

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Andrea Liptáková

Úloha beta 1 adrenergických receptorů v srdci chladově adaptovaného potkana
The role of beta 1 adrenergic receptors in heart of cold acclimated rat

Diplomová práce

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

Praha, 2020

Prohlášení

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

V Praze, 1.6.2020

.....

Bc. Andrea Liptáková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména své školitelce doc. RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za její milý přístup, obětavost a trpělivost, kterou měla při vedení této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Anetě Benešové za předání zkušeností a odborné rady. Poděkování patří též RNDr. Barbaře Elsnicové, Ph.D. za cenné rady a pomoc kterou mi poskytovala při zpracování snímků. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Bc. Pavlu Vebrovi a Bc. Františku Galatíkovi za cennou pomoc při pokusech a odběrech tkání. Díky patří též celé laboratoři svalové fyziologie a bioenergetiky Přírodovědecké fakulty UK za poskytnutí příjemného pracovního prostředí v průběhu zpracování diplomové práce.

V neposlední řadě patří poděkování celé mojí milující rodině a přátelům za jejich lásku, podporu a trpělivost, kterou mi poskytovali v průběhu celého studia. Zvláštní poděkování patří i mému snoubenci Petru Žbírkovvi, který je mi vždy oporou.

Abstrakt

V průběhu chladové adaptace dochází k posunu v produkci tepla od třesové termogeneze k netřesové termogenezi, která je zprostředkována adrenergní signalizací. Bylo též pozorováno, že chladová adaptace zvyšuje odolnost organismu vůči patologickým podnětům a může ovlivnit funkční parametry kardiovaskulárního systému. Avšak akutní expozice velkému chladu je často spojována s detrimetálními účinky na organismus. Nedávno jsme ukázali, že chronická expozice chladu zvyšuje odolnost srdce k ischemicko-reperfúznímu poškození bez negativních vedlejších účinků, pokud použijeme mírné teploty, avšak mechanismus protekce není dosud znám. Cílem této práce bylo zjistit: i) zda se mění citlivost srdce k ischemii již po prvním dni chladové expozice a nevykazuje případné negativní účinky, ii) zda β 1-adrenergní signalizace hraje úlohu v kardioprotekci vyvolané chronickým chladem. Výsledky této práce ukázaly, že i) jednodenní expozice mírnému chladu nemění citlivost srdce k ischemii a ii) podání metoprololu snížilo velikost infarktu u kontrolní skupiny, avšak nemělo vliv na srdce chladově adaptovaných potkanů.

Klíčová slova: Srdce, potkan, beta 1 adrenergní receptory, chladová adaptace

Abstract

During cold acclimation the heat production is shifted from shivering to non-shivering thermogenesis, which is mediated by adrenergic signaling. It has also been observed, that cold acclimation may increase the organismal resistance to pathological stimuli and may affect functional parameters of cardiovascular system. However, acute exposure to severe cold is often associated with detrimental effects on the body. We have recently shown that chronic exposure to cold increases the heart's resistance to ischemia-reperfusion injury without negative side effects when mild temperatures are used, however the mechanism of protection is not yet known. The aim of this work was to determine whether: i) if the sensitivity of the heart to ischemia changes already after the first day of cold exposure and does not show any negative effects, ii) if β_1 -adrenergic signaling plays a role in chronic regimen of cold-induced cardioprotection. The results of this work showed that i) one day of exposure to mild cold did not change the sensitivity of the heart to ischemia and ii) metoprolol treatment reduced the infarct size in the control group, but did not affect the heart of cold-adapted rats.

Key words : Heart, rat, beta 1 adrenergic receptors, cold acclimation

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1. Úvod	11
2. Literární přehled	12
2.1. Ischemicko-Reperfúzní poškození	12
2.1.1. Mechanismus I/R poškození	12
2.1.2. Vápenaté přetížení a jeho důsledky	14
2.1.3. Oxidační stres a mPTP	17
2.2. Kardioprotektivní režimy	20
2.2.1. Preconditioning a postconditioning	20
2.2.2. Signální dráhy asociované s conditioningem	21
2.2.3. Hypoxie	23
2.2.4. Adaptace na fyzickou zátěž	25
2.3. Úloha beta adrenergických receptorů v kardioprotektivních režimech	27
3. Cíle diplomové práce	30
4. Materiál a metody	31
4.1. Použitá zvířata	31
4.1. Průběh chladové adaptace	31
4.2. Podání metoprololu	32
4.3. Metoda ischemicko-reperfúzního poškození <i>in vivo</i>	33
4.4. Barvení a fixace srdcí	34
4.4. Analýza velikosti ischemicko-reperfúzního poškození	35
4.5. Statistické vyhodnocení výsledků	36
5. Výsledky	37
5.1. Vliv jednodenního chladu na I/R poškození srdce potkana	37
5.2. Vliv metoprololu na I/R chladově adaptovaného potkana	39

