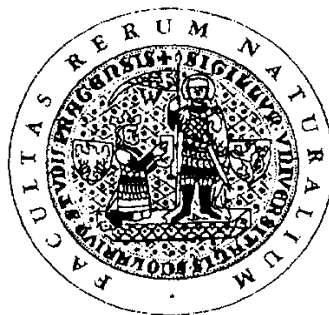


**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**  
Katedra buněčné biologie

# Úloha lipidů a reaktivních forem kyslíku v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie

Mgr. Patricie Balková

Doktorská dizertační práce



Školitelka: Doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

PRAHA 2010

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedených pramenů.

Prohlašuji, že jsem svou dizertační práci ani její podstatnou část nepředložila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Práce byla financovaná v rámci výzkumných projektů MSM 0021620858, GAČR 305/07/0875 a GA UK 153/2005/B-Bio/PrF.

V Praze dne.....

Podpis.....

Velmi ráda bych na tomto místě poděkovala svým školitelům doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. a doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc. za dlouholeté vedení, trpělivost, milý přístup, pomoc během mých experimentů a při sepisování této práce. Můj velký dík patří také prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc. a RNDr. Janu Neckářovi, PhD. za cenné rady, připomínky a stovky pokusných srdíček. Za příjemné pracovní prostředí a velkou pomoc děkuji také milé paní laborantce Jarmile Ševčíkové a celému kolektivu děvčat naší laboratoře. V neposlední řadě můj obrovský dík patří mým rodičům a Tomášovi za to, že mě vždy maximálně podporovali a pomáhali.

## **Obsah:**

Seznam použitých zkratk	5
<b>1. Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2. Chronická hypoxie</b>	<b>8</b>
2.1. Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie	9
<b>3. Oxidační stres</b>	<b>11</b>
3.1. Zdroje ROS	11
3.2. Druhy ROS	13
3.3. Úloha ROS v buňce	13
3.4. Antioxidační ochrana buňky	14
3.5. Přehled antioxidačních systémů	15
<b>4. Oxidační stres a chronická hypoxie</b>	<b>17</b>
4.1 Úloha ROS v signalizaci chronické hypoxie	20
4.1.1. ROS a PKC	21
4.1.2. ROS a mitoK <sub>ATP</sub>	22
4.1.3. ROS a antioxidační enzymy	23
<b>5. Lipidy a chronická hypoxie</b>	<b>26</b>
5.1. ROS a lipidy	26
5.2. Fosfolipidy v myokardu	26
5.3. Vliv chronické hypoxie a lipidové diety na ischemickou toleranci srdce	28
5.4. Složení mastných kyselin v sérových a srdečních lipidech: vliv chronické hypoxie a diety	32
5.4.1. Sérové a srdeční triacylglyceroly	35
5.4.2. Sérové a srdeční fosfolipidy	35
5.4.3. Sérové cholesterolestery	37
5.4.4. Srdeční diacylglyceroly a PKC	38
5.5. Vliv chronické hypoxie a lipidové diety na redoxní rovnováhu myokardu	39
<b>6. Shrnutí dosažených výsledků</b>	<b>43</b>
<b>7. Závěr</b>	<b>46</b>
<b>8. Použitá literatura</b>	<b>47</b>
<b>9. Přílohy A – D</b>	<b>67</b>

## Seznam zkratek

ADP	adenozin-5'-difosfát
AMP	adenozin-5'-monofosfát
ATP	adenozin-5'-trifosfát
CE	cholesterylester
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
DAG	diacylglycerol
DNA	kyselina deoxyribonukleová
GPX	glutathionperoxidáza
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
HSP	proteiny tepelného stresu ( <i>heat stress protein</i> )
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě ( <i>low density lipoprotein</i> )
mitoK <sub>ATP</sub>	mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP
MPTP	mitochondriální <i>permeability transition</i> pór
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
n-3 PUFA	n-3 polynenasycené mastné kyseliny
n-6 PUFA	n-6 polynenasycené mastné kyseliny
NAC	N-acetylcystein
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NF-κB	nukleární transkripční faktor κB
NO	oxid dusnatý
P <sub>B</sub>	barometrický tlak
PGE	prostaglandin E
PGI <sub>2</sub>	prostacyklin
PI3K	fosfatidylinozitol-3 kináza
PKB	proteinkináza B
PKC	proteinkináza C
PKD	proteinkináza D
PL	fosfolipid
PLA <sub>2</sub>	fosfolipáza A <sub>2</sub>
PO <sub>2</sub>	parciální tlak kyslíku

PRX	peroxiredoxin
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
ROS	reaktivní formy kyslíku
SFA	nasyčené mastné kyseliny
SOD1 (Cu,ZnSOD)	měď, zinková superoxiddismutáza
SOD2 (MnSOD)	manganová superoxiddismutáza
SOD3	extracelulární měď, zinková superoxiddismutáza
TAG	triacylglycerol
TBARS	látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou ( <i>thiobarbituric acid-reacting substances</i> )
TNF $\alpha$	nádorový nekrotizační faktor $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě ( <i>very low density lipoprotein</i> )
16:0	kyselina palmitová (hexadekanová)
18:0	kyselina stearová (oktadekanová)
18:1n-7	kyselina vakcenová (11-oktadekaenová)
18:1n-9	kyselina olejová (9-oktadekaenová)
18:2n-6	kyselina linolová (9, 12-oktadekadienová)
18:3n-3	kyselina $\alpha$ -linolenová (9, 12, 15-oktadekatrienová)
20:4n-6	kyselina arachidonová (5, 8, 11, 14-eikosatetraenová)
20:5n-3	kyselina timnodonová (5, 8, 11, 14, 17-eikosapentaenová, EPA)
22:6n-3	kyselina cervonová (4, 7, 10, 13, 16, 19-dokosahexaenová, DHA)

# **1. ÚVOD**

Nemoci srdce a cév patří vedle rakoviny a AIDS k velkým hrozbám lidstva. Současná data světové zdravotnické organizace ukazují, že kardiovaskulární onemocnění jsou zodpovědná asi za 50 % úmrtí ve vyspělých státech světa a významně zhoršují kvalitu života u velmi početné skupiny lidí.

V důsledku intenzivního rozvoje lidské společnosti a životního stylu ve vyspělých zemích se zejména ischemická choroba srdeční stala jednou z nejčastějších příčin morbidity a mortality. Její důsledky pro naše zdraví jsou příliš vážné a výskyt v našem nejbližším okolí příliš častý, než aby ji bylo možné přehlédnout a nevěnovat jí dostatečnou pozornost. Mezi hlavní rizikové faktory vzniku této srdeční choroby patří nadměrný kalorický přísun, vysoká úroveň stresu, nedostatečná fyzická aktivita, kouření a samozřejmě také genetická výbava jednotlivce. Zákeřností ischemické choroby srdeční je fakt, že v časných stádiích je zcela bez klinických příznaků; k varovným signálům patří např. vysoká hladina cholesterolu a vysoký krevní tlak. Není proto divu, že snahou kardiologů je tento nepříznivý trend zvrátit. Významných pokroků v prognóze, diagnóze a terapii tohoto onemocnění by nebylo možné dosáhnout bez základního experimentálního výzkumu a těsné spolupráce teoretických a klinických kardiologů (Ošťádal *a kol.* 2007). Jedním ze základních problémů je hledání endogenních protektivních mechanismů, které chrání myokard před ischemicko-reperfúzním poškozením. Nalezení molekulární podstaty procesů endogenní kardioprotekce by mohlo vést ke zlepšení prevence a terapie kardiovaskulárních chorob (Ošťádal *a kol.* 2007). Jednou z možností, jak chránit srdce před ischemicko-reperfúzním poškozením je adaptace organismů na hypoxické podmínky spojené s vysokou nadmořskou výškou. Dlouhodobá adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje srdeční odolnost vůči akutnímu ischemicko-reperfúznímu poškození, což se projevuje zlepšením obnovy kontraktility srdce, zmenšením velikosti infarktu myokardu a snížením počtu a závažnosti srdečních arytmií. Kardioprotektivní působení chronické hypoxie přetrvává dny až týdny. Přestože o protektivních účincích adaptace na výškovou hypoxii na ischemické srdce víme již několik desetiletí, dosud se nepodařilo zcela objasnit mechanismus, jakým je tento ochranný efekt zprostředkován. V současné době je již známá celá řada molekul účastnicích se tohoto protektivního fenoménu, jako je např. proteinkináza C (PKC), mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály (mitoK<sub>ATP</sub>) a v neposlední řadě také reaktivní formy kyslíku (ROS).

Dizertační práce předkládá soubor prací zabývajících se úlohou ROS v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie. Je prezentována formou přehledného souhrnu dosud známých poznatků a původních prací autorky, které tvoří samostatné přílohy. Závěrečné shrnutí pak v bodech rekapituluje dosažené výsledky.

## **2. CHRONICKÁ HYPOXIE**

Pojmem hypoxie obecně rozumíme nerovnováhu mezi dodávkou a požadavkem tkáně na zásobení kyslíkem. V literatuře jsou často zaměňovány pojmy ischemie a hypoxie. Oba jevy jsou charakterizovány sníženou dodávkou kyslíku do myokardu, ale na rozdíl od ischemie, hypoxie postihuje celý myokard a koronární průtok je zachován. Myokard je tudíž stále zásobovaný substráty a metabolické produkty jsou odplavovány (přehled viz Moret, 1980).

Bylo prokázáno, že adaptací na chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce lze podstatně zvýšit odolnost srdce k ischemicko-reperfúznímu poškození (přehled viz Kolář *a kol.* 2004, Ošřádal *a kol.* 2007). V podmínkách chronické hypoxie srdeční sval udržuje adekvátní funkci při sníženém parciálním tlaku kyslíku ( $PO_2$ ) v koronárních artériích. Tento stav vyžaduje nutně adaptaci, která chrání myokard i v situacích, které na něj kladou zvýšené pracovní, a tím i metabolické nároky. Adaptace na chronickou hypoxii je děj komplexní, který chrání srdce před ischemicko-reperfúzním poškozením, ale působí na kardiovaskulární systém také negativně, neboť vede např. k rozvoji plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory (přehled viz Kolář *a kol.* 1989).

Kardioprotektivních účinků adaptace na chronickou hypoxii lze docílit několika způsoby. Organizmy můžeme adaptovat v přirozených podmínkách ve vysokohorském prostředí, popřípadě umístěním do hypoxické komory, kdy je dosaženo snížení  $PO_2$  částečným odčerpáním vzduchu z komory a snížením tlaku (hypobarická hypoxie) nebo řízenou změnou složení plynů bez ovlivnění tlaku (normobarická hypoxie). Hypobarická hypoxie se také označuje jako výšková hypoxie, neboť úroveň  $PO_2$  uvnitř komory odpovídá  $PO_2$  v určité nadmořské výšce (např.  $PO_2 = 8,6$  kPa, 7000 m). K adaptaci na výškovou hypoxii vede nejen stálý pobyt v hypoxické atmosféře (permanentní výšková hypoxie), ale i každodenní několikahodinová přerušovaná expozice (intermitentní výšková hypoxie). V posledních letech se ukázalo, že dokonce každodenní série jen několikaminutových hypoxických expozic působí kardioprotektivně (tzv. hypoxický



trénink) (Zong *a kol.* 2004). Ve všech výše uvedených případech se jedná o systémovou hypoxii. Přírozenou formou systémové hypoxie (mimo trvalý pobyt ve vysokohorském prostředí) je také fetální období. I tato hypoxie s sebou přináší zvýšenou ischemickou toleranci – myokard novorozenců je odolnější k ischemii v porovnání s dospělými jedinci (přehled viz Ošťádal *a kol.* 1999).

Výsledky, které jsou předmětem této dizertační práce, se týkají modelu chronické intermitentní hypobarické hypoxie (dále jen chronická hypoxie). Dospělí samci potkana kmene Wistar byli adaptováni na výšku 7000 m v hypobarické komoře 8 hodin denně, 5 dnů v týdnu s celkovým počtem 25 expozičních. Barometrický tlak ( $P_B$ ) byl snižován postupně, tzn., že výška 7000 m ( $P_B = 41$  kPa;  $PO_2 = 8,6$  kPa) byla dosažena po 13 expozičních. Kontrolní zvířata byla paralelně udržována v  $P_B$  a  $PO_2$  na úrovni 200 m ( $P_B = 99$  kPa;  $PO_2 = 20,7$  kPa) (**Příloha A**).

## ***2.1. Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie***

Zvýšená rezistence srdce k akutnímu nedostatku kyslíku vyvolaná adaptací na chronickou hypoxii vede ke třem důležitým projevům kardioprotekce, kterými jsou zlepšená postischemická obnova kontraktálních funkcí myokardu, snížená velikost infarktu myokardu a nižší výskyt a závažnost ischemických a reperfučních komorových arytmií.

Kardioprotektivní účinek chronické hypoxie je znám více než 50 let. Již epidemiologické studie z 50. let minulého století prokázaly nižší výskyt infarktu myokardu u lidí žijících ve vysokých nadmořských výškách (Peru, 4000 m) (přehled viz Hurtado 1960).

Experimentální studie pak ukázaly, že chronická hypoxie zlepšuje obnovu kontraktility izolované pravé komory potkanů po akutní anoxii *in vitro* v porovnání s normoxickou skupinou (Kopecký *a kol.* 1958, Poupa *a kol.* 1966, Widimský *a kol.* 1973, McGrath *a kol.* 1973). Zlepšení kontraktální funkce izolované pravé komory bylo prokázáno jak u adaptovaných samců potkana, tak u samic, které jsou za normoxických podmínek odolnější k ischemii než samci (Ošťádal *a kol.* 1984 a). Intermitentní výšková hypoxie působila protektivně na obnovu kontraktálních funkcí myokardu potkana i v případě poškození srdce vápníkovým přetížením vyvolaným vápníkovým paradoxem (Zhu *a kol.* 2003, Xie *a kol.* 2004).

Již od 70. let minulého století je známo, že adaptace na chronickou hypoxii významně snižuje velikost infarktu myokardu u potkanů (Meerson *a kol.* 1973), což bylo později potvrzeno i v další studii (Turek *a kol.* 1980). Také výsledky naší skupiny tento efekt potvrdily a ukázaly, že míra kardioprotektivního účinku chronické hypoxie na velikost infarktu myokardu je závislá na intenzitě hypoxického stimulu, počtu hypoxických expozičních a době jejich trvání (Neckář *a kol.* 2003, 2005). Současně bylo ale také ukázáno, že každodenní 8 h trvající střídání extrémních hypoxických podmínek s normoxickými podmínkami v krátkých časových intervalech (40 s, 5 %  $O_2$  následované 20 s, 21 %  $O_2$ ) nevedlo k navození protekce myokardu u potkana – obsah infarktu se naopak zvětšil (Joyeux-Faure *a kol.* 2005). Tento model tzv. spánkové apnoe je současně spojen s výrazným stresem, který převáží prospěšné účinky hypoxie a vede k poškození myokardu.

Dalším život ohrožujícím projevem ischemie myokardu je výskyt závažných komorových arytmií jak v průběhu ischemie, tak i v následné reperfúzi. Řada prací ukázala, že adaptace na chronickou hypoxii má antiarytmický účinek. Meerson *a kol.* (1987, 1989) jako první ukázali, že adaptace potkanů na mírnou intermitentní výškovou hypoxii (5000 m) snižuje výskyt závažných ischemických arytmií, avšak pouze na modelu anestezovaného uměle ventilovaného zvířete (srdce *in situ*). Pozdější studie zjistily, že adaptace na mírnou intermitentní výškovou hypoxii u modelu izolovaného perfundovaného srdce vede ke snížení jak závažnosti ischemických a reperfúzních arytmií, tak i jejich celkového počtu (Asemu *a kol.* 1999, 2000, Szarszoi *a kol.* 2002). S narůstající hypoxickou zátěží však antiarytmický účinek chronické hypoxie na srdce v podmínkách *in vitro* vymizel; intenzivnější hypoxie (7000 m) působila dokonce proarytmogenně. Naproti tomu na modelu srdce *in situ* vedly stejné podmínky adaptace (7000 m) ke snížení celkového počtu i závažnosti obou typů arytmií (Asemu *a kol.* 2000, Neckář *a kol.* 2002, 2004). Zdá se tedy, že antiarytmický účinek chronické hypoxie je závislý na použitém experimentálním modelu a adaptačním protokolu (Asemu *a kol.* 2000).

Dosud ne zcela objasněnou otázkou zůstává, jak dlouhou dobu je třeba adaptovat organismus na hypoxické podmínky, abychom vyvolali kardioprotektivní účinek. K docílení antiarytmického účinku u potkana je nutná intermitentní hypoxie po dobu alespoň 2-3 týdnů (Asemu *a kol.* 2000, Zhang *a kol.* 2000). V případě dalších parametrů ischemicko-reperfúzního poškození (velikost infarktu, kontraktální dysfunkce) nebyla tato otázka dosud detailně studována.

Adaptace organismů na chronickou hypoxii je spojená s velkým množstvím strukturálních a funkčních změn sloužících k zachování homeostázy za spotřeby co nejmenšího množství energie. Tato přizpůsobení mohou chránit srdce za podmínek, které vyžadují zvýšení výkonu a následně i zvýšení metabolismu (Ošťádal *a kol.* 1994). Dnes je již jednoznačně prokázáno, že chronická hypoxie chrání srdeční buňky před základními projevy akutního ischemicko-reperfúzního poškození, ale otázkou zůstává, jaká je molekulární podstata tohoto protektivního účinku. V posledních letech se ukazuje, že významnou součástí tohoto velmi komplexního děje je zvýšená tvorba ROS. Následující kapitoly se proto budou zabývat úlohou ROS v mechanismu kardioprotekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii.

