

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Pavel Vebr

Ischemicko-reperfuzní poškození srdce u chladově adaptovaných potkanů
Ischemia-reperfusion injury in cold acclimated rats

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 8. 2016

.....
Pavel Vebr

Poděkování:

Na tomto místě bych velice rád upřímně poděkoval především své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D., za trpělivé, vytrvalé a příkladné vedení této diplomové práce a za vždy vřelý přístup při řešení jakéhokoliv, třeba i osobního problému. Dále prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc. a RNDr. Janu Neckářovi, Ph.D. z FgÚ AV ČR za cenné odborné rady a předávání zkušeností nejen v oblasti metodiky této práce. Dík patří také RNDr. Barbaře Elsnicové, Ph.D. a Máriu Helešovi za poskytnutí mikroskopických snímků, naší úžasné paní laborantce Miladě Slezákové za svědomitou technickou pomoc a mé nejbližší kolegyni Mgr. Anetě Marvanové za trpělivost, kterou se mnou má a bezvadnou spolupráci. Děkuji i svým ostatním kolegům a kolegyním za vytvoření příjemného pracovního kolektivu.

Zvláštní dík patří celé mé rodině, především mamince, za podporu, které se mi od ní vždy dostávalo, mé drahé partnerce Kláře, že při mně stála za každé situace a mým skvělým přátelům z Budějovic (kde by chtěl žít každý) i Prahy za vždy příjemný odpočinek od práce.

Abstrakt

Vliv chladové adaptace na organismus savců byl studován již mnoho desítek let s použitím poměrně nízkých teplot pro adaptaci (2-6°C). Výsledky těchto prací ukázaly významnou úlohu adrenergního a tyroidního systému v průběhu adaptace a současně negativní dopad na vylučovací soustavu. Naproti tomu nedávná studie na otužilcích naznačuje možné snížení kardiovaskulárního rizika pravidelným otužováním. Studie zabývající se vlivem chronického chladu na odolnost srdce k ischemicko-reperfuznímu poškození nejsou dostupné. Cílem této práce bylo zavést na pracovišti metodu perfuze srdce dle Langendorffa a perfuzní fixaci srdce. Dále stanovit vliv mírné chladové adaptace na velikost ischemicko-reperfuzního poškození srdce potkana. Stanovené metody byly úspěšně zavedeny a byla kvantifikována velikost ischemicko-reperfuzního poškození levé komory po 5 týdnech chladové adaptace při 10 ± 2 °C.

Klíčová slova: Chladová adaptace, srdce, ischemicko-reperfuzní poškození, perfuze srdce dle Langendorffa, fixace srdce

Abstract

The effect of cold acclimation on body of mammals has been studied for many decades by using relatively low temperatures for acclimation (6-10 °C). The results of these experiments have shown the important role of the adrenergic and thyroid system during acclimation and negative impact on renal system at the same time. In contrast, a recent study on winter swimmers suggests a possibility of positive influence of hardening on cardiovascular system. There is no available study investigating a relationship between cold adaptation and ischemia-reperfusion injury. The aim of this study was to establish a protocol of isolated rat heart and its fixation at our workplace. Furthermore, to find the impact of mild cold acclimation on the ischemia-reperfusion injury of rat. Methods of *ex vivo* heart perfusion and fixation were successfully established. The effect of 5 weeks long cold acclimation in 10 ± 2 °C on left ventricle ischemia-reperfusion injury was observed.

Key words: Cold acclimation, ischemia-reperfusion injury, Langendorff perfused heart, heart fixation

OBSAH:

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 Kardioprotektivní intervence	9
2.1.1 Ischemický preconditioning, postconditioning.....	9
2.1.2 Adaptace na hypoxii a fyzickou zátěž	10
2.1.3 Otužování, chladová adaptace	13
2.2 Perfuze srdce dle Langendorffa	17
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	19
4. MATERIÁLY A METODY	20
4.1 Adaptace	20
4.2 Krebs-Henseleitův pufr.....	20
4.3 Izolace srdce, perfuze dle Langendorffa.....	21
4.4 Analýza ischemicko-reperfuzního poškození.....	22
4.5 Zavedení metod perfuzní fixace srdce	22
4.6 Hmotnost těla a srdce.....	23
4.7 Statistická analýza	23
5. VÝSLEDKY	24
5.1 Perfuze dle Langendorffa, globální ischemie	24
5.2 Hmotnost zvířat	24
5.3 Stanovení velikosti I/R poškození LV	25
5.4 Fixace srdce pro přípravu mikroskopických preparátů	26
6. DISKUZE	27
7. ZÁVĚR.....	33
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34
9. PŘÍLOHOVÁ ČÁST	46

SEZNAM ZKRATEK

BAT	hnědá tuková tkáň
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
eNOS	endoteliální NO syntáza
(HIF-1 α)	hypoxií indukovaný faktor 1
IPC	ischemický preconditioning
KHB	Krebs-Henseleitův pufr
LV	levá komora srdeční
mK _{ATP}	mitochondriální ATP senzitivní draselný kanál
MyHC α	těžký myozinový řetězec α
PBS	fosfátový pufr
PFA	formaldehyd
PKC- δ	proteinkináza C, izoforma delta
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RPC	remote preconditioning
SERCA	sarkoplazmatická vápníková ATPáza
SOD	superoxid dismutáza
sK _{ATP}	sarkolemální ATP senzitivní draselný kanál
T ₃	trijódtyronin
T ₄	tyroxin
TSH	tyroideu stimulující hormon
TTC	2,3,5 - trifenyltetrazolium chlorid
UCP1(3)	rozpřahující protein 1 nebo 3
WAT	bílá tuková tkáň

1. ÚVOD

Onemocnění kardiovaskulárního systému patří dlouhodobě mezi choroby s vysokou mortalitou a mají celosvětově nejvyšší podíl úmrtnosti. Proto se mnoho výzkumných týmů po celém světě soustředí na léčbu, zmírnění dopadů nebo prevenci těchto onemocnění. V České republice zemřelo v roce 2013 (poslední dostupná statistická data ČSÚ, 2016) na onemocnění oběhové soustavy přes 51 000 lidí tedy 47 % všech zemřelých. Ischemická choroba srdeční se svým nejzávažnějším projevem infarktem myokardu byla nejčastější příčinou úmrtí ze všech nemocí kardiovaskulárního systému a společně s akutním infarktem myokardu a srdečním selháním tvoří 59 % ze všech úmrtí s příčinou onemocnění oběhové soustavy. Proto je náš výzkumný tým také zaměřen svými experimenty na zmírnění následků infarktu myokardu.

Otužování neboli opakované exponování chladu je známé jako tělu prospěšné. Blahodárných účinků chladové expozice na oběhovou soustavu si v první polovině 19. století všiml Vinzenze Priessnitz, který vodoléčbou vyléčil mnoho pacientů. Jeho lokální zábaly s chladnou vodou způsobí krátkodobou vazokonstrikci a následně vazodilataci. Doporučoval svým pacientům procházet se bosýma nohama studenou ranní rosou, čímž bylo dosaženo prokrvení periferie. Fyziologickým principům otužování a podstatou hibernace se věnoval mnoho let na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze prof. Janský s doc. Vybíralem. Jejich dlouholetá výzkumná činnost je pro výzkum chladové adaptace významným přispěním. Dnes, na počátku 21. století dochází k mírnému, ale znatelnému nárůstu počtu publikací zaměřených na buněčné a molekulární mechanismy aktivované v chronickém chladu a objevují se první práce na srdci. Podstatně více prací se zabývá škodlivými účinky náhlé chladové expozice. Též existuje mnoho prací, které řeší metabolickou a molekulární podstatu benefičních účinků lokálního podchlazení srdce, které se využívá v klinické praxi.

Model perfundovaného srdce *ex vivo* je používána již více než 100 let, a i v současnosti má stále své uplatnění. Dnes je používán k experimentům, u kterých je nežádoucí použít model *in vivo*, zejména při zkoumání účinků léčiv. Výhodou a zároveň i nevýhodou modelu izolovaného srdce je záměrné vyloučení endogenních vlivů respektive jejich absence při experimentu. Je důležité si připomenout, že perfuze srdce dle Langendorffa není zapomenutou metodou utlačovanou experimenty *in situ* a má své opodstatněné místo mezi experimentálními přístupy k výzkumu srdce.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Kardioprotektivní intervence

Jako kardioprotektivní označujeme děj, který vede ke zmenšení velikosti ischemicko-reperfučního poškození srdce, případně ke snížení počtu ischemických poruch srdeční frekvence (Ostadal, 2009). Kardioprotektivní intervence mohou být několika typů, tzv. preconditioning, postconditioning, chronická hypoxie, fyzická zátěž a další.

2.1.1 Ischemický preconditioning, postconditioning

Ischemický preconditioning (IPC) byl prvně popsán Murrym a jeho kolektivem (1986) jako čtyřikrát opakující se pětiminutové okluze koronárních arterií s pětiminutovými reperfuzemi. Po 40 minut dlouhé regionální ischemii levé komory srdeční psa snížil IP I/R poškození o necelých 75 %. Tento typ IPC je kardioprotektivní ve dvou intervalech, tzv. „okna“. První okno protekce nastává ihned po sérii krátkých ischemií a vymizí asi do 6 hodin po intervenci. Druhý interval protekce, tzv. „druhé okno“ se objevuje cca 24 hodin po sérii ischemií a jeho efekt klesá, až nakonec vymizí do 72 hodin od intervence. Dalším typem preconditioningu je takzvaný vzdálený (remote) preconditioning (RPC). Ten je způsoben omezením přístupu krve do jiných orgánů nebo končetin. Bylo zjištěno, že ischemie jiných orgánů než srdce způsobí po jejich reperfuzi tentýž efekt na srdci jako klasický IPC (Przyklenk et al., 2003). Pozitivní efekt RPC (zmenšení infarktového ložiska, antiarytmický efekt) byl pozorován po okluzi renální tepny králíka (Takaoka et al., 1999), infrarenální aorty potkana (Weinbrenner et al., 2002), tepny mezenteria potkana (Xiao et al., 2001), zadní končetiny prasete (Kharbanda et al., 2002) a potkana (Oxman et al., 1997), RPC nebyl na rozdíl od ischemie mozku myši (druhé okno RPC) (Tokuno et al., 2002) prokázán u ischemie mozku prasete (Zeeuw et al., 2001). Jako kardioprotektivní se ukázal i přenos koronárního efluentu po globální ischemii izolovaného srdce králíka do jiného izolovaného srdce králíka (Dickson et al., 1999). Teoreticky je RPC klinicky lépe využitelný především při plánovaných operacích srdce. Bohužel neprůkazné až neuspokojivé výsledky má RPC horní končetiny člověka, kde byl sledován výlev laktátdehydrogenázy a kreatinkinázy při operaci srdce (Günaydin et al., 2000), nicméně

v této oblasti výzkum nadále probíhá a obecně, i když opatrně, se uznává pozitivní vliv RPC, kvůli možným společným mechanismům účinku s IPC (Kloner & Yellon, 1994) i u člověka (Cheung et al., 2016).

Poměrně nedávno byl objeven efekt takzvaného postconditioningu. Ten spočívá v krátkých intervalech reperfuze po předchozí dlouhé ischemii, tedy krátkodobé dávkování malého množství perfuzátu/krve do ischemií zasažených částí srdce (Galagudza et al., 2004; Li et al., 2006). Ochrana srdce postconditioningem není zvýšena IPC, z čehož se můžeme domnívat, že mohou působit protektivně přes společné signalizační dráhy (Halkos et al., 2004).

2.1.2 Adaptace na hypoxii a fyzickou zátěž

2.1.2.1 Hypoxie

Hypoxií nazýváme sníženou dostupnost kyslíku ve srovnání s požadavky na jeho dodávku. Člověk je běžně hypoxii vystaven ve vysokých nadmořských výškách, kde je řidší vzduch, tedy i nižší parciální tlak kyslíku nebo například ve fetálním vývoji v děloze matky (Ostadalova et al., 1998). Lidí žijících ve vysokých nadmořských výškách nad 2400 m. n. m. je celosvětově přes 140 milionů. Tito lidé mají menší incidenci obezity, cukrovky a nemocí koronárního tepenného řečiště, což patrně více souvisí s životním stylem než s hypoxií samotnou. Tyto výhody jsou vykoupeny vyšším výskytem systémové a plicní hypertenze a výškového ledvinového syndromu (Hurtado et al., 2012).

