

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

**Charles University  
Faculty of Science**



Autoreferát disertační práce  
Summary of doctoral thesis

**Úloha adrenergí signalizace v adaptivním mechanismu  
kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií**

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

**Mgr. Klára Hahnová**

Praha, 2019

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

*Univerzita Karlova*  
*a Akademie věd České republiky*

*Charles University*  
*and Czech Academy of Sciences*

Program: Fyziologie živočichů

Program: 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. Klára Hahnová

Školitel/Supervisor: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

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, Charles University.

## Abstrakt

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

V první části práce jsme se zaměřili na zkoumání vlivu protektivní kontinuální (CNH; 24 h/d) a neprotektivní intermitentní (INH; 23 h/d hypoxie, 1 h/d reoxygenace) normobarické hypoxie na  $\beta$ -adrenergní signalizaci v pravé (RV) a levé (LV) komoře myokardu potkanů kmene Wistar. Oba hypoxické modely vedly k poklesu exprese  $\beta_1$ -adrenergních receptorů ( $\beta_1$ -ARs) v RV. Ve vzorcích LV nebyly zjištěny žádné významné změny v  $\beta$ -ARs. Ačkoliv aktivita adenylátcyklázy (AC) stimulovaná Gs proteiny byla po adaptaci na CNH i INH v RV snížena a v LV zvýšená, nedošlo k odhalení významnějších změn v expresi dominantních isoform AC 5/6. V případě exprese Gs proteinů byl u obou hypoxických modelů odhalen pokles v RV. Tyto výsledky naznačují, že chronická normobarická hypoxie může mít silný vliv na myokardiální  $\beta$ -adrenergní signalizaci bez rozdílů mezi protektivním a neprotektivním modelem hypoxie.

V druhé části jsme se věnovali sledování vlivu CNH na  $\beta$ -adrenergní signalizaci a antioxidační systém v LV myokardu spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a konplastického SHR-mtBN kmene, který nese mitochondriální genom kmene Brown Norway na genetickém pozadí SHR kmene. Podíl  $\beta_2$ -ARs byl signifikantně vyšší u SHR-mtBN kmene než u SHR. Adaptace na CNH zvýšila celkový počet  $\beta$ -ARs a podíl  $\beta_2$ -ARs u SHR a snížila celkové množství  $\beta$ -ARs u SHR-mtBN. Aktivita AC stimulována isoprenalinem byla vyšší u SHR-mtBN. Po expozici potkanů na CNH byly u zkoumaných kmenů pozorovány odlišné změny v aktivitě AC. Zatímco u SHR kmene došlo vesměs k jejímu nárůstu, u SHR-mtBN k poklesu. Naopak aktivita MAO-A a její exprese byly signifikantně nižší u SHR-mtBN než u SHR a po adaptaci na CNH došlo u obou kmenů ke zvýšení těchto hodnot. Kromě toho CNH výrazně zvýšila expresi katalázy a aldehyddehydrogenázy-2 u obou kmenů a snížila expresi Cu/Zn superoxidismutázy u SHR. Tyto data ukazují, že výměna mitochondriálního genomu může vést ke specifickým změnám v  $\beta$ -adrenergní signalizaci, aktivitě MAO-A a antioxidační obraně a může také ovlivnit adaptivní odpovědi na hypoxii.

V poslední části této práce jsme sledovali vliv chronické intermitentní hypobarické hypoxie (IHH) na  $\beta$ -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkanů kmene Wistar. Celkový počet  $\beta$ -ARs se po adaptaci na IHH nezměnil, ale poměr jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs výrazně vzrostl v důsledku nárůstu  $\beta_2$ -ARs a poklesu  $\beta_1$ -ARs. Současně došlo vlivem hypoxie ke snížení exprese AC5 a zvýšení hladiny Gi proteinů. Naše data společně s dalšími výsledky odhalenými v této studii naznačují možnou roli  $\beta$ -ARs ve vývoji kardioprotektivního fenotypu.

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

## Abstract

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

In the first part of the thesis, we examined the effect of protective continuous (CNH; 24 h/day) and nonprotective intermittent (INH; 23 h/day hypoxia, 1 h/day reoxygenation) normobaric hypoxia on  $\beta$ -adrenergic signaling in the right (RV) and left ventricles (LV) of Wistar rats. Both hypoxic models led to decrease in  $\beta_1$ -adrenergic receptors ( $\beta_1$ -ARs) in RV. There were no significant changes in  $\beta$ -ARs in LV preparations. Although adenylyl cyclase (AC) activity stimulated through  $G_s$  proteins was decreased in the RV and increased in the LV after adaptation to CNH and INH, there were no significant changes in the expression of dominant AC 5/6 isoforms. Expression of  $G_s$  proteins was decreased in RV in both hypoxic models. These results suggest that chronic normobaric hypoxia may have a strong effect on myocardial  $\beta$ -adrenergic signaling without differences between protective and nonprotective model of hypoxia.

In the second part of this thesis, we studied the effect of CNH on  $\beta$ -adrenergic signaling and antioxidant system in the LV of spontaneously hypertensive rats (SHR) and in a conplastic SHR-mtBN strain carrying the mitochondrial genome of Brown Norway strain on the genetic background of SHR strain. The  $\beta_2$ -ARs proportion was significantly higher in SHR-mtBN strain than in SHR. Adaptation to CNH elevated the total number of  $\beta$ -ARs and proportion of  $\beta_2$ -ARs in SHR and decreased the total amount of  $\beta$ -ARs in SHR-mtBN. AC activity stimulated by isoprenaline was higher in SHR-mtBN. After exposure of rats to CNH were observed different changes in AC activity in both examined strains. Whereas AC activity in SHR strain increased, AC activity in SHR-mtBN decreased. On the other hand, the activity of MAO-A and its expression was significantly lower in SHR-mtBN than in SHR and these figures were elevated in both strains after exposure to CNH. In addition, CNH markedly enhanced the expression of catalase and aldehyde dehydrogenase-2 in both strains, and decreased the expression of Cu/Zn superoxide dismutase in SHR. These data indicate that alterations in the mitochondrial genome can result in distinctive changes in  $\beta$ -adrenergic signaling, MAO-A activity and antioxidant system and may also affect the adaptive responses to hypoxia.

In the last part of this thesis, we examined the effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia (IHH) on  $\beta$ -adrenergic signaling in the LV of Wistar rats. The total number of  $\beta$ -ARs did not change after adaptation to IHH, but the ratio of  $\beta$ -ARs subtypes markedly increased due to the  $\beta_2$ -ARs increase and  $\beta_1$ -ARs decrease. In parallel, adaptation to hypoxia caused decrease in expression of AC5 and increase of  $G_i$  protein levels. Our data, together with other results revealed in this study, suggest a possible role of  $\beta$ -ARs in the development of a cardioprotective phenotype.

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

## **Obsah / List of Contents:**

### Seznam zkratk / List of abbreviations

#### A. ČESKÁ ČÁST

1. Úvod.....	7
2. Cíle .....	8
3. Materiál a metodika.....	9
4. Výsledky a diskuze.....	10
5. Závěr .....	16

#### B. ENGLISH PART

6. Introduction.....	17
7. Aims .....	18
8. Materials and methods.....	19
9. Results and discussion.....	20
10. Conclusion.....	26
11. Seznam použité literatury / References.....	27
12. Životopis / Curriculum Vitae .....	33
13. Seznam publikací / List of publications.....	37

## Seznam zkratek / List of abbreviations

AC	adenylátcykláza / adenylyl cyclase
Akt	proteinkináza B / protein kinase B
ALDH-2	aldehyddehydrogenáza-2 / aldehyde dehydrogenase-2
ARs	adrenergní receptory / adrenergic receptors
B <sub>MAX</sub>	celkový počet $\beta$ -adrenergních receptorů / total number of $\beta$ -adrenergic receptors
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát / cyclic adenosin monophosphate
CAT	kataláza / catalase
CNH	kontinuální normobarická hypoxie / continuous normobaric hypoxia
COX-2	cyklooxygenáza -2 / cyclooxygenase-2
cPLA <sub>2</sub> $\alpha$	cytosolická fosfolipáza A <sub>2</sub> $\alpha$ / cytosolic phospholipase A <sub>2</sub> $\alpha$
ERK	extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza / extracellular signal-regulated kinase
G	G-protein / G-protein
G <sub>i</sub>	inhibiční G-protein / inhibitory G-protein
G <sub>s</sub>	stimulační G-protein / stimulatory G-protein
IHH	intermitentní hypobarická hypoxie / intermittent hypobaric hypoxia
INH	intermitentní normobarická hypoxie / intermittent normobaric hypoxia
I/R	ischemicko/reperfuze / ischemia-reperfusion
K <sub>D</sub>	disociační konstanta / dissociation constant
K <sub>i</sub>	inhibiční konstanta / inhibitory constant
LV	levá komora / left ventricles
MAO-A	monoaminoxidáza A / monoamine oxidase A
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza/ mitogen-activated protein kinase
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti / mitochondrial permeability transition pore
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub> / prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza / phosphatidylinositol-3 kinase
PKA	proteinkináza A / protein kinase A
RV	pravá komora / right ventricles
ROS	reaktivní formy kyslíku / reactive oxygen species
SEM	standardní chyba průměru / standard error of the mean
SHR	spontánně hypertenzní potkan / spontaneously hypertensive rat
SOD	superoxiddismutáza / superoxide dismutase

# A. ČESKÁ ČÁST

## 1. Úvod

Srdeční choroby, zejména akutní infarkt myokardu, patří v dnešní době stále k nejčastějším příčinám úmrtí ve vyspělých zemích. Adaptace na chronickou hypoxii představuje jeden z mechanismů, který myokard využívá k ochraně před ischemicko/reperfučním (I/R) poškozením. Značné množství studií potvrdilo, že adaptace myokardu na určité režimy chronické hypoxie vede ke zmenšení velikosti infarktu, snižuje počet komorových arytmií a zlepšuje obnovu srdeční kontraktility po akutním I/R poškození (Asemu *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2004; Ostadal and Kolar, 2007; Wang *et al.*, 2011; Naghshin *et al.*, 2012; Neckár *et al.*, 2013). Chronická hypoxie indukuje v srdci celou řadu adaptivních změn, které mohou být považovány za protektivní, ale přesné molekulární mechanismy těchto změn nejsou stále známy. Je zřejmé, že porozumění molekulárním mechanismům, které se účastní protekce myokardu, je nezbytným předpokladem pro vývoj účinných farmakologických látek, které by mohly být použity v klinické praxi.