### **3. Oxidační stres**

#### ***3.1. Zdroje ROS***

Termín oxidační stres představuje porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním ROS. Je vyvolán zvýšenou tvorbou volných radikálů a/nebo snížením antioxidační ochrany organismu. Intenzita oxidační zátěže, kapacita antioxidačních systémů a dostupnost redukčních ekvivalentů určují oxidoredukční stav buňky. Zvýšená hladina ROS hraje významnou roli v patogenezi mnoha chorobných stavů. Dosud však není úplně jasné, kde ROS vystupují jako primární příčina poškození (např. intoxikace, reperfúzní změny, uvolnění redukováných přechodných kovů do oběhu), případně kde se porušení redoxní rovnováhy podílí na amplifikaci již existujících patologických změn (zánětlivé a degenerativní choroby). Aerobní buňky produkují ROS jako vedlejší produkty různých metabolických procesů. ROS jsou vysoce reaktivní molekuly s relativně krátkou životností. Obecně vzato nejvýkonnějším producentem reaktivních metabolitů kyslíku v buňkách jsou membránově vázané enzymy (Fieschi *a kol.* 1995) a zejména ty, jejichž koenzymy jsou schopné redukovat kyslík pouze jediným elektronem za vzniku superoxidu. Jsou to hlavně koenzymy s chinoidní nebo flavinovou strukturou a hemové koenzymy (Štípek *a kol.* 2000).

Největším zdrojem ROS v buňce jsou mitochondrie, které spotřebují více než 90 % kyslíku v buňce, neboť jsou jejím respiračním a energetickým centrem. Za fyziologických podmínek je pouze asi 1-5 % kyslíku vstupujícího do dýchacího řetězce redukováno neúplně za vzniku ROS (Starkov *a kol.* 2008). Stále je diskuzní otázkou, kde přesně jsou

ROS v respiračním řetězci produkovány. Pomocí inhibitorů dýchacího řetězce (rotenon, stigmatelin, antimycin A) bylo prokázáno, že hlavním producentem ROS je komplex I (NADH-ubichinonreduktáza) a komplex III (ubichinol: cytochrom c-reduktáza) (Ježek *a kol.* 2005). Komplex I uvolňuje ROS do matrix mitochondrie, kde jsou lokalizovány hlavní antioxidační systémy buňky, které se podstatně podílí na jejich odstraňování. Situace je komplikovanější u komplexu III, který obsahuje dvě centra vzniku ROS: Q<sub>o</sub> centrum, orientované směrem do intermembránového prostoru a Q<sub>i</sub> centrum lokalizované na vnitřní membráně mitochondrie a směřující do matrix. Podíl antioxidačních enzymů, které vychytávají ROS v intermembránovém prostoru mitochondrií je mnohem menší než v matrix. V současné době se tudíž usuzuje, že dominantním místem produkce ROS uvolňovaných z mitochondrií je komplex III (Chen *a kol.* 2003).

Významným endogenním zdrojem ROS v kardiovaskulárním systému je také NADPH oxidáza (George *a kol.* 2009 b). Tento enzym katalyzuje vznik superoxidu jednoelektronovou redukcí kyslíku. Je obsažen zejména v membránách neutrofilů a monocytů, ale také v nefagotizujících B lymfocytech. Jsou-li fagocyty v klidu, je enzym neaktivní; k hlavním stimulátorům jeho aktivity patří fagocytóza jako taková a řada cytokinů (nádorový nekrotizační faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a interferon  $\gamma$ ) (Brandes *a kol.* 2005). Události vedoucí k aktivaci oxidázového systému jsou dnes intenzivně studovány a nejsou zcela objasněny. Uvažuje se o tom, že např. přítomnost NADPH oxidázy v buňkách karotického sinu může sloužit jakožto "kyslíkový sensor", stojící na počátku neurohumorální reakce organismu na hypoxii (Youngson *a kol.* 1993). Jun *a kol.* ve své práci předpokládají, že hypoxie vede ke zvýšení exprese tohoto enzymu (2008).

Další významnou reakcí, která je zdrojem ROS v myokardu, je xantin-xantinoxidázová reakce. Jak již bylo v úvodu řečeno, normální metabolismus myokardu je aerobní a většina ATP pochází z oxidační fosforylace. Adaptace na chronickou hypoxii vede částečnému přepnutí metabolismu myokardu na anaerobní glykolýzu, a tím k poklesu tvorby ATP. Protože hladina ATP klesá, hladina ADP na začátku stoupá a ADP je následně přeměňován na AMP svalovou adenylátkinázou. AMP je dále degradován na produkty purinového metabolismu, hypoxantin a xantin, které jsou účinkem enzymu xantinoxidázy dále odbourávány na kyselinu močovou, přičemž vznikají ROS. Současně bylo také ukázáno, že hypoxie vedla nejen ke zvýšení transkripce xantinoxidázy, ale také ke zvýšení rychlosti konverze xantindehydrogenázy na xantinoxidázu (Berry *a kol.* 2004, Doehner *a kol.* 2005, George *a kol.* 2009 a).

Mezi další důležité enzymy tvořící ROS patří např. cytochrom P450 oxidáza, lipooxygenáza (peroxidace polynenasycených mastných kyselin), cyklooxygenáza, NO syntáza a další. Mezi exogenní zdroje ROS patří průmyslové zplodiny, radioaktivní záření, UV záření apod.

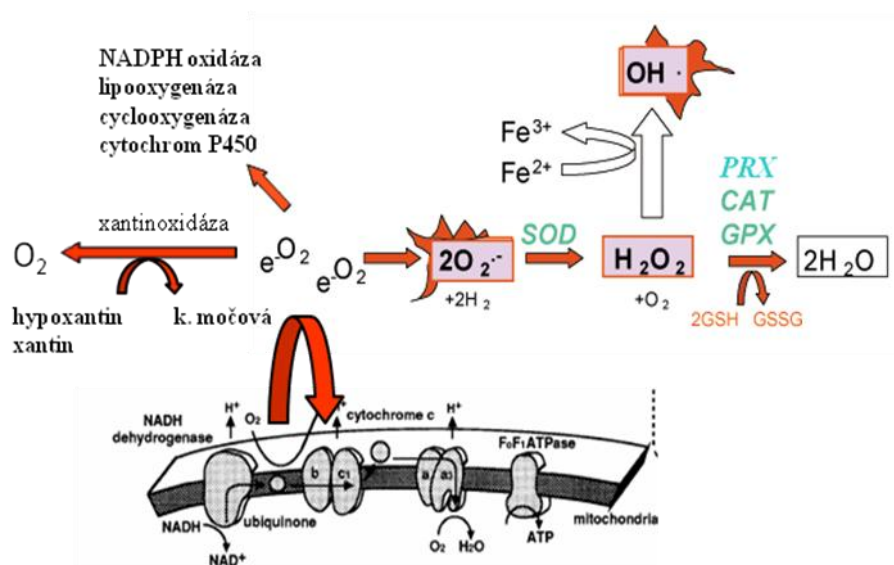
### **3.2. Druhy ROS**

Redukcí jednoho elektronu molekuly kyslíku vzniká superoxidový radikál  $O_2^{\cdot -}$ , který je při fyziologickém pH jen mírně reaktivní. Superoxid je nestabilní molekula, která v organismu rychle podléhá oxidoredukční reakci označované jako dizmutace (jeho dvě molekuly si předávají elektrony vzájemně) a jejím produktem je peroxid vodíku  $H_2O_2$ . Peroxid vodíku není radikálem v chemickém slova smyslu, avšak do skupiny ROS rozhodně patří, neboť se účastní vzniku radikálů. Je to stabilní, relativně silný oxidant, který proniká v tělních tekutinách i na značnou vzdálenost a s biologickými molekulami reaguje pomalu. V přítomnosti tranzitních kovů ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ ) vytváří vysoce toxický hydroxylový radikál  $OH^{\cdot}$  (Fentonova reakce). Hydroxylový radikál je extrémně silné oxidační činidlo, které reaguje s celou řadou biologických struktur a způsobuje oxidační poškození lipidů, proteinů a DNA (Obr. 1).

### **3.3. Úloha ROS v buňce**

O existenci volných radikálů se pochybovalo poměrně dlouho (až do 60. let minulého století) a poté jim byla přisuzována jednoznačně negativní úloha při vzniku a rozvoji onemocnění. Jen málo biologických entit mělo tak špatnou reputaci jako ROS. Jejich neustálá produkce spojená s jejich odstraňováním podporovala široce akceptovanou představu o jejich škodlivosti, ačkoliv mají buňky jasně rozvinutou obranu pro jejich eliminaci (Richard *a kol.* 1990). Během posledních let bylo potvrzeno, že ROS jsou velice důležitými chemickými prostředníky v přenosu signálu zahrnutými v regulaci buněčného růstu a diferenciaci (Burdon *a kol.* 1989, Nose *a kol.* 2000). Ukázalo se, že aplikace nízkých koncentrací ROS nebo jiné intervence podporující vznik ROS (ionizující záření, chemické sloučeniny) stimulují buněčnou diferenciaci. Antioxidační enzymy (kataláza nebo manganová superoxiddismutáza, MnSOD) naopak vedly k utlumení buněčné proliferace, což ukazuje na to, že endogenní ROS jsou životně důležitým signálním

prvkem, který udržuje růst buněk (Brown *a kol.* 1999, Zhong *a kol.* 1996). Neopomenutelná je také jejich úloha v imunitním systému (leukocyty a makrofágy), kde se ROS účastní zabíjení bakterií, a dále v regulaci hlavních signálních kaskád během embryogeneze (Babior *a kol.* 1978). V současné době se ukazuje, že ROS hrají také důležitou roli v mechanismu kardioprotekce (Yellon *a kol.* 2003). Je patrné, že ROS škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organizmus získal v průběhu evoluce. Je tedy nutné si uvědomit jejich duální charakter „jsou to dobří sluhové, ale zlí páni“ (Štípek *a kol.* 2000).



Obr. 1 *Schéma vzniku a odstraňování ROS v buňce*

*SOD-superoxiddismutáza, PRX-peroxiredoxin, CAT-kataláza, GPX-glutathionperoxidáza*

*Převzato a upraveno: Sauer 2001*

### 3.4. Antioxidační ochrana buňky

Vznik a přítomnost ROS v buňce musí být přesně regulovány. Intracelulární redoxní stav buňky je charakterizován rovnováhou mezi vznikem oxidantů a antioxidační kapacitou buněk, založenou na různých antioxidačních systémech. Antioxidační ochrana je podmínkou existence energetického metabolismu založeného na kyslíku a je vývojově velmi stará. Systémy antioxidační ochrany umožnily vznik života v kyslíkové atmosféře.

Nezávisle na antioxidačních enzymech obsahují všechny buňky různé redukční složky, které také účinně vychytávají ROS. Společně s antioxidačními enzymy udržují určitou hladinu oxidačních a redukčních látek. Obranné mechanismy jsou lokalizované v různých buněčných strukturách a kompartmentech. Buňky používají tři typy ochrany před negativními účinky ROS: v první řadě je to záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily (antioxidační enzymy a látky tvořící s ROS stálejší, a tudíž méně toxické produkty). Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné reparační mechanismy poškození biomolekul. Můžeme mezi ně zahrnout např. fosfolipázy A<sub>2</sub> (na kalcium nezávislá PLA<sub>2</sub>) odstraňující poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů (PL), reparační enzymy opravující poškozenou DNA a proteolytický aparát rozkládající oxidačně modifikované proteiny. Posledním způsobem ochrany buněk před zvýšenou tvorbou ROS je regulace aktivit enzymů, které ROS produkují např. indukibilní NO syntáza.

### ***3.5. Přehled antioxidačních systémů***

#### *a) Enzymové antioxidační systémy*

1) Superoxiddismutáza (SOD), která patří k fylogeneticky nejstarším a nejdůležitějším enzymům, stojí v první linii obrany před oxidačním stresem. Rozlišujeme tři základní izoformy SOD lišící se kofaktorem, tím je vždy atom kovu (Bannister *a kol.* 1987). Cytozolická Cu,ZnSOD (SOD1) obsahuje v aktivním centru měď a zinek, mitochondriální MnSOD (SOD2) má ve svém aktivním centru mangan a extracelulární Cu,ZnSOD (SOD3) obsahuje také měď a zinek ve svém aktivním centru, ale je imunologicky odlišná od SOD1 (Fridovich, 1997). Klíčovou izoformou je indukibilní MnSOD, jenž je kódována nukleárním chromatinem, syntetizována jako prekurzor v cytoplazmě a následně ve zralé formě, posttranslačně importována do mitochondriální matrix (Wispe *a kol.* 1989, Hoshida *a kol.* 2002, Jin *a kol.* 2005). Tento homotetramerický nebo dimerický protein katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík (McCord *a kol.* 1969). MnSOD je velmi důležitá pro životaschopnost buněk, jelikož bylo pozorováno, že myši, kterým tato izoforma chybí, umírají během několika dnů po narození na srdeční kardiomyopatii (Li *a kol.* 1995).

2) Kataláza je enzym zajišťující štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík, a působí tak jako prevence vzniku hydroxylového radikálu. Svým účinkem tak vlastně spolu s peroxidázami navazuje na činnost SOD. Je to tetramerní hemoprotein, obsahující 4 molekuly NADPH. Kataláza je lokalizovaná v peroxizomech kardiomyocytů (Yokota *a kol.* 1992, Fahimi 1979). Existuje také práce, kde byla pozorována přítomnost katalázy v mitochondriální matrix potkaních kardiomyocytů (Radi *a kol.* 1991). Toto pozorování nebylo ale v žádné další studii potvrzeno. Bez ohledu na subcelulární lokalizaci je aktivita katalázy v srdci ve srovnání s ostatními orgány velmi nízká (Zhou *a kol.* 2000). Tento fakt může být také jedním z vysvětlení vysoké citlivosti srdce k oxidačnímu poškození (Chen *a kol.* 1994).

3) Glutathionperoxidáza (GPX) je enzym katalyzující štěpení peroxidu vodíku a současnou oxidaci glutathionu. Aby tento enzym mohl zajišťovat plynulou likvidaci peroxidu vodíku, je třeba regenerovat oxidovaný glutathion. K tomu slouží enzym glutathionreduktáza, který využívá k redukci glutathionu pyridinový koenzym NADPH. Existuje 5 izoenzymů lišících se buněčnou lokalizací (cytozol, mitochondrie, membrány atd.). Membránová GPX je označovaná také jako fosfolipidová GPX. Na rozdíl od předchozích, redukuje nejen peroxid vodíku, ale také lipidové hydroperoxydy, které přeměňuje na hydroxylové deriváty lipidů. Přerušuje tím řetězovou reakci poškození lipidů ROS (lipoperoxidaci) a chrání tak PL buněčných membrán (Imai *a kol.* 1998).

4) Peroxiredoxin (PRX) redukuje peroxid vodíku, přičemž se sám oxiduje. Oxidovaný PRX je následně regenerován thioredoxinem a ten zase zpětně thioredoxinreduktázou využívající NADPH. PRX se řadí do velké rodiny peroxidáz a vedle jeho funkce antioxidačního enzymu je také důležitou signální molekulou v řadě buněčných procesů (Wood *a kol.* 2003 a). Jeho role je spojená s buněčnou proliferací, diferenciací a apoptózou. Participuje v signální kaskádě TNF $\alpha$  a růstových faktorů. Existuje šest izoform, které se liší svou lokalizací v buňce. Podle počtu a lokalizace katalytických cysteinů můžeme těchto 6 izoform seskupit do tří tříd. Největší třída PRX obsahuje dva aktivní a jeden rozlišovací cystein a je označovaná jako typická 2-Cys. Tyto PRX jsou homodimery obsahující dvě identická aktivní místa. Druhá třída PRX, označovaná jako atypická, má ve svém aktivním centru také dva cysteiny, ale z funkčního hlediska se jedná o monomery. Poslední třída konzervuje pouze jeden aktivní a žádný rozlišovací cystein (Choi *a kol.* 1998). Na základě experimentů využívajících genetické modifikace se systém



peroxiredoxin/thioredoxin jeví účinnější než peroxidázy GPX či kataláza (Wood *a kol.* 2003 b, Lee *a kol.* 2007).

#### *b) Neenzymové antioxidantní systémy*

Neenzymové antioxidanty inaktivují ROS tím, že je přemění na méně toxické produkty, které mohou být organizmem vylučovány (Štípek *a kol.* 2000).

1) Vitamín E stojí v první linii obrany proti peroxidaci polyneenasycených mastných kyselin (PUFA) v membránách. Je antioxidantní složkou membrán, protože jeho izoprenová jednotka je lipofilní. Při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály na hydroperoxydy, se kterými si poradí např. GPX. Peroxylové radikály tak zneškodní dříve, než mohou atakovat sousední „zdravé“ lipidy, a přerušují tak řetězovou reakci ROS.

2) Antioxidantní účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje radikály (superoxid, hydroxylový radikál, oxid dusičitý, kyselina chlorná a další). Všeobecně se usuzuje (i když to dosud nebylo zcela dokázáno *in vivo*), že askorbát regeneruje tokoferyllový radikál. Při těchto reakcích ztratí elektron a změní se na semidehydroaskorbát, který je mnohem méně reaktivní než výše jmenované radikály.

3) Vitamín A působí jako antioxidant tím, že stabilizuje volné peroxylové radikály vlivem své konjugované alkylové struktury. Účinně vychytává ROS ve tkáních při nízkém  $PO_2$  (Murray *a kol.* 2001).

4) Redukovaný glutathion (GSH), taurin a kyselina lipoová jsou součástí redoxního pufru buňky (Towsend *a kol.* 2003).

5) Transferin, laktoferin a ferritin jsou proteiny schopné vázat přechodné prvky. Tyto proteiny pevně váží např.  $Fe^{2+}$ , a tím je zbavují možnosti vstupovat do Fentonovy reakce, a eliminují tak možnost vzniku hydroxylového radikálu.

6) Ceruloplazmin obsahuje měď, která je schopna oxidovat  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$ .

7) Bilirubin přenáší radikálové reakce z membránových lipidů do vodného prostředí.

8) Kyselina močová je nejhojnějším antioxidantem plazmy.

