

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Charles University  
Faculty of Science



Autoreferát disertační práce  
Summary of the doctoral thesis

**ÚLOHA ENERGETICKÉHO METABOLISMU V KARDIOPROTEKCI  
INDUKOVANÉ ADAPTACÍ NA CHRONICKOU HYPOXII**

**THE ROLE OF ENERGY METABOLISM IN CARDIOPROTECTION  
INDUCED BY THE ADAPTATION TO CHRONIC HYPOXIA**

**Mgr. David KOLÁŘ**

Praha, 2018

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
**Doctoral study programmes in biomedicine**

*Univerzita Karlova*  
*a Akademie věd České republiky*

*Charles University*  
*and Czech Academy of Sciences*

Program: Fyziologie živočichů  
Programme: Animal Physiology

Předseda oborové rady/Committee Chairman:  
doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště:  
Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie

Workplace:  
Charles University, Faculty of Science, Department of Physiology

Autor/Author: Mgr. David Kolář

Školitel/Supervisor: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

The full text of the thesis is available in the relevant libraries of the Faculty of Science of Charles University.

## Abstrakt:

Energetický metabolismus srdce představuje jeden z nejkompexnějších systémů těla vůbec. Metabolismus odráží pre- a post-natální ultrastrukturální srdeční vývoj, ale také patofyziologické stavy. Míra mortality a morbidity kardiovaskulárních onemocnění je jedna z nejvyšších, především pak u ischemicko-reperfučního (I/R) poškození a infarktu myokardu. Jednou z dobře popsaných kardioprotektivních intervencí zajišťující vyšší odolnost myokardu proti I/R poškození je adaptace na chronickou hypoxii (CH). Ačkoliv byly jisté metabolické změny indukované adaptací na CH již popsány, v systému se stále skrývá velké množství tajemství

Tato práce si klade za cíl určit vliv adaptace na CH na energetický metabolismus levé komory (LV) potkana v následujících modelech – i) vliv chronické normobarické hypoxie (CNH, 3 týdny, 5500 m) během krátkého I/R protokolu *ex vivo* na signalizační dráhu protein kináza B/hexokináza (Akt/HK) včetně vlivu na expresi a míru fosforylace Akt, expresi, lokalizaci a aktivitu HK, expresi mitochondriální kreatin kinázy (mtCKS) a hladin protein z rodiny Bcl-2. Dále pak množství aktivované adenosin dependentní protein kinázy (pAMPK $\alpha$  Thr<sup>172</sup>), ii) vliv CNH (3 týdny, 5500 m) na expresi majoritních srdečních isoform Akt1 a Akt2 s následnou analýzou enzymatické aktivity HK v homogenátu a mitochondriální frakci spontánně hypertenzního potkana (SHR) a konplastického kmene přechovávajícího mitochondriální genom kmene Brown Norway, SHR-mtBN a iii) vliv intermitentní hypobarické hypoxie (IHH, 8 h denně, 35 expozií, 7000 m) na rychlost  $\beta$ -oxidace v jednotlivých kompartmentech, expresi komplexů (CI-CV) mitochondriálního elektron-transportního systému (ETS), míru spotřebu kyslíku u subsarkolemálních a interfibrilárních mitochondrií (SSM a IFM), glykolytický aparát, specifickou koncentraci NAD(H) a na CK systém. Konečně byl sledován vliv IHH na náhylnost mitochondrií k Ca<sup>2+</sup> přetížení. Výsledky ukázaly, že adaptace na CNH vyvolala navýšení exprese HK1, HK2 a zvýšila celkovou aktivitu HK v ischemii, podobně jako vyvolala vyšší míru fosforylace pAkt Ser<sup>473</sup>. Ko-lokalizace HK s mitochondriemi byla v průběhu I/R protokolu zachována jen u CNH. CNH zabránila snížení exprese mtCKs během ischemie a též snížila poměr Bax/Bcl-2. U CNH zvířat nebyla pozorována aktivace pAMPK $\alpha$  Thr<sup>172</sup> tak, jako tomu bylo u kontrol. CNH také způsobila navýšení isoformy Akt2 pouze u SHR-mtBN, ale neměla vliv ani na expresi Akt1. Nicméně, po adaptaci na CNH došlo k nárůstu aktivity HK v homogenátu SHR-mtBN více než tomu bylo u SHR. Na druhou stranu, CNH vyvolala navýšení HK aktivity mitochondriální frakce u obou kmenů obdobně. Adaptace na IHH vedla ke snížení míry  $\beta$ -oxidace v SSM i IFM, a též k nižší míře respirace indukované substráty pro CI a CII, expresi CI a CIV, CS aktivity. V kontrastu s mitochondriemi, exprese acyl-CoA oxidázy 1 (ACOX) stejně jako peroxisomální laktát dehydrogenázy (LDHBx) byly navýšeny, stejně jako glykolytický aparát. Po IHH došlo k masivní přestavbě CK systému s navýšením exprese CKB a její translokací do M-linie sarkomery. Pravděpodobnost otevření mitochondriálního póru byla po adaptaci na IHH snížena.

Tato data podporují skutečnost, že transformace energetického metabolismu srdce představuje základ kardioprotekce indukované adaptací na CH v boji proti I/R. Prvky navýšení cukerného metabolismu, útlumu metabolismu mastných kyselin (FA), re-modelace CK systému, ale i úloha peroxisomů a metabolická komunikace jednotlivých kompartmentů mohou pomoci odkrýt důležité činitele, a tak přispět k prevenci a léčbě I/R poškození. Nicméně, ačkoliv tento výzkum nemusí vyúst'ovat v druh poznání, který bude mít okamžité praktické využití, jeho důležitost v rámci teoretického poznání je nezměrná

## Abstract:

The complexity of cardiac energy metabolism is immense. This system reflects the ultrastructural changes during pre- and postnatal life, but also during pathophysiological states. Mortality and morbidity rates of cardiovascular diseases are the highest, particularly ischemia-reperfusion (I/R) injury and stroke. One of the very well described cardioprotective intervention rendering the heart less susceptible to I/R is adaptation to chronic hypoxia (CH). Although some metabolic alterations induced by the CH have been described, the system conceals still too many secrets.

This thesis has aimed to determine how the adaptation to chronic hypoxia affects the cardiac metabolism of the rat left ventricle (LV) in the following set ups – i) The effect of chronic normobaric hypoxia (CNH; 3 weeks, 5500m) during a brief I/R protocol *ex vivo* on the protein kinase B/hexokinase (Akt/HK) pathway, including the expression and phosphorylation of Akt, the expression and localization of HK, the expression of mitochondrial creatine kinase (mtCKS), and the level of Bcl-2 family proteins as well as the amount of activated adenosine monophosphate-dependent protein kinase (pAMPK $\alpha$  Thr<sup>172</sup>); ii) the effect of CNH (3 weeks, 5500m) on the expression of major cardiac Akt isoforms, Akt1 and Akt2 with subsequent determination of HK enzyme activity in LVs of spontaneously hypertensive rat (SHR) and conplastic strain harbouring mitochondrial genome from Brown Norway strain, SHR-mtBN; and iii) The effect of intermittent hypobaric hypoxia (IHH; 8h/day, 35 exposures, 7000m) on LV  $\beta$ -oxidation rates with respect to subcellular domains, on the expression of electron transport system (ETS) complexes (CI-CV), on respiratory rates, on glycolytic apparatus, NAD(H) pools, CK system, and finally, on mitochondrial susceptibility to Ca<sup>2+</sup> overload. Our results have shown that: CNH evoked HK1, HK2 expression and HK activity concomitantly with pAktSer<sup>473</sup> in ischaemia. HK colocalization with mitochondria was not affected in CNH, whereas I/R cause HK disruption in N LVs. CNH prevented downregulation of mtCKS, decreased Bax/Bcl-2 ratio and did not elevate pAMPK as much as in N group. CNH also upregulated Akt2 isoform in SHR-mtBN rats but had no impact on Akt1 expression. Adapted SHR-mtBN rats also showed higher HK activity in homogenates than SHR, whereas the mitochondrial HK activity was elevated in both strains similarly. Finally, IHH decreased  $\beta$ -oxidation rates in SSM and IFM with reduction of CI+CII-stimulated respiration, CI expression, CI activity, CIV expression, CS activity. Contrary to mitochondria, the expression fo acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) and peroxisomal lactate dehydrogenase (LDHBx) participating in  $\beta$ -oxidation was upregulated. The glycolytic apparatus was empowered and IHH also induced CK system remodelling with CKB upregulation and translocation to the sarcomeric M-line.

These data support the view that cardiac energy system remodelling presents the basis of cardioprotection against I/R induced by the adaptation to chronic hypoxia. Our data, showing the improvement of carbohydrate metabolism with concomitant downregulation of fatty acid (FA) metabolism, and CK system remodelling, may uncover the important aspects of the adaptation and thus contribute to the development of future treatment of myocardial I/R injury. Nevertheless, although the research may not lead to the kind of knowledge that can be expected to give immediate practical benefits, its importance in spite of its theoretical character is immense..

## OBSAH / LIST OF CONTENTS

OBSAH / LIST OF CONTENTS.....	5
SEZNAM ZKRATEK / LIST OF ABBREVIATIONS.....	6
A. Česká část	
1. ÚVOD.....	7
2. CÍLE.....	8
3. MATERIÁL A METODIKA.....	8
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	10
5. ZÁVĚR.....	15
B. English part	
1. INTRODUCTION.....	16
2. AIMS.....	16
3. MATERIALS AND METHODS.....	17
4. RESULTS AND DISCUSSION.....	19
5. CONCLUSION.....	23
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY / REFERENCES.....	25
CIRRICULUM VITAE.....	29
SEZNAM PUBLIKACÍ / LIST OF PUBLICATIONS.....	31

## SEZNAM ZKRATEK / LIST OF ABBREVIATIONS

ACOX	Acyl-CoA oxidáza	Acyl-CoA oxidase
ADP	Adenosin difosfát	Adenosine diphosphate
Akt	Protein kináza B	Protein kinase B
AMPK	Adenosin monofosfát dependentní kináza	Adenosine monophosphate dependent kinase
ATP	Adenosin trifosfát	Adenosine triphosphate
CAT	Kataláza	Catalase
CI-CV	Komplexy I - V	Complex I - V
CK	Kreatin kináza, B (brain), M (muscle), mtCKS (mitochondrial sarcomeric)	Creatine kinase, B (brain), M (muscle), mtCKS (mitochondrial sarcomeric)
CNH	Chronická normobarická hypoxie	Chronic normobaric hypoxia
ETS	Elektron transportní systém	Electron transport systém
FA	Mastná kyselina	Fatty acid
GLUT	Glukózový transportér	Glucose Transporter
HK	Hexokináza	Hexokinase
CH	Chronická hypoxie	Chronic hypoxia
I/R	Ischémie-reperfuze	Ischaemia-reperfusion
IFM	Interfibrilární mitochondrie	Interfibrillar mitochondria
IHH	Intermitentní hypobarická hypoxie	Intermittent hypobaric hypoxia
KC	Krebsův cyklus	Kreb's cycle
LDH	Laktát dehydrogenáza	Lactate dehydrogenase
LV	Levá komora	Left Ventricle
mPTP	mitochondriální pór (permeability transition)	mitochondrial Permeability transition pore
mRNA	messengerová RNA	messenger RNA
NAC	N-Acetylcystein	N-Acetylcysteine
NAD(H)	Nikotinamidadenin dinukleotid	Nicotinamide adenine dinucleotide
OXPHOS	Oxidativní fosforylace	Oxidative phosphorylation
PFK	Fosfofruktokináza	Phosphofructokinase
ROS	Reaktivní formy kyslíku	Reactive oxygen species
SHR	Spontánně hypertenzní potkan; -mtBN s mitochondriálním genomem Brown Norway	Spontaneously hypertensive rat; -mtBN harbouring mitochondrial genome of Brown Norway
SSM	Subsarkolemální mitochondrie	Subsarcolemmal mitochondria

# A. ČESKÁ ČÁST

## 1. ÚVOD

Srdce dospělého člověka dosáhne denní spotřeby okolo 30 kg ATP. Takto velký energetický výdej je kontinuálně doplňován oxidativní fosforylací (OXPHOS) v srdečních mitochondriích. Zisky ATP z glykolýzy, případně GTP odvozené z Krebsova cyklu (KC) jsou v srdci minoritní. Jelikož je relativní koncentrace ATP uvnitř kardiomyocytu malá, zatímco míra hydrolyzy ATP vysoká, srdce se chová jako metabolický „všežravec“. Srdce tedy využívá mnoha uhlíkatých substrátů (mastné kyseliny, sacharidy, keto-sloučeniny) jako svých energetických zdrojů.  $\beta$ -oxidace mastných kyselin (MK) především s dlouhým řetězcem představuje u srdce nejdůležitější cestu zisku energie ve formě ATP [1]. Samotný vývoj srdce provází mohutné změny v energetickém metabolismu. Stejně tak, jako je tomu u mnoha srdečních a kardiovaskulárních onemocnění (KVO), např. u srdečního selhání [2], na modelu obezity a diabetu [3,4], hypertenze, hypertrofie a ischemicko-reperfučního (I/R) poškození [5–8]. Míry mortality a morbidity KVO, zejména u I/R poškození, jsou rozsáhlé.