Existují určité indicie, které poukazují na možnou roli  $\beta$ -adrenergických receptorů ( $\beta$ -ARs) v protekci myokardu indukované hypoxii. Chronická hypoxie vede ke zvýšené aktivitě sympatického nervového systému, což má za následek zvýšenou hladinu katecholaminů v těle (Johnson *et al.*, 1983). Nárůst katecholaminů a jejich vliv na  $\beta$ -adrenergní signalizaci může přispět k rozvoji kardioprotektivního fenotypu (Frances *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2005; Salie *et al.*, 2011). Zapojení  $\beta$ -ARs v kardioprotekci indukované hypoxii bylo prokázáno zablokováním jednoho podtypů těchto receptorů během intermitentní hypoxie, což se projevilo výrazným oslabením protektivního účinku hypoxie (Mallet *et al.*, 2006).

Jsou známy 3 podtypy  $\beta$ -ARs -  $\beta_1$ -ARs,  $\beta_2$ -ARs a  $\beta_3$ -ARs (Kobilka, 2011). V kardiomyocytech mají největší zastoupení především  $\beta_1$ - a  $\beta_2$ -ARs podtypy (Brodde, 1991; Rockman *et al.*, 2002).  $\beta$ -ARs transdukuje signál obdrženy po vazbě katecholaminu přes G-proteiny k jejich následným efektorovým molekulám. Jak  $\beta_1$ -ARs tak  $\beta_2$ -ARs jsou spřaženy se stimulačními G-proteiny (Gs proteiny), které aktivují adenylátcyklázu (AC), což vede k tvorbě cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Zvýšená hladina cAMP má za následek jeho vazbu na regulační podjednotku cAMP-dependentní proteinkinázy A (PKA), což vede k její aktivaci. Aktivovaná PKA fosforyluje různé cílové proteiny, které se podílejí na zvýšení srdeční kontrakce, frekvence a rychlosti srdeční relaxace (Li *et al.*, 2000; Bers, 2002; Salazar *et al.*, 2007).  $\beta_2$ -ARs mohou na rozdíl od  $\beta_1$ -ARs působit také dráhou, která je spojená s inhibičními G-proteiny (Gi proteiny). K přepnutí signalizace od Gs na Gi je zapotřebí fosforylace intracelulární části receptoru (Daaka *et al.*, 1997). Bylo prokázáno, že  $\beta_2$ -ARs-Gi signalizace kromě inhibice aktivity AC (Xiao *et al.*, 1999) indukuje nábor a aktivaci dalších signálních molekul, včetně ERK (extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza), cPLA $2\alpha$  (cytosolická fosfolipáza A $2\alpha$ ), PI3K

(fosfatidylinositol-3 kináza) a Akt kinázy, u kterých se prokázalo, že ovlivňují růst kardiomyocytů a zabraňují jejich apoptóze (Luttrell *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001; Pavoine *et al.*, 2003).

## 2. Cíle

Hlavním cílem této práce bylo sledování vlivu různých modelů chronické hypoxie na  $\beta$ -adrenergní signalizaci v myokardu potkana a možném zapojení této signální dráhy v molekulárních mechanismech kardioprotekce.

### **Přehled specifických cílů:**

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

- stanovení celkového počtu ( $B_{MAX}$ ) a disociační konstanty ( $K_D$ )  $\beta$ -ARs
- zjištění poměru jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs ( $\beta_1$ -ARs a  $\beta_2$ -ARs) a hodnoty inhibiční konstanty ( $K_i$ )  $\beta$ -ARs pomocí vazebných studií
- stanovení zastoupení  $\beta$ -ARs na úrovni mRNA
- analýza změn na úrovni proteinů u vybraných komponent  $\beta$ -adrenergní signalizace ( $G_s\alpha$ ,  $G_\beta$ , AC)
- stanovení enzymové aktivity AC

**Cíl 2:** Sledování vlivu CNH na  $\beta$ -adrenergní signalizaci, monoaminooxidázu A (MAO-A) a vybrané komponenty antioxidačního systému v LV myokardu SHR a SHR-mtBN potkanů

- stanovení celkového počtu ( $B_{MAX}$ ) a disociační konstanty ( $K_D$ )  $\beta$ -ARs
- zjištění poměru jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs ( $\beta_1$ -ARs a  $\beta_2$ -ARs) a hodnoty inhibiční konstanty ( $K_i$ )  $\beta$ -ARs pomocí vazebných studií
- stanovení aktivity AC a MAO-A
- sledování zastoupení MAO-A a vybraných antioxidačních enzymů (katalázy, aldehyddehydrogenázy-2 (ALDH-2), Cu/ZnSOD, MnSOD) na úrovni mRNA a proteinů
- porovnání možných rozdílů v  $\beta$ -adrenergní signalizaci a antioxidačním systému mezi jednotlivými kmeny potkanů (SHR, SHR-mtBN)

**Cíl 3:** Sledování vlivu chronické intermitentní hypobarické hypoxie na  $\beta$ -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkana

- stanovení celkového počtu ( $B_{MAX}$ ) a disociační konstanty ( $K_D$ )  $\beta$ -ARs
- zjištění poměru jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs ( $\beta_1$ -ARs a  $\beta_2$ -ARs) a hodnoty inhibiční konstanty ( $K_i$ )  $\beta$ -ARs pomocí vazebných studií
- sledování zastoupení vybraných komponent  $\beta$ -adrenergní signalizace (AC5, AC6,  $G_{i\alpha 1,2}$ ,  $G_{i\alpha 3}$ )



### **3. Materiál a metodika**

#### **Laboratorní zvířata**

K experimentům byli použiti samci potkanů kmene Wistar, SHR (spontánně hypertenzní potkan) a SHR-mtBN. SHR-mtBN je konplastický kmen, který nese mitochondriální genom vysoce inbredního kmene Brown Norway (BN) na jaderném genetickém pozadí SHR potkanů. Experimentální protokoly byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České Republiky. Všechny experimenty byly provedeny v souladu s „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ publikovaným v US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revidováno 1996).

#### **Experimentální modely chronické hypoxie**

V našich studiích byly použity tři modely chronické hypoxie: kontinuální normobarická hypoxie (CNH; 3 týdny, 24 h/d), intermitentní normobarická hypoxie (INH; 3 týdny, 23 h/d hypoxie, 1 h/d reoxygenace) a intermitentní hypobarická hypoxie (IHH; 5 týdnů, 5 dní/týden, 8 h/d). Kontrolní skupiny potkanů byly po stejný časový úsek chovány v normoxických podmínkách.

#### **Homogenizace a frakcionace tkáně**

Srdce potkanů byla po vyjmutí rozdělena na jednotlivé srdeční oddíly. Pravé (RV) a levé komory (LV) byly dále homogenizovány, frakcionovány a uchovány v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

#### **Vazebné studie**

Ke stanovení celkového počtu  $\beta$ -ARs a disociační konstanty bylo využito saturačních vazebných studií za použití radioligandu [ $^3$ H]CGP 12177. Poměr jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs ( $\beta_1$ -ARs a  $\beta_2$ -ARs) a jejich inhibiční konstanty byly stanoveny prostřednictvím kompetičních vazebných studií za použití fixní koncentrace [ $^3$ H]CGP 12177 a rostoucí koncentrace selektivního antagonisty  $\beta_2$ -ARs ICI 118,551.

#### **Izolace RNA a Real-time PCR**

Izolace celkové buněčné RNA byla provedena za použití RNAzolu či TRIzolu. Získaná RNA byla přepsána v procesu reverzní transkripce do cDNA. Analýzy Real-time PCR byly provedeny na přístroji Light Cycler LC 480. Hladiny analyzovaných transkriptů byly vztaženy na relativní hodnotu referenčního genu ribosomální podjednotky 18S či hypoxanthin fosforibosyltransferázy. Stanovení bylo provedeno Mgr. Ivetou Nedvědovou, Ph.D.

## SDS-PAGE elektroforéza a Western Blot analýza

Ke stanovení exprese analyzovaných proteinů byla využita gelová elektroforéza s následným přenosem na nitrocelulóзовou membránu a detekci specifickými protilátkami.

### Stanovení aktivity adenylátcyklázy

Aktivita AC byla stanovena měřením přeměny [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP na [ $^{32}$ P]cAMP (Ihnatovych *et al.*, 2001). I. Kromě bazální aktivity AC byla stanovena její enzymová aktivita modulována různými stimulatory (10  $\mu$ M isoprenalin, 10  $\mu$ M forskolin, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M GTP $\gamma$ S a 10 mM NaF).

### Stanovení aktivity monoaminoxidázy-A

Aktivita MAO-A byla stanovena za použití kynuramin dihydrobromidu jako substrátu v přítomnosti deprenylu, inhibitoru MAO-B (Xu *et al.*, 2005) Fluorescence vzniklého produktu byla měřena na 96-jamkové destičce při Ex 310-nm/Em 380-nm na přístroji Biotek Synergy HT.

### Statistické zpracování dat

Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr a rozptyl dat jako standartní chyba průměru (SEM). Výsledky byly statisticky zpracovány programem GraphPad Prism 6 s využitím testu OneWay ANOVA s následným Student-Newman-Keuls testem. Za statisticky významný byl považován rozdíl s hladinou významnosti  $p < 0.05$ .