5.2.1. Hmotnosti zvířat	39
5.2.2. Vliv chladové adaptace na I/R poškození.....	41
5.2.3. Vliv metoprololu na I/R poškození chladově adaptovaných potkanů	42
6. Diskuze	43
7. Závěr.....	51
Seznam použité literatury.....	53

Seznam použitých zkratk

AaR	Oblast ohrožení
AC	Adenylylcykláza
ADP	Adenosindifosfát
Akt	Proteinkináza B
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
BAT	Hnědá tuková tkáň
CAMK	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní proteinkináza
cAMP	Cyklický adenosin monofosfát
CsA	Cyklosporin A
CypD	Cyklofilin D
GKS 3	Glykogen kináza syntáza 3
GRK	Receptorová kináza spojená s G-proteiny
HIF	Hypoxií indukovaný faktor
I/R	Ischemicko-reperfúzní
IPC	Ischemický preconditioning
IS	Velikost infarktu
K _{ATP}	ATP senzitivní draselný kanál
LAD	Levá přední sestupná koronární arterie
LTCC	Napětově řízené Ca ²⁺ kanály
LV	Levá komora srdeční
mCU	Mitochondriální Ca ²⁺ uniporter
mPTP	Mitochondriální pór přechodné propustnosti

NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ antiporter
NHE	Na ⁺ /H ⁺ antiporter
NO	Oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
NRG	Neureglin
NST	Netřesová termogeneze
PBS	Fosfátový pufr
PFA	Formaldehyd
PHD	Prolylhydroxyláza
Pi	Anorganický fosfát
PI3K	Fosfoinositid 3 kináza
PKA	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
PKG	Proteinkináza G
PLB	Fosfolamban
RISK	„Reperfusion injury salvage kinases“
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RyR	Ryanodinové receptory
SAFE	„Survivor activator factor enhancement“
SERCA	Ca ²⁺ ATPáza sarkoplasmatického retikula
SOD	Superoxid-dismutáza
TNF α	Tumor nekrotizující faktor α
TTC	2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid
β AR	β adrenergní receptory

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění, mezi které patří infarkt myokardu jsou nejčastější příčinou úmrtí jak v evropském, tak ve světovém měřítku (Virani et al., 2020). Stejně tak v České Republice představují tato onemocnění nejčastější příčinu úmrtí, a i nejčastější příčinu hospitalizace (Kodl, 2014). Proto je stále žádoucí hledat nové strategie, které studují endogenní mechanismy kardioprotekce a jejich možné uplatnění v léčbě i prevenci těchto onemocnění. V současné době je známo několik kardioprotektivních intervencí, které zvyšují odolnost srdce k ischemii. Mezi ně řadíme ischemický conditioning, adaptaci na fyzickou zátěž, adaptaci na hypoxii či kalorickou restrikcii. U těchto režimů bylo experimentálně prokázáno zmenšení velikosti infarktu, a bylo popsáno mnoho signálních drah, které zvyšují odolnost srdečních buněk a prodlužují jejich přežívání. Nicméně tyto poznatky v klinických studiích zatím nebyly potvrzeny a ani žádný z těchto modelů není v současné době významně využíván v klinické praxi.

Akutní vystavení chladu bývá považováno za rizikový faktor, který je příčinou mnoha úmrtí v zimním období. Oproti tomu byly nedávno publikovány dvě práce, které ukázaly, že adaptace na chlad vyvolává zvýšenou odolnost srdce k ischemii. Vedlejší účinky chladové adaptace závisí na použité teplotě. Při nižších teplotách dochází k rozvoji hypertenze a srdeční hypertrofie. Naproti tomu model mírné chladové adaptace je zcela nový kardioprotektivní režim objevený naším pracovištěm, který prokazatelně snižuje velikost infarktu po ischemicko-reperfúzním inzultu a nebyly u něj prokázány žádné vedlejší účinky jako hypertenze a srdeční hypertrofie (Tibenská et al., 2020). Jeho možné terapeutické využití se prokáže v budoucnu. Cílem této práce je zjistit, zda krátkodobé vystavení mírnému chladu po dobu jednoho dne má vliv na velikost infarktu u potkana a dále ověřit, zda kardioprotektivní efekt chronického působení chladu je zprostředkován přes β 1-adrenergní dráhu.