Jednou z možností, jak srdeční sval chránit před I/R poškozením je, kromě několika druhů srdečních preconditioningů, adaptace na chronickou hypoxii (CH). Od roku 1960 bylo prokázáno mnoho pozitivních účinků CH. Kromě jiného, adaptace vedla ke snížení infarktového ložiska [9], zlepšení post-ischemických srdečních parametrů [10], snížení incidence I/R arytmií [11,12] a dalšího [13]. Z hlediska srdeční energetiky byl zaznamenán nárůst sacharidového metabolismu [14–16], zatímco míra zpracování MK po adaptaci poklesla [17,18].

Role Akt (insulinová signalizace) byla potvrzena v kardioprotekci navozené ischemickým pre-conditioningem [19]. Ischemický pre-conditioning, stejně jako adaptace na CH snižují míru I/R poškození. Nicméně bylo ukázáno, že jejich účinky nejsou aditivní [20], což svědčí o možnosti, že molekulární mechanismy obou adaptací jsou obdobné. V roce 2014 studie Muravyeva a kol. ukázala, že modulace mitochondriálního genomu zmírnila I/R poškození u diabetických potkanů [21]. SHR jsou predisponováni k metabolickým poruchám, které postihují mnoho orgánových soustav, včetně kardiovaskulární [22,23]. Lze tedy předpokládat, že u konplastického kmene SHR-mtBN dojde ke zlepšení energetického profilu během I/R protokolu a tím i ke zvýšení kardioprotekce. I při tomto protokolu je pravděpodobné, že dochází k aktivaci Akt/HK signalizace. Zatímco u adaptací na CH dochází díky HIF-1 signalizaci k návratu k fetálnímu metabolismu a navýšení glykolytického toku [15,16,24]. Na druhou stranu dochází k deregulaci MK metabolismu [17,25] a ke snížení exprese komplexů elektron transportního systému (ETS) [26]. Z výše uvedeného vyplývá, že adaptace na CH ovlivňuje energetický metabolismus LV, který by mohl být podkladem protekce. Indukované změny a jejich popis by mohly odhalit potencionální kandidáty v budoucí prevenci a léčbě I/R poškození srdce.

## 2. CÍLE

Naše studie je primárně zaměřena na popis změn energetického metabolismu potkaní LV v CH-indukované kardioprotekci se zaměřením na mitochondriální fyziologii.

Soupis dílčích cílů je uveden níže:

1. První část je zaměřena úlohu Akt (salvage pathway) a translokaci HK u CNH adaptovaných potkanů během krátkého I/R protokolu *ex vivo* (via Langendorff). Současně zkoumala vliv CNH na energetickou bilanci (aktivace AMPK, mtCKS), hladinu pro- (Bax) a anti-apoptotických (Bcl-2) proteinů a subcelulární lokalizaci HK.
2. Druhá část je zaměřena na vliv CNH na Akt dráhu u LV SHR potkanů a konplastických potkanů SHR-mtBN. byla analyzována exprese majoritních srdečních isoforem Akt (Akt1, Akt2) a změny sacharidového metabolismu (exprese, aktivita a lokalizace HK, společně s expresí a lokalizací GLUT), jakožto potencionálních spouštěčů kardioprotekce.
3. Poslední část naší studie je zaměřena na vliv IHH na míru  $\beta$ -oxidace v jednotlivých buněčných kompartmentech (SSM, IFM, peroxisomy), na míru exprese ETS komplexů, ovlivnění glykolytického aparátu a CK systému. Společně s tím jsme testovali náchylnost mitochondriální frakce k vápníkovému přetížení.

## 3. MATERIÁL A METODIKA

**Zvířecí model:** K experimentům byly využity LV potkanů dvou kmenů – dospělých Wistar samců (Velaz, s.r.o.) a SHR, z něhož byl odvozen konplastický kmen SHR-mtBN (zprostředkované od Ing. Michala Pravence, DrSc. z AV ČR). Zvířata byla chována v režimu světlo/tma 12/12 h, krmena standardní laboratorní stravou s přístupem k vodě *ad libidum*. Všechny experimenty probíhaly v souladu s „Guide for the Care and Use of Laboratory animals“ [27]. Experimentální protokoly byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR.

**Experimentální modely chronické hypoxie:** K pokusům byly použity dva modely chronické hypoxie – kontinuální normobarická (CNH, 5500 m, 3 týdny) a intermitentní hypobarická (IHH, 7000 m, 8 hodin denně, 35 expozic). U IHH modelu došlo k postupnému snižování barometrického tlaku tak, že cílové hodnoty bylo dosaženo po 13. expozici. Kontrolní skupina byla držena ve standardních laboratorních podmínkách po stejný časový interval.

**I/R protokol:** Potkaní srdce podstoupilo I/R protokol pomocí retrográdní perfuze za konstantního průtoku *ex vivo* na Langendorff aparátu. Ischémie byla navozena zastavením perfuze klasického Krebs-Hanseleitova roztoku (no-flow ischémie). Srdce kontrolních a adaptovaných zvířat byla náhodně rozdělena do 3 podskupin – kontrolní (20 min perfuze), ischemická (20 min perfuze a 10 min ischémie) a I/R skupina (20 min perfuze, 10 min ischémie a 10 min reperfuze).

**Příprava tkáně:** Srdce potkanů byla rychle vyjmuta a opláchnuta v ledovém fyziologickém roztoku. K následných biochemickým analýzám bylo srdce rozděleno na jednotlivé



anatomické celky a LV byly homogenizovány nebo uchovány v tekutém dusíku pro další analýzy.

**Subcelulární frakcionace a analýza koncentrace proteinů:** Získané homogenáty LV byly sukcesivní centrifugací rozděleny na několik buněčných frakcí. Koncentrace proteinů ve vzorcích homogenátů i jednotlivých buněčných frakcích byly zjištěny metodou Bradfordové [28].

**RNA izolace a čipová analýza Biomark:** K extrakci buněčné RNA byly vzorky homogenizovány v RNazolu (Sigma-Aldrich). Profil genové exprese byl proveden s využitím čipové analýzy Biomark s pre-amplifikací cDNA popsanou v [29]. Čipová analýza byla provedena v Institutu Biotechnologií na AV ČR RNDr. Vlastou Korenkovou, Ph.D. Hladina analyzovaných transkriptů byla vztažena na relativní hodnotu referenčního genu hypoxantin guanin fosforybosyltransferázy 1. Extrakce byla provedena Mgr. Ditou Sotákovou a Mgr. Ivetou Nedvědovou.

**SDS-PAGE a Western Blot:** Naředěné vzorky byly rozděleny pomocí denaturační gelové elektroforézy (SDS-PAGE) s využitím 10-12 % dělicích akrylamidových gelů za následujících podmínek ( $U = 100-175$  V;  $I = 350$  mA;  $t = 60-80$  min). Takto získané gely byly blotovány na nitrocelulóзовé membrány ( $0.2 \mu\text{m}$ , Bio-Rad) s využitím systému Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) při následujících podmínkách ( $U=25$  V;  $I = 1$ A;  $t = 30$  min). Membrány byly blokovány 1 h 2-5% roztokem nízkotučného mléka v TTBS, propláchnuty, inkubovány přes noc ( $4^{\circ}\text{C}$ ) v primární protilátce, promyty, inkubovány 1 h v příslušné sekundární protilátce. Hladina proteinu byla detekována za pomoci roztoku SuperSignal West Dura (Thermo Fisher) v přístroji LAS-4000 (FujiFilm).

**Spektrofotometrické analýzy:** Enzymové aktivity (PFK, LDH, CI, CII, CIII, MDH, CS, HK a CK) byly analyzovány spektrofotometricky s využitím spektrofotometru Shimadzu UV1601 a nebo 96-jamkového multireaderu (Synergy HT, BioTek). Hladiny NAD(H) poolů byly taktéž analyzovány spektrofotometricky za využití komerčně vyráběného kitu (pro CK, LDH, PFK byly taktéž využity komerčně vyráběné kity). Dále byla spektrofotometrie využita k určení náchylnosti izolovaných mitochondrií k  $\text{Ca}^{2+}$  přetížení.

**Respirometrické analýzy:** Míra respirace mitochondriálních frakcí SSM a IFM z LV potkanů byla změřena pomocí respirometrie s vysokým rozlišením (Oxygraph-2k, Oroboros). Specifická spotřeba kyslíku byla získána při CI+CII-stimulované nebo palmitoyl-karnitinem stimulované respiraci za využití specifických substrátů.

**Imunofluorescenční analýzy:** Kvantitativní fluorescenční mikroskopie s využitím wide-field fluorescenčního mikroskopu (Olympus Cell IX2-UCB) kryo-řezů LV připravených na kryo-mikrotomu (Leica CM3050). Řezy byly permeabilizovány, blokovány a inkubovány s primární protilátkou konjugovanou s příslušnou Alexa Fluor. Řezy byly dále inkubovány v DAPI (ProLong AntiFade, Invitrogen) k vizualizaci nukleární oblasti, konjugovány s faloidinem (vizualizace M-pruhu sarkomery), či s MitoProfile Total OXPHOS Cocktail (Abcam) pro mitochondriální kompartment. Pro výpočet kvantifikace kolokalizace byly využity Pearsonův a Mandersův korelační koeficient. Imunofluorescenční analýzy byly provedeny RNDr. Barbarou Elsnicovou, Ph.D. ve spolupráci s Mgr. Máriem Helésem.

**Statistické zpracování výsledků:** Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr a rozptyl dat jako střední chyba průměru (SEM). Významnost rozdílů mezi 2 experimentálními skupinami byla hodnocena pomocí nepárového Mann Whitney testu ( $p < 0.05$ ) za využití softwaru GraphPad Prism 5.00. Významnost rozdílů mezi mitochondriálními populacemi (tj. SSM vs. IFM) byla hodnocena pomocí One-Way ANOVA a následněm Newman-Keul's testu (hladina významnosti při  $\alpha = 0.05$ ).