V laboratorních podmínkách můžeme navodit normobarickou i hypobarickou hypoxii. Normobarická hypoxie je navozena zvýšením obsahu dusíku za zachování normálního tlaku vzduchu, což vede k poklesu pO_2 (Reymann et al., 1984). Hypobarická hypoxie simulující v laboratorních podmínkách vysokohorské prostředí je navozena odsáváním vzduchu z podtlakových adaptačních komor. Dle technického řešení a velikosti komory, může adaptace probíhat buď přerušovaně, anebo kontinuálně. Srdce potkanů laboratorně adaptovaných na vysokohorskou hypoxii 5 hodin denně 5x týdně po zasažení infarktem trpěla menšími infarktovými ložisky, čímž byl potvrzen benefiční efekt chronické hypoxie na obyvatelstvo žijící ve vysokých nadmořských výškách (Meerson et al., 1973), tento nálezn byl několikrát potvrzen (Kolář et al., 2007;

Ostadal et al., 1998; Poupa et al., 1966). Příznivé účinky intermitentní hypoxie na funkčně-morfologický stav myokardu byly pozorovány například týmem Oddělení vývojové kardiologie AV ČR, který prokázal její vzrůstající antiarytmické účinky u ischemie prováděné *in situ* s prodlužující se dobou adaptace (Asemu et al., 2000) nebo švýcarskými výzkumníky, kteří chovali potkany 2 týdny v normobarické hypoxii a 1 hodinu denně jim umožnili přístup normoxického vzduchu (Milano et al., 2002). Benefiční působení 23 hodinové hypoxie je ovšem v rozporu s výsledky dr. Neckáře FGU AV, který zjistil, že zvětšuje velikost infarktu (Neckář et al., 2013). Rozdílné nálezy mohou mít příčinu patrně v odlišném metodickém přístupu.

Aktivace protektivních signálních drah se mohou lišit v závislosti na konkrétním protokolu, délce adaptace, její intenzitě případně animálním modelu atp. Nicméně některé signální dráhy aktivované hypoxií nebo jejich efekторы jsou společné (Neckář et al., 2002a). Chronická intermitentní hypoxie i preconditioning stabilizují hypoxií indukovaný transkripční faktor 1α (HIF- 1α) (Cai et al., 2003, 2013), který ovlivňuje transkripci až 200 genů (Ong and Hausenloy, 2012) a tím zajišťuje vysoce komplexní odpověď organismu i buněk. Dříve byl zastáván názor, že zvýšená adrenergická odpověď vyvolaná intermitentní hypoxií (Ostadal, 1984 in Usdin et al., 1984) a oxidativní stres způsobený zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), které vznikají při intermitentní hypoxii (Yoshikawa et al., 1982), jsou škodlivé. Později bylo prokázáno, že obojí slouží jako aktivátor signálních drah významných v kardioprotekci (Kolář et al., 2007; Mallet et al., 2006).

Bylo zjištěno, že protektivní režimy adaptace na hypoxii aktivují PKC- δ (Kolář et al., 2007; Neckář et al., 2005), proteinkinázy z rodiny mitogenem aktivovaných proteinkináz (Rafiee et al., 2002), fosfatidylinositol 3-kinázu (Ravingerová et al., 2006), cGMP-závislou proteinkinázu (Baker et al., 1999), proteinkinázu B/Akt (Ravingerová et al., 2006) a mnoho dalších. Jedním z cílů jejich fosforylace by mohly být ATP senzitivní draslíkové kanály, jak mitochondriální (mK_{ATP}), tak sarkolemální (sK_{ATP}), nebo hexokináza 2. Výsledky experimentů, při kterých docházelo k blokaci nebo otevírání mK_{ATP} myokardu potkana ukazují pravděpodobnou zásadní roli tohoto kanálu v ochraně proti I/R poškození (Kolář et al., 2005; Neckář et al., 2002b). Na protektivní účinky aktivace sK_{ATP} však bylo již také poukázáno (Gumina et al., 2003).

2.1.2.2 Cvičení

Pravidelný fyzický trénink byl opakovaně prokázán jako kardioprotektivní (Borges and Lessa, 2015; Li et al., 2014; McElroy et al., 1978). V rámci zdravého životního stylu je pohyb všeobecně doporučován, udržuje jedince v tělesné kondici, pokud je prováděn v rozumné míře ve vhodných podmínkách.

Pravidelné cvičení způsobuje dlouhodobě bradykardii jak v klidném stavu, tak snižuje srdeční frekvenci i v sub-maximálním pracovním zatížení. Zvyšuje dlouhodobě ejekční frakci a zlepšuje využití kyslíku myokardem (Saltin et al., 1968 in McElroy et al., 1978). Již v roce 1978 upozornil na kardioprotekci vyvolanou pravidelným cvičením McElroy et al. Tato práce se stala odrazovým můstkem pro nespočet experimentů zabývajících se cvičením a kardioprotekcí. Jeho experiment snížil velikost infarktu o 30%.

Na zvířecích modelech jsou zkoumány vlivy cvičení především ve dvou směrech - vytrvalostní cvičení a krátkodobá zátěž. U člověka obecně platí, že izotonická fyzická činnost, kupříkladu plavání, běh, cyklistika zahrnuje práci velkých svalových skupin, jejichž masivní vazodilatace způsobuje excentrickou hypertrofii srdce zvýšeným venózním návratem vyvolávající objemové přetížení. Tato hypertrofie se vyznačuje zvětšením levé komory a změnou tloušťky stěny levé komory. Izometrická cvičení, například vzpírání, způsobují tlakové přetížení srdce spíše než objemové, vedoucí ke koncentrické hypertrofii (Pluim et al., 2000). Průměrný arteriální tlak při double-leg pressu (vzpírání oběma nohama) činil 320/250 mmHg, nejvyšší z naměřených tlaků dokonce 480/350 mmHg (MacDougall et al., 1985), je tedy zřejmé, že adaptace srdce je nezbytná. Tyto změny jsou však morfologické, závislé čistě na fyzikálních podmínkách při adaptaci.

Kardioprotektivní mechanismy vyvolané fyzickou zátěží se stále studují a stále se čeká na jejich plné vysvětlení. Jedna ze změn vyvolaných adaptací na cvičení je zvýšení syntézy proteinů tepelného šoku (HSP). Vyšší hladina HSP70 rodiny proteinů indukovaná cvičením byla považována za kardioprotektivní (Harris and Starnes, 2001). Nicméně téměř souběžné studie toto tvrzení vyvrátily u HSP72 (Quindry et al., 2007; Taylor et al., 1999), který patří do rodiny HSP70. Po ischemii srdce bez prodloužení využívá k produkci NO endoteliální NO syntázu (eNOS), s jistým zpožděním produkce NO stoupá za přispění indukované NO syntázy (Golbidi and Laher, 2011). Již jedno

cvičení navozuje protekci přes NO (Babai et al., 2002). Protektivní vliv oxidu dusnatého byl prokázán, když byla protekce indukované cvičením zrušena zablokováním eNOS (Farah et al., 2013). K další produkci NO dochází redukcí dusitanů. Při cvičení vzrůstá schopnost srdce této redukce, což může také zprostředkovat protekci (Nicholson et al., 2013).

Aktivace antioxidantních mechanismů cvičením je přinejmenším diskutabilní. Nejdůležitějšími ve vztahu ke cvičení a tedy v tomto směru studovanými antioxidanty jsou superoxid dismutáza (SOD), kataláza a glutation peroxidáza. Někteří autoři tvrdí, že cvičení zvyšuje hladinu katalázy (Lennon et al., 2004a), glutation peroxidázy (Frasier et al., 2013), docházet může i ke zvyšování hladiny glutationu a Cu-Zn a Mn isoforem SOD (Powers et al., 1998). Ani mitochondriální MnSOD nemá stále jasný vliv na kardioprotekci, protože existují dvě práce potvrzující opak zjištěný na organismech s delecí genu pro MnSOD (Lennon et al., 2004b; Yamashita et al., 1999). Dále bylo zjištěno, že nezastupitelnou roli v kardioprotekci vyvolané cvičením hraje také zvýšená syntéza opioidních receptorů (Dickson et al., 2008).

2.1.3 Otužování, chladová adaptace

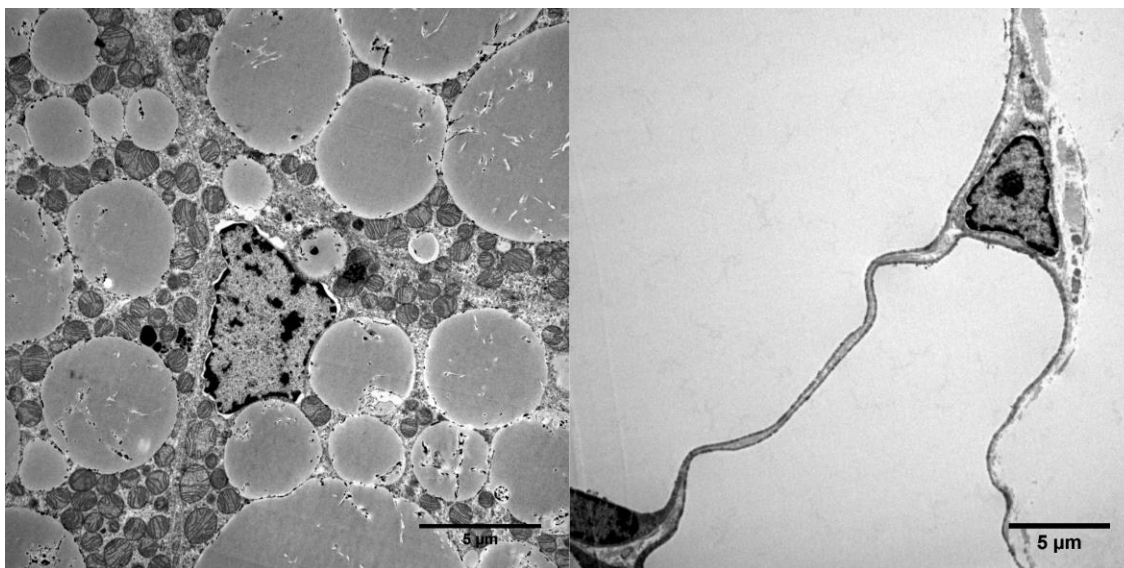
Protektivní účinky akutního chladu při anoxii jsou známé a hojně využívané zejména v transplantační medicíně, kardiochirurgii. Při podchlazení těla, orgánů, se zpomalují metabolické pochody, a tím se zpomalují i škodlivé účinky ischemie a reperfuze (Kohlhauer et al., 2015). Vede ke zpomalení produkce ROS, okyselení cytosolu buněk, excitotoxicity, tedy ke snížení nekrózy a apoptózy buněk (Polderman, 2009).

Blahodárné účinky na organismus však přináší i adaptace na chlad neboli otužování. U adaptace přetrvávají účinky delší dobu než u akutní expozice a mechanismy spuštěné adaptací se od akutní chladové expozice výrazně liší. U akutní expozice se významně uplatňuje stimulace stresové osy a adrenergní signalizace (Brenner et al., 1999). Bylo popsáno, že adaptovaný lidský organismus může vykazovat tři typy adaptace – hypotermická, inzulativní a metabolická. U hypotermického přizpůsobení dochází ke snížení teploty v rektu s nízkou metabolickou kompenzací vedoucí k ochlazení těla. Inzulativní přizpůsobení vede ke zvýšení tepelné izolace, charakterizované sníženou průměrnou teplotou kůže a nezměněnou vnitřní teplotou těla.

Metabolické přizpůsobení vede ke zvýšení povrchové teploty kůže, zvýšení metabolické produkce tepla, ale nemění vnitřní teplotu (Bittel, 1992).

U člověka byl studován vliv chladové adaptace na otužilcích na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze a díky prof. Janskému a doc. Vybíralovi již vznikla jistá tradice studia vlivu chladu na člověka. V jejich práci byli probandi z řad mladých sportovců. Adaptace byla prováděna 3x týdně 1 hodinu ve vodě o teplotě 14 °C (Janský et al., 1996) po dobu 4-6 týdnů. Touto prací bylo zjištěno, že lidé adaptovaní na chlad mají dlouhodobě sníženou vnitřní i povrchovou teplotu, opožděnou metabolickou odpověď na chlazení a subjektivně snížený třes. Hypotalamický práh pro indukci termogeneze byl posunut k nižším teplotám. Šimečková s kolektivem (2000) popsala u člověka vliv blokace adrenergických receptorů propranololem na produkci tepla při akutním chladovém stimulu. Lokální ochlazení dlouhodobě snižuje srdeční frekvenci, systolický tlak, centrální teplotu, ale nemění odpověď katecholaminů na chladovou expozici (Janský et al., 2006).

Adaptace potkana na chlad se projevuje zhoustnutím a naježením srsti, vznikem depozit hnědé tukové tkáně (BAT) mezi žebry, podél břišní aorty, okolo ledvin. Nejvýraznější a nejlépe viditelná zásoba BAT se nachází v oblasti mezi pletencem předních končetin. U člověka byla tato tkáň dlouho známa pouze u novorozených dětí kvůli jejich omezené schopnosti termoregulace. Hnědá tuková tkáň však, dle dřívějších domněnek, měla rychle zaniknout. Teprve nedávno však bylo zjištěno, že ke vzniku BAT může dojít po delší chladové stimulaci i u dospělého člověka. Pomocí pozitronové emisní tomografie byla depozita hnědého tuku objevena u dobrovolníků v krční oblasti nad klíčními kostmi (Lidell and Enerbäck, 2010). BAT je morfologicky diametrálně odlišná od bílé tukové tkáně (WAT). Tkáň se liší především masivní vaskularizací, inervací sympatickými nervovými vlákny (Bartness et al., 2010). Dále se buňky BAT liší jádrem vprostřed buňky, oproti utlačovanému jádru WAT, vysokou hustotou mitochondrií, malými kapičkami tuku, místo velkých tukových vakuol (Obr. 1), a β^3 -adrenergními receptory.