2. Literární přehled

2.1. Ischemicko-Reperfúzní poškození

Zastavení průtoku v krevním řečišti, či jeho omezení o více než 50 % vyvolá rozvoj ischemie. U srdce je ischemie nejčastěji způsobena obstrukcí či zúžením koronární arterie, což vede k infarktu myokardu (Reimer et al., 1983). Během omezení dodávky kyslíku a živin dochází k řadě biochemických změn. Tyto změny a stupeň poškození se liší v závislosti na míře omezení krevního zásobení a době trvání ischemické epizody. Zpočátku se jedná o poškození reverzibilní a s obnovením krevního průtoku dojde i k úplnému obnovení srdeční funkce. Prodlužující se ischemie však vede k vážnému poškození kardiomyocytů a buněčné smrti, která patří mezi hlavní faktory vedoucí ke špatné prognóze zotavení z ischemické srdeční choroby. Proto je včasné obnovení krevního průtoku klíčový faktor pro snížení, nebo zabránění ireverzibilního poškození funkce srdce. V průběhu reperfúze paradoxně dochází ke zvětšení rozsahu poškození tkáně, proto hovoříme o ischemicko-reperfúzním (I/R) poškození.

2.1.1. Mechanismus I/R poškození

Reperfúzní poškození poprvé ukázali ve svých průkopnických pracích Jennings a kolektiv, kteří popsali srovnatelné poškození vyvolané 24 hodinovou ischemií bez reperfúze se 30minutovou ischemií následovanou reperfúzí (Jennings et al., 1960). V současné době je známo, že fáze reperfúze je velmi komplexní a dynamický proces, který může pokračovat až 3 dny po ukončení ischemie (Zhao et al., 2000). Ačkoli mechanismy, které jsou zapojeny do I/R poškození jsou velmi složité, jejich plné pochopení je klíčové pro rozvoj nových terapeutických přístupů. Tyto přístupy snižují rozsah I/R poškození a současně i prodlužují dobu po kterou může být tkáň vystavena ischemii, než dojde k ireverzibilnímu poškození.

Srdeční sval je vysoce oxidativní tkáň s významnou metabolickou aktivitou, a proto je tak velmi citlivý na poškození způsobené nedostatečným krevním zásobením. V průběhu ischemie dochází k rychlému snížení hladin kyslíku, který tak není k dispozici pro funkci mitochondriálního respiračního řetězce a dochází k zastavení oxidativní fosforylace

(Lesnefsky et al., 1997). To má za následek snižování poměru ATP/ADP a kompenzační nárůst anaerobní glykolýzy pro jako donoru ATP. Přechod mezi aerobním a anaerobním metabolismem je detekovatelný zvýšením redukovaných koenzymů jako je NADH, ale i elektrokardiografickými změnami a poklesem kontraktility kardiomyocytů (Harden et al., 1979). Anaerobní metabolismus produkuje výrazně nižší množství ATP na jeden mol glukózy než oxidativní fosforylace, což rozhodně není dostatečné pro naplnění požadavků aerobních tkání. Jennings a kolektiv popsali, že po 40 minutové ischemii u psa dochází k 90 % poklesu hladiny ATP (Jennings et al., 1978) a obdobných výsledků bylo dosaženo i u laboratorního potkana (Neely et al., 1973). Zvýšeným anaerobním metabolismem v oblasti zasažené ischemií navíc dochází ke kumulaci kyseliny mléčné ve tkáni, která nemůže být metabolizována ani odváděna krevním řečištěm. Z experimentálních modelů je patrné, že k tvorbě laktátu dochází již během prvních 15-30 sekund po zahájení ischemie (Braasch et al., 1968), což prohlubuje zvýšení produkce protonů a tím podpoří intracelulární acidózu. Samotná hydrolýza ATP vede k vzestupu hladiny anorganického fosfátu (Pi), volného ADP a též ke snižování intracelulárního pH. To má mnoho důsledků na úrovni poklesu aktivity ATPáz, což vede k poklesu aktivity iontových pump jako jsou Na/K/ATPáza a Ca²⁺ATPáza plasmatické membrány, nebo Ca²⁺ATPáza sarkoplasmatického retikula (SERCA), což vede k akumulaci Ca²⁺ v cytosolu (Nayler et al., 1981).