#### 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

##### **CNH umocňuje Akt/HK signalizaci během krátkého I/R protokolu u LV potkanů kmene Wistar:**

Jak kontrolní, tak CNH skupina nevykazovala žádné změny ani v míře exprese celkové Akt ani v míře fosforylace Akt na treoninovém residuu (pAkt Thr<sup>308</sup>) během I/R protokolu. Během reperfuze fáze došlo u kontrolní skupiny k poklesu míry fosforylace Akt na serinovém residuu (pAkt Ser<sup>473</sup>) o 36 %. U skupiny CNH došlo k 77 % nárůstu pAkt Ser<sup>473</sup> v ischemické fázi. V této fázi navíc došlo k signifikantnímu rozdílu v míře fosforylace pAkt Ser<sup>473</sup> mezi N a CNH skupinou (o 22%). Je zajímavé, že míra fosforylace pAkt Ser<sup>473</sup> korelovala s maximální aktivitou HK. CNH skupina vykazovala vyšší expresi HK1 (31 %) a HK2 (40 %) isoforem i vyšší HK aktivitu (23 %) než kontrolní skupina v ischemické fázi. Zatímco ani CNH ani I/R protokol neměl vliv na ko-lokalizaci HK1 s mitochondriální membránou, u kontrolní skupiny došlo v průběhu I/R k poklesu mitochondriální HK2 ve všech subpopulacích (SSM, IFM, perinukleární) zhruba o 30 %. Z výsledků vyplývá, že zvýšená míra fosforylace pAktSer<sup>473</sup> může zprostředkovat fosforylaci HK2, čímž zabrání jejímu odpoutání od mitochondrií [30] a zvýšit tak i její enzymatickou aktivitu. Navýšení obou isoforem HK v ischemické fázi je nejspíše dáno inhibicí proteozomálního systému, který je též závislý na dodávkách ATP [31], zatímco exprese HK2 může být ovlivněna samotnou vazbou na mitochondriální membránu. Vazba na mitochondrie ji činí více odolnou před proteozomální degradací [32,33]. Vyjma účasti v glykolýze, vyšší aktivita HK může hrát důležitou roli v pentózo-fosfátovém cyklu generujícím NADPH [34], v udržení mitochondriálního membránového potenciálu úpravou lokálního poměru koncentrací ADP/ATP v blízkosti VDAC kanálu [35,36]. Asociovaná HK2 s mitochondriální membránou navíc kompetuje vazebné místo proapoptotickému proteinu Bax [37], a tak její vazba může významně přispívat k anti-apoptotickému efektu CNH. V naší studii jsme během I/R protokolu pozorovali snížení poměru Bax/Bcl-2 pouze u CNH skupiny, což svědčí o nižší pravděpodobnosti apoptózy během krátkého I/R protokolu. Výsledky korelují se studiemi dávající do souvislosti

odpojení mitochondriální HK, mitochondriální depolarizaci a rychlou srdeční nekrózu [38,39].

### **CNH brání energetické deprivaci během krátkého I/R protokolu v LV potkana Wistar:**

Metabolické výhody nejsou u CNH adaptace zprostředkovány pouze pomocí HK. Naše laboratoř v předešlé studii ukázala, že kromě HK, dochází po adaptaci na CNH též k přestavbě a navýšení aktivity CK systému. Mitochondriální isoforma mtCKS, která je umístěna v inter-membránovém prostoru mitochondrií, je též lokalizována v blízkosti VDAC a ANT. Jejich společná aktivita tak může přispívat ke stimulaci respirace pomocí tvorby ADP, stimulovat mitochondriální potenciál a nepřímo zabránit otevření mPTP [39–41]. Na rozdíl od výsledků ukázaných ve studii [16] jsme nebyli schopni zaznamenat změnu v expresi mtCKS mezi skupinami po 20 min perfuzi, nicméně k poklesu exprese mtCKS došlo jen v ischemické fázi kontrolní skupiny. CNH tak zabránila ischemií vyvolanou deregulací mtCKS. Snížení exprese může být zapříčiněno peroxidací kardiolipinu, který je nutný pro stabilizaci mtCKS a je primárním cílem vznikajících ROS při I/R poškození [42,43].

O nižší míře energetické deprivace svědčí nižší míra fosforylace AMPK $\alpha$  na treoninovém reziduu (pAMPK $\alpha$ Thr<sup>172</sup>) u CNH skupiny v ischemické fázi. Aktivovaná AMPK moduluje metabolismus glukózy a MK, mitochondriální funkci, stress sarkoplazmatického retikula, autofágii a apoptózu [44]. Farmakologická aktivace AMPK pomocí AICAR byla ukázána jako benefiční, jelikož snížila míru srdeční nekrózy a kontraktilní dysfunkce po I/R poškození [45]. Míra fosforylace Akt a AMPK koreluje s předpokladem ze studie [46], která ukázala, že při energetické deprivaci dochází k nárůstu aktivity AMPK, zatímco aktivita Akt prudce klesá. Je důležité zmínit, že aktivovaná Akt potřebuje ke své činnosti glukózu [47], která se stává nedostupnou s prodlužujícím časem ischemie.

### **CNH navyšuje Akt/HK dráhu u LV SHR a SHR-mtBN potkanů**

Jelikož je HK komponentou ovlivňující otevření mPTP, naše práce se nejprve zaměřila na specifickou enzymatickou aktivitu HK v homogenátu LV obou kmenů. Mezi normoxickými skupinami byl zjištěn rozdíl v HK aktivitě o zhruba 40 %. Adaptace na CNH zvýšila enzymovou aktivitu HK o 19 % u SHR a o 17 % u SHR-mtBN. Jelikož byly pozorovány změny HK aktivity v homogenátech všech skupin, aktivita HK na mitochondriální frakci byla také zanalyzována. Překvapivě nebyl pozorován žádný rozdíl v aktivitách mitochondriální HK v kontrolních skupinách. Adaptace na CNH zvýšila

aktivitu HK v obou kmenech podobně – o 50 % u SHR a o 43 % u kmene SHR-mtBN, a tak stejně jako u normoxických skupin – ani po adaptaci nebyl pozorován rozdíl v aktivitě mitochondriální HK mezi oběma kmeny. V předešlé studii na potkanech kmene Wistar bylo ukázáno zapojení Akt signalizace, a proto byla provedena analýza majoritních srdečních isoform Akt. Existují 3 homology Akt: Akt 1 (či  $\alpha$ ), Akt 2 (či  $\beta$ ), and Akt 3 (či  $\gamma$ ), které sdílejí podobnou strukturu katalytické domény, ačkoliv jsou produktem rozličných genů [48]. Majoritní isoformy Akt exprimované v srdci jsou Akt1 a Akt2, zatímco Akt3 je majoritní isoformou exprimovanou v mozku [49,50]. V naší studii bylo ukázáno, že ani adaptace na CNH, ani modulace mitochondriálního genomu nemá vliv na expresi mRNA Akt1 ani Akt2. To samé se dá říci o expresi Akt1 proteinu. Naopak, modulace mitochondriálního genomu společně s adaptací na CNH vedla ke zvýšení exprese Akt2 o 43 %. Akt2 je všeobecně vnímána jako regulátor glukózového metabolismu kardiomyocytu [51], která fosforylací zprostředkovává odpověď na stimulaci inzulinem, či IGF1 [52]. Kromě této úlohy v metabolismu nedávná studie od Reinartze a kol. ukázala, že Akt2 významným způsobem ovlivňuje vývoj srdečního svalu, reguluje kontraktilitu a ovlivňuje hospodaření s vápníkem [53]. Transfekce srdeční buněčné linie HL-1 konstitutivně aktivní Akt změnila mitochondriální morfologii [54]. Aktivace a následná translokace Akt do mitochondrií zmírnila apoptotickou signalizaci v kardiomyocytech [55]. Na základě výsledků studie [56] a výsledků exprese Akt2 bylo usouzeno zapojení pleiotropního účinku Akt v amplifikaci redukce infarktového ložiska pomocí CNH adaptace a modulace mitochondriálního genomu. Výsledky též poukazují na Akt2 jako na možný potencionální cíl kardioprotektivních terapií.

### **IHH indukuje změny $\beta$ -oxidačních center skrze regulaci ETS:**

Specifická respirace stimulovaná pomocí palmitoyl-karnitinu byla snížena v obou mitochondriálních frakcích po adaptaci na IHH. U SSM poklesla specifická spotřeba kyslíku o 16 %, zatímco u IFM došlo k 51 % poklesu. U ostatních substrátů  $\beta$ -oxidačního protokolu nedošlo po adaptaci na IHH u SSM k žádným změnám, zatímco u IFM byla redukce patrná již při použití samotného malátu (o 54 %) bez stimulace respirace pomocí ADP. Snížená schopnost zpracování MK již byla u kardiomyocytů pozorována [17,25]. Překvapivě však IHH vedla ke zvýšení rychlost-limitujícího enzymu peroxisomální  $\beta$ -oxidace, acyl-CoA oxidázu 1 (ACOX1) o cca 12 %. Stejně tak byla odhalena zvýšená exprese LDHBx (zhruba o 12 %), což bylo potvrzeno i imunofluorescenční mikroskopií. Na druhou stranu, exprese peroxisomálního membránového proteinu PMP70 (ABC translokáza MK) stejně jako exprese CAT nebyly pomocí IHH ovlivněny. Stejně tak, jako nebyla ovlivněna exprese LDHA uvnitř peroxisomů.

Dále bylo ukázáno, že po IHH dochází k represi mitochondriálního aerobního metabolismu. Expresí jednotlivých komplexů ETS bylo pomocí IHH ovlivněno různým způsobem. Zatímco došlo ke snížení exprese komplexu I (o 21 %) a komplexu IV (o 55 %), exprese komplexu II, III a V nebyla ovlivněna. Navíc došlo ke snížení míry specifické respirace U obou subpopulací byla snížena specifická míra respirace stimulované pomocí malátu+glutamátu+ADP+sukcinátu (o 34 % u SSM a o 28 % u IFM). U IFM však byla pozorována o 33 % nižší míra specifické respirace stimulované pomocí malátu a glutamátu.

Byly pozorovány rozdílné aktivity CS (o 90 %) a CI (o 52 %) mezi SSM a IFM izolovaných z kontrolních skupin. U aktivity CII nebyly pozorovány změny. Adaptace na IHH vedla ke snížení aktivity CI jen u IFM o 56 %, zatímco aktivita CS poklesla u obou mitochondriálních rodin – o 38 % u IFM a o 40 % u SSM.

Tyto výsledky ukazují, že kapacita mitochondriální  $\beta$ -oxidace je snížena díky změnám ETS – tedy sníženou expresí CI a CIV, sníženou aktivitou CI i sníženou aktivitou CS. Bylo ukázáno, že ke zformování multienzymového CI je nutná přítomnost aktivního CIV [57]. Navíc, snížení množství mitochondriálního kardiolipinu, což je doprovodný jev adaptace na IHH [58], by mohlo vysvětlovat sníženou expresi obou komplexů. Přítomnost kardiolipinu je podmínkou optimální funkce všech komplexů ETS kromě CII [59]. Kardiolipin není pouze strukturální součástí CIV, jeho přítomnost je esenciální k elektronovému transportu a protonové translokaci. Asociace kardiolipinu s CI byla také potvrzena [60]. Stabilizace mitochondriálních superkomplexů ETS je též závislá na přítomnosti kardiolipinu, stejně jako aktivita pyruvátového přenašeče a karnitin-acylkarnitin translokázy [59].

### **Kombinace sníženého aerobního metabolismu a protektivní signalizace pomocí HIF-1 je zodpovědná za extra-mitochondriální změny energetických jednotek v IHH:**

Adaptace na IHH vedla ke zvýšení mRNA transkriptu obou hlavních isoform transportérů glukózy, GLUT1 a GLUT4, ale také mRNA transkriptu HK1, HK2, PFK2 a LDHA. U transkriptu LDHB k navýšení nedošlo. Tyto změny mohou být důsledkem aktivace HIF-1 $\alpha$  [61] a jsou v souladu s nedávno vydanými publikacemi [15,16]. Redukce aerobní kapacity společně s redukcí aktivity CI jsou pravděpodobně zodpovědné za změnu NAD<sup>+</sup>/NADH poměru, který může následně ovlivnit aktivitu KC, ale i Ca<sup>2+</sup> homeostázu (cestou ryanodinových receptorů), či zvýšit aktivitu PFK (snížením koncentrace citrátu) a LDH (redukcí aktivity malát/aspartátového výměníku) [62]. Pozorovaná redukce v aerobní kapacitě obou mitochondriálních subpopulací a změny v substrátovém metabolismu nejspíše zapříčinily přestavbu CK systému. Hladina mRNA transkriptu a exprese proteinu

CKB narostla (o 37 %, respektive o 41 %), zatímco exprese mRNA i proteinu isoformem CKM i mtCKS se snížila. Na rozdíl od adaptace na CNH [16] došlo po adaptaci na IHH k úbytku isoformy mtCKS, ačkoliv se celková aktivita CK, stejně jako při CNH adaptaci, zvýšila. Zvýšení aktivity u obou adaptací koreluje se zvýšením exprese CKB. Toto zvýšení může odrážet skutečnost vyšší utilizaci glukózy, jelikož stimulace inzulínem vyvolává zvýšení aktivity pouze CKBB a CKMB dimerů [63]. Negativní regulace mezi změnami redoxního stavu a expresí CKM by mohla vysvětlit pozorované snížení CKM v IHH vzorcích. Proporcionální rozdíl mezi snížením CKM a zvýšením CKB ko-lokalizace v M-linii sarkomery naznačuje navýšení CKMB dimerů. CKB isoforma nedisponuje potřebnou N-terminální vazácní doménou [64]. Přítomnost CKB v této lokalitě by mohla indikovat sníženou aerobní schopnost a generaci ATP v IFM, která je částečně nahrazena zvýšením glykolytického toku.