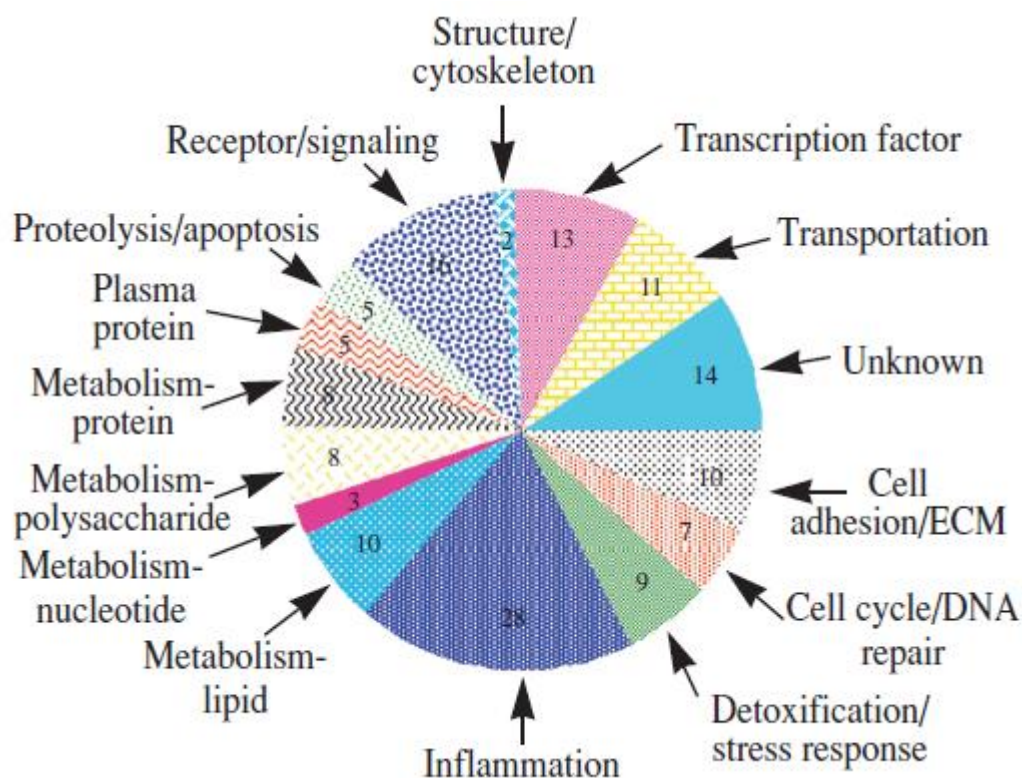


Obr. 1: Srovnání hnědé a bílé tukové tkáně. Vlevo je BAT se zmnoženými mitochondriemi, tukovými kapénkami, velmi transkripčně aktivním neutlačovaným jádrem. Vpravo WAT s velkými tukovými vakuolami, utlačeným jádrem, na obrázku bez mitochondrií. (autorka: Dr. Barbara Elsnicová; elektronový mikroskop JEOL 1011 vybavený CCD kamerou)

Aktivace těchto receptorů epinefrinem vyvolává lipolýzu a aktivaci rozpráhuujícího proteinu 1 (UCP1). Tento protein je součástí vnitřní mitochondriální membrány (Jacobsson et al., 1985; Krauss et al., 2005). Pokud je aktivní, zkratuje elektrochemický potenciál na membráně, který by byl využit pro výrobu ATP, za vzniku tepla (Krauss et al., 2005). Další odpovědí po aktivaci β^3 -adrenergických receptorů je zvýšení hladiny iodotyronin deiodinázy typu 2 (DIO2) a transkripce genu proteinu PGC-1 α , transkripčního koaktivátoru regulující mnohé geny energetického metabolismu (Puigserver et al., 1998; Silva and Larsen, 1983). PGC-1 α zvyšuje expresi genu UCP1 a dalších genů potřebných pro biogenezi mitochondrií (Puigserver and Spiegelman, 2003). DIO2 je enzym převádějící T₄ na T₃, který je schopen vázat se na tyroidní receptory. Pokud jsou tyto receptory koaktivovány PGC-1 α , vzrůstá ještě více translace proteinu UCP1 (Puigserver and Spiegelman, 2003). Díky této dráze dochází k rychlejší a větší výrobě tepla závislé na chladové adaptaci.

Tyroidní hormony mají dle Pantose a jeho kolektivu (2012) vliv na přestavbu srdečního svalu, jako odpověď na ischemický infarkt. Stávají se tedy důležitým prvkem nutným k úvaze při studiu vlivu chladové adaptace na ischemicko-reperfúzní poškození srdce. Poměr T₄ a T₃ v plazmě je asi 20:1. Množství trijódtyroninu, jako ligandu TR α 1 a TR β 1 jaderných receptorů, ovlivňuje transkripci genů zahrnutých mimo jiné i do metabolismu cukrů a tuků, jejich koncentraci v plazmě, zánětlivých faktorů,

apoptózu (viz Graf 1), dokonce i dýchání mitochondrií (O'Reilly and Murphy, 1992). T_3 ovlivňuje i srdeční frekvenci přes stimulaci exprese MyHC α a SERCA. (Arnostova et al., 2011; Harvey and Williams, 2002; Soukup et al., 2001; Yen, 2001).



Graf 1: Graf znázorňující zvýšenou transkripci genů, sjednocených dle účinku produktů transkripce, buněčné linie HepG2-TR α 1 po podání 100nM T_3 na 48 hodin (převzato z Huang et al., 2008).

Hladiny T_3 a T_4 kolísají v závislosti na roční době. Celková koncentrace T_3 byla nejvyšší v zimě naopak v létě nejnižší. A navíc nejvyšší jarní koncentrace volného T_4 se lišila od té letní nejnižší, stejně jako koncentrace volného T_3 (Levine et al., 1995). Chladovou adaptací se hladina T_3 v plazmě nezměnila (De Lorenzo et al., 1998), na rozdíl však od akutní chladové expozice, která hladinu T_3 zvyšovala (Herpin et al., 1995; Leppäluoto et al., 2005)

Literatura k objasnění chladové adaptace a jejího přímého vlivu na kardiomyocyty téměř chybí. Rozdělení chladové adaptace do dvou fází závislých na čase navrhuje Xing s kolektivem (2014). První fázi nazval chladovou stimulací, spojenou aktivací stresové osy. Doprovází ji zvyšování hladiny katecholaminů, aktivity fosfodiesterázy a adenylcyklázy. Typická pro tuto fázi je tepelná produkce v kosterních svalech

a játrech, trvá asi tři týdny. Naopak druhá fáze zvaná adaptační se vyznačuje útlumem svalové a jaterní termogeneze a aktivací netřesové produkce tepla přes UCP1 v BAT. Také by mělo docházet ke zvýšení kapacity antioxidantního komplexu zvýšením hladiny katalázy a SOD v ledvinách a játrech, kosterních svalech a právě v myokardu (Selman et al., 2000).

2.2 Perfuze srdce dle Langendorffa

Perfuzie srdce dle Langendorffa neboli protokol perfuze izolovaného srdce, srdce *ex vivo*, je významný experimentální přístup k výzkumu základních fyziologických vlastností denervovaného srdce, elektrofyzilogii, odolnosti srdce k ischemicko-reperfuznímu poškození atp. Celý systém je poměrně jednoduchý, nicméně velmi důmyslný. Jako první v roce 1866 Carl Ludwig s Eliášem Cyonem připravili první izolované žabí srdce. V roce 1883 Hendy Newell Martin vyvinul metodu perfundovaného savčího srdce, následován byl Oscarem Langendorffem v roce 1897, který perfuzní systém zdokonaluje a ve své práci například dokazuje, že umírající srdce a srdce bez rytmu může být resuscitováno pomocí perfuze. Mimo jiné také komentuje Newellem zjištěný vliv teploty na rychlost srdečního rytmu a hraniční teploty, za kterých funguje kočičí srdce (16,5°C – 45°C) (Langendorff, 1897). Langendorffova metoda perfuze izolovaného potkaního srdce byla stabilizována a používána od 60. let 20. století (Zimmer, 1998).

Model srdce *ex vivo* můžeme rozdělit na perfuzi pod stálým tlakem a perfuzi pod stálým průtokem. Perfuze pod stálým tlakem je zajištěna hydrostatickým tlakem perfuzního roztoku umístěného v zásobníku např. 100 cm nad perfundovaným srdcem. Tím je zabezpečen stálý tlak perfuze koronárního systému. Perfuze pod stálým průtokem je zajištěna peristaltickou pumpou, která v pravidelných intervalech pumpuje perfuzní roztok do srdce. Dnes již existují pumpy se zpětnou vazbou, které dokáží reagovat na změnu kapacity koronárních artérií (Bell et al., 2011). K perfuzi srdce dochází bez naplnění levé komory srdeční (LV). Srdeční sval je zásoben přes systém koronárních arterií odstupujících z místa zvaného *sinus aortae dexter et sinister*, které leží nad aortální chlopní (Sutherland & Hearse, 2000). To znamená, že perfuzní roztok, který teče kanylou retrográdně do aorty, uzavírá svým tlakem aortální chlopně a vniká tak pouze do koronárních arterií. Perfuzi pod stálým tlakem považujeme za šetrnější

a průtok koronárními arteriemi se více blíží fyziologickému stavu, protože do koronárního systému proudí perfuzní roztok pouze v okamžiku diastoly, tedy v okamžiku, kdy nejsou cévy zúžené srdečním stahem, nikoli neustále, jako je tomu v případě užití peristaltické pumpy (konzultace prof. Kolář, dr. Ballagi).

U perfundovaného srdce dle Langendorffa můžeme určit jeho stav dle následujících parametrů. Prvním je koronární průtok, který se měří při perfuzi pod stálým tlakem a udává nám vitalitu srdce. Průtok můžeme měřit ručně pomocí odměrného válce, anebo pomocí průtokoměru, který je samozřejmě přesnější a umožní dlouhodobá měření, avšak je finančně náročnější (Bell et al., 2011). Pokud je k perfuzi používána aparatura s peristaltickou pumpou, je průtok daný nastavením pumpy. Dalším parametrem, který může být měřen, je síla kontrakce neboli systolická a diastolická funkce levé komory. K tomuto měření se nejčastěji používá balonku plněného fyziologickým roztokem vloženého do LV po odstranění levé síně mitrální chlopní (Nikolic et al., 2016; Wei et al., 2011). Balonek musí být z materiálu, který není příliš elastický, aby nedocházelo ke ztrátám při přenosu tlaku na kapalinu v balonku, nebo naopak. Nesmí být ani příliš pevný, aby vůbec k přenosu tlaku došlo, musí také dobře vyplňovat dutinu komory (Curtis et al., 1986). Tlak je převodníkem převeden do elektrického signálu a přes zesilovač přenesen do záznamového zařízení (Sutherland et al., 2003). Je zřejmé, že z tlakových informací můžeme odvodit zároveň frekvenci srdečního rytmu. Pomocí elektrod lze v experimentu naměřit EKG. To je vhodné především pro zachycení arytmií, fibrilací a dalších poruch ve vedení vzruchu myokardem, samozřejmě i pro měření srdeční frekvence, které je však zbytečné, pokud je srdce uměle stimulováno, což se může provádět pro uniformitu experimentu (Chou et al., 2014).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

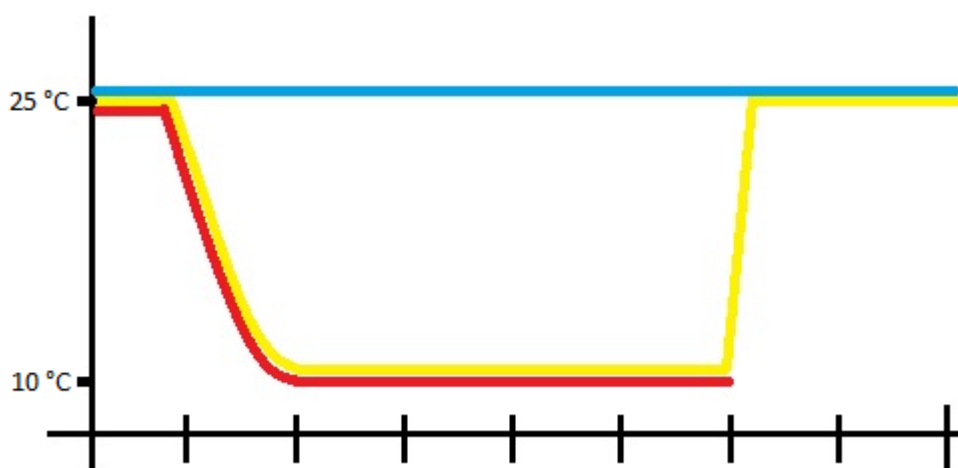
1. Zavést metodu perfuze srdce dle Langendorffa a metodu globálního ischemicko-reperfuzního poškození na našem pracovišti
2. Pozorovat vliv chladové adaptace potkana na velikost ischemicko-reperfuzního poškození levé komory srdeční
3. Zavést metodu perfuzní fixace srdcí pro přípravu mikroskopických preparátů

4. MATERIÁLY A METODY

4.1 Adaptace

Potkani kmene Wistar firmy Velaz byli rozděleni do tří skupin – kontrolní, experimentální chronická, experimentální regresní. Pro každou skupinu bylo celkem použito 20 zvířat. Zvířata měla na začátku pokusu hmotnost $250 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$.