Regenerace ADP na ATP je možná pomocí reverzibilní adenylátkinázové reakce, při které vzniká AMP. Vzniklé AMP je důležitou signální molekulou v regulaci buněčné energetické homeostázy. Zvyšující se poměr AMP/ATP aktivuje AMP závislou protein kinázu jako hlavní senzor energetického stavu buňky, které se účastní kompenzačních mechanismů pro zvýšení dodávky energie a snížení její spotřeby pomocí AMP aktivované AMP kinázy (Wang et al., 2003). AMP po reakci s 5' nukleotidázou uvolňuje adenosin, který může opouštět buňku a přispívat tak k postupnému vyčerpání intracelulárních zásob adeninového nukleotidu (Sala-Newby et al., 2000). Na druhé straně, adenosin zprostředkovává důležité signalizace pomocí purinergních receptorů a může tak být považován za metabolický signál uvolňovaný z buněk v reakci na nerovnováhu v poptávce a dodání kyslíku (Kroll et al., 1993). Adenosin se v kardiovaskulárním váže na 4 subtypy adenosinových receptorů A₁, A_{2A}, A_{2B} a A_{3A} (Mustafa et al., 2009), jejichž signalizace je spřažena s heterotriméřními G-proteiny. Jednotlivé subtypy těchto receptorů mohou tvořit heterodimery s jinými receptory jako například s glutamátovým mGLUT5 receptorem (Ferré et al., 2002), nebo též interagovat mezi sebou navzájem. V srdci byla popsána interakce mezi

adenosinovými receptory A_1 , A_{2A} a A_{2B} účastníci se kardioprotekce (Urmaliya et al., 2009). Kardioprotektivní signalizaci též vykazují adenosinové receptory ve spojení s opioidními receptory, které snižují buněčné poškození během I/R (Peart et al., 2003). Poměry ATP/ADP a ATP/AMP tak hrají ústřední roli v zachování energetické homeostázy a zachování viability kardiomyocytů (Montgomery et al., 1991).

Důležitým mechanismem udržení pH homeostázy je aktivace cytoplasmatického Na^+/H^+ výměníku (NHE), který čerpá protony z buňky výměnou za sodné ionty (Avkiran et al., 2002). To přispívá ke zvýšené akumulaci sodných iontů v cytoplasmě a zároveň vede k reverznímu čerpání Ca^{2+} iontů do buňky pomocí sarkolemálního Na^+/Ca^{2+} antiporteru (NCX) (Griffiths et al., 1998), což vyústí ve vápenaté přetížení. Tento mechanismus může přispívat k vápenatému přetížení v ischemické fázi I/R poškození.

V reperfúzi dochází ke znovuoobnovení krevního průtoku a s ním i hladin kyslíku a substrátů do ischemické oblasti, spolu s vymytím nahromaděných metabolitů způsobujících lokální acidózu (Moon et al., 2019). Normalizace pH deinhibuje aktivaci calpainů, což jsou cysteinové proteázy, které degradují cytoskeletální struktury. K jejich aktivaci dochází již během ischemie zvýšenou hladinou Ca^{2+} , avšak nízké pH je udržuje neaktivní (Hernando et al., 2010). Obdobně je popsán vliv nízkého pH na inhibici otevírání mitochondriálních pórů (mPTP), kdy snížení pH již na hodnoty 6,2 inhibuje otevírání tohoto póru (Halestrap et al., 1991). Zvýšením pH na fyziologickou úroveň v reperfúzi tak zvyšuje pravděpodobnost jejich otevření a s ním i pravděpodobnost apoptózy buněk.

2.1.2. Vápenaté přetížení a jeho důsledky

Funkce srdce je zajištěna koordinovanými kontrakcemi syncytia kardiomyocytů, kde je excitace převáděna na kontraktální sílu v reakci na elektrický podnět. Během excitace kardiomyocytů dochází ke vtoku malého množství Ca^{2+} do cytoplasmy prostřednictvím napěťově řízených Ca^{2+} kanálů L2-typu (LTCC), které spouští uvolnění většího množství Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula pomocí ryanodinových receptorů (RyR) v procesu známém jako „calcium induced calcium release“ (Bers et al., 2002). Po uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula dochází k jeho vazbě na troponin C, což umožňuje interakci aktinu a myosinu a zkrácení sarkomer. Během relaxace dochází k opětovnému vychytávání vápenatých iontů pomocí SERCA, v srdci se jedná o isoformu SERCA2A, která je

regulována fosfolambanem (PLB) (Tada et al., 1998). PLB je integrální membránový protein sarkoplasmatického retikula, jehož cytoplasmatická doména obsahuje dvě fosforylační místa (Ser16 a Thr17) (Fujii et al., 1989). V klidových podmínkách PLB funkčně interaguje se SERCA, čímž snižuje její afinitu k Ca^{2+} . Tato inhibice může být zrušena zvýšenými cytosolickými hladinami Ca^{2+} , nebo v podmínkách stimulace adrenergní signalizace skrz fosforylaci PLB na Ser16 zbytky pomocí protein kinázy A (PKA) (MacLennan et al., 2003), což vede k urychlení fáze relaxace (Brittsan et al., 2003).