## 4. Výsledky a diskuze

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

První výsledky této studie ukázaly, že adaptace potkanů kmene Wistar na protektivní (CNH) a neprotektivní (INH) model chronické normobarické hypoxie vedla k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti (CNH o 15%; INH o 14%) v porovnání s normoxickou skupinou. Na druhou stranu hmotnost srdce u hypoxických modelů vzrostla a to v důsledku výrazné hypertrofie RV. Námi zaznamenané změny v hmotnostních parametrech se shodují s výsledky předchozích studií na podobných modelech (Tual *et al.*, 2006; Laursen *et al.*, 2008; Baandrup *et al.*, 2011; Neckár *et al.*, 2013).

K charakterizaci  $\beta$ -ARs v RV a LV byly použity vazebné studie. Saturační studie nám ukázali, že v případě LV neměla CNH ani INH vliv na celkové množství  $\beta$ -ARs, což odpovídá některým předchozím studiím (Winter *et al.*, 1986; Germack *et al.*, 2002; Hrbasová *et al.*, 2003). Na druhou stranu ale existují studie, které naopak prokázaly pokles  $\beta$ -ARs v LV (Voelkel *et al.*, 1981; Kacimi *et al.*, 1992; León-Velarde *et al.*, 2001; Favret

*et al.*, 2001). Tento odlišný výsledek může být daný rozdílnými experimentálními podmínkami.

Na rozdíl od LV byl u RV v naší studii zaznamenán signifikantní pokles celkového počtu  $\beta$ -ARs u obou hypoxických skupin potkanů. Z výsledků kompetičních studií, které u CNH i IHN odhalily změnu poměru jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs ve prospěch  $\beta_2$ -ARs, se zdá, že tento pokles lze přičíst úbytku  $\beta_1$ -ARs. Selektivní pokles  $\beta_1$ -ARs je obvykle pozorován během srdeční hypertrofie. Převážná většina studií zaměřujících se na spojení srdeční hypertrofie se změnami v distribuci jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs byla ale provedena na LV (Galiner *et al.*, 1992; Communal *et al.*, 1998; Sethi *et al.*, 2007). V případě hypertrofie RV byl sice taktéž zaznamenán signifikantní pokles v celkovém množství  $\beta$ -ARs, ale změny na úrovni jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs nebyly v těchto studiích zjišťovány (Voelkel *et al.*, 1981; Ishikawa *et al.*, 1991; Yoshie *et al.*, 1994; Favret *et al.*, 2001). Existuje studie, která po adaptaci na hypobarickou hypoxii prokázala pokles celkového počtu  $\beta$ -ARs v obou komorách, jenž byl způsoben selektivním poklesem  $\beta_1$ -ARs, ale pravděpodobně z důvodu krátkodobé expozice v tomto případě nedošlo k hypertrofii RV (Mardon *et al.*, 1998). Naše výsledky tedy ukázaly, že expozice potkanů na CNH a IHN vyvolává v hypertrofované RV podobné změny v distribuci  $\beta$ -ARs podtypů, jako byly pozorovány u různých typů hypertrofie LV a ve studii Mardon a spol.

Pozorovaný pokles hladiny  $\beta_1$ -ARs na úrovni proteinů v RV u CNH a IHN byl dále podpořen poklesem  $\beta_1$ -ARs rovněž na úrovni mRNA. Podobný výsledek byl také prokázán ve studii Piao a spol., kde byl ale oproti naší studii zjištěn pokles hladiny mRNA  $\beta_1$ -ARs v obou komorách (Piao *et al.*, 2012).

Naše další experimenty odhalily vliv CNH a IHN na distribuci Gs $\alpha$  proteinů v RV, ve které byl zaznamenán významný úbytek exprese těchto proteinů. Pozorovaný pokles Gs $\alpha$  proteinů odpovídá výsledkům studie Guan a spol., ve které byla odhalena nižší exprese tohoto proteinu v RV po expozici potkanů na IHN (Guan *et al.*, 2010). Hladina AC 5/6 se u hypoxických potkanů ve srovnání s normoxickou skupinou nijak významně nelišila ani v jedné komoře.

Dále jsme zkoumali aktivitu AC a to jak na bazální úrovni, tak po modulaci různými stimulatory. Naše výsledky ukázaly, že působení jednotlivých stimulatorů mělo opačný účinek na aktivitu AC v RV a LV. Ačkoliv adaptace na CNH i IHN mezi jednotlivými vzorky nezpůsobila žádné znatelné změny v bazální aktivitě AC, oba hypoxické modely snížily aktivitu stimulovanou Gs proteiny prostřednictvím GTP $\gamma$ S v RV a naopak zvýšily tuto aktivitu v LV. Snížení aktivity AC v RV může být alespoň částečně vysvětleno pozorovaným poklesem hladiny Gs proteinů po adaptaci na oba modely hypoxie, což zároveň dobře odpovídá dříve pozorovaným změnám aktivity AC u vzorků hypertrofovaných srdcí (Böhm *et al.*, 1997; Tse *et al.*, 2000; Novotny *et al.*, 2003). Některé předchozí studie zaznamenaly pokles aktivity tohoto systému nejen v RV, ale také v LV. V případě těchto studií byl použit model hypobarické hypoxie a potlačení aktivity AC bylo pozorováno také po aplikaci jiných stimulatorů než jen GTP $\gamma$ S (Mardon *et al.*, 1998; León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). Opačný účinek jednotlivých stimulatorů na aktivitu AC v RV a LV potkanů adaptovaných na CNH a IHN může být přičítán hypertrofii

RV, která vede k narušení tohoto signálního systému. Na druhou stranu, pozorované zvýšení enzymové aktivity AC v LV po stimulaci prostřednictvím GTP $\gamma$ S a rovněž pomocí forskolinu a NaF u obou hypoxických modelů naznačuje efektivnější spojení mezi Gs proteiny a AC. Zdá se, že toto spojení by se mohlo nějakým způsobem podílet na vývoji kardioprotektivního fenotypu. Je zajímavé, že schopnost isoprenalinu, jakožto agonisty  $\beta$ -ARs, ke stimulaci AC byla v obou komorách jen mírně snížena. V RV může být tento pokles pravděpodobně vysvětlen snížením celkového počtu  $\beta$ -ARs. Zeslabená  $\beta$ -adrenergní signalizace se často objevuje u srdeční hypertrofie, stejně jako za jiných stresových podmínek (Böhm *et al.*, 1997; Vatner *et al.*, 1999; Nishizawa *et al.*, 2004; Myslivecek *et al.*, 2008).

## Cíl 2: Sledování vlivu CNH na $\beta$ -adrenergní signalizaci, monoaminoxidázu A (MAO-A) a vybrané komponenty antioxidačního systému v LV myokardu SHR a SHR-mtBN potkanů

V této studii jsme se zaměřili na zkoumání vlivu substituce mitochondriálního genomu na  $\beta$ -adrenergní signalizaci a antioxidační systém u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) za normoxických a hypoxických podmínek (CNH). Pokusy byly prováděny souběžně na dvou kmenech, SHR a SHR-mtBN, což je konplastický kmen, který nese mitochondriální genom kmene Brown Norway na genetickém pozadí SHR kmene. Konplastický kmen vykazuje stejnou velikost infarktu myokardu způsobenou I/R poškozením jako původní SHR kmen. Ačkoliv adaptace na CNH zlepšila ischemickou toleranci myokardu u obou kmenů, její účinnost na snížení velikosti infarktu byla větší u konplastického SHR-mtBN kmene než u SHR (Neckář *et al.*, 2017). Rostoucí množství důkazů naznačuje, že mitochondriální DNA je nezbytná pro buněčný fenotyp a tudíž může pomáhat buňkám se adaptovat na stres a další podmínky prostředí (Kelly *et al.*, 2013).

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

V první části studie jsme se zaměřili na  $\beta$ -adrenergní signalizaci. Naše výsledky z vazebných studií odhalily významně vyšší podíl  $\beta_2$ -ARs v LV SHR-mtBN kmene ve srovnání s SHR a že CNH měla různý vliv na distribuci  $\beta$ -ARs v obou kmenech. Zatímco u SHR kmene vedla CNH k nárůstu celkového počtu  $\beta$ -ARs pravděpodobně v důsledku zvýšené exprese  $\beta_2$ -ARs, u konplastického kmene došlo naopak k poklesu celkového množství  $\beta$ -ARs bez změny podílu jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs.

Za normoxických podmínek bylo u SHR-mtBN potkanů odhaleno zvýšené množství  $\beta$ -ARs ve srovnání s SHR kmenem, což se projevilo zvýšenou schopností isoprenalinu stimulovat aktivitu AC. Na druhou stranu, vlivem CNH byla tato aktivita u

SHR-mtBN kmene snižená, což bylo v souladu s nižší expresí  $\beta$ -ARs u těchto zvířat. Enzymová aktivita stimulována forskolinem a NaF, tedy stimulatory, které mohou modulovat aktivitu AC přímo nebo prostřednictvím G-proteinů, byla zvýšená u hypoxické SHR skupiny. Naproti tomu, u konplastického kmene byla aktivita stimulovaná NaF zvýšená již za normoxických podmínek a vlivem CNH došlo k jejímu poklesu. Tyto specifické rozdíly mezi kmeny mohou být pravděpodobně vysvětleny změnou schopnosti G-proteinů regulovat aktivitu AC.

Pozorovaný pokles celkového počtu  $\beta$ -ARs u hypoxické skupiny SHR-mtBN byl v souladu s výsledky předchozích studií, které ale nezkoumaly zastoupení jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs (Mader *et al.*, 1991; Kacimi *et al.*, 1992; León-Velarde *et al.*, 2001). Výjimkou byla studie Mardon a spol., která prokázala selektivní pokles  $\beta_1$ -ARs způsobený vlivem 5-denní hypoxie (Mardon *et al.*, 1998). Také námi odhalený pokles aktivity AC po stimulaci isoprenalinem a NaF u konplastického kmene adaptovaného na CNH odpovídá dříve publikovaným datům (León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). Na druhou stranu zvýšená schopnost G-proteinů stimulovat enzymovou aktivitu AC u hypoxické skupiny SHR nebyla dříve pozorována a může představovat specifický rys tohoto kmene.