Experimentální potkani byli 5 týdnů adaptováni v chladové komoře na teplotu $10 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Experimentální regresní potkani byli následně na dva týdny přemístěni do teploty stejné, jakou měli po celých pět týdnů kontrolní potkani. Kontrolní skupina byla po celou dobu chována v pokojové teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Všechna zvířata byla krmena standardní dietou ST1. Byla chována ve světelném režimu 12/12 v klecích s neustálým přístupem k vodě a potravě.



Obr. 2: Schéma adaptace potkanů v řádu týdnů. Modře kontrolní skupina, žlutě regresní skupina, červeně chladová skupina (Inspirace Marvanová)

4.2 Krebs-Henseleitův pufr

Krebs-Henseleitův (KHB) pufr je izotonickým roztokem solí a glukózy (viz tabulka 1). Přidávání solí a glukózy v určitém pořadí není potřebné, pouze CaCl_2 byl přidáván jako poslední po malých částech, aby nedošlo k vysrážení vápníku do roztoku. Roztok byl před použitím sycen 30 minut medicínálním plynem (95 % O_2 a 5 % CO_2) a zahříván na teplotu $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Pokud to bylo nutné, pH roztoku bylo upraveno tak, aby bylo v rozmezí fyziologického pH krve, tedy mezi $7,37 - 7,40 \pm 0,02$.

Tab. 1: Složení Krebs-Henseleitova pufru

Složka	mM/l
C ₆ H ₁₂ O ₆	11
NaCl	118.5
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
KCl	4,7
CaCl ₂	1,2

4.3 Izolace srdce, perfuze dle Langendorffa

Potkan byl usmrcen cervikální dislokací pod dohledem osoby proškolené dle zákona č. 18/2004 Sb. o uznávání odborné kvalifikace na práci se zvířaty dle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání § 15d. V oblasti mečovitého výběžku byl proveden vstup do těla, torakotomie. Srdce bylo vystřiženo tak, aby byla zachována aorta alespoň v délce 1-2 mm, zavěšeno na Langendorffův perfuzní systém. Celý proces od usmrcení zvířete až po pověšení srdce na perfuzní systém bylo nutné stihnout v co nejrychlejším čase (do 1 minuty 30 vteřin), aby bylo zabráněno ischemickým změnám na srdci. Srdce, která nebyla zavěšena do tohoto limitu, byla z pokusu vyřazena. Perfuze byla provedena KHB o teplotě 37 °C a pH 7,4. Srdce bylo 15 minut ponecháno stabilizaci. Následně byla zahájena jeho globální ischemie trvající 30 minut, způsobena přerušením průtoku pufru srdcem. Během ischemie bylo srdce ponořeno do prohřivaného KHB syčeného dusíkem. Reperfuze byla započata po ischemické fázi na dobu 30 minut (schéma Obr. 3). Poté bylo srdce sňato z perfuzního systému, jemně a rychle osušeno na filtračním papíru a zamraženo v -20 °C zabalené do hliníkového obalu. Zamražení srdce slouží pro lepší manipulaci se srdcem při krájení. Tento protokol byl proveden u všech tří skupin zvířat totožně.

stabilizace	ischemie	reperfuze
10 minut	30 minut	30 minut

Obr. 3: Časová osa protokolu I/R poškození myokardu *ex vivo*

4.4 Analýza ischemicko-reperfuzního poškození

K barvení srdce byl připraven 0,1% roztok trifenylnitrotetrazolium chloridu (TTC) ve fosfátovém pufru (PBS) o pH 7,4. Roztok byl důkladně promíchán a zahříván na teplotu 37°C.

Srdce bylo po zmražení rozkrájeno na 5 - 6 řezů. Řezy byly barveny 0,1% roztokem TTC v PBS po dobu 10 minut. Tato sůl barví po rozkladu dehydrogenázami ve viabilních buňkách tkáň načerveno (Klein et al., 1981). Po obarvení byly nakrájené řezy uloženy na 72 hodin do 4% formaldehydu (PFA).

Po třech dnech byly řezy z PFA vyňaty, byly odstřiženy stěny pravé komory a zbylé LV vyfoceny vždy z obou stran, pomocí fotoaparátu Nikon D5100 a objektivu SIGMA 105mm F2.8 MAKRO EX DG OS HSM. Snímky byly hodnoceny v programu ImageJ. Hodnotila se plocha nekrotické tkáně k celkovému obsahu řezu srdce. Výsledky byly vyjádřeny jako procento nekrotické tkáně z celkové plochy srdce.

4.5 Zavedení metod perfuzní fixace srdce

Pro fixaci srdce za účelem výroby mikroskopických preparátů je důležité srdce zastavit v relaxovaném stavu. K relaxaci používáme pufr Tyrod (v mmol/l 136,9 NaCl, 2,7 KCl, 1,8 CaCl₂, 0,1 MgCl₂, 11,9 NaHCO₃, 0,4 NaH₂PO₄ a 5,6 C₆H₁₂O₆) ovšem modifikovaný, se zvýšenou koncentrací K⁺ iontů (c_k= 16,2 mM/l) o pH 7,4 a pokojové teplotě asi 21°C. Srdce je tímto pufrem retrográdně perfundováno do 30 vteřin, obvykle kratší dobu. Čím je tento krok časově kratší, tím dříve můžeme zahájit fixaci a zamezíme tím nežádoucím ischemickým, metabolickým nebo strukturním změnám kardiomyocytu. Pokud je srdce napohled relaxované, zahájíme bez prodloužení perfuze 4% formaldehydem o pokojové teplotě na dobu asi 3 minut. Srdce po sejmutí z fixačního aparátu zbavíme síní, rozřízneme přibližně v polovině komor tak, aby vznikly podobně velké části apikální a bazální a 3 hodiny necháme fixovat ve 4% formaldehydu. Následně uložíme části srdce do 8% sacharózy přes noc.

4.6 Hmotnost těla a srdce

Pro kontrolu příjmu potravy potkanů, který by mohl být ze stresu z příliš nízkých teplot nedostatečný a pro vyloučení protektivního vlivu kalorické restrikce, byl každý potkan pravidelně jednou za týden vážen na laboratorních vahách. Naměřené hmotnosti byly zapsány do tabulek (příloha B), které byly průběžně hodnoceny.

Poměr hmotnosti srdce (HW) a hmotnosti těla (BW) určuje, zda dochází při adaptaci například ke změně velikosti srdce nebo poklesu hmotnosti. Může odhalit hypertrofii. Hmotnosti srdce byly zaznamenávány u skupin potkanů, které nebyly zahrnuty v experimentu I/R poškození srdce.

4.7 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena mezi dvěma skupinami nepárovým t-testem. K hodnocení byl použit program GraphPad Prism 5. Za statisticky významná byla považována data, pokud $p < 0,05$.

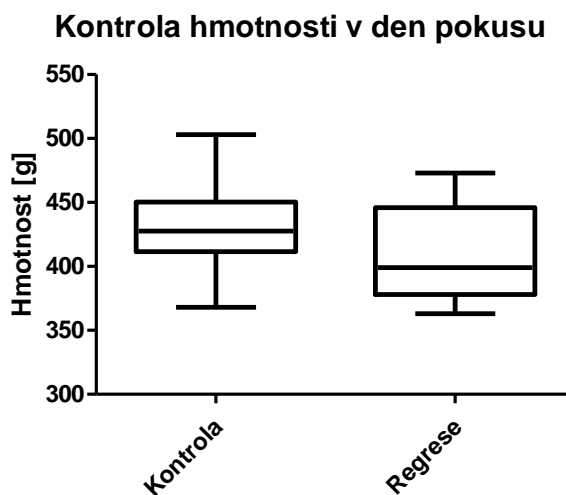
5. VÝSLEDKY

5.1 Perfuze dle Langendorffa, globální ischemie

Metoda perfuze srdce dle Langendorffa a globální ischemie byla zavedena za konzultací a pomoci prof. Koláře, dr. Neckáře a dr. Mandíkové z Fyziologického ústavu AV ČR. Ke standardizaci a optimalizaci podmínek byly použity poznatky z odborných článků (Bell et al., 2011). Byla použita peristaltická pumpa s nastaveným průtokem $12 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, která pumpovala KHB přes ohřivací kolonu do aorty navlečené na ocelovou kanylu. Srdce bylo po celou dobu v zahřívací komůrce, v jejichž stěnách proudilo ohřívací médium o teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$, čímž bylo zamezeno podchlazení srdce. Efluent byl odváděn do odpadu.

5.2 Hmotnost zvířat

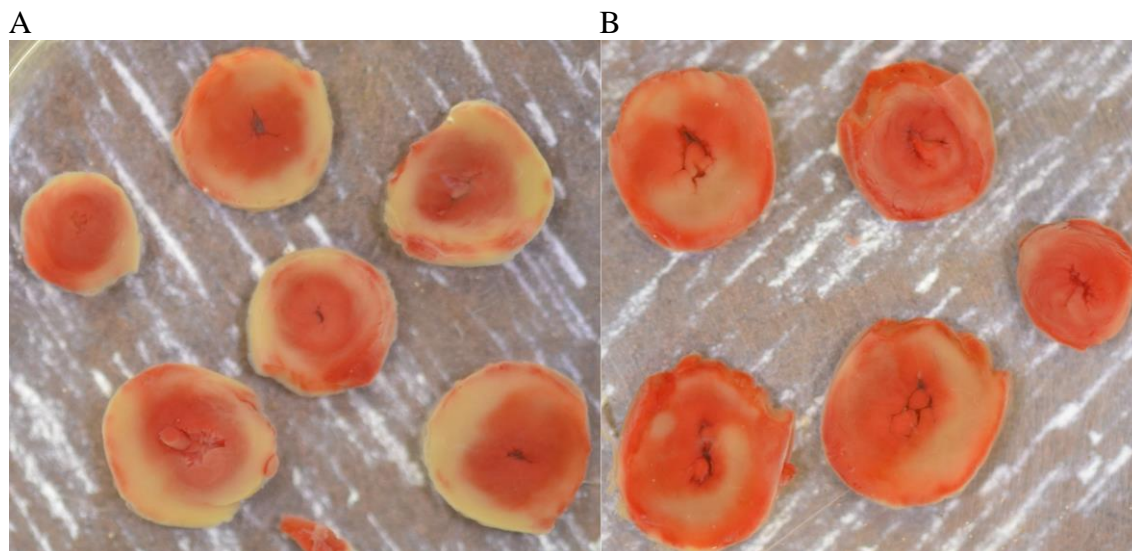
Průměrná hmotnost zvířat před experimentem ischemicko-reperfuzního poškození se nelišila statisticky průkazným rozdílem.



Graf 2: Hmotnosti zvířat před experimentem ischemicko-reperfuzního poškození. Mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl ($n_k=18$, $n_r=10$, $*p<0,05$, $m_k = 431.2 \pm 7.388 \text{ g}$, $m_r = 410.7 \pm 12.49 \text{ g}$).

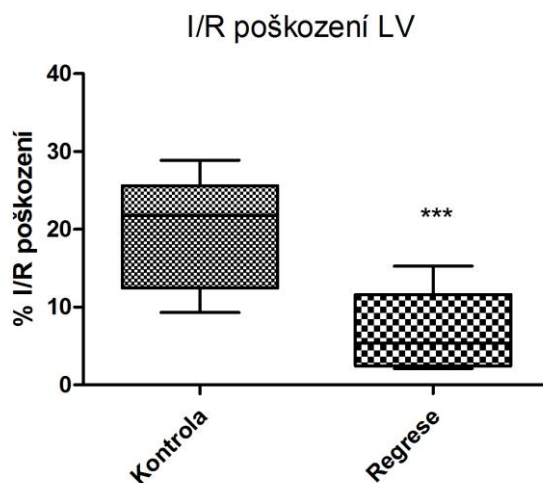
5.3 Stanovení velikosti I/R poškození LV

Krájení, barvení, fotografování a hodnocení srdce bylo zavedeno dle konzultací kolegů z Fyziologického ústavu AV ČR, a postupně doplněno a přizpůsobeno našim podmínkám.