Jak již bylo zmíněno, v procesu I/R poškození dochází ke snížení poměru ATP/ADP, což snižuje aktivitu energeticky závislé Na/K/ATPázy a narušuje iontovou homeostázu kardiomyocytů. To přispívá k vápenatému přetížení reverzní aktivací NCX (zejména isoformy NCX1) vedoucí ke zvýšenému toku Ca^{2+} do myocytů. Výměna iontů pomocí NCX je pasivním mechanismem řízeným koncentračním gradientem Na^+ , avšak fosforylace pomocí PKA vede ke zvýšené aktivitě tohoto proteinu (Perchenet et al., 2000). Hyperfosforylace NCX pomocí PKA byla též pozorována v kardiomyocytech selhávajícího srdce (Wei et al., 2003). Podání inhibitoru NCX snižuje velikost infarktu snížením pravděpodobnosti aktivace apoptózy v období reperfúze na základě snížení cytosolického a mitochondriálního Ca^{2+} přetížení (Lv et al., 2013). Toto přetížení je dále podporováno nedostatečnou hladinou ATP, která znemožňuje funkci SERCA. Reaktivace metabolismu v období reperfúze je spojena se zvýšenou aktivitou SERCA, což vede ke zvýšenému obratu Ca^{2+} , které je usnadněno těsnou blízkostí s T-tubuly a mitochondriemi (Orchard et al., 2007). Následkem toho dochází k oscilacím hladin Ca^{2+} vyvolávající hyperkontrakci kardiomyocytů, která může vyústit až v jejich nekrózu (Abdallah et al., 2011).

Calpain a jeho funkce

Zvýšené intracelulární koncentrace Ca^{2+} dále aktivují řadu enzymů jako jsou Ca^{2+} /kalmmodulin dependentní proteinové kinázy (CaMK) nebo calpains, které přispívají buněčné smrti a dysfunkci srdce po I/R. CaMK fosforylují proteiny zapojené do intracelulární manipulace s vápníkem a bylo prokázáno, že CAMKII v období reperfúze přispívá k arytmogenezi prostřednictvím zvýšené fosforylace RyR, PLB a LTCC (Said et al., 2011). Calpains, které jsou v srdci zastoupeny isoformami μ a m (Sandmann et al., 2001) se nacházejí intracelulárně v blízkosti jejich endogenních inhibitorů, calpastatinů poblíž Z- disku (Barnoy et al., 1999). Calpastatin se skládá ze čtyř inhibičních podjednotek z nichž každá podjednotka inhibuje jednu molekulu calpainu blokováním interakce mezi katalytickým místem a substrátem (Betts et al., 2003), avšak během reperfúze dochází k jeho

degradaci v proteasomu. Proteasomy se též podílí na degradaci RyR2 během I/R poškození spolu s calpainy (Pedrozo et al., 2010). Kromě destabilizace cytoskeletu aktivovaným calpainem během I/R dochází také k aktivaci Bid (proapoptotického člena rodiny Bcl2) závislé na calpainu a tím indukci mitochondriálního poškození (Chen et al., 2002). To prokazuje zásadní význam calpainů během I/R poškození, díky kterému calpains v současnosti získávají mnoho pozornosti ze stran výzkumných týmů při snahách o využití inhibice těchto enzymů a tím i zmenšení I/R poškození.

Inflamasomy

Dalším patologickým procesem, který je spojen s vápenatým přetížením je tvorba komplexů pyrofosfátu vápenatého a tvorba kyseliny močové. Tyto látky představují nebezpečné signály aktivující inflamasomy, které se podílejí na zvýšené tvorbě cytokinu TNF α (tumor nekrotizující faktor α), který aktivuje transkripční faktor NF- κ B, nebo aktivační protein 1. NF- κ B se po aktivaci translokuje do jádra, kde reguluje transkripci svých cílových genů včetně prozánětlivých cytokinů (Condorelli et al., 2002). Prozánětlivý TNF α též narušením homeostázy Ca²⁺ podporují arytmogenezi a snížení kontraktility myocytů (Duncan et al., 2010). Nové práce popisují i uvolňování Ca²⁺ vyvolené akutním podáním TNF α vedoucí k arytmiím cestou produkce reaktivních forem kyslíku (ROS- Reactive Oxygen Species) v kardiomyocytech (Zuo et al., 2018).

Významnou úlohu ve vápenatém přetížení a aktivaci apoptózy hrají mitochondrie, a proto jsou častým cílem základního i klinického výzkumu (Lemasters et al., 2010).