Je známo, že  $\beta_2$ -ARs aktivují kinázy přežívání a zmírňují dysfunkci mitochondrií během oxidačního stresu prostřednictvím inhibice otevírání mitochondriálních porů přechodné propustnosti (mPTP) (Fajardo *et al.*, 2011). Zvýšený podíl  $\beta_2$ -ARs u konplastického kmene ve srovnání s SHR a pokles celkového množství  $\beta$ -ARs u tohoto kmene po adaptaci na CNH může tedy přispět k lepší ochraně SHR-mtBN potkanů před akutním I/R poškozením (Neckář *et al.*, 2017).

V další části studie jsme zaměřili náš zájem na monoaminoxidázu A (MAO-A), což je převládající isoforma MAO v myokardu. MAO je důležitý mitochondriální enzym, který katalyzuje oxidační deaminaci katecholaminů (Schömig *et al.*, 1987) a patří mezi hlavní producenty reaktivních forem kyslíku (ROS) v kardiomyocytech (Anderson *et al.*, 2014). Naše výsledky ukázaly, že jak exprese, tak aktivita tohoto enzymu byla nižší u SHR-mtBN zvířat než SHR a že adaptace potkanů na CNH vedla k výraznému nárůstu těchto hodnot u obou kmenů. Nicméně i za hypoxických podmínek zůstaly tyto hodnoty u SHR-mtBN kmene stále signifikantně nižší ve srovnání s SHR, což lze považovat za specifický rys tohoto kmene. Pozorovaný nárůst obou sledovaných hodnot MAO-A po CNH může poukazovat na důležitou roli tohoto enzymu v adaptačních reakcích na chronickou hypoxii. Naše výsledky jsou v rozporu s dřívější studií, ve které autoři neprokázali žádnou významnou změnu aktivity MAO v kožím myokardu po adaptaci na hypobarickou hypoxii (Maher *et al.*, 1978). Tento rozpor může být vysvětlen použitím rozdílných modelů a experimentálních podmínek. Existují určité náznaky, které poukazují na to, že případné změny v aktivitě MAO mohou záviset na délce trvání hypoxické expozice (Shatemirova *et al.*, 1990).

Je dobře známo, že chronická hypoxie a stimulace  $\beta$ -ARs může mít za následek zvýšení produkce mitochondriálních ROS v kardiomyocytech (Földes-Papp *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). Zatímco přiměřený nárůst hladiny ROS je důležitý pro dosažení protektivního účinku hypoxické expozice (Kolár *et al.*, 2007;

Kasparova *et al.*, 2015), vysoká hladina ROS může naopak způsobit nadměrný oxidační stres v kardiomyocytech. Škodlivé účinky ROS generovaných z různých zdrojů, včetně mitochondrií a MAO, jsou pravidelně potlačovány řadou endogenních antioxidačních obranných mechanismů. Proto jsme se dále zaměřili na studium exprese vybraných komponent antioxidačního systému - superoxidodismutáz (SOD), katalázy (CAT) a aldehyddehydrogenázy-2 (ALDH-2). Porovnání hladin exprese těchto enzymů na úrovni mRNA a proteinů ve vzorcích z SHR a SHR-mtBN zvířat neodhalilo za normoxických podmínek žádné významné rozdíly mezi těmito kmeny. Adaptace na CNH výrazně zvýšila hladiny proteinů CAT a ALDH-2, ale neměla vliv na expresi MnSOD ve vzorcích obou kmenů. Na druhou stranu, CNH měla za následek výrazný pokles hladiny proteinu Cu/ZnSOD u SHR kmene, bez významného rozdílu u SHR-mtBN skupiny.

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

### Cíl 3: Sledování vlivu chronické intermitentní hypobarické hypoxie na $\beta$ -adrenergní signalizaci v LV myokardu potkana

Naše poslední studie se zabývala možnou úlohou  $\beta$ -adrenergní signalizace v regulaci syntézy prostaglandinu  $E_2$  ( $PGE_2$ ) závislé na cytosolické fosfolipáze  $A_2\alpha$  (cPLA $_{2\alpha}$ ) u potkanů adaptovaných na intermitentní hypobarickou hypoxie (IHH). Adaptace na IHH může mít stejně jako adaptace na CNH dlouhodobé kardioprotektivní účinky proti akutnímu I/R poškození (Asemu *et al.*, 1999; Neckář *et al.*, 2002).

Je známo, že  $\beta$ -ARs a jejich signální dráhy hrají klíčovou roli v regulaci srdeční funkce (Floreana and Blatter, 2012). Za stresových podmínek, dochází ke spuštění  $\beta_2$ -ARs-Gi signalizace, což následně vede k aktivaci dráhy přežívání zahrnující G $\beta\gamma$  podjednotku, PI3K a Akt kinázy, které hrají zásadní roli v protekci kardiomyocytů před apoptózou (Chesley *et al.*, 2000). Za stresových podmínek dochází také ke zvýšení aktivity cPLA $_{2\alpha}$  a to v důsledku snížené hladiny  $\beta_1$ -ARs, odpojení  $\beta_2$ -ARs od Gs-AC-PKA signální dráhy a současného zvýšení spřažení  $\beta_2$ -ARs s Gi-cPLA $_{2\alpha}$ -COX-2 (cyklooxygenáza 2) dráhou

(Pavoine *et al.*, 2003; Kozlovski *et al.*, 2015). cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  uvolňuje z fosfolipidů kyselinu arachidonovou, která může sloužit jako substrát pro COX, jejichž metabolické dráhy vedou k tvorbě eikosanoidů (např. PGE<sub>2</sub>) (Burke and Dennis, 2009). I přes tyto známé poznatky nebyla dosud studována možná role  $\beta$ -adrenergní signální dráhy v regulaci syntézy PGE<sub>2</sub> zprostředkované prostřednictvím cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  v chronicky hypoxickém myokardu.

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

Zdá se, že aktivace  $\beta$ -ARs může hrát zásadní roli při rozvoji silné ischemické rezistence myokardu indukované hypoxickou expozicí (Mallet *et al.*, 2006). Nicméně publikovaná data o účincích chronické hypoxie na  $\beta$ -ARs se liší a to pravděpodobně v závislosti na zvolených experimentálních podmínkách. Námi zvolené podmínky, při nichž byli potkani vystaveni IHH, neměly vliv na celkový počet  $\beta$ -ARs, což odpovídá výsledkům některých předchozích studií (Winter *et al.*, 1986; Germack *et al.*, 2002; Hahnova *et al.*, 2016). Na druhou stranu se výrazně změnil poměr jednotlivých podtypů  $\beta$ -ARs a to ve prospěch  $\beta_2$ -ARs.

Nárůst podílu  $\beta_2$ -ARs po adaptaci na IHH byl dále doprovázen signifikantním snížením exprese AC5 a zvýšenou expresí G<sub>i</sub> proteinů. Pozorovaný pokles hladiny AC5 odpovídá předchozím zjištěním, při nichž byla odhalena snížená aktivita AC po expozici potkanů na hypobarickou hypoxii (Mardon *et al.*, 1998; León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). Také další studie ukázaly, že AC5 představuje důležitou signální molekulu regulující životnost a narušení její exprese může hrát významnou roli v protekci myokardu (Okumura *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2007). Zvýšená exprese G<sub>i</sub> proteinů odhalena v naší studii se shoduje s výsledky studie Mardon a spol. (Mardon *et al.*, 1998).

Další výsledky z naší studie odhalily výrazný nárůst nejen celkového množství cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ , ale také její fosforylované formy po adaptaci na IHH. Kromě toho došlo ke zvýšení exprese COX-2 a PGE<sub>2</sub> a souběžně byla zjištěna zvýšená fosforylace mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK) ERK 1/2 a p38 (Mícova *et al.*, 2016). Získané poznatky naznačily, že expozice potkanů na IHH vede k posílení myokardiální  $\beta_2$ -ARs-G<sub>i</sub> signalizace, což může vést k aktivaci cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ -COX-2 signální dráhy prostřednictvím ERK/p38 kaskády.

## 5. Závěr

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

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

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

Naše poslední studie prokázala, že expozice potkanů na IHH měla za následek komplexní změny v signální kaskádě spouštěné  $\beta$ -ARs. Pozorovaný nárůst myokardiálních  $\beta_2$ -ARs byl doprovázen poklesem hladiny AC5 a zvýšenou expresi Gi proteinů. Další výsledky dané studie odhalily zvýšenou fosforylaci ERK 1/2 a p38 kinázy. Stimulace těchto MAPK prostřednictvím  $\beta_2$ -ARs-Gi signalizace může být přímo spojena s aktivací cPLA $_2\alpha$ -COX-2-PGE $_2$  signální dráhy. Tyto výsledky naznačují, že se  $\beta$ -ARs mohou podílet na vývoji kardioprotektivního fenotypu u potkanů adaptovaných na IHH a to prostřednictvím aktivace signální dráhy vedoucí ke stimulaci cPLA $_2\alpha$ .



## B. ENGLISH PART

### 6. Introduction

Cardiovascular diseases, especially acute myocardial infarction, are nowadays one of the most common causes of death in developed countries. Adaptation to chronic hypoxia is one of the mechanisms that myocardium used to protect against ischemia/reperfusion (I/R) injury. A large number of studies have confirmed that adaptation of myocardium to certain regimens of chronic hypoxia leads to a reduction in infarct size, reduces the number of ventricular arrhythmias, and improves the recovery of cardiac contractility after acute I/R injury (Asemu *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2004; Ostadal and Kolar, 2007; Wang *et al.*, 2011; Naghshin *et al.*, 2012; Neckár *et al.*, 2013). Chronic hypoxia induces a number of adaptive changes in the heart that can be considered cardioprotective, but the exact molecular mechanisms of these changes are not yet known. The understanding of molecular mechanisms involved in myocardial protection is a prerequisite for the development of effective pharmacological agents that could be used in clinical practice.

There are some indications that indicate the possible role of  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -ARs) in myocardial protection induced by hypoxia. Chronic hypoxia leads to increased activity of the sympathetic nervous system, which results in increased levels of catecholamines in the body (Johnson *et al.*, 1983). The increase of catecholamines and their effect on  $\beta$ -adrenergic signaling may contribute to the development of cardioprotective phenotype (Frances *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2005; Salie *et al.*, 2011). The involvement of  $\beta$ -ARs in cardioprotection induced by hypoxia was demonstrated by blocking one of subtypes of these receptors during intermittent hypoxia, which resulted in a significant weakening of the protective effect of hypoxia (Mallet *et al.*, 2006).