## **4. Oxidační stres a chronická hypoxie**

Adaptace organismů na chronickou hypoxii je spojena se zvýšeným oxidačním stresem. Důkazem oxidační zátěže je lipidová peroxidace a indukce antioxidantních enzymů v různých tkáních a orgánech (Yoshikawa *a kol.* 1982, Nakanishi *a kol.* 1995, Guo

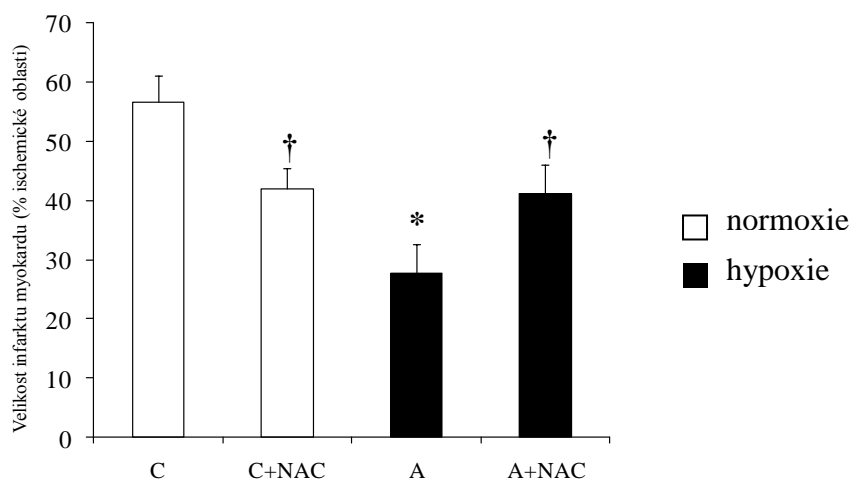
*a kol.* 2009). Pilz *a kol.* ukázali, že hypoxie vedla ke zvýšení koncentrace malondialdehydu v lidské plazmě (2000). Také další studie ukázala, že čtyřtýdenní adaptace myši na intermitentní hypoxii vede ke zvýšení malondialdehydu v játrech. Tito autoři též spekulují, že oxidační stres spojený s adaptací na chronickou hypoxii je indukován upregulací NADPH oxidázy (Jun *a kol.* 2008). Dvoutýdenní adaptace myši na intermitentní hypoxii vedla také ke zvýšení obsahu karbonylovaných proteinů, markerů proteinového poškození a zvýšení hladiny TBARS (*thiobarbituric acid-reacting substances*), jenž jsou významnými ukazateli zejména peroxidace lipidů (Park *a kol.* 2007).

Také práce naší skupiny potvrdila spojení oxidačního stresu a chronické hypoxie. Ukázali jsme, že adaptace na chronickou hypoxii vedla ke snížení poměru redukovaného a oxidovaného glutathionu (GSH/GSSG) v srdci potkana. Tento poměr je ukazatelem oslabení neenzymové antioxidační ochrany buňky. GSH je nejhojnějším redoxním pufrem buňky a už jeho samotný pokles je příznakem oxidačního stresu. Chronická hypoxie zvýšila také koncentraci srdečního „lipofuscin like pigmentu“, hnědožlutého buněčného pigmentu, jehož hromadění v buňce je důsledkem zvýšené tvorby ROS (**příloha A**) a koncentrace TBARS (nepublikovaná data). Zvýšení těchto dvou markerů je známkou lipidové peroxidace.

Je známo, že v podmínkách akutní ischemie a reperfúze má oxidační stres škodlivé účinky na myokard, ale ROS tvořené v průběhu adaptace na chronickou hypoxii se naopak podílejí na indukci kardioprotekce. Potvrzením, že ROS hrají důležitou roli v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie, byl zejména náš experiment, v němž chronické podávání antioxidantu N-acetylcysteinu (NAC) během adaptace (**příloha A**), odstranilo protektivní efekt chronické hypoxie na velikost infarktu myokardu (Obr. 2). NAC inhiboval produkci ROS, které vznikají během adaptace na chronickou hypoxii, tudíž jejich působení je pravděpodobně nezbytné k vyvolání protekce. Důkazem blokování produkce ROS byly změny na některých výše zmiňovaných indikátorech oxidačního stresu: zvýšení poměru GSH/GSSG a snížená tvorba „lipofuscin like pigmentů“ (**příloha A**). Podobné zeslabení kardioprotektivního účinku chronické hypoxie bylo pozorováno také u potkanů v situaci, kdy jim byla v hypoxické komoře zvýšena koncentrace CO<sub>2</sub>, tzv. hyperkapnie (Neckář *a kol.* 2003). I v tomto případě se jednalo o antioxidační účinek, neboť CO<sub>2</sub> je schopen reagovat s peroxynitridy, vznikajícími v průběhu adaptace reakcí NO se superoxidem, čímž pravděpodobně tlumí protektivní signalizaci chronické hypoxie (Lymar *a kol.* 1996).

Na rozdíl od experimentů, ve kterých byl oxidační stres redukován v průběhu adaptace, akutní snížení tvorby ROS v srdci během ischemie a reperfuze podáním tempolu (mimetikum superoxid dismutázy) nemělo vliv na omezení velikosti infarktu myokardu chronicky hypoxických potkanů. Akutně podaný tempol však zcela inhiboval antiarytmický efekt chronické hypoxie (Neckář *a kol.* 2003). Je známo, že hlavní příčinou vzniku reperfučních arytmií jsou právě ROS produkované po obnovení průtoku krve částí myokardu, postiženého okluzí koronární artérie (Hearse *a kol.* 1992). Szarszoi *a kol.* prokázali, že akutní podání antioxidantů melatoninu a tempolu zcela eliminovalo antiarytmický účinek chronické hypoxie, naproti tomu oba antioxidanty snížily závažnost reperfučních arytmií u normoxických srdcí potkanů (2001).

Zvýšený oxidační stres vyvolaný adaptací na chronickou hypoxii s sebou současně přináší i své negativní projevy. V systémové cirkulaci má adaptace na chronickou hypoxii vazodilatační účinky, v plicní cirkulaci má však účinky vazokonstrikční (přehled viz Moret 1980). Působením hypoxických podmínek dochází ke konstrikci plicních arteriol a k následné přestavbě jejich stěny (Herget *a kol.* 1988). Výsledkem je vznik plicní hypertenze, která ovlivňuje pravou srdeční komoru tak, že dochází k jejímu přetížení a vzniku hypertrofie (Kolář *a kol.* 1989). Adaptace vede také k morfologickým změnám myokardu včetně vzniku drobných nekrotických ložisek převážně v pravé komoře (Urbanová *a kol.* 1977). Dochází i ke změnám proteinového složení myokardu, mění se např. zastoupení jednotlivých forem kolagenu a dochází k fibróze (Pelouch *a kol.* 1997).



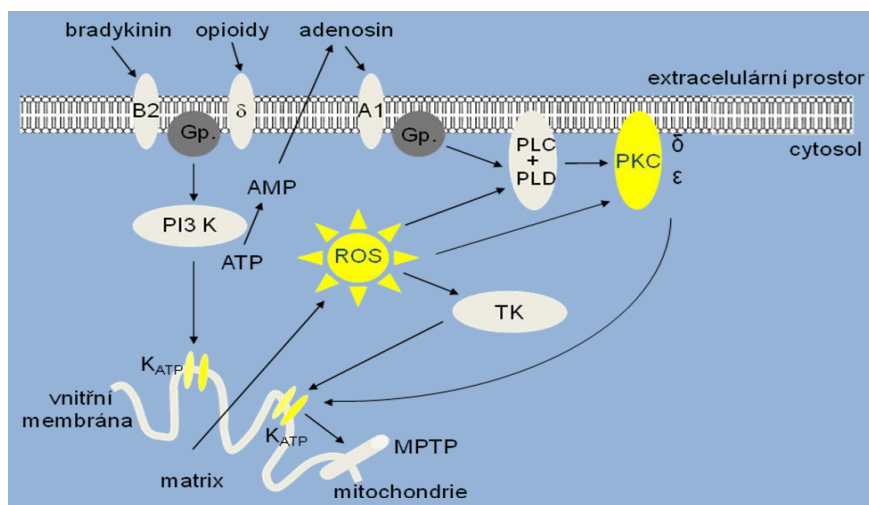
Obr. 2 *Vliv dlouhodobého podávání antioxidantu NAC (N-acetylcystein) na velikost infarktu myokardu u normoxických a chronicky hypoxických potkanů*

C, kontrola; NAC, N-acetylcystein. \* $p < 0.05$  vs. normoxická skupina; † $p < 0.05$  vs. skupina bez antioxidantu

Převzato: Příloha A

#### 4.1. Úloha ROS v signalizaci chronické hypoxie

Během posledních deseti let se ukázalo, že mnoho intracelulárních drah je regulováno ROS (Kamata *a kol.* 1999). Díky experimentům dokazujícím, že přítomnost ROS je v kardioprotekci důležitá, byl vypracován model buněčné signální dráhy, který popisuje vztahy jednotlivých molekul a buněčných struktur v signální kaskádě ischemického preconditioningu, který byl nejdříve prostudovaným krátkodobým protektivním jevem (Obr. 3). Výsledky výzkumu protektivních signálních drah preconditioningu přinesly řadu klíčových poznatků, které lze do určité míry aplikovat při studiu mechanismů kardioprotektivního působení chronické hypoxie. Je to logické, protože výsledný ochranný účinek na ischemický myokard je společným jmenovatelem obou fenoménů. Způsob aktivace pomocí ROS souvisí s přímou reakcí se specifickým receptorem a/nebo redoxní aktivací prvků signálních drah (proteinkinázy, proteinfosfatázy, transkripční faktory atd.). Ačkoliv se ukázalo, že ROS jsou zapojeny do mnoha signálních drah, zatím se nepodařilo přesně určit molekulární cíle jejich účinku (Brown *a kol.* 1999). Řada studií naznačuje, že v signální dráze protekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii mohou být zapojeny ROS, PKC,  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ , kaskáda fosfatidylinozitol-3 kináza a proteinkináza B (PI3K a PKB), oxid dusnatý (NO) a mitochondriální PT póry (MPTP, z angl. *mitochondrial permeability transition pore*).



Obr. 3 *Navržený model mechanismu kardioprotektivního účinku preconditioningu spojující tři klíčové struktury: PKC, mitoK<sub>ATP</sub> a ROS*

*PLC – fosfolipáza C, PLD – fosfolipáza D, PKC – proteinkináza C, TK – tyrosinkinázy, K<sub>ATP</sub> – mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP, ROS – reaktivní formy kyslíku, PI3K – fosfatidylinozitol-3-OH kináza, Gp. – G proteiny, MPTP – mitochondriální permeability transition pór, B2,  $\delta$ , A1 – receptory*

*Převzato a upraveno: Yellon a kol. 2003*

#### **4.1.1. ROS a PKC**

Mezi klíčové hráče v buněčné signalizaci chronické hypoxie patří PKC. PKC reprezentuje rodinu serin-threoninových kináz, které hrají důležitou roli v buněčných odpovědích, jako je např. proliferace a diferenciaci kardiomyocytů, a je zapojena v procesech vedoucích k hypertrofii a apoptóze (Sabri *a kol.* 2003, Malhotra *a kol.* 2001). Jednou z podmínek aktivace PKC je její translokace z cytozolu na buněčné membrány. Bylo identifikováno 12 izoenzymů, které se na základě své struktury a aktivátorů rozdělují do 4 skupin: klasické, nové, atypické a zvláště řazené. Mezi hlavní izoformy detekované v srdečním svalu jsou alfa, patřící do skupiny klasických a delta a epsilon, patřící mezi nové izoformy. Výsledky naší laboratoře ukázaly, že adaptace potkanů na intermitentní výškovou hypoxii vedla k nárůstu jak exprese izoform alfa a delta, tak i k jejich zvýšené translokaci z cytozolu do partikulární frakce myokardu. Podání selektivního blokátoru PKC delta, rottlerinu, významně oslabilo kardioprotektivní účinek chronické hypoxie na velikost infarktu (Neckář *a kol.* 2005). Další potenciálně kardioprotektivní izoforma PKC epsilon nebyla výškovou hypoxií ovlivněná, anebo byla dokonce snižena (Neckář *a kol.* 2005, **příloha A**). Zdá se tedy, že v myokardu dospělého potkana je antiischemický efekt chronické hypoxie alespoň zčásti zprostředkován PKC delta, o které je také známo, že se podílí v protektivní buněčné signalizaci preconditioningu vyvolaného anestetiky, opioidy nebo adenosinem (Fryer *a kol.* 2001, Kudo *a kol.* 2002, Zhao *a kol.* 2003).

PKC je regulována řadou cest a molekul jako jsou např. fosforylace, lipidy, Ca<sup>2+</sup> a v neposlední řadě také ROS (Newton *a kol.* 1997). Bylo prokázáno, že přidání peroxidu vodíku k buňkám vedlo ke zvýšení aktivity PKC (Brawn *a kol.* 1995). Ukázalo se, že peroxid vodíku vyvolává fosforylaci PKC na tyrozinu, a tím ji aktivuje (Konishi *a kol.* 1997). Jiná studie používající purifikovanou PKC odhalila, že selektivní oxidační

modifikace na amino-terminální regulační doméně, která obsahuje zinek-thiolátovou strukturu, aktivovala PKC (Gopalakrishna *a kol.* 1989). I další studie potvrdily přímou aktivaci PKC ROS (Gopalakrishna *a kol.* 2000, Konishi *a kol.* 2001). Ve shodě s těmito výsledky jsme ukázali, že indukce PKC delta během adaptace na chronickou hypoxii je závislá na oxidačním stresu, protože preventivní podávání antioxidantu NAC eliminovalo zvýšenou expresi PKC delta u chronicky hypoxických potkanů (**příloha A**). Navíc bylo ukázáno, že oxidovaný diacylglycerol (DAG) může také stimulovat aktivitu PKC (O'Brian *a kol.* 1998, Takekoshi *a kol.* 1995). Je tedy zřejmé, že PKC je podrobena komplikované buněčné redoxní regulaci zahrnující přímou redoxní regulaci, lipidovou oxidaci a tyrozinovou fosforylaci.

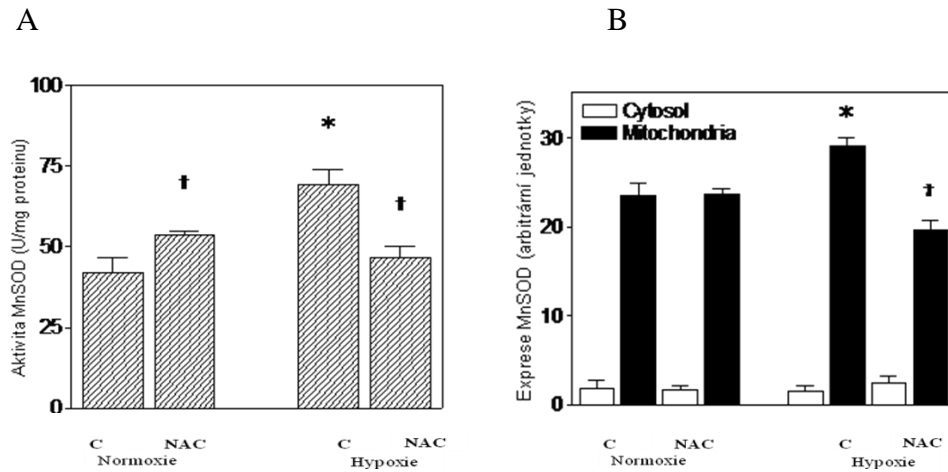
#### **4.1.2. ROS a mitoK<sub>ATP</sub>**

O klíčové úloze mitoK<sub>ATP</sub> kanálů v protekci svědčí skutečnost, že mohou být nejen mediátorem protekce (otevřené mitoK<sub>ATP</sub> kanály v ischemii zprostředkují ochranný účinek), ale také mohou protekci spouštět (přechodné otevření mitoK<sub>ATP</sub> kanálů před ischemií vyvolá ochranný účinek). Detailní vysvětlení mechanismu, k jakým dějům vede jejich otevření, je však stále na úrovni hypotéz. Jedna z představ předpokládá, že otevření mitoK<sub>ATP</sub> kanálů zvyšuje produkci ROS mitochondriemi, pravděpodobně z komplexu III dýchacího řetězce, které mají schopnost aktivovat další signální molekuly a možné koncové efekty protekce (Garlid *a kol.* 2003). Tato hypotéza byla podložena experimenty, v nichž podání antioxidantů zablokovalo kardioprotektivní účinek vyvolaný ischemickým preconditioningem nebo přímou farmakologickou aktivací mitoK<sub>ATP</sub> kanálů. Jedna z nejvíce studovaných teorií předpokládá, že otevření mitoK<sub>ATP</sub> kanálů zabrání otevření MPTP během časné reperfúze, jenž hraje klíčovou úlohu v mechanismech buněčné smrti (Halestrap *a kol.* 2009 a, b). Bylo prokázáno, že akutní podání selektivního blokátoru mitoK<sub>ATP</sub> kanálu 5-hydroxydekanoátu vedlo k úplnému zablokování protektivního účinku chronické hypoxie na velikost infarktu a zlepšenou obnovu kontraktlní funkce v myokardu dospělého potkana (Neckář *a kol.* 2002 b). Předmětem dalšího výzkumu zůstává, jaké je postavení mitoK<sub>ATP</sub> kanálů v kardioprotektivní buněčné signalizaci vyvolané chronickou hypoxií vzhledem k ostatním mediátorům. Otázky, zda PKC a ROS zprostředkovávají otevření mitoK<sub>ATP</sub> kanálů anebo stojí v signální kaskádě až

za těmito kanály nebo jaké děje otevření mitoK<sub>ATP</sub> kanálů následně vyvolává, zůstávají stále ještě nezodpovězeny.

#### **4.1.3. ROS a antioxidační enzymy**

Je známo, že zvýšená produkce ROS v průběhu adaptace na chronickou hypoxii aktivuje antioxidační systémy v různých tkáních a orgánech včetně myokardu (Yoshikawa *a kol.* 1982, Nakanishi *a kol.* 1995, Singh *a kol.* 2001, Zhu *a kol.* 2004, Guo *a kol.* 2009). Naše studie ukázala, že aktivity hlavních antioxidačních enzymů (kataláza, GPX, MnSOD) v srdečních homogenátech se po adaptaci nezměnily (**příloha A**). I když jsme žádné změny v aktivitách antioxidačních enzymů v homogenátech nepozorovali, nemůžeme vyloučit, že chronická hypoxie je mohla ovlivnit během prvních expozičních hypoxie a tento účinek vymizel, když byla zvířata již plně adaptovaná. Tuto teorii podporuje práce, která ukázala, že tvorba ROS a lipidová peroxidace probíhá jen v poměrně úzkém časovém oknu, které souvisí se stresovou událostí (Esterbauer *a kol.* 1996). Protože jsme na úrovni homogenátu, žádné změny antioxidačních enzymů nepozorovali, v další studii jsme analyzovali buněčné frakce, zejména mitochondriální. Zajímali jsme se především o jeden z nejdůležitějších antioxidačních enzymů, MnSOD. Vycházeli jsme z prací, které ukázaly, že aktivita a exprese MnSOD se zvyšuje po cvičení, hypertermii, ischemickém a farmakologickém preconditioningu (Lennon *a kol.* 2004, Hoshida *a kol.* 2002). Chen *a kol.* kromě toho ve své studii ukázali, že transgenní myši se zvýšenou expresí MnSOD měly menší infarkt myokardu (1998). Na základě výsledků těchto prací lze konstatovat, že přítomnost a správná funkce MnSOD je v srdečních buňkách kritická. Výsledky naší studie (**příloha B**) pak ukázaly, že adaptace na chronickou hypoxii vede ke zvýšení aktivity i exprese MnSOD v srdečních mitochondriích potkana. Důkazem, že ve zvýšené regulaci tohoto enzymu jsou klíčové ROS, byly výsledky experimentu s antioxidantem NAC, jehož podávání během adaptace eliminovalo jak zvýšenou aktivitu, tak i expresi MnSOD vyvolanou chronickou hypoxií (Obr. 4 A, B) (**příloha B**).