2.1.3. Oxidační stres a mPTP

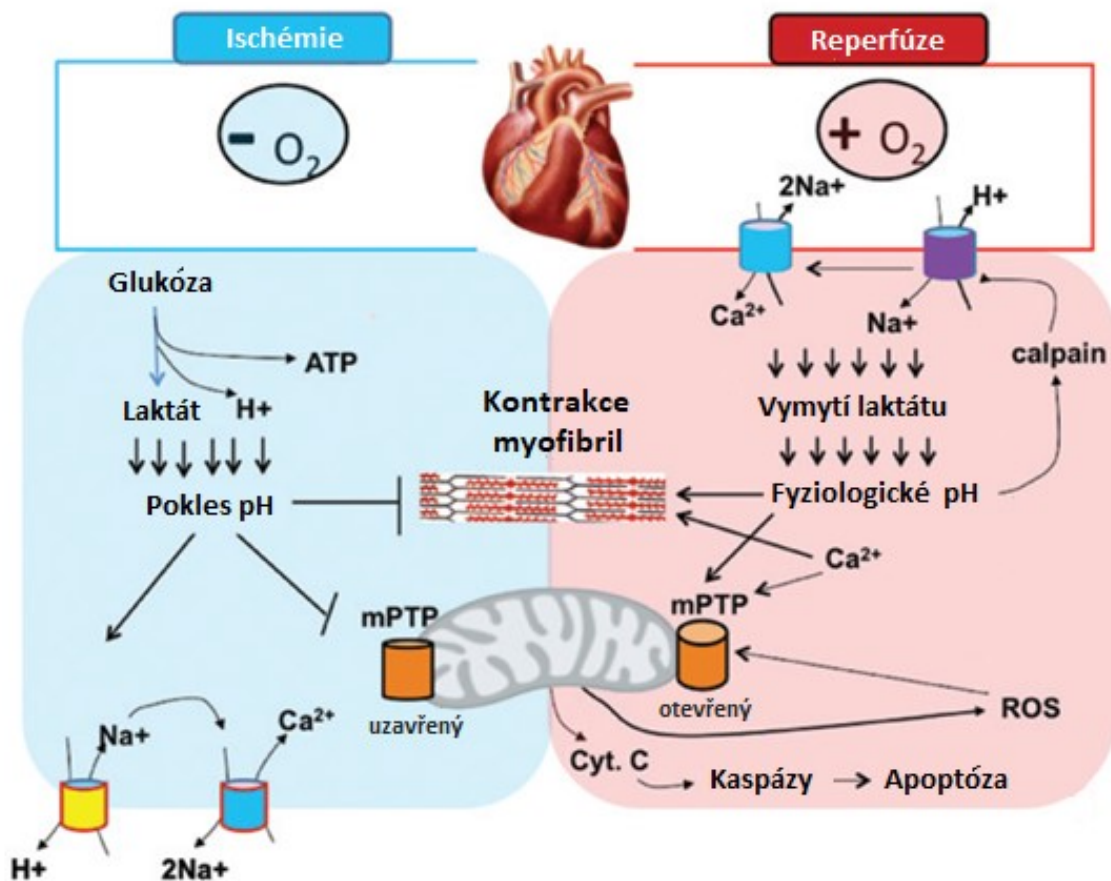
Mezi kompenzační mechanismy vyrovnávající změny v intracelulárních změnách cytosolických hladin Ca^{2+} patří zvýšený transport Ca^{2+} do mitochondrií pomocí napětově závislého kanálu VDAC (voltage dependent anion channel) přes vnější mitochondriální membránu a pomocí mitochondriálního uniporteru mCU (mitochondrial Calcium Uniporter), přes vnitřní mitochondriální membránu (Kirichok et al., 2004). Vstup Ca^{2+} pomocí mCU je závislý na mitochondriálním membránovém potenciálu. Mitochondrie tak působí jako pufr Ca^{2+} a zvýšené hladiny cytosolického vápníku vedou ke zvýšeným koncentracím Ca^{2+} v mitochondriích (Ausma et al., 2000). To zvyšuje pravděpodobnost narušení syntézy ATP, zvýšené produkce ROS a otevření mitochondriálních pórů přechodné propustnosti (mPTP), což je spojeno s redistribucí nízkomolekulárních látek menších 1,5 kDa (Parks et al., 2018).

