ATP) channel subunit (Kir6.1) in cardiomyocyte mitochondria: Implications in cytoprotection against hypoxia induced cell apoptosis. *Cell Signal* **26**, 1909-1917.
- Webb BL, Hirst SJ & Giembycz MA. (2000). Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol* **130**, 1433-1452.
- Widimský J, Urbanová D, Ressler J, Ošťádal B, Pelouch V & Procházka J. (1973). Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res* **7**, 798-808.
- World Health Organization. (2014). The 10 leading causes of death in the World in 2012. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/, staženo dne 1.5.2016.

- Wu J, Chen P, Li Y, Ardell C, Der T, Shohet R, Chen M & Wright GL. (2013). HIF-1 α in heart: protective mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **305**, H821-828.
- Xie Y, Zhu Y, Zhu WZ, Chen L, Zhou ZN, Yuan WJ & Yang HT. (2005). Role of dual-site phospholamban phosphorylation in intermittent hypoxia-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H2594-2602.
- Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A & O'Rourke B. (2002). Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* **298**, 1029-1033.
- Xue Q & Zhang L. (2009). Prenatal hypoxia causes a sex-dependent increase in heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in adult male offspring: role of protein kinase C epsilon. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 624-632.
- Yan LJ & Sohal RS. (1998). Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12896-12901.
- Yellon DM & Hausenloy DJ. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* **357**, 1121-1135.
- Yeung HM, Kravtsov GM, Ng KM, Wong TM & Fung ML. (2007). Chronic intermittent hypoxia alters Ca²⁺ handling in rat cardiomyocytes by augmented Na⁺/Ca²⁺ exchange and ryanodine receptor activities in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C2046-2056.
- Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ & McNiven MA. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* **23**, 5409-5420.
- Yuan H, Yan B, Wang HH, Hua S & Hu A. (2012). Nitric oxide preserves XIAP and reduces hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes apoptosis via ERK1/2 activation. *Biochem Biophys Res Commun* **421**, 134-139.
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ & Semenza GL. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* **283**, 10892-10903.
- Zhang X, Xiao Z, Yao J, Zhao G, Fa X & Niu J. (2013). Participation of protein kinase C in the activation of Nrf2 signaling by ischemic preconditioning in the isolated rabbit heart. *Mol Cell Biochem* **372**, 169-179.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA & Vinten-Johansen J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H579-588.

- Zhong N, Zhang Y, Zhu HF, Wang JC, Fang QZ & Zhou ZN. (2002). Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Acta Pharmacol Sin* **23**, 305-310.
- Zong P, Setty S, Sun W, Martinez R, Tune JD, Ehrenburg IV, Tkatchouk EN, Mallet RT & Downey HF. (2004). Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**, 806-812.
- Zweier JL, Flaherty JT & Weisfeldt ML. (1987). Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1404-1407.

Přílohy

Příloha A

Holzerová K, Hlaváčková M, Žurmanová J, Borchert G, Neckář J, Kolář F, Novák F & Nováková O. (2015). Involvement of PKCepsilon in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. *Physiol Res* **64**, 191-201. IF = 1,618.

Příloha B

Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F & Nováková O. (2010). Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol Cell Biochem* **345**, 271-282. IF = 2,57.

Příloha C

Míčová P, Hahnová K, Hlaváčková M, Elsnicová B, Chytilová A, Holzerová K, Žurmanová J, Neckář J, Kolář F, Nováková O & Novotný J. Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A2 α /cyclooxygenase 2 pathway via β 2-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation.
Dne 3.6.2016 zasláno do časopisu *Mol Cell Biochem*.