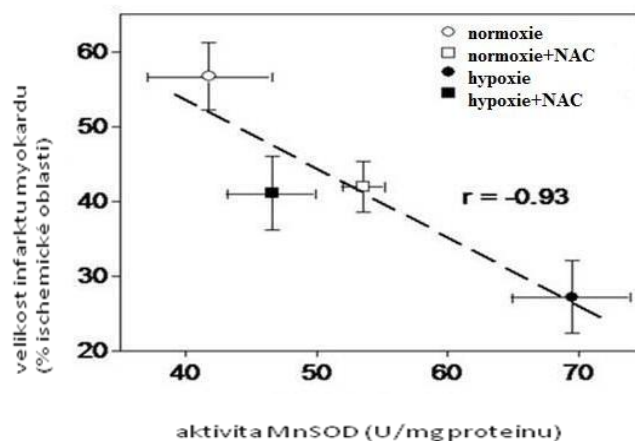


Obr. 4 Vliv dlouhodobého podávání antioxidantu (*N*-acetylcystein) na aktivitu (A) a expresi (B) MnSOD v srdečních mitochondriích a v cytozolu normoxických a chronicky hypoxických potkanů

C, kontrola; NAC, *N*-acetylcystein. \* $p < 0.05$  vs. normoxická skupina; † $p < 0.05$  vs. skupina bez antioxidantu

Převzato: příloha B

Obr. 5 demonstruje negativní korelaci mezi aktivitou MnSOD a infarktem myokardu, která naznačuje, že se tento enzym uplatňuje v mechanismu zvýšené tolerance k ischemicko-reperfúznímu poškození. Odstranění tohoto efektu antioxidantem NAC podporuje představu, že ROS hrají důležitou roli v kardioprotektivní signalizaci chronické hypoxie (příloha A, B).

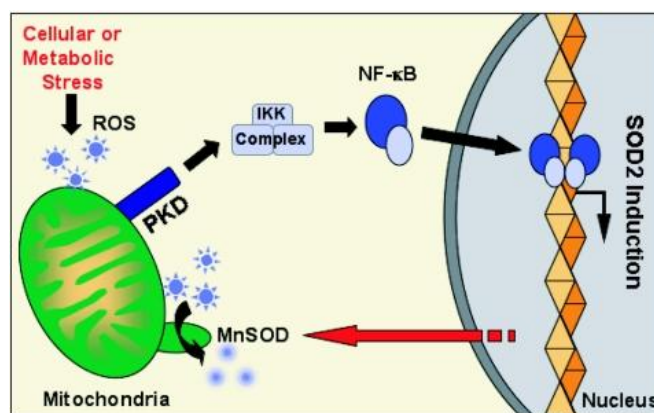




**Obr. 5 Vztah mezi aktivitou MnSOD a infarktem myokardu**

*Převzato: Příloha B*

Obecně je známo mnoho faktorů, které se podílejí na regulaci MnSOD, avšak specifická signální dráha vedoucí k indukci tohoto enzymu v srdci stále není plně objasněná. Nedávno byla navržena signální dráha spojená se zvýšenou expresí MnSOD (obr. 6), která zahrnuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B, ROS a PKD (Storz *a kol.* 2005).



**Obr. 6 Navržený model aktivace MnSOD: regulace genové exprese MnSOD**

*Převzato: Storz a kol. 2005*

Další autoři zdůrazňují úlohu cytokinů (TNF $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ ) ve zvýšené regulaci MnSOD (Masuda *a kol.* 1988, Wong *a kol.* 1988). Chronická hypoxie v souladu s touto představou zvyšuje hladinu pro-zánětlivých cytokinů ve fetálním prasečím srdci (Oh *a kol.* 2008). Také PKC delta, klíčový hráč v kardioprotekci, indukovaný chronickou hypoxií se zdá být důležitou komponentou vedoucí k syntéze MnSOD: inhibitory PKC zabránily expresi MnSOD v buněčné linii lidského adenokarcinomu (Das *a kol.* 1998). Současně byla také ukázána úzká spolupráce MnSOD a proteinů tepelného stresu (HSP) v kardioprotekci vyvolané preconditioningem (Bolli *a kol.* 2000). Zvýšená aktivita MnSOD a HSP 72 vyvolala kardioprotekci u potkanů (Suzuki *a kol.* 2002). Navíc je známo, že HSP 72 mají funkci chaperonů během zrání a transportu MnSOD do mitochondrií (Voos *a kol.* 1993).

Je známo, že MnSOD eliminuje ROS mnohem efektivněji v intaktních mitochondriích (Raha *a kol.* 2000). Proto jsme v naší práci analyzovali také další mitochondriální markery (pyruvátdehydrogenázu a cytochrom c), abychom ověřili integritu izolovaných mitochondrií po jejich izolaci. Nízké hladiny MnSOD a pyruvátdehydrogenázy, které jsme pozorovali v cytozolické frakci u všech experimentálních skupin, potvrdily dobrou kvalitu izolovaných mitochondrií. Senzitivita vnitřní mitochondriální membrány k poškození nebyla ovlivněna chronickou hypoxií ani podáváním NAC. Relativně větší podíl cytochromu c v cytozolické frakci ve srovnání s MnSOD a pyruvátdehydrogenázou v mitochondriální matrix může být pravděpodobně způsoben jeho lokalizací. Cytochrom c se nachází na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány a destrukce vnější mitochondriální membrány během homogenizace by mohla vést k jeho uvolnění do cytozolu (**příloha B**).

## **5. Lipidy a chronická hypoxie**

### ***5.1. ROS a lipidy***

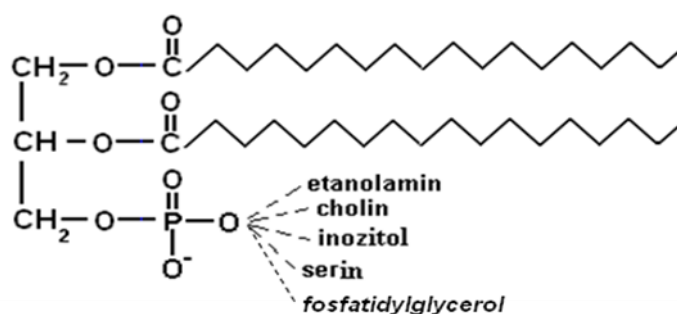
Lipidy jsou důležitou strukturní složkou buněčných membrán zajišťující řadu životně důležitých procesů. Jsou také významným cílem ROS. Proces spojený s poškozením jemné struktury a ztrátou funkčnosti biologických membrán a v ní ukotvených proteinových struktur označujeme jako lipidová peroxidace. Lipoperoxidace vedou ke vzniku toxických produktů, které následně mohou vést ke snižování membránového potenciálu, zvyšování propustnosti membrány pro ionty a nakonec až k nekrotické smrti buněk (Rice-Evans *a kol.* 1992).

Již bylo diskutováno (viz str. 17), že adaptace na chronickou hypoxii je spojená se zvýšenou tvorbou ROS, a proto se následující kapitoly budou podrobněji zabývat problematikou lipidů a chronické hypoxie a jejich vztahem k oxidačnímu stresu.

### ***5.2. Fosfolipidy v myokardu***

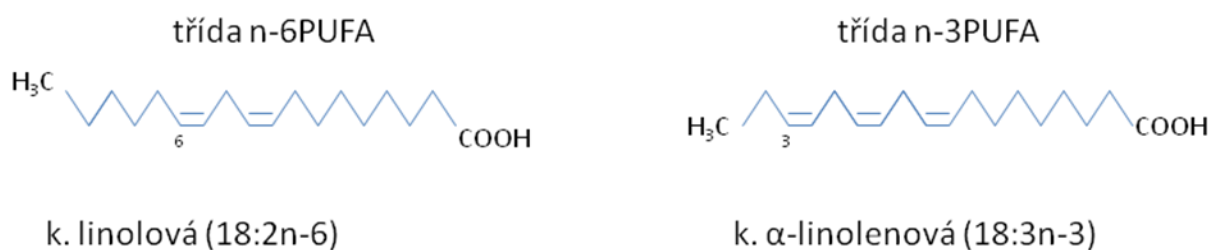
Jak již bylo řečeno, příčiny většiny patologických změn, které vedou k poškození srdce, je třeba hledat na buněčné a molekulární úrovni. V procesech jako je energetický metabolismus, transport molekul a kontraktilita hrají podstatnou roli membrány

kardiomyocytů. Funkci membrán zajišťují její základní strukturní složky, kterými jsou proteiny a lipidy. Poměr těchto složek závisí na druhu a funkci dané membrány. Vzhledem k vysokým nárokům srdeční tkáně na aerobní metabolismus jsou v srdci dospělých jedinců nejvíce zastoupené membrány mitochondriální (Page *a kol.* 1978). Lipidová složka membrán je tvořena PL, glykosfingolipidy a cholesterolem. S výjimkou sfingomyelinu patří PL mezi glycerofosfolipidy. Základ jejich molekuly tvoří glycerol, kde na pozici sn-1 a sn-2 jsou esterově vázané mastné kyseliny a na pozici sn-3 esterově vázaný zbytek kyseliny fosforečné s příslušnouází určující druh PL (Obr. 7). Zastoupení různých skupin mastných kyselin ve PL srdečních membrán významně ovlivňuje jejich permeabilitu a fluiditu (Stilwell *a kol.* 2003). PL také vytvářejí prostředí pro řadu receptorů, kanálů a enzymů a jejich složení tudíž významně ovlivňuje funkce těchto struktur. Kromě toho poskytují řadu lipidových signálních molekul, jež jsou prekurzory pro eikosanoidy nebo samy zprostředkovávají přenos signálu do buňky po stimulaci receptoru agonistou. Mastné kyseliny vázané ve PL mají obvykle sudý počet uhlíků v řetězci a většinou jsou nevětvené, nasycené nebo nenasycené. Nenasycené mastné kyseliny mohou mít v řetězci jednu dvojnou vazbu – mononenasycené (MUFA) nebo více dvojných vazeb – polynenasycené (PUFA). Většina PL má v poloze sn-1 vázaný nasycený a v poloze sn-2 nenasycený řetězec. Majoritními PL druhy membrán srdečního svalu jsou cholinové a ethanolaminové fosfoglyceridy. Významně zastoupeným PL v srdečním svalu je také difosfatidylglycerol neboli kardiolipin, PL vnitřní mitochondriální membrány (Houtkooper *a kol.* 2008, Ježková *a kol.* 2002). Protože buňky srdečního svalu obsahují velké množství mitochondrií, je jeho koncentrace v membránách myokardu ve srovnání s ostatními tkáněmi vysoká.



Obr. 7 *Struktura fosfolipidu*

PL v membránách myokardu jsou značně bohaté na PUFA. PUFA rozdělujeme podle polohy první dvojně vazby od metylového konce do dvou skupin: n-6 a n-3 (Obr. 8). Prekurzorem pro syntézu n-3 PUFA je 18:3n-3 a pro n-6 PUFA je to 18:2n-6. Tyto dvě mastné kyseliny jsou pro živočichy esenciální, je tedy nutné přijímat je v potravě. Jejich relativní zastoupení v membránách srdečních buněk není konstantní – závisí na věku, dietě, může se měnit vlivem stresu, podáváním farmak a také záleží na živočišném druhu (van der Vusse *a kol.* 1992). Naše studie ukázaly, že v celkových PL srdečního svalu potkana jsou nejvíce zastoupenými nasycenými mastnými kyselinami (SFA) 16:0 a 18:0, MUFA 18:1n-9 a 18:1n-7, n-6 PUFA 20:4n-6 a 18:2n-6, n-3 PUFA 22:6n-3 a 20:5n-3 (**příloha D**).



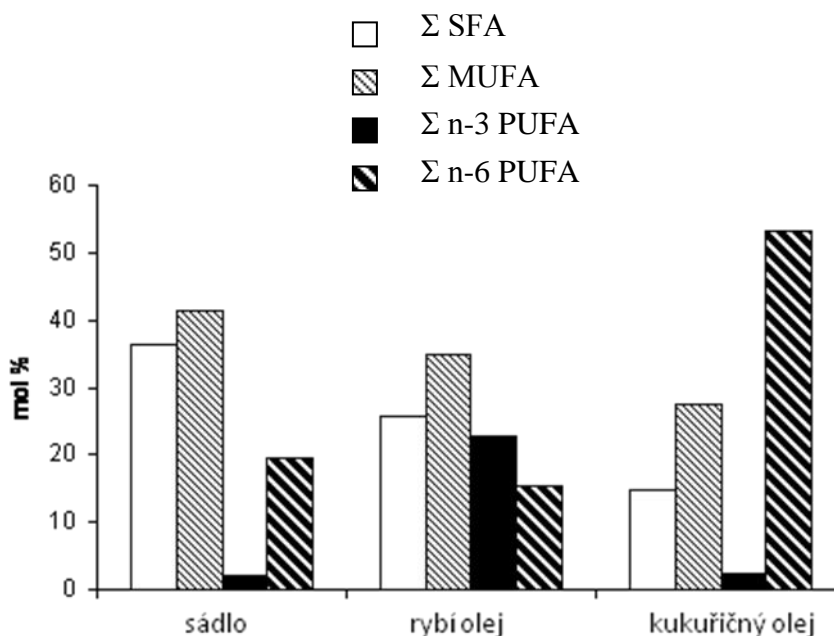
Obr. 8 *Struktura polynenasycených mastných kyselin*

### ***5.3. Vliv chronické hypoxie a lipidové diety na ischemickou toleranci srdce***

Řada experimentálních i klinických studií ukázala, že dieta s různým profilem mastných kyselin může významně ovlivnit senzitivitu myokardu k ischemicko-reperfúznímu poškození. Změny ve složení mastných kyselin v membránových PL významně ovlivňují kvalitu membrány. SFA obsažené v dietě jsou spojené se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob (Erkkilä *a kol.* 2008). MUFA a PUFA podávané dietou vykazují řadu benefičních účinků, i když jejich spojitost s nižším výskytem kardiovaskulárních chorob není v literatuře úplně jednoznačná (White 2009, Lavie *a kol.* 2009). Obě skupiny PUFA (n-3 a n-6) chrání srdce před ischemicko-reperfúzním poškozením, avšak n-3 PUFA jsou považovány za více potentní v jejich kardioprotektivním působení. K jejich nejvýznamnějším benefičním vlastnostem patří

antitrombotický a protizánětlivý účinek, dále zlepšují funkci endotelu, snižují krevní tlak, snižují hladinu cholesterolu a triacylglycerolu (TAG) v plazmě, ovlivňují inzulínovou senzitivitu, rozvoj diabetu typu 2, snižují riziko další ischemické příhody a arytmií (Din *a kol.* 2004, Bhatnagar *a kol.* 2003).

Dieta s různým podílem mastných kyselin tudíž hraje důležitou roli v prevenci a progresi srdečních onemocnění, jelikož moduluje složení sérových a tkáňových lipidů, a tím ovlivňuje metabolické a signální dráhy. Na základě těchto skutečností jsme navrhli pokus, kde bylo naším cílem, na základě dietních intervencí, měnit složení mastných kyselin v srdečních a sérových lipidech a sledovat vliv remodelace na projevy ischemicko-reperfúzního poškození (infarkt myokardu a arytmie), na redoxní rovnováhu myokardu a na expresi PKC u normoxických a chronicky hypoxických potkanů. Potkani byli krmeni beztukovou dietou obohacenou 10 % sádla (SFA), rybím olejem (n-3 PUFA) nebo kukuřičným olejem (n-6 PUFA). Obr. 9 ukazuje, že nejvíce zastoupenými mastnými kyselinami v dietě obohacené sádlem jsou SFA a MUFA (16:0 a 18:1n-9) a v dietě obohacené kukuřičným olejem je to 18:2n-6, která představovala téměř 50 % všech mastných kyselin v této dietě. Nejvíce zastoupenými n-3 PUFA v rybí dietě byly 20:5n-3 a 22:6n-3.