Obr. 4: Srovnání srdce kontroly (A) a dvouměsíční regrese (B). Nakrájená srdce barvena 1% TTC, nekrotická místa odbarvena 3 dny 4% formaldehydem. Foceno fotoaparátem Nikon D5100 s objektivem SIGMA 105mm F2.8 MAKRO EX DG OS HSM na Petriho miskách.

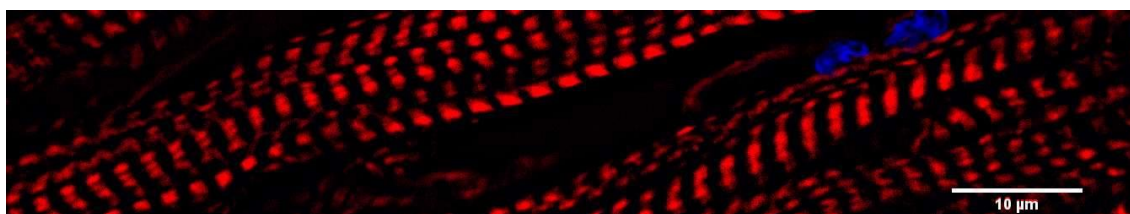
Protokol I/R poškození srdce *ex vivo* ukázal, že chladová adaptace potkana má prokazatelně pozitivní účinky po 14 dnech teplotní regrese, ve smyslu zmenšení plochy nekrotické tkáně na řezech barvených TTC (viz graf 3). Nekróza postihla 20 % plochy řezů kontrolních srdcí, zatímco srdce potkanů regresního protokolu byla postižena nekrózou o 65 % méně, s plochou nekrózy řezů 7 %.



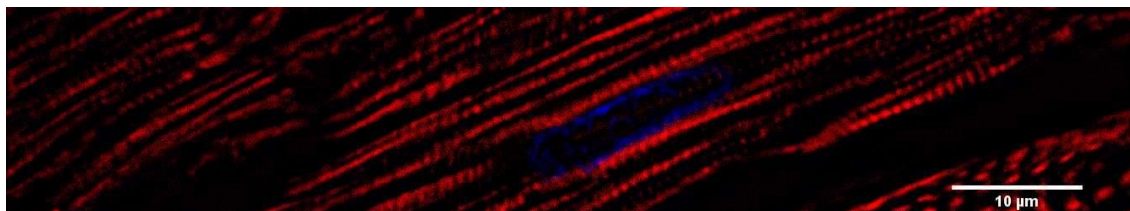
Graf 3: Ischemicko-reperfuční poškození levé komory srdeční potkana ($n_k=18$, $n_r=10$, $***p<0,0001$)

5.4 Fixace srdce pro přípravu mikroskopických preparátů

Fixace srdce byla původně zavedena ve spolupráci s prof. Kolářem z Fyziologického ústavu AV ČR. Poté byl protokol modifikován po konzultaci s dr. Martou Novotovou z Ústavu molekulární fyziologie a genetiky SAV v Bratislavě. Drobné úpravy protokolu jsem provedl na základě rozdílných podmínek na našem pracovišti. Rozdíl mezi dobře a špatně fixovaným srdcem ilustrují následující obrázky (Obr. 5, Obr. 6). Mým úkolem, vedle prezentovaných výsledků, byla fixace všech srdcí v naší laboratoři. Kvalita fixace a řezů a obrázků B. Elsnicové byla oceněna na mezinárodní konferenci v Paříži francouzskými kolegy a protokol jsme jim s potěšením poskytli ke všeobecnému užití.



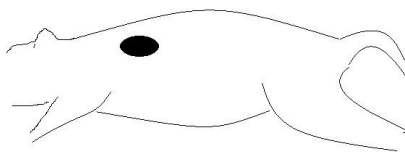
Obr. 5: Fixované relaxované srdce ve fluorescenčním mikroskopu. Červeně phalloidinem značený aktin sarkomer, modře DAPI značená jádra kardiomyocytu (autor: Mário Heleš; fluorescenční mikroskop Olympus IX 81).



Obr. 6: Fixované kontrahované srdce ve fluorescenčním mikroskopu. Červeně phalloidinem značený aktin sarkomer, modře DAPI značená jádra kardiomyocytu (autor: Mário Heleš; fluorescenční mikroskop Olympus IX 81).

6. DISKUZE

V předložené práci jsem po zavedení metodických přístupů stanovil velikost infarktu u kontrolních a experimentálních zvířat po 5 týdnech chladové adaptace a následných dvou týdnech ve standardních tepelných podmínkách. Tento model jsme zvolili jako ideální pro měření přetrvávajících důsledků chladové adaptace po zvážení technických a metodických komplikací, které by mohly nastat v případě odběru srdce ihned po adaptaci. Pokud bychom analyzovali srdce ihned po adaptaci, tak by byl potkan vystaven náhlému vzestupu teploty okolí, což by mohlo vyvolat zvýšenou odpověď na úrovni Heat shock proteinů (HSP), které jsou známé jako protektivní (Currie et al., 1988; Karmazyn et al., 1990). Odběr srdce v chladu a přenos do vzdálené místnosti jsme též nepovažovali za ideální protokol. Potkan byl průkazně adaptován na chlad po pěti týdnech (Janský et al., 1996; Xing et al., 2014), kdy bylo možné pouhým okem vidět interscapulární zásobu BAT, která vážila zhruba 1 gram.



Obr. 5: Schéma potkana, černě vyznačeno místo vzniku makroskopického mezilopatkového zásobníku BAT. (upraveno dle: Cannon and Nedergaard, 2004)

Co se týká chronické adaptace na chlad, v literatuře se setkáváme s mnoha pracemi (Arnold and Richard, 1987; Puerta and Abelenda, 1987; Stancic et al., 2013; Vybíral et al., 1985), ve kterých bylo užíváno velmi nízkých teplot 2-6°C. Při takto nízkých teplotách byly zjištěny poruchy na úrovni ledvin i nadledvin, vyvolané dehydratací způsobenou chladem (Fregly, 1982). Za našich podmínek nebylo žádné poškození prokázáno (Marvanová, 2015). Objevovaly se i příznaky hypertenze a následné hypertrofie (Sun et al., 1997). Proto jsme zvolili vyšší teplotu adaptace, abychom předešli těmto negativním dopadům. Marvanová ve své diplomové práci vyšetřovala moč a nezaznamenala žádné negativní důsledky této adaptace. Ani hypertrofie srdce se nejeví u tohoto modelu jako významný důsledek, snížená

hmotnost adaptovaných potkanů je vysvětlována vyšším energetickým výdejem (Marvanová, 2015).

Jako perfuzát pro srdce *ex vivo* se nejčastěji používá roztok Tyrod (Frosini et al., 2012) nebo Krebs-Henseleitův pufr (KHB - pro složení viz kapitolu 4 - materiály a metody). V závislosti na experimentu se oba roztoky užívají v různých modifikacích a to například bez Ca^{2+} , s vysokým obsahem iontů K^+ , s hovězím sérovým albuminem, volnými mastnými kyselinami nebo léčivy atp. (Freisleben, 2000; Park et al., 2016; Xue et al., 2011). Srdce v našem experimentu byla perfundovaná nemodifikovaným KHB namíchaným dle tab. 1.

Zvláštností KHB, je vysoká koncentrace glukózy v roztoku (10 – 11 mmol/l) vzhledem k fyziologické koncentraci glukózy v krvi (5 mmol/l). Takto vysoká koncentrace glukózy je substitucí za absenci mastných kyselin a pyruvátu, tedy přirozených substrátů pro metabolismus srdce (Stanley et al., 2005). Zde se ukazuje asi největší nevýhoda KHB, tedy absence velkého množství látek běžně se vyskytujících v krevní plazmě, nejen majoritního substrátu pro metabolismus srdce či kreatinu, ale také hormonů, bílkovin atp. Samozřejmě další nevýhodou je omezené množství kyslíku, rozpuštěného v roztoku, pro oxidativní fosforylaci. I proto se někdy používají perfuzáty s přidanými krevními elementy, či rovnou krev (Clements-Jewery et al., 2002; Pasini et al., 1999; Qiu and Hearse, 1992). Nástupem experimentů *in vivo* se však perfuze krví přestala téměř používat, protože tím odpadly její nevýhody. Hormonální vliv dárce krve, větší spotřeba zvířat, hemolýza a další. Při použití perfuzátu s červenými krvinkami byly používány hovězí červené krvinky v modifikovaném KHB. Tento typ perfuzátu je velmi časově náročný na přípravu a dokonce i na materiál. Neboť, pro snížení počtu lyzovaných červenýchrvinek, při přípravě je vhodné se vyhnout skleněným nádobám a používat především plast. Stejně jako perfuze krví má perfuze KHB s červenými krvinkami své výhody - snížení rizika edému srdce, pomalejší snižování kvality kontrakce, než je tomu u perfuze samostatným KHB, asi 5 % za hodinu, přiblížení koronárnímu průtoku *in vivo* 2-3 ml/min. Imunologická reakce hovězích erytrocytů se srdcem potkana je málo pravděpodobná, protože připravený perfuzát by měl být prost bílýchrvinek (Sutherland & Hearse, 2000).

Poměrně zásadní v každém protokolu je časový protokol pro stabilizaci srdce, ischemii, ať už globální nebo regionální, a trvání reperfuze. Existuje nespočet článků

o ischemicko-reperfučním poškození srdce *ex vivo* s odlišně dlouhými protokoly. Časové úseky jednotlivých fází protokolů I/R poškození izolovaného srdce se často mění v závislosti na kmeni zvířete, druhu experimentu aj. Stabilizace srdce je důležitá pro zotavení srdce po vyjmutí z těla zvířete a nasazení na perfuzní systém. Doporučená doba stabilizace je 15-20 minut (Bell et al., 2011), najdeme však i články, kde je stabilizace půlhodinová (Li et al., 2016). Ischemie může trvat libovolně dlouhou dobu. Účelem experimentu může být pouhá ischemizace srdce bez vzniku nekrotických ložisek nebo naopak vyvolání nekrotických změn na myokardu. Ischemii můžeme vyvolat buď globálně, nebo regionálně. Pro globální ischemie se používají dva protokoly buď tzv. „no flow“ (bez průtoku), nebo „slow flow“ (malým průtokem). Standardní doba pro vyvolání I/R poškození v rozsahu asi 40 % při použití globální „no flow“ ischemie je mezi 20 – 35 minutami (Manukyan et al., 2011). Například Qiu s Hearsem (1992) měli v jednom z experimentů i 105 minut trvající globální ischemii. Naproti tomu, regionální ischemie je působena standardně 30 – 40 minut podvazem levé sestupné koronární tepny. Doba trvání reperfuze může být velmi variabilní a její délka se s rostoucím poznáním molekulárních a buněčných mechanismů mění. Záleží zde i na druhu použitého zvířecího modelu. U myši byl doporučený čas reperfuze 60 minut, u potkana 120 minut. Experimenty prokázaly, že dehydrogenázy jsou z myšního srdce plně vymyty již po 30 minutách, z potkaního po 60 minutách (Ferrera et al., 2009; Schwarz et al., 2000).

Ve svém protokolu jsem provedl 10 minutovou stabilizaci, na konci vykazovalo srdce normální rytmus a tepovou frekvenci nad 120 úderů za minutu. Stabilizaci následovala 30 minutová globální „no flow“ ischemie, kterou doporučil prof. Kolář (ústní sdělení), je doporučována v odborných člancích (Bell et al., 2011) a v předběžných experimentech se mi osvědčila. Reperfuzi jsem do svého protokolu zvolil 30 minutovou jako kompromis mezi nejkratší publikovanou, o délce 15 minut (Teng et al., 2015), a nejčastěji prováděnou 60 minutovou. Dr. Neckář doporučoval reperfuzi minimálně hodinovou, lépe dvouhodinovou (ústní sdělení). Nicméně se vzrůstajícím časem, během kterého je srdce zavěšené na kanyle bez jakéhokoliv zásahu, se zhoršuje práce LV minimálně o 5-10 % za hodinu (Sutherland et al., 2003) a narůstá edém.

Velikost ischemicko-reperfuzního poškození LV regresní skupiny se signifikantně lišila od kontroly o 65 %. Na základě těchto měření předpokládáme, že fyziologické změny vyvolané chladovou adaptací jsou 14 dní po jejím skončení kardioprotektivní. Tento výsledek nelze porovnávat s literárními údaji, neboť jsem nenašel, že by někdo stanovil velikost ischemicko-reperfuzního poškození po adaptaci na chlad.