ROS jsou molekuly s nepárovým elektronem ve své valenční sféře, které mohou vyvolat řetězové radikálové reakce, avšak v přiměřeném množství mohou sloužit i k signalizačním funkcím a k modulaci fyziologických či protektivních procesů. Mezi ROS patří superoxidový anion, který je produktem jedoelektronové redukce kyslíku schopný inaktivovat jiné enzymy jako je např. akonitáza. Nicméně, bývá rychle metabolizován enzymem superoxid-dismutázou (SOD) na peroxid vodíku (H_2O_2), který je následně eliminován katalázou. H_2O_2 je volně rozpustný v lipidech a může tak v malém množství působit jako modulátor buněčné signalizace, ale ve velkém množství se může podílet na tvorbě hydroxylového radikálu. Pro přehled (Finkel, 2011).

Při ischemii dochází k produkci ROS zejména respiračním komplexem I a III elektron transportního řetězce, což bylo podpořeno výzkumem inhibitorů jednotlivých kroků (Chen et al., 2003). Další důležitou úlohu v produkci ROS má enzym xantinoxidáza. Jedná se o oxidoreduktázu katalyzující oxidaci hypoxantinu na xantin a dále i oxidaci xantinu na kyselinu močovou. Obě tyto reakce jsou doprovázeny tvorbou ROS. Obnovení přísunu kyslíku během reperfúze a náhlé zvýšení jeho koncentrace ve tkáni vyvolá nadměrnou tvorbu superoxidového radikálu, a to zejména v respiračním řetězci, působením NADPH oxidázy a katabolismem hypoxantinu. Takto vytvořené ROS rychle překročí obranné antioxidační kapacity buňky, což vede k peroxidaci polynenasycených mastných kyselin, proteinové karboxylaci a poškození DNA (Becker et al., 2004).

Kombinované účinky nadměrné produkce ROS a vysoké hladiny Ca^{2+} předurčují mitochondrii k otevření mPTP, který hraje rozhodující úlohu při reperfúzním poškození tkáně (Abdallah et al., 2011). Zvýšená koncentrace Ca^{2+} v mitochondriální matrix vyvolává zvýšený koloidní osmotický tlak, který podporuje transport vody do mitochondrií a způsobuje tak mitochondriální bobtnání (swelling) (Eliseev et al., 2002). Nadměrný nárůst objemu mitochondrií vede k rozpojení oxidativní fosforylace a následné otevření mPTP póru, který umožní vylití cytochromu c do cytoplasmy, kde dochází k aktivaci kaspás 3 a 9 a následné tvorbě apoptosomu, což vede k buněčné smrti (Narula et al., 1999; Kim et al., 2005). Inhibice mCU pomocí Ru360 zlepšuje funkční stabilitu mitochondrie omezením mitochondriálního Ca^{2+} přetížení během I/R (Guan et al., 2019). Experimentální důkazy však spojují otevření mPTP nejen s apoptotickou, ale i nekrotickou smrtí buňky, a to v závislosti na jejím energetickém stavu. V důsledku otevření mPTP také dochází ke zvýšené produkci superoxidu, což je spojeno se ztrátou cytochromu c a NADPH z mitochondrií, které významně oslabují antioxidační kapacitu mitochondrií (Pasdois et al., 2011).

V posledních letech bylo mnoho studií na ochranu před I/R poškozením zaměřeno na prevenci otevření mPTP a to zejména pomocí inhibice cyklofilinu D (CypD). CypD, kódovaný genem *Ppif* je prolylimeráza umístěná v mitochondriální matrix, která moduluje mPTP, ačkoliv sama není strukturální složkou tohoto póru (Basso et al., 2005) a zároveň je receptorem pro imunosupresivní léčivo cyklosporin A (CsA) (Kajitani et al., 2008). Účinek CsA bývá popisován jako znecitlivující pro otevření mPTP, které sice může nastat, ale stává se odolnější vůči Ca^{2+} , Pi a dalším induktorům (Crompton et al., 1988; Bernardi et al., 1992). Užití chemických inhibitorů CypD jako sanglifehrin-A a Debilo-025 umožňují studium úlohy otevření mPTP při I/R a je i popsáno, že užití těchto inhibitorů působilo protektivně před I/R (Lim et al., 2007; Gomez et al., 2007), avšak nedávné klinické studie neprokazují účinnost užití inhibice CypD při léčbě akutního infarktu myokardu (Mewton et al., 2015). Tyto výsledky naznačují, že stále chybí přesné znalosti pro pochopení kaskádovité signalizace způsobující otevření mPTP. Obrázek 1 představuje schématické znázornění mechanismu I/R poškození v kardiomyocytech.