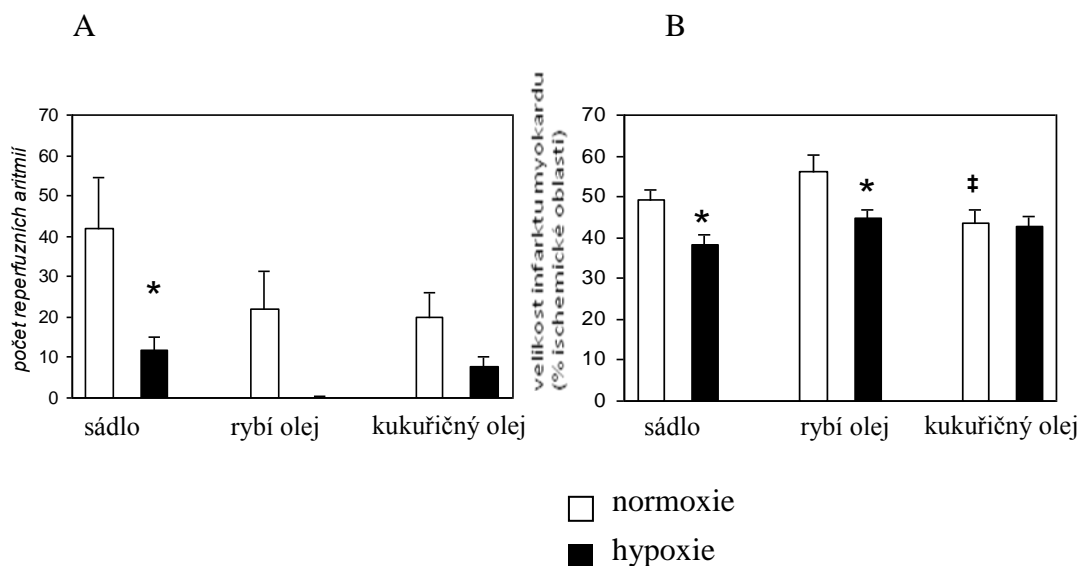
Obr. 9 Zastoupení SFA, MUFA, n-3 PUFA a n-6 PUFA v podávané dietě

Naše studie ukázala, že dieta obohacená rybím a kukuřičným olejem měla tendenci ke snížení počtu ischemických arytmií (**příloha C**), podobně jako tomu bylo u jiných studií (Pepe *a kol.* 1996, McLennan, 1993). Adaptace na chronickou hypoxii arytmiie dále snižovala u všech dietních skupin, avšak u diety obohacené rybím olejem byl antiarytmický vliv hypoxie největší: závažné komorové tachykardie a fibrilace se téměř nevyskytovaly (Obr. 10 A, **příloha C**). Tyto výsledky jsou v souladu se studii, které ukázaly, že n-3 PUFA jsou nejefektivnější v redukci ischemických (McLennan *a kol.* 1992) a reperfúzních arytmií (McLennan, 1993). N-3 PUFA zasahují příznivým způsobem do rovnováhy autonomního nervstva parasympatického nervového systému, což podstatně snižuje náchylnost myokardu ke vzniku závažných arytmií a vzniku náhlé srdeční smrti (Žák *a kol.* 2005). Vysvětlení antiarytmického efektu n-3 PUFA je pravděpodobně spojeno s jejich působením na napětově závislé sodíkové a draslíkové kanály a na vápníkové kanály typu L. Bylo ukázáno, že n-3 PUFA vedou k hyperpolarizaci membrány kardiomyocytů, zvyšují prahové napětí, které je nutné k otevření sodíkových kanálů a prodlužují relativní refrakterní periodu. Důsledkem těchto změn bylo zvýšení elektrické stability srdce a jeho odolnost k arytmogenním podnětům (Leaf *a kol.* 2003).

Dalším projevem ischemicko-reperfúzního poškození, který jsme v této studii sledovali, byla velikost infarktu myokardu. Překvapivě jsme pozorovali největší infarkt myokardu u zvířat krmených dietou obohacenou rybím olejem a naopak nejmenší u diety obohacené kukuřičným olejem (Obr. 10 B, **příloha C**). Adaptace na chronickou hypoxii významně snížila velikost infarktu myokardu u skupin zvířat krmených dietami obohacenými sádlem a rybím olejem, zatímco u zvířat s kukuřičnou dietou již nebyl zaznamenán další protektivní vliv (Obr. 10 B, **příloha C**). Zdá se, že již samotná dieta obohacená kukuřičným olejem vyvolá takovou kardioprotekci, že vliv chronické hypoxie se už neprojeví.

Výsledky studií zabývajících se vlivem PUFA diety na velikost infarktu myokardu jsou nejednoznačné. Faktorů, jež mohou způsobit rozdílná data u těchto dietních studií, je celá řada: např. věk, zvířecí druh, relativní množství n-3 a n-6 PUFA v dietě a také jak dlouho byla dieta podávána (Ahotupa *a kol.* 1993, Pepe *a kol.* 2005, Labbe *a kol.* 1991, Palozza *a kol.* 1996). Řada prací potvrdila benefiční efekt (Ogita *a kol.* 2003, Zhu *a kol.* 1994, McLennan *a kol.* 1985) a v dalších nepozorovali žádné změny na velikost infarktu myokardu po dietě bohaté na n-3 PUFA (Force *a kol.* 1989). Podobně i několik *in vitro* studií neprokázalo kardioprotektivní účinky po podávání n-3 a n-6 PUFA (Karmazyn *a kol.* 1987, Sergiel *a kol.* 1998). Naše pozorování nižší ischemické tolerance u potkanů

krmených dietou obohacenou rybím olejem podporuje pozorování Gudbjarssona *a kol.*, který ukázal, že n-3 dieta zhoršila izoprenalinem indukovanou srdeční nekrózu a mortalitu (Gudbjarsson *a kol.* 1975). Zdá se tedy, že vliv diety bohaté na PUFA, zejména n-3 PUFA, na citlivost srdce k poškození není příznivý za všech okolností, jak je obvykle předkládáno. Jednoznačně příznivý účinek n-3 PUFA na myokard neukázala ani nedávná systematická studie Hoopera *a kol.* (2006). Tato klinická studie, která shrnuje výsledky 48 randomizovaných studií, 41 kohortových studií a velkého počtu publikací ukazuje nekonzistentní a nejednoznačný efekt suplementace n-3 PUFA na kardiovaskulární mortalitu. Na základě našich pozorování můžeme říci, že rozsah ischemického poškození je významně ovlivněn lipidovou dietou a chronickou hypoxií. Dieta obohacená rybím a kukuřičným olejem měla rozdílný vliv na arytmiie a velikost infarktu myokardu (**Příloha C**).



Obr. 10 *Vliv chronické hypoxie a lipidové diety na počet reperfúzních arytmií (A) a na velikost infarktu myokardu (B) \* $p < 0.05$  vs. příslušná normoxická skupina, <sup>‡</sup> $p < 0.05$  vs. příslušná skupina s dietou obohacenou rybím olejem*

*Převzato: Příloha C*

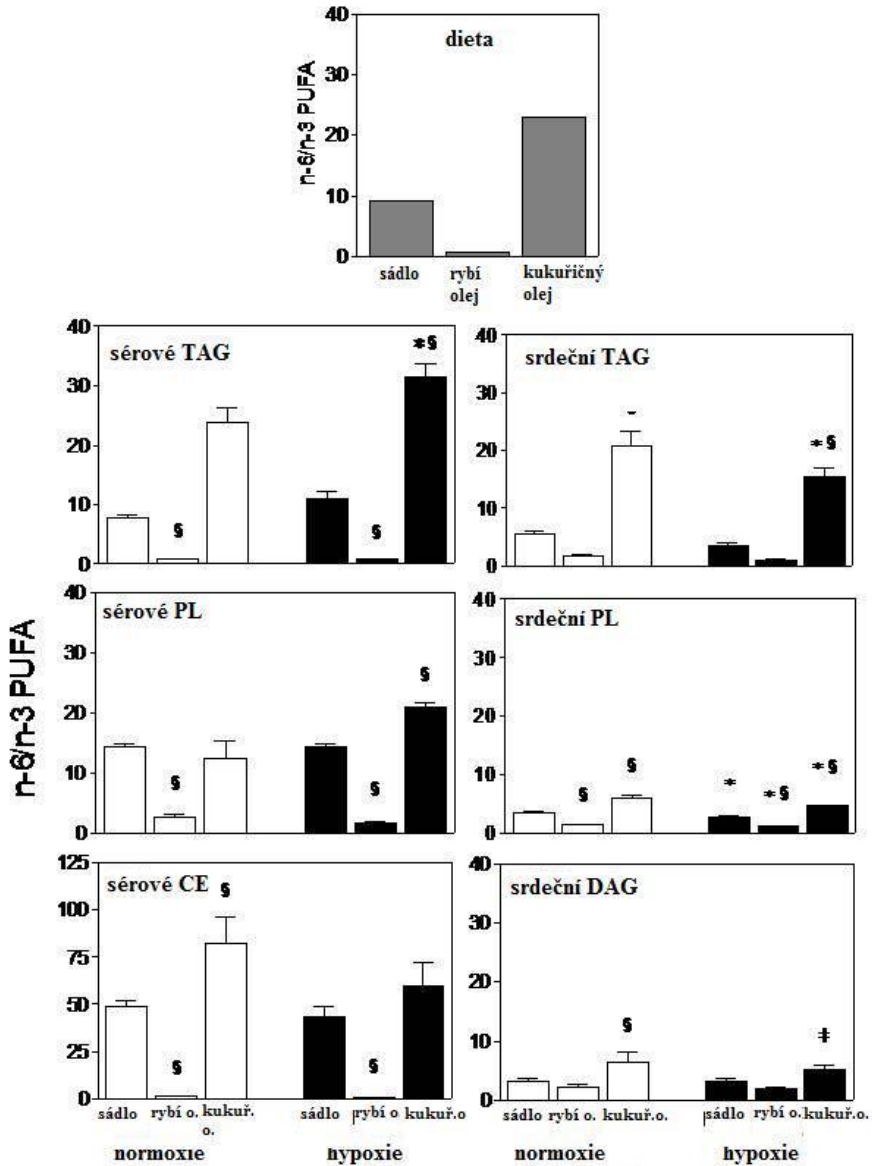
#### ***5.4. Složení mastných kyselin v sérových a srdečních lipidech: vliv chronické hypoxie a diety***

Analýzy lipidového složení srdeční tkáně byly předmětem řady prací, ale prakticky neexistovala studie, která by přinesla kompletní a detailní analýzu mastných kyselin jednotlivých druhů membránových a transportních lipidů u potkanů, kteří byli krmeni dietou obohacenou o sádlo, rybí nebo kukuřičný olej a současně byli vystaveni chronické hypoxii. V naší další studii jsme kombinovali tyto dvě systémové intervence (chronická hypoxie a lipidová dieta), ukázali jsme charakteristický profil mastných kyselin v sérových a srdečních lipidech. Dokázali jsme značnou regulační schopnost membrán udržovat stabilní prostředí, které je nezbytné pro vlastní funkce membrán a v ní ukotvených proteinů (**příloha D**).

Z naší studie vyplývá, že membrány jsou schopné udržovat relativně konstantní hladinu SFA a MUFA přijímaných dietou. Podíl n-6 a n-3 PUFA byl naproti tomu významně ovlivněn podávanou dietou. Zjistili jsme, že poměr n-6/n-3 PUFA v jednotlivých sérových a srdečních lipidech kopíruje tento poměr v dietě (Obr. 11). Tento poměr byl největší u skupin zvířat, kterým byla podávána kukuřičná dieta, a naopak nejnižší byl u rybí diety. V srdečních PL a DAG byly rozdíly v tomto poměru ve srovnání s ostatními lipidy daleko méně zřetelné.

Chronická hypoxie snížila nebo měla tendenci ke snížení tohoto poměru v důsledku zvýšeného obsahu 22:6n-3 na úkor 20:4n-6 ve všech srdečních lipidech nezávisle na dietě. Tento efekt byl nejvíce konsistentní v srdečních PL (**příloha D**).



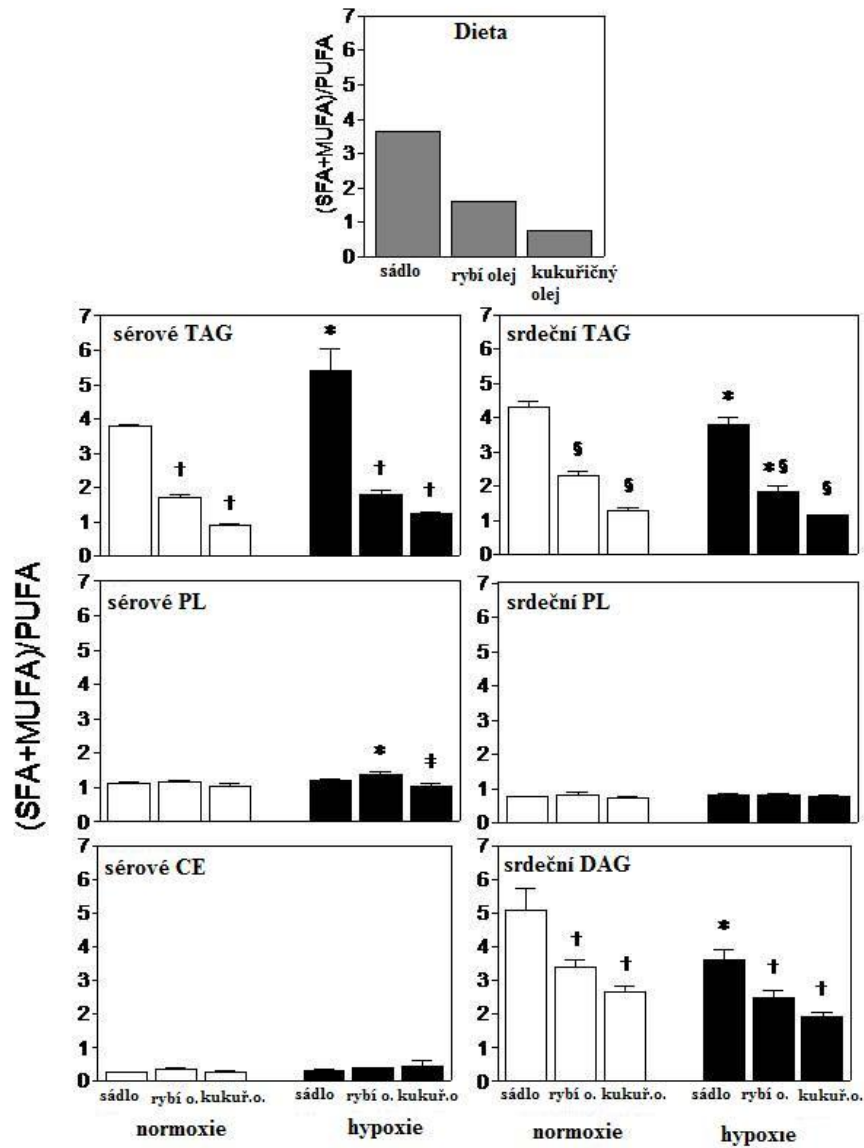


Obr. 11 Poměr n-6/n-3 PUFA v dietě, sérových TAG, PL, CE a srdečních TAG, PL, DAG u normoxických a chronicky hypoxických potkanů krměných dietou obohacenou o sádlo, rybí a kukuřičný olej \* $p < 0.05$  vs. příslušná normoxická skupina, § $p < 0.05$  vs. ostatní dietní skupiny, ‡ $p < 0.05$  vs. příslušná skupina krměná dietou obohacenou rybím olejem

Převzato: Příloha D

Poměr SFA+MUFA/PUFA v srdečních a sérových TAG a srdečních DAG reflektoval tento poměr v dietě. V sérových PL, cholesterylesterech (CE) a srdečních PL se tento poměr udržoval relativně konstantní i po adaptaci na chronickou hypoxii nebo

dietní intervenci (obr. 12). V důsledku vysokého obsahu PUFA je tento poměr podstatně nižší v sérových PL, CE a srdečních PL ve srovnání s ostatními lipidy (**Příloha D**).



Obr.12 Poměr (SFA+MUFA)/ PUFA v dietě, sérových TAG, PL, CE a srdečních TAG, PL, DAG u normoxických a chronicky hypoxických potkanů krmených dietou obohacenou o sádlo, rybí nebo kukuřičný olej \* $p < 0.05$  vs. příslušná normoxická skupina, § $p < 0.05$  vs. ostatní dietní skupiny, † $p < 0.05$  vs. příslušná skupina krmená dietou obohacenou sádlem, ‡ $p < 0.05$  vs. příslušná skupina krmená dietou obohacenou rybím olejem

Převzato: Příloha D

#### **5.4.1. Sérové a srdeční triacylglyceroly**

TAG jsou důležitým zdrojem volných mastných kyselin, které jsou degradovány  $\beta$ -oxidací, sehrávají tedy důležitou roli v metabolismu jako zdroj energie v srdci (Lopaschuk *a kol.* 1994). Získávají se buď exogenní cestou – z potravy a/nebo endogenní cestou – syntetizují se převážně v játrech, tukové tkáni a v tenkém střevě. TAG jsou v krevní cirkulaci transportovány ve formě lipoproteinů. Největší podíl TAG obsahují chylomikra a VLDL (lipoproteiny o velmi nízké hustotě) (Voet *a kol.* 1990). Chylomikra vznikají v enterocytech a zajišťují transport exogenních (tj. z potravy, ze střeva) lipidů do kapilár tukové a svalové tkáně. TAG jsou zde hydrolyticky štěpeny působením enzymu lipoproteinové lipázy a chylomikronové částice (remnants) putují do jater. VLDL jsou svým obsahem, velikostí a hustotou podobné chylomikronům. Vznikají v játrech a transportují syntetizované TAG do kapilár tukové a svalové tkáně. TAG jsou zde lipoproteinovou lipázou rozštěpeny, a dále putují krví jako zbytkové částice LDL (lipoproteiny o nízké hustotě) obsahující převážně cholesterol.

V naší studii profil mastných kyselin v sérových a srdečních TAG kopíroval dietu, což je ve shodě s tím, že analyzované vzorky byly získávány od nakrmených potkanů, to znamená, že chylomikrony byly hlavní formou cirkulujících lipoproteinů (**Příloha D**). Mastné kyseliny z chylomikrů bohatých na TAG mohou být primárním zdrojem mastných kyselin, které jsou využívány srdcem zejména postprandiálně (Augustus *a kol.* 2003). TAG jsou značně bohaté na MUFA, zejména 18:1n-9, na rozdíl od PL, kde se nacházejí převážně PUFA (**Příloha D**). Toto pozorování je konsistentní téměř u všech živočišných druhů, ptáky počínaje (Infante *a kol.* 2001) a člověkem konče (Andersson *a kol.* 1998).