Možnou příčinou kardioprotekce chladové adaptace by mohly být různé hormonální změny, které jsou s ní spojené. Chladová adaptace působí na svém začátku jako významný stresor, podobně jako jednorázová chladová expozice (Huttunen et al., 2001). Dochází tedy k uvolňování noradrenalinu, následně k celkové reakci organismu na vliv zvýšeného tonu sympatiku, jako je vazokonstrikce a rozvoj termogeneze v kosterních svalech (Astrup et al., 1989; Dronjak et al., 2004). Na rozdíl od hlodavců, kterým zvyšuje noradrenalin v akutním chladu termogenezi, člověk nemá termogenní systém tak mnoho závislý na noradrenalinu. Noradrenalin také nevyvolává u otužilého člověka zvýšení metabolismu oproti kontrole (Lesná et al., 1999). Ke změnám v adrenergní signalizaci však dochází po celou dobu adaptace a to především ve stresové fázi adaptace, při které dochází k desenzitizaci adrenoreceptorů, jako při mnoha druzích stresu (Fitzgerald et al., 1981; Janský et al., 2007).

Dalším stresovým hormonem vyplavovaným do krve při akutní chladové reakci je kortikosteron, glukokortikoidní hormon, prekurzor aldosteronu (Bramham et al., 1998). Bylo prokázáno, že akutní chlad zvyšuje u potkana hladinu kortikosteronu minimálně na 24 hodin (Ustunel et al., 2014). Na izolovaných kardiomyocytech byl pozorován vliv kortikosteronu na L-typ Ca^{2+} proud, který byl pod jeho vlivem zvýšen (Wagner et al., 2011). Další poznatky vztahující se ke vlivu kortikosteronu na srdce nebyly nalezeny.

Na zvýšenou adrenergní signalizaci navazuje stimulace funkce tyroidních hormonů zvýšenou aktivací deiodáz (Silva and Larsen, 1983). Tyroidní hormony se podílejí na rozvoji netřesové termogeneze spolu s β_3 adrenergní dráhou. Mimo jiné mají též přímý vliv na správný vývoj srdce, mikromorfologii kardiomyocytu (White and Dauncey, 1999) expresi rychlých srdečních izoforem těžkých řetězců myozinu (Arnostova et al., 2011). Tyroidní hormony zvyšují expresi UCP1 proteinu, který slouží k tepelné produkci v BAT (Krauss et al., 2005). V BAT můžeme najít také UCP3, který je dále ve větším množství exprimován v kosterních svalech (Vidal-Puig et al., 1997). UCP3 je však exprimován i v srdci chronicky zatíženém infarktem (Murray et al., 2008),

při vysokém příjmu mastných kyselin (Krauss et al., 2005) nebo léčbě tyroidními hormony (Buroker et al., 2007). *Ex vivo* provedené ischemicko-reperfuční poškození potkaního srdce vykazovalo lepší zotavení po IPC, který prokazatelně zvýšil hladinu UCP3. Zásadní kardioprotektivní role rozpřažení zapříčiněnému proteinem UCP3 byla následně potvrzena (Ozcan et al., 2013). U lidí vystavených chladnému vzduchu o teplotě 5 -10 °C, půl hodiny, nebo pár hodin, nebyla naměřena změna tyroidních hormonů ani tyroideu stimulujícího hormonu (TSH) v séru (Hershman et al., 1970; Leppäluoto et al., 1988). Avšak v práci Hermanussena (1995) koncentrace TSH v séru byla prokazatelně vyšší jak po jednom, tak po opakovaných vstupech do chladné vody. Dále, po několika hodinách práce v mrazicím boxu (-20 °C) sérová hladina celkových T₃ a T₄ klesla. U jiných pracovníků denně pracujících v nízkých teplotách mezi -10 a 8 °C celková hladina T₃ klesla, ale vzrostla hladina volného T₃ (Solter and Misjak, 1989). Zebřičky pruhované (*Danio rerio*) adaptované na nízké teploty vykazovaly vyšší srdeční frekvenci a aktivitu sarkoplazmatické Ca²⁺-ATPázy. Při vyvolaném nedostatku T₃ tato odpověď na hypotermii nenastala, a obráceně po umělém dodání tohoto hormonu se obnovila (Little and Seebacher, 2014). Nesrovnalosti v naměřených hodnotách mezi pracemi mohou být způsobené například rozdílnými experimentálními přístupy. Pochopení vlivu chladové adaptace na produkci tyroidních hormonů bude vyžadovat sjednocení protokolů minimálně ve smyslu způsobu chladové adaptace, její délky, intenzity. Na konci naší adaptace jsme po jednom měření žádné změny v T₃ nenašli (nepublikováno). Tyto parametry se liší v rámci citovaných prací, stejně jako druhy organismu (člověk, prase, potkan, morče, ryba), na kterých je vztah chladové adaptace k tyroidní regulaci pozorován (Little and Seebacher, 2014; Macari et al., 1983; Solter and Misjak, 1989; Yamada et al., 1965). Chladová adaptace má prokazatelný vliv i na posílení ochrany před ROS (Ozcan et al., 2013), což bylo prokázáno i u otužilců (Lubkowska et al., 2013). V první fázi byly sledovány změny v hladině Cu-Zn SOD v kosterním svalstvu, která se v druhé fázi vrátila do hodnot naměřených u kontrolních potkanů. V obou fázích byla však sledována zvýšená aktivita katalázy, glutathion reduktázy, Mn SOD i glutathion peroxidázy (Petrović et al., 2008).

Snahou správné fixace srdce je dostatečné rychlost pro zachování uspořádání morfologie buňky nejpodobnější nativnímu stavu před fixací. Úspěšnost fixace nelze

ověřit, dokud není řez srdce pod mikroskopem. Relaxované srdce má délku sarkomery maximálně 2,3 μm , ale lze je rozpoznat již při fixaci v PFA. Dutina levé komory je prostorná a srdeční stěna LV je relativně tenká. Pokud je srdce kontrahované, prostor LV je zmenšený, její stěna relativně ztluštělá. Ve fluorescenčním mikroskopu tvoří phalloidinem značený aktin sarkomer hyperkontrahovaného (délka sarkomery 0,9 μm) srdce zdánlivé proužky. Relaxované srdce má při stejném značení aktin sarkomer v postavení připomínající obdélníky (viz kapitolu 5.4). Srdce zůstalo v kontrakci pravděpodobně po nedůkladné perfuzi relaxačním roztokem.

7. ZÁVĚR

Mírný model adaptace na chlad prezentovaný v této práci se jeví jako dostačující pro studium ischemicko-reperfuzního poškození srdce u potkanů adaptovaných na chlad. Potkani měli vyvinutou BAT i po dvou týdnech teplotní regrese, což znamená přetrvání účinků adaptace, které jsme předpokládali. Ischemicko-reperfuzní poškození navozené u kontrolní a experimentální skupiny zvířat 30 minutovou globální ischemií bez průtoku následovanou 30 minutami reperfuze výrazně pokleslo u experimentální skupiny zvířat. Tento experiment bychom rádi nyní zopakovali na modelu srdce *in vivo*, abychom se přiblížili co nejvíce reálnému fyziologickému stavu. Molekulární podstata protekce vyvolané mírným chladem není známa a čeká na postupné objasnění standardizovanými experimenty. Možnými faktory ovlivňující toleranci srdce k ischemii by mohly být adrenergní signalizace, tyroidní hormony, jejich společný účinek přes UCP, apod.

Správná a co nejrychlejší fixace srdce je základem pro kvalitní obraz a studium molekulárně-morfologických jevů myokardu. To je zajištěno rychlým a přesným pověšením srdce na perfuzní soustavu (modifikovaný Langendorff), dále krátkou, ale účinnou relaxací a co nejrychleji započatou perfuzní fixací. Vypracovali jsme dobrý protokol pro fixaci a dostatek praxe mi umožnil dosáhnout co nejlepších výsledků.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

* Sekundární citace jsou označeny hvězdičkou

Arnold, J., and Richard, D. (1987). Exercise during intermittent cold exposure prevents acclimation to cold rats. *J. Physiol.* 390, 45–54.

Arnostova, P., Jedelsky, P.L., Soukup, T., and Zurmanova, J. (2011). Electrophoretic Mobility of Cardiac Myosin Heavy Chain Isoforms Revisited: Application of MALDI TOF/TOF Analysis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011.

Asemu, G., Neckár, J., Szárszoi, O., Papousek, F., Ostádal, B., and Kolar, F. (2000). Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 49, 597–606.

Astrup, A., Simonsen, L., Bülow, J., Madsen, J., and Christensen, N.J. (1989). Epinephrine mediates facultative thermogenesis in human skeletal muscle. *ResearchGate* 257, E340-5.

Babai, L., Szigeti, Z., Parratt, J.R., and Végh, A. (2002). Delayed cardioprotective effects of exercise in dogs are aminoguanidine sensitive: possible involvement of nitric oxide. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 102, 435–445.

Baker, J.E., Holman, P., Kalyanaraman, B., Griffith, O.W., and Pritchard, K.A. (1999). Adaptation to Chronic Hypoxia Confers Tolerance to Subsequent Myocardial Ischemia by Increased Nitric Oxide Production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 874, 236–253.

Bartness, T., Vaughan, C., and Song, C. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int. J. Obes.* 2005 34, S36–S42.

Bell, R.M., Mocanu, M.M., and Yellon, D.M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 940–950.

Bittel, J. (1992). The different types of general cold adaptation in man. *Int. J. Sports Med.* 13 Suppl 1, S172-176.

Borges, J.P., and Lessa, M.A. (2015). Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. *Arq. Bras. Cardiol.* 105, 71–81.

Bramham, C.R., Southard, T., Ahlers, S.T., and Sarvey, J.M. (1998). Acute cold stress leading to elevated corticosterone neither enhances synaptic efficacy nor impairs LTP in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res.* 789, 245–255.

Brenner, I.K.M., Castellani, J.W., Gabaree, C., Young, A.J., Zamecnik, J., Shephard, R.J., and Shek, P.N. (1999). Immune changes in humans during cold exposure: effects of prior heating and exercise. *J. Appl. Physiol.* 87, 699–710.

Buroker, N.E., Young, M.E., Wei, C., Serikawa, K., Ge, M., Ning, X.-H., and Portman, M.A. (2007). The dominant negative thyroid hormone receptor beta-mutant

{Delta}337T alters PPAR{alpha} signaling in heart. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E453-460.

Cai, Z., Manalo, D.J., Wei, G., Rodriguez, E.R., Fox-Talbot, K., Lu, H., Zweier, J.L., and Semenza, G.L. (2003). Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108, 79–85.

Cai, Z., Luo, W., Zhan, H., and Semenza, G.L. (2013). Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17462–17467.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.

Cheung, C.X., Healy, D.A., and Walsh, S.R. (2016). Remote preconditioning and cardiac surgery: regrouping after Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery (RIPHeart) and Effect of Remote Ischemic Preconditioning on Clinical Outcomes in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery (ERICCA). *J. Thorac. Dis.* 8, E197-199.

Chou, C.-C., Wen, M.-S., Lee, H.-L., Chang, P.-C., Wo, H.-T., Yeh, S.-J., and Wu, D. (2014). Dantrolene suppresses ventricular ectopy and arrhythmogenicity with acute myocardial infarction in a langendorff-perfused pacing-induced heart failure rabbit model. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 25, 431–439.

Clements-Jewery, H., Hearse, D.J., and Curtis, M.J. (2002). The isolated blood-perfused rat heart: an inappropriate model for the study of ischaemia- and infarction-related ventricular fibrillation. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1089–1099.

Currie, R.W., Karmazyn, M., Kloc, M., and Mailer, K. (1988). Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ. Res.* 63, 543–549.

Curtis, M.J., Macleod, B.A., Tabrizchi, R., and Walker, M.J.A. (1986). An improved perfusion apparatus for small animal hearts. *J. Pharmacol. Methods* 15, 87–94.

De Lorenzo, F., Mukherjee, M., Kadziola, Z., Sherwood, R., and Kakkar, V.V. (1998). Central cooling effects in patients with hypercholesterolaemia. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 95, 213–217.

Dickson, E.W., Lorbar, M., Porcaro, W.A., Fenton, R.A., Reinhardt, C.P., Gysembergh, A., and Przyklenk, K. (1999). Rabbit heart can be “preconditioned” via transfer of coronary effluent. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 277, H2451–H2457.

Dickson, E.W., Hogrefe, C.P., Ludwig, P.S., Ackermann, L.W., Stoll, L.L., and Denning, G.M. (2008). Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 294, H402–H408.