### **Přechod $\beta$ -oxidace z mitochondrií do peroxisomů jako strategie spořicí kyslík v IHH:**

Nynější výsledky pobízejí k návrhu následující hypotézy. Navýšení peroxisomální  $\beta$ -oxidace pomáhá zpracovávat dlouhé MK, které nejsou zpracovány v mitochondriích. Za určitých podmínek může tento přechod představovat i velmi sofistikovaný způsob, jakým si srdeční buňka chrání reziduální zásoby kyslíku. Jak již bylo zmíněno, aktivita ACOX1 a dalších peroxisomálních oxidáz je spojena s produkcí peroxidu vodíku, jehož koncentrace je udržována na velmi nízké úrovni aktivitou CAT. Několik studií dokumentovalo zvýšení aktivity a/nebo exprese CAT důsledkem hypoxie [65,66]. V naší studii jsme však nebyli schopni poukázat na změny v expresi CAT. Avšak CAT disponuje duální enzymatickou aktivitou – za nízké hladiny ROS CAT využívá molekul peroxidu vodíku a peroxiduje proteiny a lipidové molekuly, zatímco při vysokých hladinách ROS se CAT stane enzymaticky aktivní a generuje molekuly kyslíku [67]. Up-regulace ACOX1 pomocí IHH pravděpodobně upraví redoxní stav uvnitř peroxisomu, což CAT drží v enzymaticky aktivním stavu, jelikož jsou peroxisomy malé, membránou opouzdřené organely. V ischemii srdce přechází na metabolismus glukózy, ale oxidace MK zůstává primárním energetickým substrátem [68]. Celková míra mitochondriálního oxidativního metabolismu díky ischemii klesá a intracelulární zásoby volných MK narůstají. Koordinovaná aktivita ACOX1 a CAT může jednak ulevit přebytkům volných MK v sarkoplazmě, nicméně též může díky enzymatické aktivitě CAT (generující  $O_2$ ) a zvýšenému toku MK do peroxisomů (stimulujícím CAT) ovlivnit koncentraci  $O_2$ , díky níž může myokard po delší dobu derivovat energii aerobními procesy. Zvýšený glykolytický tok tak může souviset s navýšením peroxisomální  $\beta$ -oxidace a stimulovat jej ve formě molekul pyruvátu.

Peroxisomální  $\beta$ -oxidace dovoluje provádět katabolismus MK s dlouhým řetězcem za nižší spotřeby kyslíku. Tento fenomén může částečně vysvětlit pozorovaný jev při podávání N-acetylcysteinu (NAC) při adaptaci na IHH, kdy NAC zrušil kardioprotektivní účinek IHH [69]. Aktivita CAT je nezbytná pro ochranu enzymatického aparátu peroxisomální  $\beta$ -oxidace před účinky peroxidu vodíku [70]. Antioxidační účinek NAC by mohlo změnit enzymatickou aktivitu KAT a podpořit její peroxidázovou aktivitu ovlivňující peroxisomální funkci, a tak i rušit pozorovaný kardioprotektivní účinek samotné IHH adaptace.

## 5. ZÁVĚR

Naše výsledky naznačují, že srdeční rezistence k I/R poškození indukovaná adaptací na chronickou hypoxii se projevuje především změnou energetického metabolismu. Oba režimy adaptace (tj. CNH a IHH) vedly k navýšení metabolismu glukózy. Tento jev byl prokázán up-regulací GLUT, HK, PFK a LDH a může být připisován kombinovanému účinku signalizace HIF-1 a Akt. Obě adaptace vedou k restrukturalizaci CK systému, což je doloženo zvýšením exprese CKB a snížením exprese CKM. Na druhou stranu dochází v adaptaci na IHH k utlumení metabolismu mitochondriálních subpopulací. Adaptací na IHH též došlo ke zvýšení proporce peroxisomální  $\beta$ -oxidační kapacity, pravděpodobně v důsledku snížení mitochondriální aerobní kapacity. Tento přechod pravděpodobně představuje mechanismus šetřící kyslík a je částečně stimulován zvýšenou rychlostí glykolýzy a změnou poměru  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Tyto změny poskytují podklad ochrany mitochondrií před  $\text{Ca}^{2+}$ -přetížením pozorovaným u IHH. Nicméně, všechny tyto energetické účinky mohou poskytnout základ kardioprotekce proti I/R poškození pomocí snížené generace ROS na počátku reperfuční periody, úpravou  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázy, sníženou pravděpodobností otevírání mPTP, obnovením post-ischemických funkčních parametrů srdce, ale též mitochondriální a buněčnou ochranou.

## B. ENGLISH PART

### 1. INTRODUCTION

The adult heart reaches the highest ATP requirement of ~30 kg daily in humans. To fulfil these demands, almost all of ATP is derived from mitochondrial OXPHOS with only minor provision of glycolysis and GTP generation by Krebs cycle (KC). As the relative ATP content within the cardiomyocytes is low and the ATP hydrolysis rates therein are high, the heart acts as a “omnivore” metabolizing a spectacular assortment of carbon substrates as energy sources. Fatty acid (FA)  $\beta$ -oxidation process, however, represents the major pathway how the adult heart replenishes ATP molecules [1]. The developmental changes associate with myocardial energy metabolism alterations, but so do the cardiac and cardiovascular diseases (CVDs) – for instance, in different models of heart failure [2], in models of obesity and diabetes [3,4], in hypertension, hypertrophy, and I/R [5–8]. Moreover, the mortality rates of CVDs, particularly those induced by I/R, are extreme.

Beside several forms of cardiac conditioning, a procedure rendering the heart less vulnerable to I/R injury is the adaptation to chronic hypoxia. Since 1960, many beneficial effects of adaptation to CH have been revealed – reduced infarct size (Turek *et al.* 1980), improved post-ischaemic recovery [10], reduced incidence of arrhythmias during I/R [11,12] and more [13]. Adaptations to CH were reported to upregulate cardiac carbohydrate metabolism [14–16], while the fatty acid processing was downregulated [17,18].

Akt (as major carbohydrate metabolism regulator) was reported to play role in ischaemic preconditioning [19]. Ischaemic preconditioning, similarly to CH adaptation decreases cardiac susceptibility to I/R. Nevertheless, cardioprotection induced by CH and preconditioning are not additive [20], we suggested that some of the molecular mechanisms may be shared by both interventions. In 2014, Muravyeva *et al.* reported that the modulation of mitochondrial genome modulated the I/R tolerance in diabetic rats [21]. SHR rats were reported to be predisposed to metabolic disturbances affecting many systems including the cardiovascular [22,23]. We proposed that the exchange of mitochondrial genome in I/R vulnerable strain SHR by that of more resistant BN may relief the cardiac energetic balance during I/R protocol and provide a stronger cardioprotection. As shown is study of Neckar *et al.* [56], the replacement of mitochondrial genome of SHR by BN potentiated the cardioprotective effect of CNH. We observed a different HK activity in homogenates, so we aimed to determine the possible role of RISK pathway in SHR and conplastic strain SHR-mtBN. Hypoxia was shown to reduce the cardiomyocyte ability to process FAs [25]. On the other hand, foetal-gene reprogramming induced by hypoxia upregulated glycolytic genes [15,16,24]. Changes in ETS complexes were observed due to hypoxia [26]. It is clear that adaptation to either CNH or IHH affects LV energy metabolism and the exact depiction may reveal potential candidates in future interventions and treatment.

### 2. AIMS



In all parts of our study, we majorly aimed to depict the role of altered cardiac energy metabolism of rat LV in cardioprotection induced by adaptation to CH with special interest to mitochondrial physiology.

The fractional aims are summarized below:

1. In the first part, we aimed to determine the possible role of Akt salvage pathway and HK translocation in the CNH adapted rat LV subjected to a brief I/R protocol *ex vivo* (via Langendorff). Concomitantly, we investigated CNH role in energy metabolism alteration and balance during I/R (AMPK, mtCKS), the level of pro- (Bax) and anti-(Bcl-2) apoptotic proteins, and HK subcellular translocation during I/R.
2. In the second part, we strived to describe the effect of CNH to Akt pathway in SHR and SHR-mtBN rat LVs. Therefore, we analysed the expression of major cardiac Akt isoforms (Akt1, Akt2) and the alterations of carbohydrate metabolism (expression and localization of HKs and GLUTs) as potential inducers of cardioprotection in LVs of both adapted and non-adapted SHR and SHR-mtBN. Additionally, we aimed to describe Akt affection on HK enzyme activity in sarcoplasmic and mitochondrial compartment.
3. In the last part, the aims were to determine how IHH affects rat LV ability to process FAs with respect to cardiac energy domains (SSM, IFM, peroxisomes), the expression of ETS complexes, glycolytic apparatus and CK system. Contemporarily, we tested the susceptibility of cardiac mitochondria to Ca<sup>2+</sup> overload.

### 3. MATERIALS AND METHODS

**Animals:** Two strains were used – Adult male Wistar Rats (Velaz, Ltd., Czech Republic) and SHR and conplastic SHR-mtBN strain (provided by Ing. Michal Pravenec, DrSc. from Czech Academy of Sciences). All rats were kept at 12/12-h light/dark cycle and fed by a standard laboratory chow, water access *ad libidum*. The animals were handled in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Academies Press [27]. The experimental protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of the Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences.

**Experimental models of CH:** Animals were housed either in a normobaric chamber equipped with hypoxic generators (Everest Summit, Hypoxico Inc., NY, USA), which reduced the percentage of oxygen in the ambient air to 10%, corresponding to altitude of 5500 m. All animals were exposed to CNH for 3 weeks. In the case of IHH (7000 m, 8 h/day, total 35 exposures), barometric pressure was lowered stepwise, so the level equivalent to an altitude of 7000 m was reached after 13 exposures. Control groups were kept at room air for the same time.

**I/R protocol:** The hearts underwent a brief (10 min of global no-flow ischemia) *ex vivo* I/R protocol. Extracted hearts were retrogradely perfused at constant flow (10 ml/min/g)

by standard Krebs–Hanseleit solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucose, pH 7.4) gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The hearts were subsequently divided into three subgroups: (i) controls: perfused for 20 min; (ii) ischaemia: perfused for 20 min and then subjected to global (i.e. no flow) ischaemia for 10 min; (iii) ischaemia/reperfusion: perfused for 20 min, subjected to 10 min ischaemia followed by reperfusion for 10 min.

**Tissue preparation:** After cervical dislocation, the hearts were rapidly excised and washed in ice-cold saline. For biochemical analyses, the left ventricles (LV) were dissected, weighed, and used fresh or were immediately frozen in liquid nitrogen for further analyses. Homogenization was carried in glass-teflon homogenizer (Sartorius) using overhead stirrer (Ika) after resuspension of the samples in homogenization buffer (in MM: 12.5 TRIS, 2.5 EGTA, 1 EDTA, 250 sucrose, 5 DL-dithiothreitol (DTT), protease (cOmplete, Roche/Sigma-Aldrich) and phosphatase (PhosSTOP, Roche/Sigma-Aldrich; pH = 7.4) inhibitors) in the ratio 1:8 (w/v)

**Subcellular fractionation and protein concentration analysis:** Homogenate samples were successively centrifuged to obtain the particular cellular fractions and the protein concentration of each fraction (e.g. SSM, IFM, peroxisomal) was determined by Bradford method spectrophotometrically [28].