#### **5.4.2. Sérové a srdeční fosfolipidy**

Důležitým atributem srdečních membránových PL je vysoký podíl PUFA ve srovnání s TAG a DAG (**Příloha D**). Tyto výsledky jsou ve shodě s prací Nikolaidise *a kol.*, kteří ukázali, že index nenasycenosti (mol % mastné kyseliny násobené počtem dvojných vazeb) PL v potkaním srdci je téměř dvakrát vyšší než u TAG (2006). Dieta obohacená rybím olejem obsahovala téměř stejný podíl 20:5n-3 a 22:6n-3, do sérových PL a CE byla ale přednostně inkorporována 20:5n-3, zatímco do srdečních PL byla inkorporována především 22:6n-3 (Rousseau *a kol.* 2003). Preferenční inkorporace

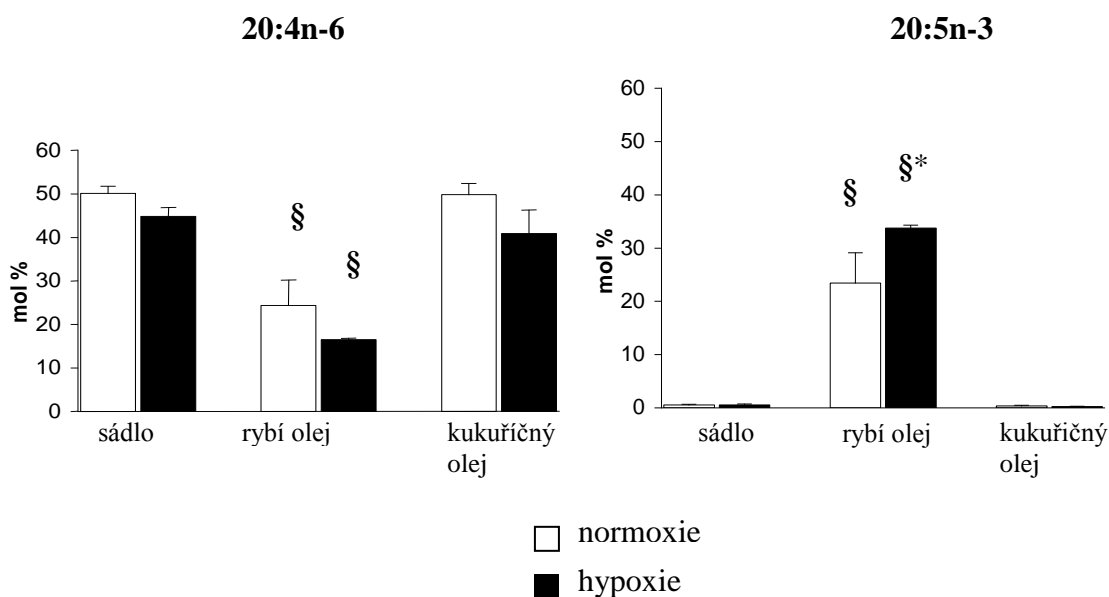
22:6n-3 do srdečních PL byla pozorována i v dalších studiích na hlodavcích (Rousseau *a kol.* 2003) a na lidech (Metcalf *a kol.* 2007). Po adaptaci na chronickou hypoxii se v srdečních PL zvyšoval podíl 22:6n-3 na úkor 20:4n-6 u potkanů krměných dietou obohacenou sádlem a kukuřičným olejem. U diety obohacené rybím olejem jsme pozorovali též kumulaci 22:6n-3, ale na úkor 18:2n-6. Je evidentní, že chronicky hypoxický myokard má tendenci udržet hladinu 20:4n-6 ve PL, která byla již snižená podáním diety obohacené rybím olejem (**Příloha D**). Podobné výsledky byly pozorovány i u zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii, krměných standartní dietou (Ježková *a kol.* 2002). Profil mastných kyselin v sérových a srdečních PL neodpovídá profilu mastných kyselin podávaných v dietě. Ve srovnání s dietou obsahují PL podstatně větší podíl 18:0 a 20:4n-6 (**Příloha D**). Bylo ukázáno, že velký podíl těchto mastných kyselin je inkorporován do PL v důsledku preferenční afinity acyltransferáz a transacyláz k těmto mastným kyselinám během remodelačního procesu spojeného se syntézou PL *de novo* v játrech potkana (Yamashita *a kol.* 1997). Remodelace mastných kyselin je realizovaná pomocí deacylačně-reacylačního cyklu, který je důležitý k udržení optimální integrity a funkce membrán (Sun GY, 1989). V tomto procesu se uplatňují čtyři enzymy: acyl CoA syntáza, acyl CoA hydroláza, acyl CoA:lysofosfolipid acyltransferáza a PLA<sub>2</sub>. Bylo ukázáno, že acyl CoA syntáza má zvýšenou afinitu pro 22:6n-3 (Bouroudian, 1990) a PLA<sub>2</sub> je v kardiomyocytech za podmínek hypoxie aktivována (Kawaguchi *a kol.* 1991, Grynberg *a kol.* 1988). Nalbene *a kol.* publikovali, že PLA<sub>2</sub> má vysokou afinitu k 20:4n-6 v sn-2 pozici membránových PL (1990). Uvolněná 20:4n-6 se pak stává substrátem pro produkci eikosanoidů (Gilroy *a kol.* 2004). Již bylo několikrát popsáno, že 20:4n-6 a 20:5n-3 vzájemně kompetují o enzymy jako jsou cyklooxygenáza, lipooxygenáza a epoxygenáza, které katalyzují syntézu různých tříd eikosanoidů lišících se svými biologickými vlastnostmi; eikosanoidy syntetizující se z 20:5n-3 jsou méně potentními mediátory zánětu, vazokonstrikce a arytmiogenních procesů než eikosanoidy vznikající z 20:4n-6 (Bagga *a kol.* 2003). PLA<sub>2</sub> i acyl CoA syntáza tak mohou přispívat ke kumulaci 22:6n-3 v srdečních PL pomocí deacylačně-reacylačního cyklu po adaptaci na chronickou hypoxii.

Změny v proporcích n-6 a n-3 PUFA v srdečních PL, které jsme pozorovali po chronické hypoxii (zvýšení 22:6n-3 ve všech dietetických skupinách a pokles 18:2n-6 ve skupině s rybí dietou) a dietní intervencí (zvýšení 22:6n-3 a snížení 20:4n-6 u rybí diety a naopak snížení 22:6n-3 u kukuřičné diety), byly podobné těm, které byly popsány u potkanů po chronickém podávání vysokých dávek katecholaminů a po dietě bohaté na n-

3 a n-6 PUFA (Benediktsdottir *a kol.* 1988). Je známo, že chronická hypoxie je spojená s přechodným zvýšením aktivity sympatického nervového systému a zvýšenou hladinou plazmatických katecholaminů (Maher *a kol.* 1975, Ošťádal *a kol.* 1984 b). To znamená, že remodelace mastných kyselin ve PL, která je indukovaná chronickou hypoxií, by mohla být vysvětlena stresově závislou hormonální modulací enzymů účastnících se tohoto procesu.

### 5.4.3. Sérové cholesterolestery

CE představují transportní formu cholesterolu v krvi, který je dodáván do srdce, jež má pro něj nízkou biosyntetickou kapacitu (Spady *a kol.* 1983, Tvrzická *a kol.* 2008). Prakticky všechny CE vznikají enzymovou aktivitou lecithin:cholesterolacyltransferázy (Lubanda *a kol.* 2009). Lecithin:cholesterol acyltransferáza je odpovědná za přenos mastné kyseliny z polohy sn-2 fosfatidylcholinu (lecitinu) na 3 $\beta$ -hydroxyskupinu cholesterolu (Holub 1987). Naše výsledky ukázaly, že téměř polovinu všech mastných kyselin v CE představuje 20:4n-6 a to u skupin zvířat, kterým byla podávána dieta obohacená sádlem a kukuřičným olejem, zatímco u potkanů na dietě obohacené rybím olejem je 50 % 20:4n-6 nahrazeno 20:5n-3 (Obr. 13, **Příloha D**). Náhrada 20:4n-6 za 20:5n-3 u rybí diety může být vysvětlena skutečností, že 20:5n-3 je preferenčním substrátem pro lecithin:cholesterol acyltransferázu, která transportuje PUFA z fosfatidylcholinu do CE (Garg *a kol.* 1989). Adaptace na chronickou hypoxii dále zvyšovala inkorporaci 20:5n-3 do CE u zvířat krmených dietou obohacenou rybím olejem. Tento efekt je dán pravděpodobně vyšší dodávkou 20:5n-3 ze sérových PL (Obr. 13).



Obr. 13 *Vliv chronické hypoxie a diety na podíl 20:4n-6 a 20:5n-3 v sérových CE*

\*  $p < 0.05$  vs. příslušná normoxická skupina, §  $p < 0.05$  vs. ostatní dietní skupiny

Převzato: Příloha D

#### **5.4.4. Srdeční diacylglyceroly a PKC**

DAG jsou centrálními molekulami glycerolipidového metabolismu, které působí jako intermediáty v biosyntéze TAG a PL (Igal *a kol.* 1996). Jsou to též důležité endogenní lipidové aktivátory PKC (Nishizuka, 1992). PKC je zapojena v signální dráze, kde je přenos signálu spojen se štěpením fosfoinozitudů a fosfatidylcholinu fosfolipázami C a D za současné produkce lipidových signálních molekul jako jsou DAG, volné mastné kyseliny nebo lyzofosfolipidy, kterými je PKC aktivovaná. Je známo, že aktivace PKC je závislá na profilu mastných kyselin v membránových PL a kvalitě a kvantitě od nich odvozených DAG (Hrelia *a kol.* 1992). Naše pozorování, že DAG obsahují velké množství SFA a MUFA a naopak malý podíl PUFA ve srovnání s ostatními lipidy bez ohledu na podávanou lipidovou dietu, je ve shodě s řadou publikací (Hamplová *a kol.* 2005, Nasa *a kol.* 1997, Murase *a kol.* 2000, Eskildsen-Helmond *a kol.* 1998). Dieta obohacená rybím olejem zvýšila podíl 22:6n-3 v srdečních DAG potkana ve srovnání s ostatními dietami. Podobný výsledek byl pozorován také u myši a psů, kterým byla podávána dieta obohacená rybím olejem (Takahashi *a kol.* 2005, Jude *a kol.* 2007). Bylo potvrzeno, že DAG obsahující 20:5n-3 a 22:6n-3 jsou méně efektivní aktivátory PKC, než DAG obsahující 20:4n-6 (Madani *a kol.* 2001). Také v další studii pozorovali menší aktivaci PKC delta a epsilon u psů, kterým byla podávána dieta obohacená rybím olejem ve srovnání se standardní dietou (Jude *a kol.* 2007). Tyto výsledky potvrzuje naše studie, kde jsme ukázali, že exprese PKC delta v partikulární frakci myokardu byla snížena u potkanů krmených dietou obohacenou rybím olejem ve srovnání se zvířaty krmenými dietou obohacenou kukuřičným olejem a sádlem (**příloha C**). Naproti tomu chronická hypoxie zvyšovala podíl 22:6n-3 v srdečních DAG u diety obohacené rybím olejem, zvyšovala expresi PKC delta a měla protektivní vliv na velikost infarktu myokardu (**příloha C**). Tato data naznačují, že změny ve složení mastných kyselin v DAG a zvýšení ischemické srdeční tolerance ve spojení s PKC jsou velmi komplexní procesy, které se liší u normoxických a chronicky hypoxických potkanů. Současně s tím adaptace na chronickou hypoxii zvýšila

nebo měla tendenci ke zvýšení 20:4n-6 v DAG u všech dietetických skupin zvířat, na rozdíl od srdečních TAG a PL, kde se podíl 20:4n-6 buď snižoval, anebo zůstal nezměněn (**Příloha D**). Skutečnost, že chronická hypoxie zvyšuje akumulaci 20:4n-6 v srdečním fosfatidylcholinu (Ježková *a kol.* 2002), nabízí vysvětlení, že fosfatidylcholin by mohl být důležitým zdrojem DAG v hypoxických podmínkách. V souvislosti s tímto předpokladem bylo již publikováno, že se DAG hydrolyzované z fosfatidylcholinu fosfolipázou D uplatňují v kardioprotekci indukované ischemickým preconditioningem (Tosaki *a kol.* 1997, Cohen *a kol.* 1996). Murase *a kol.* pozorovali, že po preconditioningu se zvýšila jak koncentrace DAG, tak i podíl 20:4n-6 v DAG, a podpořili tak tezi o účasti těchto signálních lipidů v kardioprotekci (Murase *a kol.* 2000).

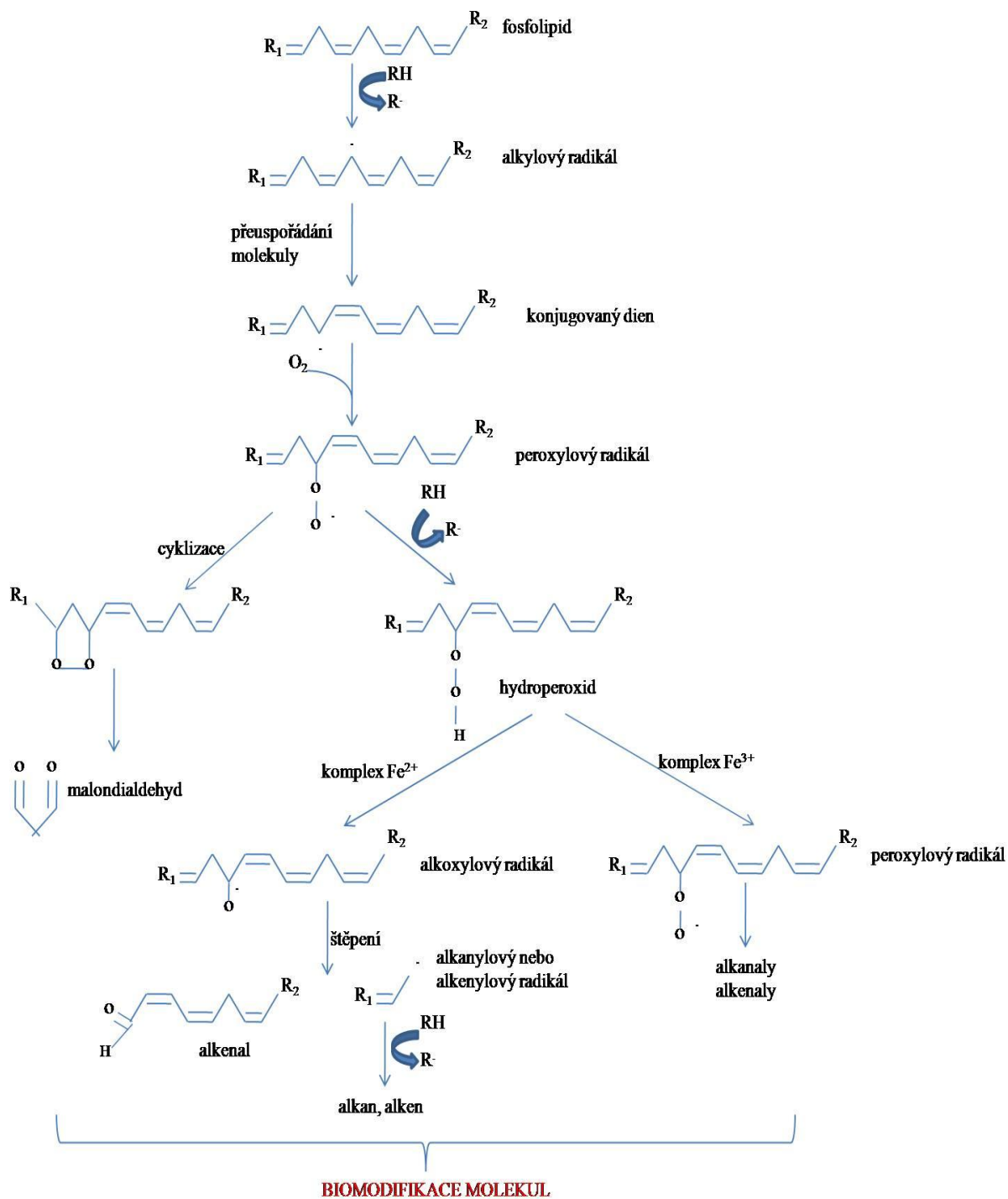
### ***5.5. Vliv chronické hypoxie a lipidové diety na redoxní rovnováhu myokardu***

Adaptace na chronickou hypoxii a dietní intervence mají systémový účinek, který vede k odlišným změnám v profilu mastných kyselin v sérových a srdečních lipidech. Důkazem značné schopnosti membrán udržet stabilní prostředí je téměř konstantní podíl SFA+MUFA a PUFA v membránových PL po adaptaci na chronickou hypoxii a dietě. Naproti tomu poměr n-6/n-3 PUFA byl ovlivněn chronickou hypoxií i různými dietami ve všech lipidových třídách. Bylo ukázáno, že zdroj a/nebo obsah lipidů v dietě ovlivňuje citlivost membrán k peroxidacím a ovlivňuje aktivitu antioxidantních enzymů (Yuan *a kol.* 2003). Na základě těchto faktů jsme si položili otázku, jak dva potenciálně kardioprotektivní fenomény, chronická hypoxie a dieta bohatá na PUFA, ovlivňují redoxní rovnováhu srdce.

Lipidová peroxidace je proces, při kterém jsou PUFA poškozovány působením ROS a kyslíku za vzniku hydroperoxidů. Z hydroperoxidů pak dalšími reakcemi vznikají následné sekundární produkty. Je třeba připomenout, že pod pojmem peroxidace lipidů se většinou uvažuje neenzymový a nekontrolovaný proces přeměny lipidů. V řadě buněk však probíhá i enzymová peroxidace lipidů, která vede k tvorbě biologicky aktivních produktů, důležitých pro regulaci buněčných pochodů (eikosanoidy). V průběhu neenzymové peroxidace lipidů (obr. 14) jsou rozlišovány 3 fáze tohoto procesu: iniciace, propagace a terminace. Pochod iniciace zahrnuje reakci, při níž je molekula mastné kyseliny atakována ROS. Největší význam se připisuje působení hydroxylového radikálu, iniciaci však v

závislosti na podmínkách mohou vyvolat i radikály jiné. Působením ROS se odtrhne atom vodíku a z mastné kyseliny se stává radikál  $L^\bullet$ . V jeho struktuře dojde po té k přeskupení dvojných vazeb a vznikne konjugovaný dien. Ten reaguje spontánně s molekulou kyslíku za vzniku lipoperoxylového radikálu  $LOO^\bullet$ . Tento radikál je rovněž velmi reaktivní a je schopen reagovat s jinou molekulou PUFA. Odštěpí z ní atom vodíku a sám se přemění na hydroperoxid LOOH. Tím je zahájena propagace, která pokračuje tak dlouho, dokud se volný radikál  $L^\bullet$  nesetká s jiným radikálem nebo molekulou antioxidantu, a nedojde tak k ukončení řetězové radikálové reakce, tzv. terminaci. Hydroperoxydy jsou pouze primárními produkty peroxidace. V následných reakcích, z nichž některé jsou opět radikálové (obr. 14), se mění na řadu dalších tzv. sekundárních produktů, jako jsou např. toxické aldehydy (malondialdehyd, 4- hydroxynonenal, 4- hydroxyhexenal, izoprostany, nízkomolekulární těkavé uhlovodíky a další). Malondialdehyd je relativně stabilní a biologicky aktivní produkt lipoperoxidace, který je v literatuře označován jako „cytotoxický sekundární posel“ (Esterbauer *a kol.* 1991, Yazdanpanah *a kol.* 1997). Tvorba některých sekundárních produktů může být ovlivněna volnými ionty kovů, zejména železa a mědi. Nejcitlivějším místem pro atak radikálu v molekule mastné kyseliny je  $-CH_2-$  skupina obklopená z obou stran dvojnou vazbou. To vysvětluje, proč především PUFA podléhají peroxidacím. Je známo, že n-3 PUFA jsou mnohem více citlivé k peroxidacím než n-6 PUFA, a to především v důsledku vysokého počtu dvojných vazeb (Scislowski *a kol.* 2005).