There are 3 subtypes of  $\beta$ -ARs -  $\beta_1$ -ARs,  $\beta_2$ -ARs and  $\beta_3$ -ARs (Kobilka, 2011). In cardiomyocytes, the most important subtypes are  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs (Brodde, 1991; Rockman *et al.*, 2002).  $\beta$ -ARs transduce the signal obtained after catecholamine binding via G-proteins to their downstream effector molecules. Both  $\beta_1$ -ARs and  $\beta_2$ -ARs are coupled to stimulatory G-proteins (Gs proteins) that activate adenylate cyclase (AC), resulting in formation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Increased level of cAMP results in its binding to the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase A (PKA), which leads to its activation. Activated PKA phosphorylates a variety of target proteins which are involved in increasing cardiac contraction, heart rate and cardiac relaxation (Li *et al.*, 2000; Bers, 2002; Salazar *et al.*, 2007).  $\beta_2$ -ARs, in contrast to  $\beta_1$ -ARs, may also be coupled to inhibitory G-proteins (Gi proteins). To switch signaling from Gs to Gi proteins requires phosphorylation of intracellular part of receptor (Daaka *et al.*, 1997). It has been shown that  $\beta_2$ -ARs-Gi signaling in addition to the inhibition of AC activity (Xiao *et al.*, 1999) induces the recruitment and activation of other signal molecules, including ERK (extracellular signal-regulated protein kinase), cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  (cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> $\alpha$ ), PI3K (phosphatidylinositol- 3 kinase) and Akt kinases, which have been shown to affect

the growth of cardiomyocytes and prevent cardiomyocyte apoptosis (Luttrell *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001; Pavoine *et al.*, 2003).

## 7. Aims

The main aim of this study was to investigate the influence of different models of chronic hypoxia on the  $\beta$ -adrenergic signaling in rat myocardium and the possible involvement of this pathway in the molecular mechanisms of cardioprotection.

### **Summary of specific objectives:**

#### **Objective 1: Monitoring the effect of protective continuous and nonprotective intermittent normobaric hypoxia on $\beta$ -adrenergic signaling in RV and LV rat myocardium**

- determination of the total number ( $B_{MAX}$ ) and dissociation constant ( $K_D$ ) of  $\beta$ -ARs
- determination of the ratio of  $\beta$ -ARs subtypes ( $\beta_1$ -ARs and  $\beta_2$ -ARs) and inhibitory constant ( $K_i$ ) of  $\beta$ -ARs by radioligand binding studies
- determination of  $\beta$ -ARs at mRNA level
- analysis of changes in protein levels of selected components of  $\beta$ -adrenergic signaling ( $G_s\alpha$ ,  $G\beta$ , AC)
- determination of AC enzyme activity

#### **Objective 2: Monitoring the effect of CNH on $\beta$ -adrenergic signaling, monoamine oxidase A (MAO A) and selected components of the antioxidant system in LV myocardium of SHR and SHR-mtBN rats**

- determination of the total number ( $B_{MAX}$ ) and dissociation constant ( $K_D$ ) of  $\beta$ -ARs
- determination of the ratio of  $\beta$ -ARs subtypes ( $\beta_1$ -ARs and  $\beta_2$ -ARs) and inhibitory constant ( $K_i$ ) of  $\beta$ -ARs by radioligand binding studies
- determination of AC and MAO-A activity
- monitoring the presence of MAO-A and selected antioxidant enzymes (catalase, aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH-2), Cu/ZnSOD, MnSOD) at mRNA and protein level
- comparison of possible differences in  $\beta$ -adrenergic signaling and antioxidant system between different strains of rats (SHR, SHR-mtBN)

#### **Objective 3: Monitoring the effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia on $\beta$ -adrenergic signaling in LV rat myocardium**

- determination of the total number ( $B_{MAX}$ ) and dissociation constant ( $K_D$ ) of  $\beta$ -ARs
- determination of the ratio of  $\beta$ -ARs subtypes ( $\beta_1$ -ARs and  $\beta_2$ -ARs) and inhibitory constant ( $K_i$ ) of  $\beta$ -ARs by radioligand binding studies
- monitoring the presence of selected  $\beta$ -adrenergic signaling components (AC5, AC6,  $Gi_{\alpha 1,2}$ ,  $Gi_{\alpha 3}$ )

## **8. Materials and methods**

### **Animals**

We used male rats of Wistar, SHR (spontaneously hypertensive rat) and SHR-mtBN for experiments. SHR-mtBN is conplastic strain carrying the mitochondrial genome of Brown Norway strain on the genetic background of SHR strain. The experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences. All experiments were carried out in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" published in the National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

### **Experimental models of chronic hypoxia**

In our studies three models of chronic hypoxia were used: continuous normobaric hypoxia (CNH; 3 weeks, 24 h/day), intermittent normobaric hypoxia (INH; 3 weeks, 23 h/day hypoxia, 1 h/day reoxygenation) and intermittent hypobaric hypoxia (IHH; 5 weeks, 5 days / week, 8 h/day). Control groups of the rats were reared for the same time under normoxic conditions.

### **Homogenization and fractionation of the tissue**

The rat hearts were dissected into individual main parts. The right (RV) and left ventricles (LV) were further homogenized, fractionated and stored in a deep-frosting box (-80 ° C).

### **Radioligand binding studies**

To determine the total number of  $\beta$ -ARs and the dissociation constant, saturation binding studies using the [<sup>3</sup>H] CGP 12177 radioligand were used. The ratio of the  $\beta$ -ARs subtypes ( $\beta_1$ -ARs and  $\beta_2$ -ARs) and their inhibitory constants were determined by competitive binding studies using fixed concentrations of [<sup>3</sup>H] CGP 12177 and increasing concentrations of selective  $\beta_2$ -ARs antagonist ICI 118,551.

### **Isolation of RNA and Real-time PCR**

Isolation of total cellular RNA was performed using RNazol or TRIzol. The obtained RNA was transcribed in the process of reverse transcription into the cDNA. Real-time PCR analyzes were performed on a Light Cycler LC 480 instrument. The levels of the analyzed transcripts were based on the relative value of the reference ribosomal subunit 18S gene and hypoxanthine phosphoribosyltransferase. This determination was made by Mgr. Iveta Nedvředova, Ph.D.

## SDS-PAGE electrophoresis and Western blot analysis

To determine the expression of the analyzed proteins we used gel electrophoresis followed by transfer to nitrocellulose membrane and detection of proteins by specific antibodies.

### Determination of adenylate cyclase activity

AC activity was determined by measuring the conversion of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP to [ $^{32}$ P]cAMP (Ihnatovych *et al.*, 2001). In addition to basal AC activity, the enzyme activity stimulated by different stimulators (10  $\mu$ M isoprenaline, 10  $\mu$ M forskolin, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M GTP $\gamma$ S and 10 mM NaF) was determined.

### Determination of monoamine oxidase-A activity

MAO-A activity was determined using kynuramine dihydrobromide as a substrate in the presence of deprenyl, a MAO-B inhibitor (Xu *et al.*, 2005). The fluorescence of the resulting product was measured on a 96-well plate at Ex 310-nm/Em 380-nm on the Biotek Synergy HT instrument.

### Statistical analysis

The results were expressed as means  $\pm$  standard error of mean (SEM). The results were statistically processed by GraphPad Prism 6 using the OneWay ANOVA test followed by a Student-Newman-Keuls test. The values differing at significance level  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## 9. Results and discussion

### Objective 1: Monitoring the effect of protective continuous and nonprotective intermittent normobaric hypoxia on $\beta$ -adrenergic signaling in RV and LV rat myocardium

The first results of this study indicate that adaptation of Wistar rats to the protective (CNH) and nonprotective (INH) model of chronic normobaric hypoxia leads to a significant decrease in body weight (CNH by 15%, INH by 14%) compared to normoxic group. On the other hand, heart weight in hypoxic models increased due to significant RV hypertrophy. The observed changes in weight parameters are in line with the results of previous studies on similar models (Tual *et al.*, 2006; Laursen *et al.*, 2008; Baandrup *et al.*, 2011; Neckár *et al.*, 2013).

For characterization of  $\beta$ -ARs in RV and LV were used radioligand binding studies. Saturation binding studies have shown that, in the case of LV, CNH or INH did not have an effect on the total number of  $\beta$ -ARs, which corresponds to some previous studies (Winter *et al.*, 1986; Germack *et al.*, 2002; Hrbasová *et al.*, 2003). On the other hand, there are studies that have shown a decrease in  $\beta$ -ARs in LV (Voelkel *et al.*, 1981;

Kacimi *et al.*, 1992; León-Velarde *et al.*, 2001; Favret *et al.*, 2001). This different result may be due to different experimental conditions.

In contrast to LV, in RV we found a significant decrease in the total number of  $\beta$ -ARs in both hypoxic groups of rats. From the results of competitive studies that revealed change in the ratio of  $\beta$ -ARs subtypes in behalf of  $\beta_2$ -ARs in both hypoxic models, it seems that this decrease can be attributed to the loss of  $\beta_1$ -ARs. A selective decrease of  $\beta_1$ -ARs is usually observed during cardiac hypertrophy. The vast majority of studies focusing on the association of cardiac hypertrophy with changes in distribution of  $\beta$ -ARs subtypes were performed on LV (Galinier *et al.*, 1992; Communal *et al.*, 1998; Sethi *et al.*, 2007). For RV hypertrophy, a significant decrease in the total number of  $\beta$ -ARs was also reported but changes at the level of the individual  $\beta$ -ARs subtypes were not detected in these early studies (Voelkel *et al.*, 1981; Ishikawa *et al.*, 1991; Yoshie *et al.*, 1994; Favret *et al.*, 2001). There is a study showing a decrease in the total number of  $\beta$ -ARs in both chambers due to selective decrease of  $\beta_1$ -ARs after adaptation to hypobaric hypoxia. However, there was not detectable RV hypertrophy in this case probably due to short-term exposure to hypoxia (Mardon *et al.*, 1998). Our results indicated that exposure of rats to CNH and INH causes similar changes in distribution of  $\beta$ -ARs subtypes in hypertrophic RV, as observed in various types of LV hypertrophy and in the study of Mardon *et al.* (1998).