- Dronjak, S., Gavrilović, L., Filipović, D., and Radojčić, M.B. (2004). Immobilization and cold stress affect sympatho–adrenomedullary system and pituitary–adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiol. Behav.* *81*, 409–415.
- Farah, C., Kleindienst, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayrard, S., Geny, B., Obert, P., Cazorla, O., Tanguy, S., and Reboul, C. (2013). Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res. Cardiol.* *108*, 389.
- Ferrera, R., Benhabbouche, S., Bopassa, J.C., Li, B., and Ovize, M. (2009). One Hour Reperfusion is Enough to Assess Function and Infarct Size With TTC Staining in Langendorff Rat Model. *Cardiovasc. Drugs Ther.* *23*, 327–331.
- Fitzgerald, G.A., Robertson, D., and Wood, A.J. (1981). Beta-adrenoreceptor down-regulation by dynamic exercise and upright posture in man. *Trans. Assoc. Am. Physicians* *94*, 310–313.
- Frasier, C.R., Moukdar, F., Patel, H.D., Sloan, R.C., Stewart, L.M., Alleman, R.J., Favor, J.D.L., and Brown, D.A. (2013). Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovasc. Res.* *98*, 47–55.
- Fregly, M.J. (1982). Thermogenic drinking: mediation by osmoreceptor and angiotensin II pathways. *Fed. Proc.* *41*, 2515–2519.
- Freisleben, H.-J. (2000). Lipoic acid reduces ischemia-reperfusion injury in animal models. *Toxicology* *148*, 159–171.
- Frosini, M., Larini, A., Ricci, L., Lucas, L., Gorelli, B., Sgaragli, G., Tanganelli, P., and Valoti, M. (2012). Effects of Autologous, Cross-Linked Erythrocytes on Isolated Hypoperfused Rabbit Heart Dynamics. *Pharmacology* *90*, 274–280.
- Galagudza, M., Kurapeev, D., Minasian, S., Valen, G., and Vaage, J. (2004). Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* *25*, 1006–1010.
- Golbidi, S., and Laher, I. (2011). Molecular Mechanisms in Exercise-Induced Cardioprotection. *Cardiol. Res. Pract.* *2011*.
- Gumina, R.J., Pucar, D., Bast, P., Hodgson, D.M., Kurtz, C.E., Dzeja, P.P., Miki, T., Seino, S., and Terzic, A. (2003). Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *284*, H2106–H2113.
- Günaydin, B., Cakici, I., Soncul, H., Kalaycioglu, S., Cevik, C., Sancak, B., Kanzik, I., and Karadenizli, Y. (2000). Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol. Res.* *41*, 493–496.
- Halkos, M.E., Kerendi, F., Corvera, J.S., Wang, N.-P., Kin, H., Payne, C.S., Sun, H.-Y., Guyton, R.A., Vinten-Johansen, J., and Zhao, Z.-Q. (2004). Myocardial protection with

postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann. Thorac. Surg.* 78, 961–969.

Harris, M.B., and Starnes, J.W. (2001). Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 280, H2271–H2280.

Harvey, C.B., and Williams, G.R. (2002). Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 12, 441–446.

Hermanussen, M., Jensen, F., Hirsch, N., Friedel, K., Kröger, B., Lang, R., Just, S., Ulmer, J., Schaff, M., and Ahnert, P. (1995). Acute and chronic effects of winter swimming on LH, FSH, prolactin, growth hormone, TSH, cortisol, serum glucose and insulin. *Arctic Med. Res.* 54, 45–51.

Herpin, P., Berthon, D., Bertin, R., De Marco, F., Dauncey, M., and Le Dividich, J. (1995). Cold-induced changes in circulating levels of catecholamines and thyroid hormones are modulated by energy intake in newborn pigs. *Exp. Physiol.* 80, 877–880.

Hershman, J.M., Read, D.G., Bailey, A.L., Norman, V.D., and Gibson, T.B. (1970). Effect of cold exposure on serum thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 430–434.

Huang, Y.-H., Tsai, M.-M., and Lin, K.-H. (2008). Thyroid hormone dependent regulation of target genes and their physiological significance. *Chang Gung Med. J.* 31, 325–334.

Hurtado, A., Escudero, E., Pando, J., Sharma, S., and Johnson, R.J. (2012). Cardiovascular and renal effects of chronic exposure to high altitude. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, iv11-iv16.

Huttunen, P., Rintamäki, H., and Hirvonen, J. (2001). Effect of regular winter swimming on the activity of the sympathoadrenal system before and after a single cold water immersion. *Int. J. Circumpolar Health* 60, 400–406.

Jacobsson, A., Stadler, U., Glotzer, M.A., and Kozak, L.P. (1985). Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. *J. Biol. Chem.* 260, 16250–16254.

Janský, L., Janáková, H., Ulicný, B., Srámek, P., Hosek, V., Heller, J., and Parížková, J. (1996). Changes in thermal homeostasis in humans due to repeated cold water immersions. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 432, 368–372.

Janský, L., Matousková, E., Vávra, V., Vybíral, S., Janský, P., Jandová, D., Knížková, I., and Kunc, P. (2006). Thermal, cardiac and adrenergic responses to repeated local cooling. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 55, 543–549.

Janský, L., Vybíral, S., Trubačová, M., and Okrouhlík, J. (2007). Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 104, 131–135.

- Karmazyn, M., Mailer, K., and Currie, R.W. (1990). Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischemic ventricular recovery. *Am. J. Physiol.* 259, H424-431.
- Kharbanda, R.K., Mortensen, U.M., White, P.A., Kristiansen, S.B., Schmidt, M.R., Hoschtitzky, J.A., Vogel, M., Sorensen, K., Redington, A.N., and MacAllister, R. (2002). Transient Limb Ischemia Induces Remote Ischemic Preconditioning In Vivo. *Circulation* 106, 2881–2883.
- Klein, H.H., Puschmann, S., Schaper, J., and Schaper, W. (1981). The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch. A* 393, 287–297.
- Kloner, R.A., and Yellon, D. (1994). Does ischemic preconditioning occur in patients? *J. Am. Coll. Cardiol.* 24, 1133–1142.
- Kohlhauer, M., Lidouren, F., Remy-Jouet, I., Mongardon, N., Adam, C., Bruneval, P., Hocini, H., Levy, Y., Blengio, F., Carli, P., et al. (2015). Hypothermic Total Liquid Ventilation Is Highly Protective Through Cerebral Hemodynamic Preservation and Sepsis-Like Mitigation After Asphyxial Cardiac Arrest. *Crit. Care Med.* 43, e420-430.
- Kolář, F., Neckár, J., and Ostádal, B. (2005). MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 54, 467–471.
- Kolář, F., Ježková, J., Balková, P., Břeh, J., Neckár, J., Novák, F., Nováková, O., Tomášová, H., Srbová, M., Ošťádal, B., et al. (2007). Role of oxidative stress in PKC- δ upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 292, H224–H230.
- Krauss, S., Zhang, C.-Y., and Lowell, B.B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 248–261.
- Langendorff, O. (1897). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Arch. Für Gesamte Physiol. Menschen Tiere* 66, 355–400.
- Lennon, S.L., Quindry, J., Hamilton, K.L., French, J., Staib, J., Mehta, J.L., and Powers, S.K. (2004a). Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J. Appl. Physiol.* 96, 1299–1305.
- Lennon, S.L., Quindry, J.C., Hamilton, K.L., French, J.P., Hughes, J., Mehta, J.L., and Powers, S.K. (2004b). Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 287, H975–H980.
- Leppäluoto, J., Korhonen, I., Huttunen, P., and Hassi, J. (1988). Serum levels of thyroid and adrenal hormones, testosterone, TSH, LH, GH and prolactin in men after a 2-h stay in a cold room. *Acta Physiol. Scand.* 132, 543–548.
- Leppäluoto, J., Pääkkönen, T., Korhonen, I., and Hassi, J. (2005). Pituitary and autonomic responses to cold exposures in man. *Acta Physiol. Scand.* 184, 255–264.

- Lesná, I., Vybíral, S., Janský, L., and Zeman, V. (1999). Human nonshivering thermogenesis. *J. Therm. Biol.* *24*, 63–69.
- Levine, M., Duffy, L., Moore, D.C., and Matej, L.A. (1995). Acclimation of a non-indigenous sub-Arctic population: seasonal variation in thyroid function in interior Alaska. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* *111*, 209–214.
- Li, S., Wu, J., Watanabe, M., Li, C., and Okada, T. (2006). Protective effects of ischemic postconditioning against hypoxia-reoxygenation injury and hydrogen peroxide-induced damage in isolated rat hearts. *Exp. Clin. Cardiol.* *11*, 280–285.
- Li, Y., Cai, M., Cao, L., Qin, X., Zheng, T., Xu, X., Sandvick, T.M., Hutchinson, K., Wold, L.E., Hu, K., et al. (2014). Endurance Exercise Accelerates Myocardial Tissue Oxygenation Recovery and Reduces Ischemia Reperfusion Injury in Mice. *PLoS ONE* *9*.
- Li, Y.-H., Li, Y.-Y., Fan, G.-W., Yu, J.-H., Duan, Z.-Z., Wang, L.-Y., and Yu, B. (2016). Cardioprotection of ginsenoside Rb1 against ischemia/reperfusion injury is associated with mitochondrial permeability transition pore opening inhibition. *Chin. J. Integr. Med.*
- Lidell, M.E., and Enerbäck, S. (2010). Brown adipose tissue--a new role in humans? *Nat. Rev. Endocrinol.* *6*, 319–325.
- Little, A.G., and Seebacher, F. (2014). Thyroid hormone regulates cardiac performance during cold acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Biol.* *217*, 718–725.
- Lubkowska, A., Dołęgowska, B., Szyguła, Z., Bryczkowska, I., Stańczyk-Dunaj, M., Sałata, D., and Budkowska, M. (2013). Winter-swimming as a building-up body resistance factor inducing adaptive changes in the oxidant/antioxidant status. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *73*, 315–325.
- Macari, M., Dauncey, M.J., Ramsden, D.B., and Ingram, D.L. (1983). Thyroid hormone metabolism after acclimatization to warm or cold temperature under conditions of high or low energy intake. *Q. J. Exp. Physiol. Camb. Engl.* *68*, 709–718.
- MacDougall, J.D., Tuxen, D., Sale, D.G., Moroz, J.R., and Sutton, J.R. (1985). Arterial blood pressure response to heavy resistance exercise. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *58*, 785–790.
- Mallet, R.T., Ryou, M.-G., Williams, A.G., Howard, L., and Downey, H.F. (2006). β 1-Adrenergic receptor antagonism abrogates cardioprotective effects of intermittent hypoxia. *Basic Res. Cardiol.* *101*, 436–446.
- Manukyan, M.C., Keck, A.C., Poynter, J.A., Wang, Y., Weil, B.R., Abarbanell, A.M., Herrmann, J.L., Crowe, B.J., Alvernaz, C., and Meldrum, D.R. (2011). Transforming growth factor-alpha does not protect myocardium during acute ischemia/reperfusion. *Surgery* *150*, 339–346.

- Marvanová, A. (2015). Gene expression of selected genes in heart of long-term cold acclimated rat under mild conditions. Master thesis. Univerzita Karlova v Praze.
- McElroy, C.L., Gissen, S.A., and Fishbein, M.C. (1978). Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation* 57, 958–962.
- Meerson, F.Z., Gomzakov, O.A., and Shimkovich, M.V. (1973). Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am. J. Cardiol.* 31, 30–34.
- Milano, G., Corno, A.F., Lippa, S., Von Segesser, L.K., and Samaja, M. (2002). Chronic and intermittent hypoxia induce different degrees of myocardial tolerance to hypoxia-induced dysfunction. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 227, 389–397.
- Murray, A.J., Cole, M.A., Lygate, C.A., Carr, C.A., Stuckey, D.J., Little, S.E., Neubauer, S., and Clarke, K. (2008). Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 694–700.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136.
- 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.* 113, 791–798.
- Neckář, J., Papoušek, F., Nováková, O., Ost'ádal, B., and Kolár, F. (2002a). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res. Cardiol.* 97, 161–167.
- Neckář, J., Szárszoi, O., Kóten, L., Papoušek, F., Ost'ádal, B., Grover, G.J., and Kolář, F. (2002b). Effects of mitochondrial KATP modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc. Res.* 55, 567–575.
- Neckář, J., Marková, I., Novák, F., Nováková, O., Szárszoi, O., Ost'ádal, B., and Kolář, F. (2005). Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- δ in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 288, H1566–H1572.
- Neckář, J., Borchert, G.H., Hlousková, P., Mícová, P., Nováková, O., Novák, F., Hroch, M., Papoušek, 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, 6880–6889.
- Nicholson, C.K., Lambert, J.P., Chow, C.-W., Lefer, D.J., and Calvert, J.W. (2013). Chronic Exercise Downregulates Myocardial Myoglobin and Attenuates Nitrite Reductase Capacity During Ischemia-Reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 0, 1–10.