Obr. 14 Schéma lipidové peroxidace, vznik primárních a sekundárních produktů

Převzato a upraveno: Štípek a kol. 2000

Naše studie prokázala zvýšenou hladinu konjugovaných dienu (primární metabolické meziprodukty lipoperoxidací) v srdci po dietě obohacené rybím olejem, což je v souladu s vyšší citlivostí n-3 PUFA k oxidačnímu stresu (Corongiu *a kol.* 1994, Hendra *a kol.* 1991). Zvýšená hladina konjugovaných dienu v srdci potkanů, kterým byla podávána dieta obohacená rybím olejem, koresponduje s nálezem většího infarktu myokardu u této skupiny zvířat. Tato skupina však vykazovala nižší incidenci a závažnost komorových arytmií (**příloha C**). V souvislosti s tímto pozorováním Jude *a kol.* naznačili, že oxidační produkty 22:6n-3 mohou efektivněji chránit srdce před arytmiemi než samotná 22:6n-3 (2003). I když jsme pozorovali zvýšenou hladinu konjugovaných dienu u zvířat krmených dietou obohacenou rybím olejem, nezaznamenali jsme žádné změny v aktivitách antioxidantních enzymů (SOD, GPX, kataláza) v srdečních homogenátech. Podobně tomu bylo i ve studii Nageswari *a kol.*, kde nebyly pozorovány žádné změny aktivit antioxidantních enzymů v srdci potkana, navzdory zvýšené hladině hydroperoxidů (1999). Avšak jiná studie zase ukazuje snížení aktivity SOD, katalázy a zvýšenou aktivitu GPX v srdcích potkanů po n-3 a n-6 PUFA dietě (Diniz *a kol.* 2004). Byly pozorovány i snížené aktivity SOD a GPX v podobných experimentálních podmínkách (Schimke *a kol.* 1997). Velká variabilita a nekonzistence dostupných dat týkajících se efektů podávané lipidové diety na aktivity antioxidantních enzymů jsou dány pravděpodobně rozdílnými experimentálními modely, různým lipidovým složením diety a také množstvím podané diety.

Chronická hypoxie zvýšila aktivitu srdeční katalázy u zvířat, kterým byla podávána dieta obohacená rybím a kukuřičným olejem (**příloha D**). Oxidační stres byl pravděpodobně větší u zvířat krmených dietou obohacenou o PUFA (diety obohacené rybím a kukuřičným olejem) než u zvířat, které byly krmeny sádlovou dietou bohatou na SFA a MUFA. Také Zhu *a kol.* ukázali, že chronická hypoxie zvýšila aktivitu katalázy v srdci potkanů krmených standardní dietou (2004). Chronická hypoxie neovlivnila hladinu konjugovaných dienu u žádné z dietetických skupin. Tento nálezn může být vysvětlen tím, že konjugované dieny jsou primárním a dočasným nestabilním produktem lipoperoxidace a jejich změny se mohou projevovat v časných fázích adaptace na chronickou hypoxii. Ačkoli se aktivity SOD a GPX po adaptaci na chronickou hypoxii v srdečních homogenátech neměnily, ukázali jsme, že situace může být jiná v subcelulárních kompartmentech, konkrétně v mitochondriích. Jak již bylo výše podrobně diskutováno (viz str. 22), chronická hypoxie zvýšila aktivitu a expresi MnSOD v mitochondriální frakci. V cytozolu jsme žádné změny nezaznamenali (**příloha B**).

## **6. Shrnutí dosažených výsledků**

Studie, zahrnuté v této dizertační práci, se zabývaly úlohou lipidů a ROS v kardioprotektivním mechanismu adaptace na chronickou hypoxii.

Dosažené výsledky lze shrnout do následujících bodů:

### **1) Příloha A (Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia).**

- Adaptace na chronickou hypoxii je spojená se zvýšeným oxidačním stresem, který je důležitý v indukci endogenních kardioprotektivních mechanismů. Podávání antioxidantu NAC v průběhu adaptace vedlo k odstranění ochranného účinku chronické hypoxie na velikost infarktu myokardu.
- Adaptace na chronickou hypoxii zvýšila expresi PKC delta v myokardu levé komory ve srovnání s normoxickou skupinou. Podání NAC zvířatům vedlo k významnému poklesu exprese PKC delta v partikulární frakci, kde je enzym v aktivní formě. Zvýšená produkce ROS a zvýšená exprese PKC delta hrají důležitou roli v indukci kardioprotektivního mechanismu chronické hypoxie.

### **2) Příloha B (Up-regulation of MnSOD and cytochrome c in chronically hypoxic rat hearts is prevented by N-acetylcysteine).**

- Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje aktivitu a expresi MnSOD, důležitého antioxidantního enzymu, v srdečních mitochondriích potkana. Inhibice zvýšené aktivity a exprese MnSOD antioxidantem NAC jsou důkazem, že ve zvýšené regulaci tohoto enzymu jsou klíčové ROS.
- Korelace mezi zvýšenou aktivitou MnSOD a omezením velikosti infarktu myokardu po adaptaci na chronickou hypoxii naznačuje, že tento enzym hraje důležitou roli ve zvýšené ischemické toleranci srdce.

### **3) Příloha C (Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia).**

- Rozsah ischemického poškození je významně ovlivněn kvalitou lipidové diety a chronickou hypoxií. Diety obohacené rybím (n-3 PUFA) nebo kukuřičným olejem (n-6 PUFA) snižovaly počet ischemických arytmií v srdcích potkanů ve srovnání s dietou bohatou na sádlo (SFA). Adaptace na chronickou hypoxii dále arytmiie snižovala u všech dietních skupin, avšak u rybí diety byl protektivní vliv hypoxie největší, závažné komorové tachykardie a fibrilace se téměř nevyskytovaly. Antiarytmické účinky diety obohacené o PUFA byly aditivní.
- PUFA diety měly rozdílný vliv na velikost infarktu myokardu. Překvapivě byl pozorován největší infarkt myokardu u zvířat krmených dietou obohacenou rybím olejem a naopak nejmenší u diety obohacené kukuřičným olejem. Adaptace na chronickou hypoxii významně snížila velikost infarktu myokardu u skupin zvířat krmenými dietami obohacenými sádlem a rybím olejem, zatímco u zvířat s dietou obohacenou kukuřičným olejem nebyla zaznamenána již žádná změna.
- Exprese PKC delta v partikulární frakci myokardu byla snižena u potkanů krmených dietou obohacenou rybím olejem ve srovnání se zvířaty krmenými dietami obohacenými sádlem a kukuřičným olejem. Exprese PKC delta je ovlivněna složením mastných kyselin v membránových PL a lipidová dieta významně moduluje efekt chronické hypoxie na expresi PKC v srdci.

### **4) Příloha D (Dietary polyunsaturated fatty acids and adaptation to chronic hypoxia alter acyl composition of serum and heart lipids).**

- Chronická hypoxie a dietní intervence (diety obohacené sádlem, rybím nebo kukuřičným olejem) vedou k odlišným změnám v profilu mastných kyselin v sérových a srdečních lipidech. Membránové PL udržují konstantní podíl SFA+MUFA a celkových PUFA nezávisle na chronické hypoxii a dietě, což svědčí o značné regulační schopnosti membrán udržet stabilní prostředí pro jejich správnou funkci.

- Poměr n-6/n-3 PUFA ve všech lipidových třídách (sérové TAG, PL, CE a srdeční TAG, PL, DAG) odrážel tento poměr v dietě a to v pořadí: kukuřičná dieta>sádlo>rybí dieta. Chronická hypoxie vedla ke snížení poměru n-6/n-3 PUFA v důsledku kumulace 22:6n-3 na úkor 20:4n-6 ve všech srdečních lipidech, nezávisle na dietě.
- Lipidová dieta ovlivnila nejen membrány srdečních buněk, ale také kvalitu DAG, důležitého endogenního lipidového aktivátoru PKC.
- Dieta obohacená rybím olejem zvýšila hladinu konjugovaných dienů (primární meziproducty lipoperoxidace) v srdcích normoxických i chronicky hypoxických potkanů. Tento nálezn je v souladu s vyšší citlivostí n-3 PUFA k oxidačnímu stresu a koresponduje s nálezem většího infarktu myokardu u této skupiny zvířat. Adaptace na chronickou hypoxii zvýšila aktivitu katalázy v srdeci u skupin zvířat krmených dietami obohacenými o rybí a kukuřičný olej ve srovnání s dietou obohacenou sádlem.

#### **Příspěvek autorky k publikovaným pracím:**

**Příloha A:** aktivity antioxidantních enzymů (kataláza, GPX, celková SOD, MnSOD) v homogenátu

**Příloha B:** aktivita a exprese antioxidantních enzymů (MnSOD) v homogenátu, mitochondriích a cytozolu; exprese cytochromu c v homogenátu a cytozolu; exprese pyruvátdehydrogenázy v homogenátu a cytozolu

**Příloha C:** profil mastných kyselin v srdečních PL

**Příloha D:** profil mastných kyselin v sérových PL, TAG a CE a v srdečních PL, TAG a DAG; koncentrace konjugovaných dienů v lipidových extraktech; aktivity antioxidantních enzymů (kataláza, GPX, celková SOD, MnSOD) v homogenátu

## **7. Závěr**

Ukázali jsme, že adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje oxidační stres, který je spojený s indukci endogenní kardioprotekce. Aktivace mitochondriální MnSOD a PKC delta paralelně se zvýšenou produkcí ROS negativně koreluje se snížením velikosti infarktu myokardu. Potlačení těchto efektů antioxidantem NAC naznačuje důležitou roli ROS-dependentní signální dráhy v mechanismu kardioprotekce chronické hypoxie.

Z práce vyplývá, že jak lipidová dieta, tak chronická hypoxie vedou ke změnám ve složení mastných kyselin sérových a srdečních lipidů. Tyto změny ovlivňují kardioprotektivní adaptační odpovědi myokardu spojené se signální dráhou zahrnující ROS a PKC.

## **8. Použitá literatura**

Ahotupa M, Bereziat JC, Mantyla E, Bartsch H: Dietary fat- and phenobarbital-induced alterations in hepatic antioxidant functions of mice. *Carcinogenesis* **14**: 1225-1228, 1993.

Andersson A, Sjodin A, Olsson R, Vessby B: Effects of physical exercise on phospholipid fatty acid composition in skeletal muscle. *Am J Physiol* **274**: E432-E438, 1998.

Asemu G, Neckar J, Szarszoi O, Papousek F, Ostadal B, Kolar F: Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res* **49**: 597-606, 2000.

Asemu G, Papousek F, Ostadal B, Kolar F: Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat hearts against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial  $K_{ATP}$  channels. *J Mol Cell Cardiol* **31**: 1821-1831, 1999.

Augustus AS, Kako Y, Yagyu H: Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E331-E339, 2003.

Babior BM: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* **298**: 659-668, 1978.

Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST: Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1751-1756, 2003.

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G: Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* **22**: 111-180, 1987.

Benediktsdottir VE, Gudbjarnason S: Reversible alterations in fatty acid composition of heart muscle membrane phospholipids induced by epinephrine in rats fed different fats. *J Lipid Res* **29**: 765-772, 1988.

Berry CE, Hare JM: Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* **555**: 589-606, 2004.

Bhatnagar D, Durrington PN: Omega-3 fatty acids: their role in the prevention and treatment of atherosclerosis related risk factors and complications. *Int J Clin Pract* **57**: 305-314, 2003.

Bolli R: The late phase of preconditioning. *Circ Res* **87**: 972-983, 2000.

Bouroudian M, Nalbone G, Grynberg A: In vitro study of docosahexaenoic acid incorporation into phosphatidylcholine by enzymes of rat heart. *Mol Cell Biochem* **93**: 119-128, 1990.

Brandes RP, Kreuzer J: Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* **65**: 16-27, 2005.

Brawn MK, Chiu WJ, Leach KL: Oxidant-induced activation of protein kinase C in UC11MG cells. *Free Radical Res* **22**: 23-37, 1995.

Brown MR, Miller FJ Jr, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley, LW, Fang X, Spector AA, Weintraub NL: Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **85**: 524-533, 1999.

Burdon RH, Rice-Evans C: Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic Res Commun* **6**: 345-358, 1989.

Cohen MV, Liu Y, Liu GS: Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. *Circulation* **94**: 1713-1718, 1996.

Corongiu FP, Banni S: Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods Enzymol* **233**: 303-310, 1994.



Das KC, Guo XL, White CW: Protein kinase C delta-dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J Biol Chem* **273**: 34639-34645, 1998.

Din JN, Newby DE, Flapan AD: Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *BMJ* **328**: 30-35, 2004.

Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR: Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition* **20**: 230-234, 2004.

Doehner W, Anker SD: Xanthine oxidase inhibition for chronic heart failure: is allopurinol the next therapeutic advance in heart failure? *Heart* **91**: 707-709, 2005.

Erkkila A, de Mello VD, Riserus U, Laaksonen DE: Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. *Prog Lipid Res* **47**: 172-187, 2008.

Eskildsen-Helmond YE, Hahnel D, Reinhardt U: Phospholipid source and molecular species composition of 1,2- diacylglycerol in agonist-stimulated rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **40**: 182-190, 1998.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4- hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**: 81-128, 1991.

Fahimi HD, Kino M, Hicks L, Thorp KA, Abelman WH: Increased myocardial catalase in rats fed ethanol. *Am J Pathol* **96**: 373-390, 1979.

Fahimi HD: An assessment of the DAB methods for cytochemical detection of catalase and peroxidase. *J Histochem Cytochem* **27**: 1365-1366, 1979.

Fieschi F, Niviere V, Frier C, Decout JL, Fontecave MJ: The mechanism and substrate specificity of the NADPH:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Biol Chem* **270**: 30392-30400, 1995.

Force T, Malis CD, Guerrero JL, Varadarajan GS, Bonventre JV, Weber PC, Leaf A: n-3 fatty acids increase postischemic blood flow but do not reduce myocardial necrosis. *Am J Physiol* **257**: H1204-H1210, 1989.

Fridovich I: Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* **272**: 18515-7, 1997.

Fryer RM, Hsu AK, Gross GJ: ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. *Basic Res Cardiol* **96**: 136-42, 2001.

Garg ML, Wierzbicki AA, Thomson AB: Omega-3 fatty acids increase the arachidonic acid content of liver cholesterol ester and plasma triacylglycerol fractions in the rat. *Biochem J* **261**: 11-15, 1989.

Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P: Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* **1606**: 1-21, 2003.

George J, Struthers AD: The role of urate and xanthine oxidase in vascular oxidative stress: future directions. *Ther Clin Risk Manag* **5**: 799-803, 2009 b.

George J, Struthers AD: Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc Health Risk Manag* **5**: 265-272, 2009 a.

Gilroy DW, Newson J, Sawmynaden P, Willoughby DA, Croxtall JD: A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB J* **18**: 489-498, 2004.

Gopalakrishna R, Anderson WB: Ca<sup>2+</sup>- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U SA* **86**: 6758-6762, 1989.

Gopalakrishna R, Jaken S: Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **28**: 1349-1361, 2000.

Grynberg A, Nalbone G, Degois M: Activities of some enzymes of phospholipid metabolism in cultured rat ventricular myocytes in normoxic and hypoxic conditions. *Biochim Biophys Acta* **958**: 24-30, 1988.

Gudbjarnason S, Oskarsdottir G: Changes in fatty acid composition of cardiac lipids accompanying myocardial necrosis. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* **6**: 193–203, 1975.

Guo HC, Zhang Z, Zhang LN, Xiong C, Feng C, Liu Q, Liu X, Shi XL, Wang YL: Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects the heart against ischemia/reperfusion injury through upregulation of antioxidant enzymes in adult guinea pigs. *Acta Pharmacol Sin* **30**: 947-955, 2009.

Halestrap AP, Pasdois P: The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 1402-1415, 2009 a.

Halestrap AP: What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* **46**: 821-831, 2009 b.

Hamplova B, Novakova O, Tvrzicka E: Protein kinase C activity and isoform expression during early postnatal development of rat myocardium. *Cell Biochem Biophys* **43**: 105-117, 2005.

Hearse DJ, Bolli R: Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res* **26**: 101-108, 1992.

Hendra TJ, Wickens DG, Dormandy TL: Platelet function and conjugated diene concentrations in diabetic and non-diabetic survivors of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **25**: 676-683, 1991.

Herget J: Mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Pneumonol Pol* **56**: 89-93. 1988.

Holub BJ, Bakker DJ, Skaeff CM: Alterations in molecular species of cholesterol esters formed via plasma lecithin-cholesterol acyltransferase in human subjects consuming fish oil. *Atherosclerosis* **66**: 11-18, 1987.

Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Ness AR, Moore HJ, Worthington HV, Durrington PN, Higgins JP, Capps NE, Riemersma RA, Ebrahim SB, Davey Smith G: Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. *BMJ* **332**: 752-760, 2006.

Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, Hori M: The importance of manganese superoxide dismutase in delayed preconditioning: involvement of reactive oxygen species and cytokines. *Cardiovasc Res* **55**: 495-505, 2002.

Houtkooper RH, Vaz FM: Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2493-2506, 2008.

Hrelia S, Biagi PL, Turchetto E, Rossi CA, Bordoni A: Protein kinase C activity in neonatal cultured rat cardiomyocytes supplemented with docosahexaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **183**: 893-898, 1992.

Hurtado A: Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med* **53**: 247-258, 1960.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ: Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**: 36027-36031, 2003.

Chen Y, Saari JT, Kang YJ: Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats. *Free Radic Biol Med* **17**: 529-536, 1994.

Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC Hamdy RC Chua BH: Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Mol Cell Cardiol* **30**: 2281-2289, 1998.

Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE: Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* **5**: 400-406, 1998.