The observed decrease of  $\beta_1$ -ARs at protein level in RV after hypoxia was further supported by the decrease of  $\beta_1$ -ARs also at mRNA level. A similar result was also demonstrated in study Piao *et al.*, but these authors found decrease of  $\beta_1$ -ARs at mRNA level in both ventricles (Piao *et al.*, 2012).

Our next experiments revealed the effect of CNH and INH on distribution of  $G_s\alpha$  proteins in RV. We determined a significant loss in expression of these proteins. The observed decrease in  $G_s\alpha$  proteins corresponds to the results of Guan *et al.*, which revealed lower expression of this protein in RV after exposure of rats to IHH (Guan *et al.*, 2010). Level of AC 5/6 was not significantly different in the case of hypoxic rats compared to normoxic group.

We have also investigated AC activity under basal conditions as well as after modulation by different stimulators. Our results showed that action of individual stimulators had opposite effect on AC activity in RV and LV. Although chronic exposure to CNH and INH did not cause any appreciable changes in basal AC activity, both these hypoxic models reduced the enzyme activity stimulated through  $G_s$  protein (by  $GTP\gamma S$ ) in the RV and increased this activity in the LV. The reduction of AC activity in the RV may be at least partly explained by the drop in  $G_s$  protein level and corresponds well to previously observed derangement of AC in samples of hypertrophied heart (Böhm *et al.*, 1997; Tse *et al.*, 2000; Novotny *et al.*, 2003). Some previous studies have demonstrated a decline in the activity of this system not only in RV but also in LV. In these studies, hypobaric model of hypoxia was used and suppression of AC activity was also observed after administration of other stimulators than  $GTP\gamma S$  (Mardon *et al.*, 1998; León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). The opposite effect of different stimulators on AC activity in RV and LV from rats adapted to CNH and INH can be attributed to RV

hypertrophy that leads to derangement of this signaling system. On the other hand, the observed increase in AC activity stimulated by GTP $\gamma$ S, forskolin and NaF in the LV after adaptation to CNH or INH indicates more efficient coupling between Gs protein and AC, which may perhaps somehow participate in the development of a cardioprotective phenotype. Interestingly, the ability of the  $\beta$ -AR agonist isoprenaline to stimulate AC in both ventricles was only slightly reduced. In RV, this decrease can be ascribed to lesser amount of  $\beta$ -ARs. Attenuated  $\beta$ -adrenergic signaling has been frequently found in cardiac hypertrophy, as well as in other stressful conditions (Böhm *et al.*, 1997; Vatner *et al.*, 1999; Nishizawa *et al.*, 2004).

**Objective 2: Monitoring the effect of CNH on  $\beta$ -adrenergic signaling, monoamine oxidase A (MAO A) and selected components of the antioxidant system in LV myocardium of SHR and SHR mtBN rats**

In this study, we explored the effect of mitochondrial genome substitution on  $\beta$ -adrenergic signaling and antioxidant system in spontaneously hypertensive rats (SHR) under normoxic and hypoxic conditions (CNH). Experiments were performed in parallel on two strains, SHR and SHR-mtBN, which is a conplastic strain carrying the Brown Norway mitochondrial genome on the genetic background of SHR strain. Conplastic strain exhibits the same myocardial infarct size caused by I/R injury as the original SHR strain. Although adaptation to chronic hypoxia improved cardiac ischemic resistance in both strains, the infarct size-limiting effect was stronger in SHR-mtBN than in SHR (Neckář *et al.*, 2017). Increasing evidence indicates that mitochondrial DNA is essential for the cell phenotype and, thus, may contribute to stress and environmental adaptability (Kelly *et al.*, 2013).

Results comparing weight parameters showed that both tested strains of rats under normoxic conditions, in addition to the relative weight of LV, did not differ in any other parameter. Conversely, adaptation to CNH in both strains resulted in a decrease in body weight and an increase in mass of most other parameters, compared to the relevant normoxic groups. Changes induced by CNH correspond to the results obtained in our previous study using the same model of hypoxia (Hahnova *et al.*, 2016).

In the first part of the study, we focused on  $\beta$ -adrenergic signaling. Our results from radioligand binding studies revealed a significantly higher proportion of  $\beta_2$ -ARs in the LV of SHR-mtBN strain compared to SHR and that CNH had a different effect on  $\beta$ -ARs distribution in both strains. Whereas CNH led to an increase in the total number of  $\beta$ -ARs expression in the SHR strain probably due to increased  $\beta_2$ -ARs, there was decrease in the total amount of  $\beta$ -ARs without changing the proportion of individual  $\beta$ -ARs subtype in conplastic rat strain.

Under normoxic conditions, an increased amount of  $\beta$ -ARs was detected in SHR-mtBN rats compared to SHR strain, resulting in an increased ability of isoprenaline to stimulate AC activity. On the other hand, due to CNH, this activity was reduced in the

SHR-mtBN strain, which was consistent with lower expression of  $\beta$ -ARs in these animals. Enzyme activity stimulated with forskolin and NaF, i.e., stimulators that can modulate AC activity directly or via G-proteins, was increased in the hypoxic SHR group. Conversely, in conplastic strain, NaF-stimulated activity was elevated under normoxic conditions and decreased by CNH. These specific differences between strains may probably be explained by changing the ability of G-proteins regulate AC activity.

The observed decline in the total number of  $\beta$ -ARs in SHR-mtBN after CNH exposure is consistent with the results of previous studies (Mader *et al.*, 1991; Kacimi *et al.*, 1992; León-Velarde *et al.*, 2001). As a rule,  $\beta$ -AR subtypes were not discerned in these studies. The only exception is a study of Mardon *et al.*, which demonstrated a selective decrease in  $\beta_1$ -ARs caused by 5-day hypoxia (Mardon *et al.*, 1998). Similarly, the decrease in AC activity after stimulation with isoprenaline and NaF in conplastic strain adapted to CNH corresponds to some previously published data (León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). On the other hand, the increased ability of G-proteins to stimulate AC enzyme activity in the SHR hypoxic group has not been previously observed and may represent a specific feature of this strain.

It is known that the  $\beta_2$ -ARs activate pro-survival kinases and attenuate dysfunction of mitochondria during oxidative stress by inhibiting opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) (Fajardo *et al.*, 2011). The increased proportion of  $\beta_2$ -ARs in the conplastic strain, compared to SHR, and decrease in the total number  $\beta$ -ARs in this strain after adaptation to CNH may, thus, contribute to better protection of SHR-mtBN rats against acute I/R injury (Neckář *et al.*, 2017).

In the next part of the study, we focused our attention on monoamine oxidase A (MAO-A), the predominant MAO isoform in the myocardium. MAO is an important mitochondrial enzyme that catalyzes the oxidative deamination of catecholamines (Schömig *et al.*, 1987) and is one of the major producers of reactive oxygen species (ROS) in cardiomyocytes (Anderson *et al.*, 2014). Our results showed that both expression and activity of this enzyme were lower in SHR-mtBN animals than SHR and that the adaptation of rats to CNH resulted in a significant increase in these values in both strains. However, even under hypoxic conditions, these values remained significantly lower in the SHR-mtBN strain compared to SHR, which can be considered as a strain-specific feature. The observed elevation in both monitored values of MAO-A after exposure to CNH may suggest the importance of this enzyme in adaptive responses to chronic hypoxia. Our results are in contradiction with an earlier study in which authors did not find any change in MAO activity in a goat myocardium after adaptation to hypobaric hypoxia (Maher *et al.*, 1978). This discrepancy can be explained by using different models and experimental conditions. There are some indications that the possible changes in MAO activity may depend on the duration of hypoxic exposure (Shatemirova *et al.*, 1990).

It is well known that chronic hypoxia and  $\beta$ -ARs stimulation may result in increased production of mitochondrial ROS in cardiomyocytes (Földes-Papp *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). Whereas the appropriate rise in ROS is important for achieving suitable protective outcomes of hypoxic adaptation (Kolár *et al.*,

2007; Kasparova *et al.*, 2015), high levels of ROS can cause excessive oxidative stress in cardiomyocytes. The harmful effects of ROS generated from different sources, including mitochondria and MAO activity, are regularly suppressed by a number of endogenous antioxidant defense mechanisms. Therefore, we have also focused on studying the expression of selected components of the antioxidant system - superoxide dismutases (SOD), catalase (CAT) and aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH-2). Assessment of expression levels of all these enzymes at mRNA and protein level in myocardial preparations from SHR and SHR-mtBN did not reveal any significant differences between both these strains under normoxic conditions. Adaptation to CNH significantly increased protein levels of CAT and ALDH-2 but did not affect the expression of MnSOD in myocardial preparations from both strains. On the other hand, CNH markedly reduced the amount of Cu/ZnSOD protein in SHR strain, with no significant difference in SHR-mtBN group.

In contrast to our findings, Kasparova *et al.* in 2015 found that after the adaptation of Wistar rats to the same model of chronic hypoxia there was an increase in Cu/ZnSOD and MnSOD expression and decrease in the level of CAT (Kasparova *et al.*, 2015). A significant increase in myocardial Cu/ZnSOD and MnSOD levels was also detected in Wistar rats adapted to different hypoxic conditions (Nakanishi *et al.*, 1995; Neckář *et al.*, 2013; Bu *et al.*, 2015). Hence, the observed discordant changes in expression of antioxidant enzymes induced by hypoxic exposure appear to be strain-specific. The observed downregulation of Cu/ZnSOD in SHR following hypoxia may partly explain the lower cardioprotective effect of CNH against acute I/R injury in these strain when compared to conplastic SHR-mtBN strain (Neckář *et al.*, 2017). The effect of hypoxia on ALDH-2 expression has not yet been investigated and our finding of increased levels of ALDH-2 in both rat strains exposed to CNH supports the notion that this enzyme is highly important for reducing ischemic heart damage (Chen *et al.*, 2008) and may follow activation of MAO-A.