- Nikolic, T.R., Zivkovic, V.I., Srejovic, I.M., Radovanovic, D.S., Jeremic, N.S., Jevdjevic, M.D., Djuric, D.M., and Jakovljevic, V.L. (2016). Acute effects of nandrolone decanoate on cardiodynamic parameters in isolated rat heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1–10.
- Ong, S.-G., and Hausenloy, D.J. (2012). Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection. *Pharmacol. Ther.* 136, 69–81.
- O'Reilly, I., and Murphy, M.P. (1992). Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 127, 542–546.
- Ostadal, B. (2009). The past, the present and the future of experimental research on myocardial ischemia and protection. *Pharmacol. Rep.* PR 61, 3–12.
- *Ostadal, B., Kvetnansky, R., Prochazka, J., Pelouch, V., 1984a. Effect of intermittenthigh altitude stress on epinephrine and norepinephrine levels in theright and left ventricular myocardium of rats. In: Usdin, E., Kvetnansky, R.,Kopin, I.J. (Eds.), *The Role of Catecholamines and Other NeurotransmittersUnder Stress*. Gordon and Breach, New York, pp. 669–674.
- Ostadal, B., Ostadalova, I., Kolar, F., Pelouch, V., and Dhalla, N.S. (1998). Cardiac Adaptation to Chronic Hypoxia. In *Advances in Organ Biology*, (Elsevier), pp. 43–60.
- Ostadalova, I., Ostadal, B., Kolár, F., Parratt, J.R., and Wilson, S. (1998). Tolerance to ischaemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 857–865.
- Oxman, T., Arad, M., Klein, R., Avazov, N., and Rabinowitz, B. (1997). Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 273, H1707–H1712.
- Ozcan, C., Palmeri, M., Horvath, T.L., Russell, K.S., and Russell, R.R. (2013). Role of uncoupling protein 3 in ischemia-reperfusion injury, arrhythmias, and preconditioning. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 304, H1192–H1200.
- Pantos, C., Mourouzis, I., and Cokkinos, D.V. (2012). Thyroid hormone and cardiac repair/regeneration: from Prometheus myth to reality? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 977–987.
- Park, J., Kim, Y.A., Han, J.Y., Jin, S., Ok, S.-H., Sohn, J.-T., Lee, H.-K., Chung, Y.-K., and Shin, I.-W. (2016). Lipofundin® MCT/LCT 20% increase left ventricular systolic pressure in an ex vivo rat heart model via increase of intracellular calcium level. *Korean J. Anesthesiol.* 69, 57–62.
- Pasini, E., Solfrini, R., Bachetti, T., Marino, M., Bernocchi, P., Visioli, F., and Ferrari, R. (1999). The blood perfused isolated heart: characterization of the model. *Basic Res. Cardiol.* 94, 215–222.

- Petrović, V., Buzadžić, B., Korać, A., Vasiljević, A., Janković, A., Mićunović, K., and Korać, B. (2008). Antioxidative defence alterations in skeletal muscle during prolonged acclimation to cold: role of l-arginine/NO-producing pathway. *J. Exp. Biol.* *211*, 114–120.
- Pluim, B.M., Zwinderman, A.H., Laarse, A. van der, and Wall, E.E. van der (2000). The Athlete's Heart. *Circulation* *101*, 336–344.
- Polderman, K.H. (2009). Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit. Care Med.* *37*, S186-202.
- Poupa, O., Krofta, K., Prochazka, J., and Turek, Z. (1966). Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed. Proc.* *25*, 1243–1246.
- Powers, S.K., Demirel, H.A., Vincent, H.K., Coombes, J.S., Naito, H., Hamilton, K.L., Shanely, R.A., and Jessup, J. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *275*, R1468–R1477.
- Przyklenk, K., Darling, C.E., Dickson, E.W., and Whittaker, P. (2003). Cardioprotection “outside the box”--the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res. Cardiol.* *98*, 149–157.
- Puerta, M.L., and Abelenda, M. (1987). Cold acclimation in food-restricted rats. *Comp. Biochem. Physiol. A* *87*, 31–33.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* *24*, 78–90.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* *92*, 829–839.
- Qiu, Y., and Hearse, D.J. (1992). Comparison of ischemic vulnerability and responsiveness to cardioplegic protection in crystalloid-perfused versus blood-perfused hearts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *103*, 960–968.
- Quindry, J.C., Hamilton, K.L., French, J.P., Lee, Y., Murlasits, Z., Tumer, N., and Powers, S.K. (2007). Exercise-induced HSP-72 elevation and cardioprotection against infarct and apoptosis. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *103*, 1056–1062.
- Rafiee, P., Shi, Y., Kong, X., Pritchard, K.A., Tweddell, J.S., Litwin, S.B., Mussatto, K., Jaquiss, R.D., Su, J., and Baker, J.E. (2002). Activation of Protein Kinases in Chronically Hypoxic Infant Human and Rabbit Hearts. *Circulation* *106*, 239–245.
- Ravingerová, T., Matejíková, J., Neckář, J., Anđelová, E., and Kolář, F. (2006). Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* *297*, 111–120.

- Reymann, J.M., Van den Driessche, J., Bentue-Ferrer, D., Allain, H., and Pape, D. (1984). Impairment of acquired temporal response regulation of rats under normobaric hypoxia. *Behav. Brain Res.* *11*, 233–239.
- *Saltin, B., Blomqvist, G., Mitchell, J.H., Johnson, R.L., Wildenthal, K., and Chapman, C.B. (1968). Response to exercise after bed rest and after training. *Circulation* *38*, VII1-78.
- Schwarz, E.R., Somoano, Y., Hale, S.L., and Kloner, R.A. (2000). What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat? *J. Thromb. Thrombolysis* *10*, 181–187.
- Selman, >Colin, McLaren, J.S., Himanka, M.J., and Speakman, J.R. (2000). Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free Radic. Biol. Med.* *28*, 1279–1285.
- Silva, J.E., and Larsen, P.R. (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* *305*, 712–713.
- Šimečková, M., Janský, L., Lesná, I., Vybíral, S., and Šrámek, P. (2000). Role of beta adrenoceptors in metabolic and cardiovascular responses of cold exposed humans. *J. Therm. Biol.* *25*, 437–442.
- Solter, M., and Misjak, M. (1989). Pituitary-gonadal response to extreme cold exposure in healthy men. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* *21*, 343–344.
- Soukup, T., Zacharová, G., Smerdu, V., and Jirmanová, I. (2001). Body, heart, thyroid gland and skeletal muscle weight changes in rats with altered thyroid status. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* *50*, 619–626.
- Stancic, A., Buzadzic, B., Korac, A., Otasevic, V., Jankovic, A., Vucetic, M., Markelic, M., Velickovic, K., Golic, I., and Korac, B. (2013). Regulatory role of PGC-1 α /PPAR signaling in skeletal muscle metabolic recruitment during cold acclimation. *J. Exp. Biol.* *216*, 4233–4241.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiol. Rev.* *85*, 1093–1129.
- Sun, Z., Cade, J.R., Fregly, M.J., and Rowland, N.E. (1997). Effect of chronic treatment with propranolol on the cardiovascular responses to chronic cold exposure. *Physiol. Behav.* *62*, 379–384.
- Sutherland, F.J., and Hearse, D.J. (2000). The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol. Res.* *41*, 613–627.
- Sutherland, F.J., Shattock, M.J., Baker, K.E., and Hearse, D.J. (2003). Mouse isolated perfused heart: Characteristics and cautions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *30*, 867–878.

- Takaoka, A., Nakae, I., Mitsunami, K., Yabe, T., Morikawa, S., Inubushi, T., and Kinoshita, M. (1999). Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning." *J. Am. Coll. Cardiol.* 33, 556–564.
- Taylor, R.P., Harris, M.B., and Starnes, J.W. (1999). Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 276, H1098–H1102.
- Teng, X., Yuan, X., Tang, Y., and Shi, J. (2015). Protective effects of remote ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 12575–12583.
- Tokuno, S., Hinokiyama, K., Tokuno, K., Löwbeer, C., Hansson, L.-O., and Valen, G. (2002). Spontaneous Ischemic Events in the Brain and Heart Adapt the Hearts of Severely Atherosclerotic Mice to Ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 995–1001.
- Ustunel, I., Acar, N., Gemici, B., Ozbey, O., Edizer, I., Soyulu, H., Tepekoy, F., and Izgut-Uysal, V.N. (2014). The effects of water immersion and restraint stress on the expressions of apelin, apelin receptor (APJR) and apoptosis rate in the rat heart. *Acta Histochem.* 116, 675–681.
- Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J.S., and Lowell, B.B. (1997). UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 79–82.
- Vybíral, S., Andrews, J.F., Bostík, J., Langer, P., and Janský, L. (1985). Thyroid hormones in rats during long-term cold exposure and hypometabolic effect of reverse triiodothyronine on adrenaline induced thermogenesis. *Endocrinol. Exp.* 19, 179–185.
- Wagner, M., Moritz, A., and Volk, T. (2011). Interaction of gonadal steroids and the glucocorticoid corticosterone in the regulation of the L-type Ca(2+) current in rat left ventricular cardiomyocytes. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 202, 629–640.
- Wei, L., Wu, R.-B., Yang, C.-M., Zheng, S.-Y., and Yu, X.-Y. (2011). Cardioprotective effect of a hemoglobin-based oxygen carrier on cold ischemia/reperfusion injury. *Cardiology* 120, 73–83.
- Weinbrenner, C., Nelles, M., Herzog, N., Sárváry, L., and Strasser, R.H. (2002). Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc. Res.* 55, 590–601.
- White, P., and Dauncey, M.J. (1999). Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *J. Mol. Endocrinol.* 23, 241–254.
- Xiao, L., Lu, R., Hu, C.-P., Deng, H.-W., and Li, Y.-J. (2001). Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 427, 131–135.

- Xing, J.-Q., Zhou, Y., Chen, J.-F., Li, S.-B., Fang, W., and Yang, J. (2014). Effect of cold adaptation on activities of relevant enzymes and antioxidant system in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 4232–4237.
- Xue, Q., Dasgupta, C., Chen, M., and Zhang, L. (2011). Foetal hypoxia increases cardiac AT2R expression and subsequent vulnerability to adult ischaemic injury. *Cardiovasc. Res.* 89, 300–308.
- Yamada, T., Kajihara, A., Onaya, T., Kobayashi, I., Takemura, Y., and Shichijo, K. (1965). Studies on acute stimulatory effect of cold on thyroid activity and its mechanism in the guinea pig. *Endocrinology* 77, 968–976.
- Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T., and Hori, M. (1999). Exercise Provides Direct Biphasic Cardioprotection via Manganese Superoxide Dismutase Activation. *J. Exp. Med.* 189, 1699–1706.
- Yen, P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81, 1097–1142.
- Yoshikawa, T., Furukawa, Y., Wakamatsu, Y., Takemura, S., Tanaka, H., and Kondo, M. (1982). Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats. *Biochem. Med.* 27, 207–213.
- Zeeuw, S. de, Lameris, T.W., Duncker, D.J., Hasan, D., Boomsma, F., Meiracker, A.H. van den, and Verdouw, P.D. (2001). Cardioprotection in Pigs by Exogenous Norepinephrine but not by Cerebral Ischemia-Induced Release of Endogenous Norepinephrine. *Stroke* 32, 767–774.

9. PŘÍLOHOVÁ ČÁST

Příloha A: Tabulka pro zapisování experimentálního protokolu

Číslo potkana:	Skupina:	Datum:
Hmotnost [g]:	Poznámky:	
Stabilizace [min]		
Ischemie [min]		
Reperfuze [min]		

Příloha B: Ilustrace týdenního zapisování hmotnosti

Č. p.	Typ ad.	[g] 14.12.2015	[g]21.12. 28.12.	[g] 28.12.	[g] 4.1.2016	[g] 11.1. 18.1.	[g] 18.1.	[g] 25.1.	[g] 4.2.2016	[g] 8.2.2016	[g] 15.2.2016	[g] 22.2.2016	
1	kontrola	259	303	326	356	378	393						
2	kontrola	246	284	310	340	357	367	387	400	403	415	424	
3	kontrola	265	300	327	350	372	387	403	406				
4	kontrola	246	280	307	338	356	367	389					
5	kontrola	263	306	335	359	384	399	412	430	433	442	458	
6	kontrola	257	284	306	330	346	356	369	382	385	390		
7	kontrola	302	347	375	409	431	445	367	374	480			
8	kontrola	268	291	318	335	349	356	368	380	382	393	403	
9	kontrola	205	235	260	338								
10	kontrola	279	309	333	357	373	385	399	416	416			
11	kontrola	259	293	316	337	357	369	386	398	396			
12	kontrola	266	295	320	341	358	375	387	409	407			
13	kontrola	291	319	338	356	366	377	390	403	408	410	424	422
14	kontrola	294	327	353	380	397	409	419	403	401	407	423	436
15	kontrola	287	317	345	371	388	405	419	429	438	448	455	458
16	kontrola	296	320	344	374	389	399	414	434	438	444	452	459
17	kontrola	285	320	345	376	388	400	426	442	445	450		
18	kontrola	287	320	332	367	379	393	406	426	426	431		
19	kontrola	285	320	337	353	371	380	393	400	403	408		
20	kontrola	270	300	324	341	357	369	386	395	401	403		
21	kontrola	308	340	366	389	414	428	448	468	469	480		
22	kontrola	281	318	338	365	380	393	409	427	431	438	449	
23	kontrola	282	315	342	363	377	393	409	424	429			
24	kontrola	261	290	312	333	344	355	371	390	395	398	414	
25	kontrola	279	313	334	360	377	392	407	421	422	425		