**RNA isolation and Biomark chip analysis:** To extract RNA, tissue samples were homogenized in RNazol (Sigma-Aldrich). Gene expression profiling was performed by RNDr. Vlasta Korenková, Ph.D. at the Institute of Biotechnology, with cDNA preamplification according to [29] deploying Biomark chip analysis. Transcript levels were normalized to the level of Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT) transcript.

**SDS-PAGE and Western Blot:** Diluted samples were separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10-12% polyacrylamide separating gels with the following conditions (U = 100-175V; I = 350 mA; t = 60 – 100 min). The gels were electro-transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad) by Trans-Blot Turbo system (U = 25 V; I = 1 A; t = 30 min). Membranes were blocked in non-fat milk TTBS solution for 1 hour at room temperature, incubated with the primary antibody overnight in the fridge, washed several times with TTBS, incubated with appropriate secondary antibody diluted in TTBS for 1 hour at room temperature, and visualised by Supersignal West Dura (Thermo Fisher). See the doctoral thesis for the list of antibodies.

**Spectrophotometric analyses:** Enzyme activities (PFK, LDH, CI, CII, CIII, MDH, CS, HK, CK) were assessed spectrophotometrically using either spectrophotometer Shimadzu UV1601 or 96-well Multi-reader system (Synergy HT, BioTek). Additionally, NAD(H) pools were analysed using a commercial kit. Also, mitochondrial susceptibility to mPTP opening was measured this way. The specific parameters can be found in section of the thesis (6.10.1.; 6.10.2., and 6.11.).

**Oxygraphic analyses:** Respiration of LV SSM and IFM samples was determined using high-resolution respirometry (Oxygraph-2k, Oroboros). CI+CII-stimulated as well as palmitoyl-carnitine-stimulated respiration was achieved by adding appropriate substrates.

**Immunofluorescence analyses:** Quantitative fluorescence microscopy was used using a wide-field fluorescence microscope (Olympus Cell IX2-UCB) using cryo-sections prepared on cryo-microtome (Leica CM3050). The sections were permeabilized, blocked and counterstained with appropriate primary, and secondary antibody conjugated with Alexa Fluor. Sections were mounted either in DAPI (ProLong Antifade; Invitrogen) to visualize the nuclear compartment, phalloidin conjugation (Thermo Fisher) of M-band, or MitoProfile Total OXPHOS Cocktail (Abcam). To evaluate the co-localization, Mander's and Pierson's correlation coefficient calculation were used.

**Statistical analyses:** The WB, immunoreactivity and relative mRNA abundance were expressed as fold over control group or as in- or decrease of overall immunoreactivity. The statistical differences between two groups were determined by the unpaired Mann Whitney test ( $P < 0.05$ ) using the GraphPad Prism 5.00 software. The statistical differences between more groups (e.g. mitochondrial sub-populations) were determined by ANOVA test with Newman-Keul's post-test ( $P < 0.05$ ). All data are expressed as means  $\pm$  SEM.

#### 4. RESULTS AND DISCUSSION

##### **CNH potentiates Akt/HK pathway in a brief I/R insult in Wistar rats LVs:**

Both N and CNH groups did not show any significant changes in the expression of total Akt and the amount of Akt phosphorylated on threonine residue (pAkt Thr<sup>308</sup>) during the I/R insult. Interestingly, a significant decrease by 36 % was seen in Akt phosphorylated on serine residue (pAkt Ser<sup>473</sup>) after reperfusion compared to ischaemic N group. In the CNH group, there was a significant increase by 77 % in the level of pAkt Ser<sup>473</sup> after ischaemia. Ischaemic level of pAkt Ser<sup>473</sup> was higher by 22 % in CNH than in N group. Interestingly, the maximal amount of pAkt Ser<sup>473</sup> correlated with the maximal HK activity. Moreover, CNH group increased the level of both HK1 and HK2 after ischaemic period by 31 % and 40 %, respectively which also corresponds with elevated HK enzyme activity in this group (by 23 %). Although the phosphorylation level of Akt corresponds with the expression of both HK isoforms, no translocation of HK1 isoform during the whole I/R protocol could be observed in any group. Contrary, ischaemia resulted in approximate 30 % decrease of HK2 colocalization in all mitochondrial subpopulations.

Several corollaries can arise – increased phosphorylation of pAktSer473 may mediate HK2 phosphorylation and prevent the detachment from mitochondrial OMM [30] which enhances HK activity. The elevated expression of both HK isoforms is possibly due to inhibition of proteasome system in ischaemic conditions [31], whereas HK2 association with OMM may also make it more resistant to degradation [32,33]. Besides the upregulation of carbohydrate metabolism, HK play an indisputable role in pentose phosphate pathway increasing NADPH/NADP ratio [34], HK2 association with OMM maintains mitochondrial membrane potential by increasing ADP/ATP ratio in close vicinity of VDAC [35,36] thus decreasing ROS levels. Moreover, HK2 associated with VDAC

competes with pro-apoptotic protein Bax for the binding site, which may prevent apoptosis triggered by mPTP opening [37]. It is interesting that we observed the decreased Bax/Bcl-2 ratio in the ischaemic and in reperfused CNH hearts compared to the corresponding normoxic controls. This provides strong evidence that the probability of apoptosis during brief myocardial I/R insult is lower in hearts adapted to CNH than in normoxic controls and the results correspond with the studies showing that detachment of mitochondrial HK leads to mitochondrial depolarization and cardiac necrosis [38,71].

### **CNH prevents energy deprivation during a brief I/R in Wistar rats LV:**

The metabolic benefits induced by CNH are not provided only by HK. Our laboratory showed previously that CNH also upregulates mtCKS located in the mitochondrial intermembrane space which preferentially supplies ADP for Complex V [16]. Thus, both mtCKS and HK associated with OMM contribute to the coupled state of mitochondrial respiration that may indirectly inhibit mPTP opening [40,41,71]. Contrary to the results of Waskova *et al.*, we were unable to detect any significant change of mtCKS, however – CNH prevented mtCKS downregulation during I/R protocol. The downregulation may be due to mtCKS binding to cardiolipin [42] which represents a primary target of ROS attack in ischaemia [72].

These metabolic benefits are reflected by the fact that ischaemic period did not elevate the pAMPK $\alpha$ Thr<sup>172</sup> in CNH as much as it did in the control group (See Figure R5 in the DT). Activated AMPK modulates the glucose and FA metabolism, mitochondrial function, stress of sarcoplasmic reticulum, autophagy and apoptosis [44]. Additionally, pharmacological activation of AMPK by AICAR was shown beneficial as it reduced myocardial necrosis and contractile dysfunction during I/R injury [45]. The phosphorylation levels of Akt and AMPK correlate with the proposed mechanism of [46] who showed higher levels of activated AMPK in energy deprived conditions whereas the activated Akt was downregulated. It is of note that the activated Akt needs glucose to provide beneficial effects [47] which is withdrawn in prolonged ischaemia.

### **CNH upregulates Akt/HK pathway in SHR and SHR-mtBN rat LVs:**

Due the fact that HK was shown as a component regulating mPTP opening, we first determined the specific enzyme activity of HK in LV tissue homogenates. The specific enzyme activity was significantly higher in LV homogenates of normoxic SHR-mtBN compared to with normoxic SHR (by ~40 %). Adaptation to CNH increased HK activity by 19 % and 17 %, respectively in SHR and SHR-mtBN. Due the differences between HK activities in tissue homogenates, we analysed the mitochondrial HK activity. Surprisingly, any difference between the strains could be determined in control groups, although the adaptation to CNH upregulated HK activity in SHR (by 50 %) and in SHR-mtBN (by 43 %). However, even in this case, both adapted CNH groups did not differ between each other. As shown in Wistar rats, HK may be affected by Akt signalling.

Therefore, we determined the major cardiac Akt isoform mRNA and protein expression. There are 3 Akt homologues: Akt 1 (or  $\alpha$ ), Akt 2 (or  $\beta$ ), and Akt 3 (or  $\gamma$ ) that all

share a common domain structure although they are products of distinct genes [48]. The cardiac major isoforms are represented by Akt1 and Akt2 as Akt3 is the major isoform of the brain [49,50]. In our study, neither the adaptation, nor the replacement of mitochondrial genome had any effect on Akt1 and Akt2 mRNA expression. The same can be concluded about Akt1 protein expression, however, the protein expression of Akt2 was upregulated by 43% in SHR-mtBN strain. Akt2 is generally accepted as a regulator of glucose metabolism in cardiomyocytes [51], where it contributes to the phosphorylation of Akt target proteins stimulated by insulin and IGF1 [52]. Beside that general and well accepted role, recent studies have revealed its pleiotropic effects influencing many other signalling pathways. Reinartz *et al.* [53] reported that Akt2 significantly affects development of cardiac muscle tissue, regulation of contractility, and last but not least Akt2 was observed to play a fundamental role in the intracellular Ca<sup>2+</sup> handling. Furthermore, transfection of HL-1 cardiac cells with constitutively active Akt changed mitochondrial morphology [54]. Importantly, translocation of Akt into mitochondria suppressed mitochondrial apoptotic signalling in cardiac muscle cells [55]. Based on our recent study [56], the present data suggest an involvement of Akt pleiotropic action in mitochondrial genome-dependent amplification of infarct size-limiting effect of chronic hypoxia and point to Akt2 as a potential target of cardioprotective therapies.

### **IHH promotes changes in $\beta$ -oxidation centres through ETS regulation:**

Palmitoyl-carnitine (PC)-stimulated O<sub>2</sub> consumption rates were affected by IHH in both mitochondrial fractions. In SSM, PC-stimulated respiration rates fell by 16 % and by 51 % in IFM. In the case of other respiratory substrates (malate and/or malate+ADP), IHH did not affect SSM, whereas IFM consumption rates were reduced by 54% just when malate was used as sole substrate. The cardiomyocyte inability to process FAs was shown many times [17,25]. However, and in contrast - IHH adaptation resulted in the upregulation of the rate-limiting enzyme of peroxisomal  $\beta$ -oxidation, ACOX1, by 12%. Accordingly, peroxisomal NAD(H)-redox shuttle, essential for this pathway and represented by peroxisomal lactate dehydrogenase B (LDHBx), was upregulated after IHH by ~ 12%. The expression of neither 70 kDa peroxisomal membrane protein (PMP70) nor peroxisomal catalase was affected. Higher co-localization of LDHB with peroxisomal PMP70 in IHH (by ~ 10 %) was confirmed by quantitative immunofluorescent microscopy using Pearson's correlation coefficient. On the other hand, we were not able to detect any significant change in LDHA abundance in peroxisomes between the groups.

Afterwards, we demonstrated the suppressing effect of IHH on the capacity of aerobic metabolism in mitochondria. The individual ETS complexes protein expression in tissue homogenate was affected differently by the adaptation. Whereas IHH downregulated the protein expression of CI and CIV (by 21 % and 55 %, respectively), it had no effect on the expression of CII, CIII and CV. Moreover, the specific O<sub>2</sub> consumption rates of SSM dropped in compared to N by 34 % when malate+glutamate+ADP+succinate were used as substrates. The difference was also apparent (28%) when IFM isolated from both groups

were analysed. Moreover, IFM from IHH LV samples showed significantly lower O<sub>2</sub> consumption rates (by 33 %) when only malate+glutamate were used..

Higher activity of citrate synthase (CS) and complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase; CI) in IFM isolated from control (N) compared to those observed in SSM (by 90 % and 52 %, respectively) were observed. No significant difference was found in complex II (Succinate dehydrogenase; CII) activity. IHH decreased the activity of CI in IFM by 56 %. IHH also reduced the activity of CS in IFM by 38 % and in SSM by 40 %.