### **Objective 3: Monitoring the effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia on $\beta$ -adrenergic signaling in LV rat myocardium**

Our last study dealt with the possible role of  $\beta$ -adrenergic signaling in regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis dependent on cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> $\alpha$  (cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ ) in rats adapted to intermittent hypobaric hypoxia (IHH). Adaptation to IHH can have long-term cardioprotective effects against acute I/R injury as well as adaptation to CNH (Asemu *et al.*, 1999; Neckář *et al.*, 2002).

It is known that  $\beta$ -ARs and their signaling pathways play a key role in the regulation of cardiac function (Florea and Blatter, 2012). Under stress conditions,  $\beta_2$ -ARs-Gi signaling is triggered, resulting in activation of the survival pathway involving the G $\beta\gamma$  subunit, PI3K and Akt kinases, which play a crucial role in the protection of cardiomyocytes from apoptosis (Chesley *et al.*, 2000). It has been found that activity of



cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  is also increased under stress conditions due to diminution in  $\beta_1$ -ARs density, uncoupling of  $\beta_2$ -ARs from the Gs-AC-PKA signaling pathway and increased coupling of  $\beta_2$ -ARs to the Gi-cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ -COX-2 (cyclooxygenase-2) pathway (Pavoine *et al.*, 2003; Kozlovski *et al.*, 2015). cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  releases arachidonic acid from phospholipids, which can serve as a substrate for COX, whose metabolic pathways lead to eicosanoid formation (e.g. PGE<sub>2</sub>) (Burke and Dennis, 2009). Despite these known findings, the possible role of  $\beta$ -adrenergic signaling pathways in regulation of cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ -dependent PGE<sub>2</sub> synthesis in chronically hypoxic myocardium has not yet been explored.

Our results comparing the weight parameters showed that, similarly as in previous two studies (Hahnova *et al.*, 2016; Hahnova *et al.*, 2017), the adaptation of rats to chronic hypoxia resulted in a significant body growth retardation compared to control. These data indicate that weight loss after hypoxic adaptation is observed in both normobaric and hypobaric hypoxic models. However, unlike normobaric hypoxia, not only RV hypertrophy but also LV hypertrophy were detected in IHH-adapted rats, resulting in an increase of most other weight parameters over the control group.

It appears that activation of  $\beta$ -ARs may play an essential role in the development of powerful myocardial ischemic resistance conferred by hypoxic exposure (Mallet *et al.*, 2006). However, published data about the effects of chronic hypoxia on  $\beta$ -ARs differ, probably depending on the specific experimental conditions. The selected conditions in which rats were exposed to IHH had no effect on the total number of  $\beta$ -ARs, which corresponds to the results of some previous studies (Winter *et al.*, 1986; Germack *et al.*, 2002; Hahnova *et al.*, 2016). On the other hand, the ratio of  $\beta$ -ARs subtypes significantly changed in favor of  $\beta_2$ -ARs.

The increase in proportion of  $\beta_2$ -ARs after adaptation to IHH was further accompanied by a significant decrease in AC5 expression and increased expression of Gi proteins. The observed decrease in AC5 corresponds to the previous findings, which revealed a reduced AC activity after exposure of rats to hypobaric hypoxia (Mardon *et al.*, 1998; León-Velarde *et al.*, 2001; Hrbasová *et al.*, 2003). Also other studies have shown that AC5 is an important signaling molecule regulating the longevity, and that disruption of its expression may play a significant role in the protection of myocardium (Okumura *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2007). The increased expression of Gi proteins revealed in our study is consistent with the results of Mardon *et al.* (1998).

Further results from our study revealed a significant increase not only in the total amount of cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  but also in its phosphorylated forms after adaptation to IHH. In addition, we detected increased expression of COX-2 and PGE<sub>2</sub> and concurrently enhanced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and ERK 1/2 (Micova *et al.*, 2016). This evidence suggests that exposure of rats to IHH leads to enhanced myocardial  $\beta_2$ -ARs-Gi signaling, which may result in activation of the cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ -COX-2 signaling pathway through the ERK/p38 cascade.

## 10. Conclusion

A common goal of publications used as the basis for writing this dissertation was to investigate the effect of adaptation of rats to chronic hypoxia on the myocardial  $\beta$ -adrenergic signaling pathway and the possible involvement of this pathway in molecular mechanisms of cardioprotection.

The results from our first study have shown that adaptation to chronic normobaric hypoxia is accompanied by discordant alterations in  $\beta$ -adrenergic signaling in RV and LV. Exposure of animals to continuous and intermittent model of chronic hypoxia resulted in both cases in disruption of this signaling pathway in RV without significant changes in LV, and any more prominent differences were revealed either between the effects of protective (CNH) and non-protective (INH) model of hypoxia. Hence, these results indicate that changes in  $\beta$ -adrenergic signaling are in this case ventricle-specific and do not appear to be dependent on a particular hypoxia model. Although these data do not allow to identify a specific role of  $\beta$ -ARs and AC signaling in the adaptive process to chronic hypoxia, participation of this signaling system in the development of a cardioprotective phenotype cannot be excluded.

The results obtained in the second study suggested that the selective replacement of mitochondrial genome of SHR rats under mitochondrial genome of Brown Norway strain, which is more resistant to ischemia, can modify the functioning of myocardial AC signaling regulated by  $\beta$ -ARs, as well as the expression and activity of MAO A and some components of the antioxidant defense system. This exchange of genome also affected adaptive responses to chronic hypoxia. While exposure of SHR and SHR mtBN rats to CNH had a different effect on  $\beta$ -adrenergic signaling pathways, MAO-A and individual components of antioxidant system responded to the effect of CNH in both strains similarly. This is the first study to demonstrate that manipulation with the mitochondrial genome may have relatively far-reaching consequences for  $\beta$ -adrenergic signaling and redox balance in rat myocardium, and may therefore lead to complex changes in target cells. These findings should be taken into account when planning application of these genetic manipulations for research or therapeutic purposes.

Our last study has shown that exposure of rats to IHH resulted in complex alterations in the signal cascade triggered by  $\beta$ -ARs. The observed up-regulation of myocardial  $\beta_2$ -ARs was accompanied by decrease of AC5 level and increased expression of Gi proteins. Further results of the study revealed increased phosphorylation of ERK 1/2 and p38 kinase. Stimulation of these MAPKs through  $\beta_2$ -ARs-Gi signaling may be directly associated with activation of the cPLA<sub>2</sub>-COX-2-PGE<sub>2</sub> signaling pathway. These results suggest that  $\beta$ -ARs may be involved in the development of cardioprotective phenotype in rats adapted to IHH by activating the signal pathway leading to stimulation of cPLA<sub>2</sub>.

## 11. Seznam použité literatury / References

Anderson E J, Efir J T, Davies S W, O'Neal W T, Darden T M, Thayne K A, Katunga L A, Kindell L C, Ferguson T B, Anderson C A, Chitwood W R, Koutlas T C, Williams J M, Rodriguez E and Kypson A P 2014 Monoamine oxidase is a major determinant of redox balance in human atrial myocardium and is associated with postoperative atrial fibrillation *J Am Heart Assoc* **3** e000713

Andersson D C, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang S J, Katz A and Westerblad H 2011 Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the  $\beta$ -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes *J Physiol* **589** 1791-801

Asemu G, Papousek F, Ostádal B and Kolár F 1999 Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel *J Mol Cell Cardiol* **31** 1821-31

Baandrup J D, Markvardsen L H, Peters C D, Schou U K, Jensen J L, Magnusson N E, Ørntoft T F, Kruhøffer M and Simonsen U 2011 Pressure load: the main factor for altered gene expression in right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats *PLoS One* **6** e15859

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

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

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

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

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

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

Chesley A, Lundberg M S, Asai T, Xiao R P, Ohtani S, Lakatta E G and Crow M T 2000 The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase *Circ Res* **87** 1172-9

Communal C, Ribout C, Durand A and Demenge P 1998 Myocardial beta-adrenergic reactivity in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat *Fundam Clin Pharmacol* **12** 590-8

Daaka Y, Luttrell L M and Lefkowitz R J 1997 Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A *Nature* **390** 88-91

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

Favret F, Richalet J P, Henderson K K, Germack R and Gonzalez N C 2001 Myocardial adrenergic and cholinergic receptor function in hypoxia: correlation with O<sub>2</sub> transport in exercise *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280** R730-8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ihnatovych I, Hejnová L, Kostrnová A, Mares P, Svoboda P and Novotný J 2001 Maturation of rat brain is accompanied by differential expression of the long and short splice variants of G(s)alpha protein: identification of cytosolic forms of G(s)alpha *J Neurochem* **79** 88-97

Ishikawa S, Honda M, Yamada S, Morioka S and Moriyama K 1991 Biventricular down-regulation of beta-adrenergic receptors in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline *Jpn Circ J* **55** 1077-85

Johnson T S, Young J B and Landsberg L 1983 Sympathoadrenal responses to acute and chronic hypoxia in the rat *J Clin Invest* **71** 1263-72

Kacimi R, Richalet J P, Corsin A, Abousahl I and Crozatier B 1992 Hypoxia-induced downregulation of beta-adrenergic receptors in rat heart *J Appl Physiol (1985)* **73** 1377-82

Kasparova D, Neckar J, Dabrowska L, Novotny J, Mraz J, Kolar F and Zurmanova J 2015 Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems *Physiol Genomics* **47** 612-20

Kelly R D, Rodda A E, Dickinson A, Mahmud A, Nefzger C M, Lee W, Forsythe J S, Polo J M, Trounce I A, McKenzie M, Nisbet D R and St John J C 2013 Mitochondrial DNA haplotypes define gene expression patterns in pluripotent and differentiating embryonic stem cells *Stem Cells* **31** 703-16

Kobilka B K 2011 Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology *Trends Pharmacol Sci* **32** 213-8