Igal RA, Coleman RA: Acylglycerol recycling from triacylglycerol to phospholipid, not lipase activity, is defective in neutral lipid storage disease fibroblasts. *J Biol Chem* **271**: 16644-16651, 1996.

Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y: Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* **273**: 1990-1997, 1998.

Infante JP, Kirwan RC, Brenna T: High levels of docosahexaenoic acid (22:6n-3)-containing phospholipids in high-frequency contraction muscles of hummingbirds and rattlesnakes. *Comp Biochem Physiol B* **130**: 291-298, 2001.

Jezek P, Hlavata L: Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2478-2503, 2005.

Jezkova J, Novakova O, Kolar F: Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Mol Cell Biochem* **232**: 49-56, 2002.

Jin ZQ, Zhou HZ, Cecchini G, Gray MO, Karliner JS: MnSOD in mouse heart: acute responses to ischemic preconditioning and ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H2986-H2994, 2005.

Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Béguin P, Godin-Ribuot D, Ribouot C, Launois SH, Bessard G, Levy P: Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol* **98**: 1691-1696, 2005.

Jude S, Bedut S, Roger S: Peroxidation of docosahexaenoic acid is responsible for its effects on I TO and I SS in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* **139**: 816-822, 2003.

Jude S, Martel E, Vincent F: Dietary long-chain n-3 fatty acids modify blood and cardiac phospholipids and reduce protein kinase-C-delta and protein kinase-C-epsilon translocation. *Br J Nutr* **98**: 1143-1151, 2007.

Jun J, Savransky V, Nanayakkara A, Bevans S, Li J, Smith PL, Polotsky VY: Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**: R1274-R1281, 2008.

Kamata H, Hirata H: Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**: 1-14, 1999.

Karmazyn M, Horackova M, Murphy MG: Effects of dietary cod liver oil on fatty-acid composition and calcium transport in isolated adult rat ventricular myocytes and on the response of isolated hearts to ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* **65**: 201-209, 1987.

Kawaguchi H, Shoki M, Iizuka K: Phospholipid metabolism and prostacyclin synthesis in hypoxic myocytes. *Biochim Biophys Acta* **1094**: 161-167, 1991.

Kolar F, Ostadal B, Prochazka J, Pelouch V, Widimsky J: Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration* **56**: 57-62, 1989.

Kolar F, Ostadal B: Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* **53**: S3-S13, 2004.

Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y: Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11233-11237, 1997.

Konishi H, Yamauchi E, Taniguchi H, Yamamoto T, Matsuzaki H, Takemura Y, Ohmae K, Kikkawa U, Nishizuka Y: Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6587-6592, 2001.

- Kopecky M, Daum S: Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium. *Cs Fyziol* **7**: 518-521, 1958.
- Kudo M, Wang Y, Xu M, Ayub A, Ashraf M: Adenosine A(1) receptor mediates late preconditioning via activation of PKC-delta signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H296-H301, 2002.
- L'Abbe MR, Trick KD, Beare-Rogers JL: Dietary (n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation. *J Nutr* **121**: 1331-1340, 1991.
- Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HOJ: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Am Coll Cardiol* **54**: 585-594, 2009.
- Leaf A, Xiao YF, Kang JX, Billman GE: Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Ther* **98**: 355-377, 2003.
- Lee CK, Kim HJ, Lee YR, So HH, Park HJ, Won KJ, Park T, Lee KY, Lee HM, Kim B: Analysis of peroxiredoxin decreasing oxidative stress in hypertensive aortic smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 848-855, 2007.
- Lennon SL, Quindry JC, Hamilton KL, French JP, Hughes J, Mehta JL, Powers SK: Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: H975-H980, 2004.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* **11**: 376-381, 1995.
- Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schönekeess BO: Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1213**: 263-276, 1994.

- Lubanda H, Vecka M: Cholesterol- pritel ci nepritel ? *Chem. Listy* **103**: 40-51, 2009.
- Lymar SV, Hurst JK: Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant? *Chem Res Toxicol* **9**: 845-850, 1996.
- Madani S, Hichami A, Legrand A: Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *Faseb J* **15**: 2595-2601, 2001.
- Maher JT, Manchanda SC, Cymerman A: Cardiovascular responsiveness to beta-adrenergic stimulation and blockade in chronic hypoxia. *Am J Physiol* **228**: 477-481, 1975.
- Malhotra A, Kang BP, Opawumi D, Belizaire W, Meggs LG: Molecular biology of protein kinase C signaling in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* **225**: 97-107, 2001.
- Masuda A, Longo DL, Kobayashi Y, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K: Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J* **15**: 3087-3091, 1988.
- McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055, 1969.
- McGrath JJ, Prochazka J, Pelouch V, Ostadal B: Physiological response of rats to intermittent high altitude stress: effect of age. *J Appl Physiol* **34**: 289-293, 1973.
- McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS: Influence of dietary lipids on arrhythmias and infarction after coronary artery ligation in rats. *Can J Physiol Pharmacol* **63**: 1411-1417, 1985.
- McLennan PL, Barnden LR, Bridle TM, Abeywardena MY, Charnock JS: Dietary fat modulation of left ventricular ejection fraction in the marmoset due to enhanced filling. *Cardiovasc Res* **26**: 871-877, 1992.
- McLennan PL: Relative effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats. *Am J Clin Nutr* **57**: 207-212, 1993.



Meerson FZ, Gomazkov GA, Shimkovich MV: Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol* **31**: 30-34, 1973.

Meerson FZ, Ustinova EE, Manukhina EB: Prevention of cardiac arrhythmias by adaptation: regulatory mechanisms and cardiotropic effect. *Biomed Biochim Acta* **48**: 583-588, 1989.

Meerson FZ, Ustinova EE, Orlova EH: Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Clin Cardiol* **10**: 783-789, 1987.

Metcalf RG, James MJ, Gibson RA, Edwards JR, Stubberfield J, Stuklis R, Roberts-Thomson K, Young GD, Cleland LG: Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* **85**: 1222-1228, 2007.

Moret PR: Hypoxia and the heart. V knize: Hearts and Heart-like Organs, Bourne G. H. ed, Academic Press, New York, str. 333-387, 1980.

Murase K, Okumura K, Hayashi K: Measurements of 1,2-diacylglycerol and ceramide in hearts subjected to ischemic preconditioning. *Life Sci* **66**: 1491-1500, 2000.

Murray RK: Harperova Biochemie. 3. vyd. Jinočany: H & H, ISBN 80-7319-003-6, 2001.

Nageswari K, Banerjee R, Menon VP: Effect of saturated, omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on myocardial infarction. *J Nutr Biochem* **10**: 338-344, 1999.

Nakanishi K, Tajima F, Nakamura A, Yagura S, Ookawara T, Yamashita H, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H: Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol* **489**: 869-876, 1995.

Nalbone G, Grynberg A, Chevalier A: Phospholipase A activity of cultured rat ventricular myocyte is affected by the nature of cellular polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **25**: 301-306, 1990.

Nasa Y, Sakamoto Y, Sanbe A: Changes in fatty acid compositions of myocardial lipids in rats with heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* **176**: 179-189, 1997.

Neckar J, Markova I, Novak F, Novakova O, Szarszoi O, Ostadal B, Kolar F. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC isoform  $\delta$  in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H1566-H1572, 2005.

Neckar J, Papousek F, Novakova O, Ostadal B, Kolar F: Cardioprotective effects of chronic hypoxia and preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol* **97**: 161-167, 2002 a.

Neckar J, Szarszoi O, Herget J, Ostadal B, Kolar F: Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiol Res* **52**: 171-175, 2003.

Neckar J, Szarszoi O, Koten L, Papousek F, Ostadal B, Grover GJ, Kolar F: Effects of mitochondrial K (ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* **55**: 567-75, 2002 b.

Neckar J, Ostadal B, Kolar F: Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res* **53**: 621-628, 2004.

Newton AC: Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 161-167, 1997.

Nikolaidis MG, Petridou A, Mougios V: Comparison of the phospholipid and triacylglycerol fatty acid profile of rat serum, skeletal muscle and heart. *Physiol Res* **55**: 259-265, 2006.

Nishizuka Y: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-614, 1992.

Nose K: Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol Pharm Bull* **23**: 897-903, 2000.

O'Brian CA: Protein kinase C-alpha: a novel target for the therapy of androgen-independent prostate cancer? *Oncol Rep* **5**: 305-309, 1998.

Ogita H, Node K, Asanuma H, Sanada S, Takashima S, Minamino T, Soma M, Kim J, Hori M, Kitakaze MJ: Eicosapentaenoic acid reduces myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rabbit hearts. *Cardiovasc Pharmacol* **41**: 964-969, 2003.

Oh C, Dong Y, Liu H, Thompson LP: Intrauterine hypoxia upregulates proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in fetal guinea pig hearts. *Am J Obstet Gynecol* **199**: 6, 2008.

Ostadal B, Kolar F, Pelouch V, Prochazka J, Widimsky J: Intermittent high altitude and cardiopulmonary system. V knize: The adapted heart. (Nagano M., Takeda N, Dhalla, NS, ed.), Raven Press, New York, str. 173-182, 1994.

Ostadal B, Kolar F: Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol* **30**: 224-236, 2007.

Ostadal B, Kvetnansky R, Prochazka J: Effect of intermittent high altitude stress on epinephrine and norepinephrine levels in the right and left ventricular myocardium of rats. In: *Role of Catecholamines and Other Neurotransmitters Under Stress*, pp. 669-674 [Usdin E, Kvetnansky R, Kopin IJ, editors]. New York, USA: The Gordon and Breach, 1984 b.

Ostadal B, Ostadalova I, Dhalla NS: Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* **79**: 635-659, 1999.

Ostadal B, Prochazka J, Pelouch V, Urbanova D, Widimsky J: Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov* **33**: 129-138, 1984 a.

Page E: Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology. *Am J Physiol* **235**: C147-158, 1978.

Palozza P, Sgarlata E, Luberto C, Piccioni E, Anti M, Marra G, Armelao F, Franceschelli P, Bartoli GM: n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am J Clin Nutr* **64**: 297–304, 1996.

Park AM, Suzuki YJ: Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol* **102**: 1806-1814, 2007.

Pelouch V, Kolar F, Ostadal B, Milerova M, Cihak R, Widimsky J: Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and fibrosis: effect of enalapril. *Cardiovasc Drugs Ther* **11**: 177-185, 1997.

Pepe S, McLennan PL: Dietary fish oil confers direct antiarrhythmic properties on the myocardium of rats. *J Nutr* **126**: 34-42, 1996.

Pepe S: Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on age-related changes in cardiac mitochondrial membranes. *Exp Gerontol* **40**: 751-758, 2005.

Pilz J, Meineke I, Gleiter CH: Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4- dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **742**: 315-325, 2000.

Poupa O, Krofta K, Prochazka J, Turek Z: Acclimatization to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc* **25**: 1243-1246, 1966.

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA: Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* **266**: 22028-22034, 1991.

Raha S, McEachern GE, Myint AT, Robinson BH: Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* **29**: 170-180, 2000.

Rice-Evans C, Bruckdorfer KR: Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Mol Aspects Med* **13**: 1-11, 1992.

Richard VJ, Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial reperfusion: therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol* **4**: 85-103, 1990.

Rousseau D, Helies-Toussaint C, Moreau D: Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**: H1294-H1302, 2003.

Sabri A, Steinberg SF: Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. *Mol Cell Biochem* **251**: 97-101, 2003.

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J: Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* **11**: 173-86. 2001.

Scislowski V, Bauchart D, Gruffat D: Effects of dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids protected or not against ruminal hydrogenation on plasma lipids and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. *J Anim Sci* **83**: 2162-2174, 2005.

Sergiel JP, Martine L, Raederstorff D, Grynberg A, Demaison L: Individual effects of dietary EPA and DHA on the functioning of the isolated working rat heart. *Can J Physiol Pharmacol* **76**: 728-736, 1998.

Schimke I, Haberland A, Wirth M: Influence of long-term supplementation with alpha-linolenic acid on myocardial lipid peroxidation and antioxidative capacity in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **57**: 545-550, 1997.

Singh RP, Banerjee S, Rao AR: Effect of *Aegle marmelos* on biotransformation enzyme systems and protection against free-radical-mediated damage in mice. *J Pharm Pharmacol* **52**: 991-1000, 2000.

Spady DK, Dietschy JM: Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the monkey, quinea pig, rabbit, hamster, and rat. *J Lipid Res* **24**: 303-315, 1983.

Starkov AA: The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1147**: 37-52, 2008.

Stillwell W, Wassall SR: Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* **126**: 1-27, 2003.

Stipek S: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, ISBN 80-7169-704-4, 2000.

Storz H, Döppler A, Toker: Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* **19**: 8520-8530, 2005.

Sun GY, MacQuarrie RA: Deacylation-reacylation of arachidonoyl groups in cerebral phospholipids. *Ann N Y Acad Sci* **559**: 37-55, 1989.

Suzuki K, Murtuza B, Sammut IA, Latif N, Jayakumar J, Smolenski RT, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Yacoub MH: Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation* **106**: I270-I276, 2002.

Szarszoi O, Asemu G, Ostadal B, Kolar F: Cardioprotection by chronic hypoxia: role of nitric oxide. *Physiol Res* **51**: 69P, 2002.

Szarszoi O, Asemu G, Vanecek J, Ostaddal B, Kolar F: Effects of melatonin on ischemia and reperfusion injury of the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* **15**: 251-257, 2001.

Takahashi R, Okumura K, Asai T: Dietary fish oil attenuates cardiac hypertrophy in lipotoxic cardiomyopathy due to systemic carnitine deficiency. *Cardiovasc Res* **68**: 213-223, 2005.

Takekoshi S, Kambayashi Y, Nagata H, Takagi T, Yamamoto Y, Watanabe K: Activation of protein kinase C by oxidized diacylglycerols. *Biochem Biophys Res Commun* **217**: 654-660, 1995.

Tosaki A, Maulik N, Cordis G: Ischemic preconditioning triggers phospholipase D signaling in rat heart. *Am J Physiol* **273**, H1860-H1866, 1997.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H: The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* **57**: 145-155, 2003.

Turek Z, Kubat K, Ringalda BEM: Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude. *Basic Res Cardiol* **75**: 544-553, 1980.

Tvrzicka E, Stankova P, Vecka M, Zak A: Mastné kyseliny. *Atherosklerosa, diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku* ISBN: 978-80-254-2834-4, S14-S37, 2008.

Urbanova D, Pelouch V, Ostadal B, Widimsky J, Ressler J, Prochazka J: The development of myocardial changes during intermittent high altitude hypoxia in rats. *Cor Vasa* **19**: 246-250, 1977.

van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, Reneman RS: Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* **72**: 881-940, 1992.

Voet D, Voet JG: Biochemie. 1. vyd. Praha: Victoria publishing, ISBN 80-85605-44-9, 1990.

Voos W, Gambill BD, Guiard B, Pfanner N, Craig EA: Presequence and mature part of preproteins strongly influence the dependence of mitochondrial protein import on heat shock protein 70 in the matrix. *J Cell Biol* **123**: 119-126, 1993.

White B: Dietary fatty acids. *Am Fam Physician* **80**: 345-350, 2009.

Widimsky J, Urbanova D, Ressel J, Ostadal B, Pelouch V, Prochazka J: Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res* **7**: 798-808, 1973.

Wispe JR, Clark JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR, Whitsett JA: Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* **994**: 30-36, 1989.

Wong GHW, Goeddel DV: Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* **242**: 941-944, 1988.

Wood ZA, Poole LB, Karplus PA: Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**: 650-653, 2003a.

Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB: Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**: 32-40, 2003 b.

Xie Y, Zhu WZ, Zhu Y, Chen L, Zhou ZN, Yang HT: Intermittent high altitude hypoxia protects the heart against lethal Ca<sup>2+</sup> overload injury. *Life Sci* **76**: 559-572, 2004.

Yamashita A, Sugiura T, Waku K: Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J Biochem* **122**: 1-16, 1997.

Yazdanpanah M, Luo X, Lau R, Greenberg M, Fisher LJ, Lehotay DC: Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer. *Free Radic Biol Med* **23**: 870-878, 1997.

Yellon DM, Downey JM: Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* **83**: 1113-1151, 2003.

Yokota S, Asayama K: Proliferation of myocardial peroxisomes in experimental rat diabetes: a biochemical and immunocytochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **63**: 43-49, 1992.



- Yoshikawa T, Furukawa Y, Wakamatsu Y, Takemura S, Tanaka H, Kondo M: Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats. *Biochem Med* **27**: 207-213, 1982.
- Youngson C, Nurse C, Yeger H, Cutz E: Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature* **365**: 153-155, 1993.
- Yuan YV, Kitts DD: Dietary (n-3) fat and cholesterol alter tissue antioxidant enzymes and susceptibility to oxidation in SHR and WKY rats. *J Nutr* **133**: 679-88, 2003.
- Zhao TC, Kukreja RC: Protein kinase C-delta mediates adenosine A3 receptor-induced delayed cardioprotection in mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**: H434-441, 2003.
- Zhang YS, Du JZ: The response of growth hormone and prolactin of rats to hypoxia. *Neurosci Lett* **279**: 137-140, 2000.
- Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, Yan T, Domann FE, St. Clair DK: Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells. *Cell Growth Differ* **7**: 1175-1186, 1996.
- Zhou Z, Kang YJ: Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. *J Histochem Cytochem* **48**: 585-594, 2000.
- Zhu B, Min S, Long C, Ye T: Ischemic preconditioning in immature hearts: mechanism and compatibility with cardioplegia. *Chin Med J (Engl)*: **116**: 253-257, 2003.
- Zhu BQ, Sievers RE, Sun YP, Morse-Fisher N, Parmley WW, Wolfe CL: Is the reduction of myocardial infarct size by dietary fish oil the result of altered platelet function? *Am Heart J* **127**: 744-755, 1994.
- Zhu WZ, Dong JW, Ding HL: Postnatal development in intermittent hypoxia enhances resistance to myocardial ischemia/reperfusion in male rats. *Eur J Appl Physiol* **91**: 716-722, 2004.

Zong P, Setty S, Sun W, Martinez R, Tune JD, Ehrenburg IV, Tkatchouk EN, Mallet RT, Downey HF: Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction. *Exp Biol Med* **229**: 806-812, 2004.

Zak A, Tvrzicka E, Zeman M, Vecka M: Pathophysiology of and clinical significance of polyunsaturated fatty acids n-3 family. *Cas Lek Cesk* **1**: 6-18. 2005.

## **10. Přílohy A-D**