These data demonstrate that the mitochondrial  $\beta$ -oxidation rates are downregulated through ETS inhibition manifested in the decrease of CI and CIV expression and CI activity. It is of interest that CI assembly process requires a functional CIV [57]. Furthermore, the reduction of mitochondrial phospholipid cardiolipin content, seen in our IHH model, may partially explain the reduced expression in both, CI and COX (Jezkova et al., 2002). Indeed, cardiolipin is required for optimal function of all respiratory complexes, except complex II (i.e. CI, CIII, COX, and CV) [59]. This phospholipid is not only a passive component of COX, but it was shown to be essential in normal electron transport and proton translocation activity. As well as COX, the association of CI with cardiolipin was shown [60]. The stabilization of mitochondrial super-complexes was dependent on the presence of cardiolipin. Likewise, the activity of the pyruvate carrier and the carnitine acylcarnitine translocase stimulating mitochondrial  $\beta$ -oxidation have been shown to be the most efficient in cardiolipin presence [59].

### **The combination of reduced aerobic metabolism with protective signalling deploying HIF-1 is responsible for the extramitochondrial alterations of energy units in IHH:**

IHH upregulated mRNA transcripts of both major cardiac glucose transporters, GLUT1 and GLUT4, but also mRNA transcripts of HK1, HK2, PFK2, LDHA whereas it downregulated mRNA of LDHB. The expression of LDHA, but not that of LDHB increased after IHH. These alternations may be ascribed to the activity of HIF1 $\alpha$  [61] and are in accordance with recently published studies [15,16]. Reduction of aerobic capacity and the drop in CI activity are likely responsible for the altered NAD<sup>+</sup>/NADH ratio which may ultimately lead to reduced KC rates, but also may have impact on Ca<sup>2+</sup> homeostasis (*via* Ryanodine receptor regulation), increased PFK activity (*via* low sarcoplasmic citrate) and LDH activity (*via* reduction of malate/aspartate shuttle). The reduction of aerobic metabolism observed in SSM and IFM may be the reason of the CK system restructure. We observed an upregulation in CKB mRNA and protein expression (37 % and 42%, respectively), whereas the expression of CKM (by 17%) and mtCKS (by 37%) isoforms decreased. The overall CK activity rose in IHH LV homogenate by 55% when compared to the control. IHH thus promotes a different type of CK system remodelling than CNH in which mtCKS was upregulated [16]. However, both adaptations share the upregulated CK activity possibly *via* CKB expression. Interestingly, CKB upregulation likely reflects the upregulated carbohydrate metabolism as only CKBB and CKMB dimers activities are affected by insulin [63]. A negative regulation between CKM and changes in cellular redox

state [73] may explain the decrease in CKM expression. The proportional decline of CKM and elevation of CKB in M-band in this study suggests the presence of CKMB dimers in the M-band as CKB itself does not possess the desirable N-terminal binding domain [64] and may indicate that the lower mitochondrial ATP provision within the interfibrillar region is partially compensated by the upregulated glycolytic flux.

### **$\beta$ -oxidation shift from mitochondria to peroxisomes as oxygen saving strategy in IHH:**

In the light of the results from IHH study, it seems tempting to suggest that the upregulation of peroxisomal  $\beta$ -oxidation helps to utilize mitochondrially-unprocessed FAs but in certain conditions may also represent a very sophisticated oxygen saving mechanism. As it was mentioned, the activity of ACOX and other peroxisomal oxidases are coupled with hydrogen peroxide generation which is rapidly eliminated by the activity of catalase (CAT). Several studies have documented the activity and/or the expression of CAT to be upregulated by hypoxia [65,66]. We were unable to detect any significant increase in CAT expression. Nevertheless, CAT is an enzyme with dual enzyme activity. Whereas it processes  $H_2O_2$  molecules and further peroxidises proteins or lipids when ROS levels are low, it becomes catalytically active when ROS levels are high generating oxygen molecules [67]. Upregulation of ACOX in IHH modulates peroxisomal redox state possibly keeping CAT in its catalytically-active state thanks to the fact that peroxisomes are small and membranous organelles. In ischaemia, the heart switches the metabolism towards glucose utilization, nevertheless fatty acid oxidation continues to be the predominant source of energy [68]. Overall mitochondrial oxidative metabolism decreases in proportion to the decrease in cardiac oxygen supply and the intracellular FA levels rise. The co-ordinated activity of peroxisomal ACOX and CAT may alleviate higher sarcoplasmic FA levels, especially in the case of LCFAs. Moreover, the activity of CAT switched to  $O_2$  generation in IHH may be hereafter stimulated by FA flux in ischaemia enabling the myocardium to continue with oxidative processes. A portion of glycolytic flux may thus exclusively serve to stimulate peroxisomal FA oxidation in form of the pyruvate molecules. This mechanism would allow the long-chain acyl-CoA molecules to be processed without such needs of oxygen. Although not wholly, this phenomenon could also explain the abolishing effect of N-acetylcysteine (NAC) on IHH-induced cardioprotection [69]. CAT has been shown to participate in the protection of peroxisomal  $\beta$ -oxidation machinery from the effect of  $H_2O_2$  [70]. The antioxidant effect of NAC may reverse CAT catalytic activity in ischaemic conditions, promoting CAT peroxidase activity affecting peroxisomal function, thus abolishing the observed cardioprotective effect of IHH itself.

## **5. CONCLUSION**

In conclusion, our data suggest that the cardiac resistance to I/R injury induced by adaptation to chronic hypoxia is manifested mainly by alteration of cardiac energy metabolism. Both regimens of adaptation (i.e. CNH and IHH) promoted upregulation of glucose metabolism. This phenomenon was exhibited by upregulation of GLUT and HK, PFK and LDH and as whole may be ascribed to the combined effect of Akt and HIF-1

signalling. Both adaptations lead to the re-structure of CK system, illustrated by upregulation of CKB and downregulation of CKM. Contrary, the centre of lipid metabolism represented by mitochondrial subpopulations was subdued in IHH. However, this adaptation led to the increased proportion of peroxisomal  $\beta$ -oxidation capacity, possibly as consequence of decreased mitochondrial aerobic rates. This shift likely represents cardiac oxygen saving mechanism in FA utilization and is partly stimulated by elevated glycolytic rates and altered  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio serving as a basis of IHH-induced protection against  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial transition pore opening. Nevertheless, all of these energetic effects may provide the basis for cardioprotection against I/R by downregulation of ROS burst observed at the onset of reperfusion period, augmentation of  $\text{Ca}^{2+}$  handling, lowering the probability of mPTP opening, re-establishment of post-ischaemic cardiac functions, mitochondrial, and cellular protection.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY / REFERENCES

- [1] G.D. Lopaschuk, J.R. Usher, C.D.L. Folmes, J.S. Jaswal, W.C. Stanley, Myocardial fatty acid metabolism in health and disease., *Physiol. Rev.* 90 (2010) 207–58. doi:10.1152/physrev.00015.2009.
- [2] R. Ventura-Clapier, A. Garnier, V. Veksler, Energy metabolism in heart failure., *J. Physiol.* 555 (2004) 1–13. doi:10.1113/jphysiol.2003.055095.
- [3] S. Boudina, S. Sena, H. Theobald, X. Sheng, J.J. Wright, X.X. Hu, S. Aziz, J.I. Johnson, H. Bugger, V.G. Zaha, E.D. Abel, Mitochondrial Energetics in the Heart in Obesity-Related Diabetes: Direct Evidence for Increased Uncoupled Respiration and Activation of Uncoupling Proteins, *Diabetes*. 56 (2007) 2457–2466. doi:10.2337/db07-0481.
- [4] J.G. Duncan, Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813 (2011) 1351–1359. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.014.
- [5] D.I. Brown, M.S. Willis, J.M. Berthiaume, Influence of Ischemia-Reperfusion Injury on Cardiac Metabolism, in: *Sci. Guid. to Card. Metab.*, Elsevier, 2016; pp. 155–167. doi:10.1016/B978-0-12-802394-5.00011-X.
- [6] D. Shao, R. Tian, Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy, in: *Compr. Physiol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 331–351. doi:10.1002/cphy.c150016.
- [7] H. Taegtmeier, M.L. Overturf, Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit, *Hypertens.* (Dallas, Tex. 1979). 11 (1988) 416–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3366475>.
- [8] R. Tian, N. Musi, J. D'Agostino, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy., *Circulation*. 104 (2001) 1664–1669. doi:10.1161/01.circ.104.11.1664.
- [9] Z. Turek, K. Kubát, B.E. Ringnald, F. Kreuzer, Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude., *Basic Res. Cardiol.* 75 (n.d.) 544–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7436998>.
- [10] J.E. Baker, B.D. Curry, G.N. Olinger, G.J. Gross, Increased tolerance of the chronically hypoxic immature heart to ischemia. Contribution of the KATP channel., *Circulation*. 95 (1997) 1278–1285.
- [11] G. Asemu, J. Neckář, O. Szárszoi, F. Papoušek, B. Ošťádal, F. Kolář, Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats, *Physiol. Res.* 49 (2000) 597–606.
- [12] G. Asemu, F. Papoušek, B. Ošťádal, F. Kolář, Adaptation to High Altitude Hypoxia Protects the Rat Heart Against Ischemia-induced Arrhythmias. Involvement of Mitochondrial KATPChannel, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31 (1999) 1821–1831. doi:10.1006/jmcc.1999.1013.
- [13] B. Ostadal, F. Kolar, Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects., *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158 (2007) 224–36. doi:10.1016/j.resp.2007.03.005.
- [14] A.J. Belanger, Z. Luo, K.A. Vincent, G.Y. Akita, S.H. Cheng, R.J. Gregory, C. Jiang, Hypoxia-inducible factor 1 mediates hypoxia-induced cardiomyocyte lipid accumulation by reducing the DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364 (2007) 567–72. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.062.
- [15] X. Li, Y. Liu, H. Ma, Y. Guan, Y. Cao, Y. Tian, Y. Zhang, Enhancement of Glucose Metabolism via PGC-1 $\alpha$  Participates in the Cardioprotection of Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia, *Front. Physiol.* 7 (2016). doi:10.3389/fphys.2016.00219.
- [16] P. Waskova-Arnostova, D. Kasparova, B. Elsnicova, J. Novotny, J. Neckar, F. Kolar, J. Zurmanova, Chronic hypoxia enhances expression and activity of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in the rat ventricular myocardium., *Cell. Physiol. Biochem.* 33 (2014) 310–320. doi:10.1159/000356671.
- [17] A. Bass, B. Ostádal, J. Procházká, V. Pelouch, M. Samánek, M. Stejskalová, Intermittent high altitude--induced changes in energy metabolism in the rat myocardium and their reversibility., *Physiol. Bohemoslov.* 38 (1989) 155–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2528758>.
- [18] K.C. Ngumbela, M.N. Sack, M.F. Essop, Counter-regulatory effects of incremental hypoxia on the transcription of a cardiac fatty acid oxidation enzyme-encoding gene., *Mol. Cell. Biochem.* 250 (2003) 151–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12962153>.
- [19] D.J. Hausenloy, A. Tsang, M.M. Mocanu, D.M. Yellon, Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 (2005) H971–6. doi:10.1152/ajpheart.00374.2004.
- [20] J. Neckar, F. Papoušek, O. Novakova, B. Ost'adal, F. Kolar, J. Neckář, F. Papoušek, O. Nováková, B. Ošťádal, F. Kolář, J. Neckar, F. Papoušek, O. Novakova, B. Ost'adal, F. Kolar, Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive., *Basic Res. Cardiol.* 97 (2002) 161–167. doi:10.1007/s003950200007.
- [21] M. Muravyeva, I. Baotic, M. Bienengraeber, J. Lazar, Z.J. Bosnjak, F. Sedlic, D.C. Warltier, J.R. Kersten, Cardioprotection during diabetes: the role of mitochondrial DNA., *Anesthesiology*. 120 (2014) 870–9. doi:10.1097/ALN.000000000000107.
- [22] L.M. Gouveia, I.C. Kettelhut, M.C. Foss, Abnormalities of glucose metabolism in spontaneously hypertensive rats., *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas e Biol.* 33 (2000) 1357–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050668>.
- [23] M. Pravenec, V. Landa, V. Zidek, A. Musilová, L. Kazdová, N. Qi, J. Wang, E. St Lezin, T.W. Kurtz, Transgenic expression of CD36 in the spontaneously hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic disturbances