Kolár F, Jezková J, Balková P, Breh J, Neckár J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ostádal B, Wilhelm J and Herget J 2007 Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292** H224-30

Kozlovski V I, Lomnicka M, Bartus M, Sternak M and Chlopicki S 2015 Anti-thrombotic effects of nebivolol and carvedilol: Involvement of  $\beta_2$  receptors and COX-2/PGI<sub>2</sub> pathways *Pharmacol Rep* **67** 1041-7

Laursen B E, Dam M Y, Mulvany M J and Simonsen U 2008 Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy is unaltered by long-term oral L-arginine administration *Vascul Pharmacol* **49** 71-6

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

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

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

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

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

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

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

Micova P, Hahnova K, Hlavackova M, Elsnicova B, Chytilova A, Holzerova K, Zurmanova J, Neckar J, Kolar F, Novakova O and Novotny J 2016 Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A(2)alpha/cyclooxygenase 2 pathway via beta(2)-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation *Molecular and Cellular Biochemistry* **423** 151-63

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

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

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

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

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

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

Nishizawa T, Iwase M, Kanazawa H, Ichihara S, Ichihara G, Nagata K, Obata K, Kitaichi K, Yokoi T, Watanabe M, Tsunematsu T, Ishikawa Y, Murohara T and Yokota M 2004 Serial alterations of beta-adrenergic signaling in dilated cardiomyopathic hamsters: possible role of myocardial oxidative stress *Circ J* **68** 1051-60

Novotny J, Hrbasová M, Kolár F and Svoboda P 2003 Cardiomegaly induced by pressure overload in newborn rats is accompanied by altered expression of the long isoform of G(s)alpha protein and deranged signaling of adenylyl cyclase *Mol Cell Biochem* **245** 157-66

Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Yang G, Lee M C, Hong C, Liu J, Vatner D E, Sadoshima J, Vatner S F and Ishikawa Y 2003 Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene preserves cardiac function against pressure overload *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** 9986-90

Ostadal B and Kolar F 2007 Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects *Respir Physiol Neurobiol* **158** 224-36

Pavoine C, Behforouz N, Gauthier C, Le Gouvello S, Roudot-Thoraval F, Martin C R, Pawlak A, Feral C, Defer N, Houel R, Magne S, Amadou A, Loisanche D, Duvaldestin P and Pecker F 2003 beta2-Adrenergic signaling in human heart: shift from the cyclic AMP to the arachidonic acid pathway *Mol Pharmacol* **64** 1117-25

Piao L, Fang Y H, Parikh K S, Ryan J J, D'Souza K M, Theccanat T, Toth P T, Pogoriler J, Paul J, Blaxall B C, Akhter S A and Archer S L 2012 GRK2-mediated inhibition of adrenergic and dopaminergic signaling in right ventricular hypertrophy: therapeutic implications in pulmonary hypertension *Circulation* **126** 2859-69

Rockman H A, Koch W J and Lefkowitz R J 2002 Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function *Nature* **415** 206-12

Salazar N C, Chen J and Rockman H A 2007 Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts *Biochim Biophys Acta* **1768** 1006-18

Salie R, Moolman J A and Lochner A 2011 The role of  $\beta$ -adrenergic receptors in the cardioprotective effects of beta-preconditioning ( $\beta$ PC) *Cardiovasc Drugs Ther* **25** 31-46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Xu Y, Ku B S, Yao H Y, Lin Y H, Ma X, Zhang Y H and Li X J 2005 The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice *Eur J Pharmacol* **518** 40-6

Yan L, Vatner D E, O'Connor J P, Ivessa A, Ge H, Chen W, Hirotani S, Ishikawa Y, Sadoshima J and Vatner S F 2007 Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress *Cell* **130** 247-58

Yoshie H, Tobise K and Onodera S 1994 Intraventricular changes in the beta-adrenoceptor-adenylate cyclase system of the rat heart with the progress of monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy *Jpn Circ J* **58** 855-65

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

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



## 12. Životopis / Curriculum Vitae

**Jméno a příjmení:** Klára Hahnová  
**Adresa:** Jabloňová 2136/11, Praha 10 - Záběhlice, 106 00  
**Telefon:** +420 736 727 998  
**E-mail:** hahnova1@natur.cuni.cz

### Vzdělání:

- 2011 -**           **Doktorské studium:**  
Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta  
studijní obor: Fyziologie živočichů  
**Disertační práce:** Úloha adrenergní signalizace v adaptivním  
mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií
- 2009 - 2011**       **Magisterské studium:**  
Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta  
studijní obor: Buněčná a vývojová biologie
- 2006 - 2009**       **Bakalářské studium**  
Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta  
obor: Biologie

### Dosavadní praxe:

- 2018 -**           Vědecký pracovník  
Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha  
Oddělení biomateriálů a biofyzikálních metod
- 2015**            Vědecký pracovník  
Národní ústav duševního zdraví, Klecany  
Výzkumný program 5: Spánková medicína a chronobiologie
- 2011 – 9/2017**   Vědecký pracovník  
Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta,  
Katedra fyziologie  
Skupina membránových receptorů a buněčné signalizace

## Granty:

- 2015 - 2018** GAUK (Grantová Agentura Univerzity Karlovy) – 392615  
Role JAK/STAT dráhy v kardioprotektivním mechanismu adaptace na chronickou hypoxii
- 2012 – 2014** GAUK (Grantová Agentura Univerzity Karlovy) – 610612  
Úloha adrenergní signalizace v adaptivním mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií

## Publikace:

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

Micova P., Hahnova K., Hlavackova M., Elsnicova B., Chytilova A., Holzerova K., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novakova O., Novotny J. (2016) Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ /cyclooxygenase 2 pathway via  $\beta$ 2-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Mol Cell Biochem*, 423(1-2):151-163

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

Hahnova K., Pacesova D., Volfova B., Cervena K., Kasparova D., Zurmanova J., Bendova Z.(2016) Circadian Dexas1 in rats: Development, location and responsiveness to light. *Chronobiol Int*, 33(2):141-50

Hejnova L., Hahnova K., Kockova R., Svatunkova J., Sedmera D., Novotny J. (2014) Adenylyl cyclase signaling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs. *BioMed Research International*, 2014:4631230

## **Životopis / Curriculum Vitae**

**Name:** Klára Hahnová  
**Address:** Jabloňová 2136/11, Praha 10 - Záběhlce, 106 00  
**Telephone:** +420 736 727 998  
**E-mail:** hahnova1@natur.cuni.cz

### **Education:**

- 2011 - Ph.D. Grade:**  
Charles University, Faculty of Science  
Study program: Animal Physiology  
**Doctoral Thesis:** The role of adrenergic signaling in cardioprotection induced by adaptation to chronic hypoxia
- 2009 – 2011 M.Sc. Grade:**  
Charles University, Faculty of Science  
Study program: Cell and Developmental Biology
- 2006 – 2009 B.Sc. Grade:**  
Charles University, Faculty of Science  
Program: Biology

### **Experience and skills:**

- 2018 -** Researcher  
Institute of Experimental Medicine AV ČR, Prague  
Department of Biomaterials and Biophysical Methods
- 2015** Researcher  
National Institute of Mental Health, Klecany  
Program 5: Sleeping and circadian rhythmicity
- 2011 – 9/2017** Researcher  
Charles University, Faculty of Science  
Department of Physiology  
Group of membrane receptors and cell signaling

## Grants:

- 2015 – 2018** GAUK (Grant Agency of Charles University) – 392615  
The role of the JAK / STAT pathway in the cardioprotective mechanism of adaptation to chronic hypoxia
- 2012 – 2015** GAUK (Grant Agency of Charles University) – 610612  
The role of adrenergic signaling in cardioprotection induced by adaptation to chronic hypoxia

## Publications:

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

Micova P., Hahnova K., Hlavackova M., Elsnicova B., Chytilova A., Holzerova K., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novakova O., Novotny J. (2016) Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ /cyclooxygenase 2 pathway via  $\beta$ 2-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Mol Cell Biochem*, 423(1-2):151-163

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

Hahnova K., Pacesova D., Volfova B., Cervena K., Kasparova D., Zurmanova J., Bendova Z. (2016) Circadian Dexas1 in rats: Development, location and responsiveness to light. *Chronobiol Int*, 33(2):141-50

Hejnova L., Hahnova K., Kockova R., Svatunkova J., Sedmera D., Novotny J. (2014) Adenylyl cyclase signaling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs. *BioMed Research International*, 2014:4631230

### 13. Seznam publikací / List of publications

#### Publikace, které jsou podkladem disertace / Doctral thesis-related publications

**Hahnova K.**, Kasparova D., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novotny J. (2016)  $\beta$ -Adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia. *Gen Physiol Biophys*, 35(2):165-73 (IF = 1,479)

**Hahnova K.**, Brabcova I., Neckar J., Weissova R., Svatonova A., Novakova O., Zurmanova J., Kalous M., Silhavy J., Pravenec M., Kolar F., Novotny J. (2017)  $\beta$ -Adrenergic signaling, monoamine oxidase A and antioxidant defence in the myocardium of SHR and SHR-mtBN conplastic rat strains: the effect of chronic hypoxia. *J Physiol Sci*, 68(4):441-454 (IF = 2,757)

Micova P., **Hahnova K.**, Hlavackova M., Elsnicova B., Chytilova A., Holzerova K., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novakova O., Novotny J. (2016) Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ /cyclooxygenase 2 pathway via  $\beta_2$ -adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Mol Cell Biochem*, 423(1-2):151-163 (IF = 2,561)

#### Ostatní publikace / Other publications

Hejnova L., **Hahnova K.**, Kockova R., Svatunkova J., Sedmera D., Novotny J. (2014) Adenylyl cyclase signaling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs. *BioMed Research International*, 2014:463123 (IF = 2,583)

**Hahnova K.**, Pacesova D., Volfova B., Cervena K., Kasparova D., Zurmanova J., Bendova Z. (2016) Circadian Dexas1 in rats: Development, location and responsiveness to light. *Chronobiol Int*, 33(2):141-50 (IF = 2,643)