- but has no effect on hypertension., *Physiol. Res.* 52 (2003) 681–8.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640889>.
- [24] M.F. Essop, Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia, *J. Physiol.* 584 (2007) 715–726.  
 doi:10.1113/jphysiol.2007.143511.
- [25] A.J. Morash, A.O. Kotwica, A.J. Murray, Tissue-specific changes in fatty acid oxidation in hypoxic heart and skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 305 (2013) R534–R541. doi:10.1152/ajpregu.00510.2012.
- [26] D. Tello, E. Balsa, B. Acosta-Iborra, E. Fuertes-Yebra, A. Elorza, Á. Ordóñez, M. Corral-Escariz, I. Soro, E. López-Bernardo, E. Perales-Clemente, A. Martínez-Ruiz, J.A. Enríquez, J. Aragonés, S. Cadenas, M.O. Landázuri, Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 $\alpha$  decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity., *Cell Metab.* 14 (2011) 768–79. doi:10.1016/j.cmet.2011.10.008.
- [27] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Academies Press, Washington, D.C., 2011.  
 doi:10.17226/12910.
- [28] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [29] H. Laurell, J.S. Iacovoni, A. Abot, D. Svec, J.-J. Maoret, J.-F. Arnal, M. Kubista, Correction of RT–qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) e51–e51. doi:10.1093/nar/gkr1259.
- [30] D.J. Roberts, V.P. Tan-Sah, J.M. Smith, S. Miyamoto, Akt phosphorylates HK-II at Thr-473 and increases mitochondrial HK-II association to protect cardiomyocytes., *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 23798–806.  
 doi:10.1074/jbc.M113.482026.
- [31] N. Gurusamy, S. Goswami, G. Malik, D.K. Das, Oxidative injury induces selective rather than global inhibition of proteasomal activity, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44 (2008) 419–428. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.10.005.
- [32] P.L. Pedersen, S. Mathupala, A. Rempel, J. Geschwind, Y.H. Ko, Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1555 (2002) 14–20. doi:10.1016/S0005-2728(02)00248-7.
- [33] W.Y. Wani, M. Boyer-Guitaut, M. Dodson, J. Chatham, V. Darley-Usmar, J. Zhang, Regulation of autophagy by protein post-translational modification, *Lab. Invest.* 95 (2015) 14–25. doi:10.1038/labinvest.2014.131.
- [34] K.S. McCommiss, D.L. Douglas, M. Krenz, C.P. Baines, Cardiac-specific hexokinase 2 overexpression attenuates hypertrophy by increasing pentose phosphate pathway flux., *J. Am. Heart Assoc.* 2 (2013) e000355.  
 doi:10.1161/JAHA.113.000355.
- [35] J.G. Pastorino, J.B. Hoek, Regulation of hexokinase binding to VDAC., *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (2008) 171–82.  
 doi:10.1007/s10863-008-9148-8.
- [36] A.P.S.A. Santiago, E.A. Chaves, M.F. Oliveira, A. Galina, Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues., *Biochimie.* 90 (2008) 1566–77. doi:10.1016/j.biochi.2008.06.013.
- [37] J.G. Pastorino, N. Shulga, J.B. Hoek, Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 7610–8. doi:10.1074/jbc.M109950200.
- [38] N. Majewski, V. Nogueira, P. Bhaskar, P.E. Coy, J.E. Skeen, K. Gotlob, N.S. Chandel, C.B. Thompson, R.B. Robey, N. Hay, Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak., *Mol. Cell.* 16 (2004) 819–30. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.014.
- [39] K.M. Smeele, L.H. ter Horst, A. Koeman, S. Heikinen, M. Laakso, N.C. Weber, M.W. Hollmann, C.J. Zuurbier, The effect of standard chow and reduced hexokinase II on growth, cardiac and skeletal muscle hexokinase and low-flow cardiac ischaemia-reperfusion injury., *Lab. Anim.* 45 (2011) 160–166. doi:10.1258/la.2011.010096.
- [40] M. Dolder, B. Walzel, O. Speer, U. Schlattner, T. Wallimann, Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17760–6.  
 doi:10.1074/jbc.M208705200.
- [41] V.A. Saks, Y.O. Belikova, A. V Kuznetsov, In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP., *Biochim. Biophys. Acta.* 1074 (1991) 302–11.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065083>.
- [42] U. Schlattner, M. Tokarska-Schlattner, S. Ramirez, A. Brückner, L. Kay, C. Polge, R.F. Eppard, R.M. Lee, M.-L. Lacombe, R.M. Eppard, Mitochondrial kinases and their molecular interaction with cardiolipin., *Biochim. Biophys. Acta.* 1788 (2009) 2032–47. doi:10.1016/j.bbame.2009.04.018.
- [43] E.J. Lesnfsky, S. Moghaddas, B. Tandler, J. Kerner, C.L. Hoppel, Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: Ischemia–Reperfusion, Aging, and Heart Failure, *J Mol Cell Cardiol.* 33 (2001) 1065–1089.  
 doi:10.1006/jmcc.2001.1378.
- [44] D. Qi, L.H. Young, AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart., *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (2015) 422–9. doi:10.1016/j.tem.2015.05.010.
- [45] R.R. Russell, J. Li, D.L. Coven, M. Pypaert, C. Zechner, M. Palmeri, F.J. Giordano, J. Mu, M.J. Birnbaum, L.H. Young, AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury., *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 495–503. doi:10.1172/JCI19297.
- [46] A. Tzatsos, P.N. Tschlis, Energy depletion inhibits phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling and induces

- apoptosis via AMP-activated protein kinase-dependent phosphorylation of IRS-1 at Ser-794, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 18069–82. doi:10.1074/jbc.M610101200.
- [47] K. Gottlob, N. Majewski, S. Kennedy, E. Kandel, R.B. Robey, N. Hay, Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase., *Genes Dev.* 15 (2001) 1406–18. doi:10.1101/gad.889901.
- [48] T.O. Chan, S.E. Rittenhouse, P.N. Tsichlis, AKT/PKB and Other D3 Phosphoinositide-Regulated Kinases: Kinase Activation by Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 965–1014. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.965.
- [49] E. Fayard, Protein kinase B/Akt at a glance, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 5675–5678. doi:10.1242/jcs.02724.
- [50] H. Yu, T. Littlewood, M. Bennett, Akt isoforms in vascular disease, *Vascul. Pharmacol.* 71 (2015) 57–64. doi:10.1016/j.vph.2015.03.003.
- [51] S. John, J.N. Weiss, B. Ribalet, Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose., *PLoS One.* 6 (2011) e17674. doi:10.1371/journal.pone.0017674.
- [52] A.J. Muslin, B. DeBosch, Role of Akt in cardiac growth and metabolism., *Novartis Found Symp.* 274 (2006) 118–131, 152–155, 272–276. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17019809>.
- [53] M. Reinartz, A. Raupach, W. Kaisers, A. Gödecke, AKT1 and AKT2 induce distinct phosphorylation patterns in HL-1 cardiac myocytes, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 4232–4245. doi:10.1021/pr500131g.
- [54] S.-B. Ong, A.R. Hall, R.K. Dongworth, S. Kalkhoran, A. Pyakurel, L. Scorrano, D.J. Hausenloy, Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology., *Thromb. Haemost.* 113 (2015) 513–521. doi:10.1160/TH14-07-0592.
- [55] C.-C. Su, J.-Y. Yang, H.-B. Leu, Y. Chen, P.H. Wang, Mitochondrial Akt-regulated mitochondrial apoptosis signaling in cardiac muscle cells, *AJP Hear. Circ. Physiol.* 302 (2012) H716–H723. doi:10.1152/ajpheart.00455.2011.
- [56] J. Neckář, A. Svatoňová, R. Weissová, Z.Z.Z. Drahotá, P. Zajíčková, I. Brabcová, D. Kolář, P. Alánová, J. Vašíňová, J. Šilhavý, M. Hlaváčková, K. Tauchmannová, M. Milerová, B. Ošťádal, L. Červenka, J. Žurmanová, M. Kalous, O. Nováková, J. Novotný, M. Pravenec, F. Kolář, J. Neckar, A. Svatonova, R. Weissova, Z.Z.Z. Drahotá, P. Zajickova, I. Brabcova, D. Kolar, P. Alanova, J. Silhavy, M. Hlavackova, K. Tauchmannova, M. Milerova, B. Ostadal, L. Cervenka, J. Zurmanova, M. Kalous, O. Novakova, J. Novotny, M. Pravenec, F. Kolar, J. Neckář, A. Svatoňová, R. Weissová, Z.Z.Z. Drahotá, P. Zajíčková, I. Brabcová, D. Kolář, P. Alánová, J. Vašíňová, J. Šilhavý, M. Hlaváčková, K. Tauchmannová, M. Milerová, B. Ošťádal, L. Červenka, J. Žurmanová, M. Kalous, O. Nováková, J. Novotný, M. Pravenec, F. Kolář, Selective replacement of mitochondrial DNA increases cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats., *Clin. Sci.* 131 (2017) 865–881. doi:10.1042/CS20170083.
- [57] F. Díaz, H. Fukui, S. Garcia, C.T. Moraes, Cytochrome c Oxidase Is Required for the Assembly/Stability of Respiratory Complex I in Mouse Fibroblasts, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 4872–4881. doi:10.1128/MCB.01767-05.
- [58] J. Jezková, O. Nováková, F. Kolář, E. Tvrzická, J. Neckář, F. Novák, Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium., *Mol. Cell. Biochem.* 232 (2002) 49–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12030379>.
- [59] G. Paradies, V. Paradies, V. De Benedictis, F.M. Ruggiero, G. Petrosillo, Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837 (2014) 408–417. doi:10.1016/j.bbabbio.2013.10.006.
- [60] M.S. Sharpley, R.J. Shannon, F. Draghi, J. Hirst, Interactions between Phospholipids and NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from Bovine Mitochondria †, *Biochemistry.* 45 (2006) 241–248. doi:10.1021/bi051809x.
- [61] G.L. Semenza, Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine, *Cell.* 148 (2012) 399–408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021.
- [62] W. Ying, NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences., *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 179–206. doi:10.1089/ars.2007.1672.
- [63] S. Mítani, K. Okumura, H. Matsui, Y. Toki, H. Hashimoto, T. Ito, T. Hayakawa, Insulin alters cardiac muscle creatine kinase activity., *Heart Vessels.* 15 (2000) 23–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001482>.
- [64] T. Hornemann, S. Kempa, M. Himmel, K. Hayess, D.O. Fürst, T. Wallimann, Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein., *J. Mol. Biol.* 332 (2003) 877–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972258>.
- [65] H. Guo, Z. Zhang, L. Zhang, C. Xiong, C. Feng, Q. Liu, X. Liu, X. Shi, Y. Wang, Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects the heart against ischemia/reperfusion injury through upregulation of antioxidant enzymes in adult guinea pigs, *Acta Pharmacol. Sin.* 30 (2009) 947–955. doi:10.1038/aps.2009.57.
- [66] H. Awad, N. Nolette, M. Hinton, S. Dakshinamurti, AMPK and FoxO1 regulate catalase expression in hypoxic pulmonary arterial smooth muscle, *Pediatr. Pulmonol.* 49 (2014) 885–897. doi:10.1002/ppul.22919.
- [67] A.M. Vetrano, D.E. Heck, T.M. Mariano, V. Mishin, D.L. Laskin, J.D. Laskin, Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 35372–35381. doi:10.1074/jbc.M503991200.
- [68] W. STANLEY, Changes in cardiac metabolism: a critical step from stable angina to ischaemic cardiomyopathy, *Eur.*

- Hear. J. Suppl. 3 (2001) O2–O7. doi:10.1016/S1520-765X(01)90147-6.
- [69] F. Kolář, J. Jezková, P. Balková, J. Břeh, J. Neckář, F. Novák, O. Nováková, H. Tomášová, M. Srbová, B. Ost'ádal, J. Wilhelm, J. Herget, F. Kolář, J. Jezková, P. Balková, J. Břeh, J. Neckář, F. Novák, O. Nováková, H. Tomášová, M. Srbová, B. Ost'ádal, J. Wilhelm, J. Herget, F. Kolář, J. Jezková, P. Balková, J. Břeh, J. Neckář, F. Novák, O. Nováková, H. Tomášová, M. Srbová, B. Ost'ádal, J. Wilhelm, J. Herget, F. Novák, O. Nováková, H. Tomášová, M. Srbová, B. Ost'ádal, J. Wilhelm, J. Herget, Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292 (2007) H224-30. doi:10.1152/ajpheart.00689.2006.
- [70] F. Hashimoto, H. Hayashi, Significance of catalase in peroxisomal fatty acyl-CoA beta-oxidation: NADH oxidation by acetoacetyl-CoA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>., *J. Biochem.* 108 (1990) 426–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2277034>.
- [71] K.M.A. Smeele, R. Southworth, R. Wu, C. Xie, R. Nederlof, A. Warley, J.K. Nelson, P. van Horsen, J.P. van den Wijngaard, S. Heikkinen, M. Laakso, A. Koeman, M. Siebes, O. Eerbeek, F.G. Akar, H. Ardehali, M.W. Hollmann, C.J. Zuurbier, Disruption of hexokinase II-mitochondrial binding blocks ischemic preconditioning and causes rapid cardiac necrosis., *Circ. Res.* 108 (2011) 1165–9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.244962.
- [72] E.J. Lesnfsky, T.J. Slabe, M.S. Stoll, P.E. Minkler, C.L. Hoppel, Myocardial ischemia selectively depletes cardioliipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280 (2001) H2770-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356635>.
- [73] T.-J. Zhao, Y.-B. Yan, Y. Liu, H.-M. Zhou, The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle creatine kinase., *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12022–9. doi:10.1074/jbc.M610363200.
- [74] I. Nedvedova, D. Kolar, B. Elsnicova, D. Hornikova, J. Novotny, M. Kalous, M. Pravenec, J. Neckar, F. Kolar, J.M. Zurmanova, Mitochondrial genome modulates myocardial Akt/GLUT/HK salvage pathway in spontaneously hypertensive rats adapted to chronic hypoxia, *Physiol. Genomics.* (2018) [physiolgenomics.00040.2017](https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00040.2017). doi:10.1152/physiolgenomics.00040.2017.
- [75] D. Kolar, M. Gresikova, P. Waskova-Arnostova, B. Elsnicova, J. Kohutova, D. Hornikova, P. Vebr, J. Neckar, T. Blahova, D. Kasparova, J. Novotny, F. Kolar, O. Novakova, J.M. Zurmanova, Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult, *Mol. Cell. Biochem.* 432 (2017) 99–108. doi:10.1007/s11010-017-3001-5.

# CIRRICULUM VITAE

**Full name:** David Kolář  
**Mailing address:** K.H. Máchy 292, 407 01 Jílové (Czech Republic)  
**Date and place of birth:** 9<sup>th</sup> March 1987, Děčín (Czech Republic)  
**Telephone:** +420 723 087 960  
**E-mail address:** [kolar2@natur.cuni.cz](mailto:kolar2@natur.cuni.cz) or [cookydavid@gmail.com](mailto:cookydavid@gmail.com)

## Education:

*Ph.D.* 2013 – now Department of Physiology, Faculty of Science,  
Charles University, Prague, CZ  
Thesis topic: The role of energy metabolism in the  
cardioprotection induced by the adaptation to chronic  
hypoxia  
Supervisor: Dr. Jitka Zurmanova, Ph.D.

*M. Sc.* 2012–2013 Faculty of Science, Charles University, Prague, CZ  
Main study programme/subject of qualification: Biology /  
Animal Physiology  
Diploma Thesis: The role of lactate shuttle in ischemia-  
reperfusion of the rat heart adapted to chronic  
hypoxia  
Supervisor: Dr. Jitka Zurmanova, Ph.D.  
Consultant: Dr. Petra Wasková, Ph.D.

*B. Sc.* 2008–2012 Faculty of Science, Charles University, Prague, CZ  
Main study programme/subject of qualification: Chemistry  
/ Chemistry and Biology Focused on Education  
Bachelor Thesis: Energy metabolism of the heart during  
acute and chronic hypoxia  
Supervisor: Dr. Jitka Zurmanova, Ph.D.

*High-school* 2004-2008 Gymnázium Děčín, Děčín, CZ - *A-tests* (Czech, English, Chemistry, Biology)

## Grants:

Charles University Agency Grant No: 1052214  
Period: 2014 -2016  
Title: Monocarboxylate compounds and their potential role in the cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury  
Role: Principal investigator  
Outcome: Submitted study to Basic Research in Cardiology (2018)

Charles University Agency Grant No: 1214214  
Period: 2014 – 2016  
Title: Hypoxia inducible factor and its effect on energy metabolism of the heart in rat conplastic strain Shr-mtBN in adaptation to hypoxia  
Role: Co-investigator  
Outcome: see references - [56,74]

S.T.A.R.S. (Supporting Talented PhD Research Students) grant holder:  
Period: 2013-2017  
Topic: The role of Akt/HK2 signalling pathway in cardioprotective eddects of adaptation to hypoxia and regular exercise training  
Outcome: see reference [75]

## Publications:

**D. Kolar**, M. Gresikova, P. Waskova-Arnostova, B. Elsnicova, J. Kohutova, D. Hornikova, P. Vebr, J. Neckar, T. Blahova, D. Kasparova, J. Novotny, F. Kolar, O. Novakova, J.M. Zurmanova, Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult, *Mol. Cell. Biochem.* 432 (2017) 99–108. doi:10.1007/s11010-017-3001-5.

J. Neckář, A. Svatoňová, R. Weisssová, Z. Drahota, P. Zajíčková, I. Brabcová, **D. Kolář**, P. Alánová, J. Vašinová, J. Šilhavý, M. Hlaváčková, K. Tauchmannová, M. Milerová, B. Ošřádal, L. Cervenka, J. Žurmanová, M. Kalous, O. Nováková, J. Novotný, M. Pravenec, F. Kolář, Selective replacement of mitochondrial DNA increases cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats., *Clin. Sci.* 131 (2017) 865–881. doi:10.1042/CS20170083.

I. Nedvedova, **D. Kolar**, B. Elsnicova, D. Hornikova, J. Novotny, M. Kalous, M. Pravenec, J. Neckar, F. Kolar, J.M. Zurmanova, Mitochondrial genome modulates myocardial Akt/GLUT/HK salvage pathway in spontaneously hypertensive rats adapted to chronic hypoxia, *Physiol. Genomics.* (2018) *physiolgenomics.00040.2017*. doi:10.1152/physiolgenomics.00040.2017.

D. Manakov, **D. Kolar**, J. Zurmanova, M. Pravenec, J. Novotny, Changes in the activity of some metabolic enzymes in the heart of SHR rat incurred by transgenic expression of CD36, *J. Physiol. Biochem.* (2018). doi:10.1007/s13105-018-0641-1.

## Submitted publication:

**D. Kolar**, P. Waskova-Arnostova, B. Elsnicová, D. Sotakova, I. Nedvedova, M. Heles, J. Neckar, D. Hornikova, J. Kohutova, V. Tibenska, P. Vebr, M. Kalous, Z. Drahota, F. Kolar, O. Novakova, J. M. Zurmanova,  $\beta$ -oxidation shift from mitochondria to peroxisomes as oxygen saving strategy in the rat heart adapted to intermittent hypobaric hypoxia. (2018) *Submitted to Basic Research in Cardiology*.

## Educational activity:

2013 – 2017

### Practical course in animal and human physiology

**MB150C37; MB150C26C, MB150C31**

Practical assistant

Presentation: Course of cardiac physiology

2014-2016

### Muscle Physiology

**MB150P20**

Practical assistant – ergo-spirometry with successive workload

Presentation: ECG curve and basics of spirometry

2016-2017

### Supervisor of Bachelor thesis

by B.Sc. Denisa Čejková

Title: The role of peroxisomes in cardiac energy metabolism

06/2014

Opponent to Bachelor thesis by M.Sc. Eliška Flégrová

06/2015

Opponent to Bachelor thesis by M.Sc. Jiří Funda

09/2015

Opponent to Bachelor thesis by B.Sc. Petra Svatoňová

06/2016

Opponent to Bachelor thesis by Adéla Jeřábková

06/2016

Opponent to Bachelor thesis by B.Sc. Barbora Veselá

09/2016

Opponent to Bachelor thesis by Jana Nová

06/2017

Opponent to Bachelor thesis by B.Sc. Barbora Dvořáková

06/2017

Opponent to Bachelor thesis by B.Sc. Václav Tichý

09/2017

Opponent to Bachelor thesis by B.Sc. Lilla Biriczová

## Conferences:

07/2014

Frontiers in Cardiovascular Biology 2014, Barcelona; Poster presentation

02/2015

91<sup>st</sup> Physiological days, Brno; Poster session

10/2015

KEK Buchovice; Poster session

10/2015

World Congress on Targeting Mitochondria, Berlin; Poster session

06/2016

11<sup>th</sup> FLIM International Workshop, Prague

10/2016

KEK Stará Lesná, Poster Session

10/2017

KEK Kutná Hora, Organization team, Poster session

## Research interest:

Cellular and tissue physiology, cellular and muscle energetics, mitochondria, substrate metabolism, cardiovascular system, cardiac muscle adaptation

## Languages:

Czech (mother language), English (fluent in written and spoken), French (mais n'est pas beaucoup), German (beginner)

# SEZNAM PUBLIKACÍ / LIST OF PUBLICATIONS

## DOCTORAL THESIS-RELATED PUBLICATIONS

**Kolar, D.**, Gresikova, M., Waskova-Arnostova, P., Elsnicova, B., Kohutova, J., Hornikova, D., Vebr, P., Neckar, J., Blahova, T., Kasparova, D., et al. (2017). Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult. *Mol. Cell. Biochem.* 432, 99–108.

IF = 2.669

Nedvedova, I., **Kolar, D.**, Elsnicova, B., Hornikova, D., Novotny, J., Kalous, M., Pravenec, M., Neckar, J., Kolar, F., and Zurmanova, J.M. (2018). Mitochondrial genome modulates myocardial Akt/GLUT/HK salvage pathway in spontaneously hypertensive rats adapted to chronic hypoxia. *Physiol. Genomics* physiolgenomics.00040.2017.

IF = 3.004

## OTHER PUBLICATIONS

**Kolar, D.**, Waskova-Arnostova, P., Elsnicova B., Sotakova, D., Nedvedova, I., Heles, M., Neckar, J., Hornikova, D., Kohutova, J., Tibenska, V., et al. (2018).  $\beta$ -oxidation shift from mitochondria to peroxisomes as oxygen saving strategy in the rat heart adapted to intermittent hypobaric hypoxia. *Submitted to Basic Research in Cardiology*.

IF = 5.306

Neckar, J., Svatonova, A., Weissova, R., Drahota, Z., Zajickova, P., Brabcova, I., **Kolar, D.**, Alanova, P., Vasinova, J., Silhavy, J., et al. (2017). Selective replacement of mitochondrial DNA increases cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* CS20170083.

IF = 4.936

Manakov, D., **Kolar, D.**, Zurmanova, J., Pravenec, M., and Novotny J. (2018). Changes in the activity of some metabolic enzymes in the heart of SHR rat incurred by transgenic expression of CD36. *Journal of Physiology and Biochemistry*

IF = 2.444