Obrázek 1 : Schematické znázornění mechanismu ischemicko-reperfúzního poškození myokardu. Během ischemie pokles pH inhibuje otevírání mitochondriálních pórů (mPTP). Narušená intracelulární iontová homeostáza způsobuje vápenaté přetížení, které spolu se zvýšenou tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) zvyšuje pravděpodobnost otevírání mPTP. Otevření mPTP vede k vylití cytochromu C (Cyt. C) aktivaci kaspáz a apoptóze kardiomyocytu. Upraveno dle Li et al., 2016.

Rozsah I/R poškození závisí na intenzitě a trvání ischemického podnětu a může být zmírněn zvýšenou odolností myokardu k ischemii. Stabilizace funkce mitochondrií a inhibice otevírání mPTP jsou součástí většiny kardioprotektivních strategií, které pravděpodobně zmírňují vápenaté přetížení a oxidační stres.

2.2. Kardioprotektivní režimy

Jako kardioprotektivní režimy označujeme nefarmakologické strategie s adaptivní reakcí, která výrazně zvyšuje schopnost srdce odolávat I/R poškození. Zkoumání těchto režimů má velmi dlouhou historii. V posledních letech se velmi intenzivně studují různé typy conditioningů, z nichž nejznámější je ischemický preconditioning. Avšak i adaptace na hypoxii, či adaptace na fyzickou zátěž si v současnosti získávají stále větší pozornost ze stran výzkumných kolektivů pro jejich potenciální terapeutické využití.

2.2.1. Preconditioning a postconditioning

Mezníkem ve výzkumu kardioprotekce patří experiment Murryho a kolektivu, kdy bylo psí srdce vystaveno čtyřem po sobě jdoucím koronárním okluzím trvajícím 5 minut, následovaných 5 minutovou reperfúzí před dlouhodobou ischemií a konečnou reperfúzí, při kterém byl pozorován téměř 75% pokles velikosti infarktu oproti zvířatům, prodávajícím pouze prodlouženou ischemii následovanou reperfúzí (Murry et al., 1986). Tento jev zvýšené endogenní tolerance myokardu proti ischemii byl pojmenován jako ischemický preconditioning (IPC). Zpočátku byl tento protektivní fenotyp připisován změnám v buněčném metabolismu, avšak navazující studie s využitím antagonistů adenosinových receptorů A1 prokázaly účinek adenosinu jako signalizační událost v IPC (Liu et al., 1991). Odpověď vyvolaná krátkou sekvencí ischemií a reperfúzí je dvoufázová, kdy k první protektivní fázi dochází téměř okamžitě, zatím co k druhé, opožděné fázi dochází po refrakterní periodě 24 hodin. Do časně fáze IPC je zapojena aktivace již existujících molekul spolu se signalizací subletálních dávek ROS, kdy posttranslační modifikace redoxně senzitivních proteinů spouští kardioprotektivní dráhy, zatím co druhá fáze, též nazývána jako „druhé okno kardioprotekce“ (Marber et al., 1993) zahrnuje zvýšenou expresi ochranných proteinů v reakci na akutní signál.

Postconditioning byl poprvé popsán před necelými 20 lety. Po 60 minutové ischemii autoři provedli 3 cykly za sebou jdoucích reperfúzí přerušovaných krátkými epizodami ischemie v trvání 30 sekund před konečnou reperfúzí. Tento zákrok významně snížil velikost infarktu, ekvivalentně k IPC (Zhao et al., 2003). Od té doby byl kardioprotektivní fenotyp způsobený ischemickým postconditioningem prokázán mnohými laboratořemi, i když se

značnými rozdíly ve výsledcích a experimentálních protokolech (Penna et al., 2008). Předpokládá se, že ischemický postconditioning omezuje rychlé navrácení fyziologického pH v ischemické oblasti vedoucí k otevírání mPTP (Cohen et al., 2007). Nespornou výhodou ischemického postconditioningu je možnost jeho snadného užití v klinické praxi. Obdobně se nabízí i možnost snadného využití v klinické praxi vzdáleného ischemického conditioningu, při kterém je přechodná ischemie aplikovaná na místo vzdálené od cílového orgánu, jako je tomu v pracích, při kterých byla pozorována kardioprotekce po vystavení ledviny (Gho et al., 1996) či kosterního svalu (Birnbbaum et al., 1997) lokální ischemii. Kardioprotece vyvolaná využitím vzdáleného conditioningu se jeví stejně silná jako protekce vyvolaná postconditioningem (Kerendi et al., 2005), avšak doposud nebyl nalezen optimální orgán či protokol pro využití tohoto přístupu, neboť v průběhu I/R dochází ke komplikacím v souvislosti se špatným prokrvením periferie.

2.2.2. Signální dráhy asociované s conditioningem

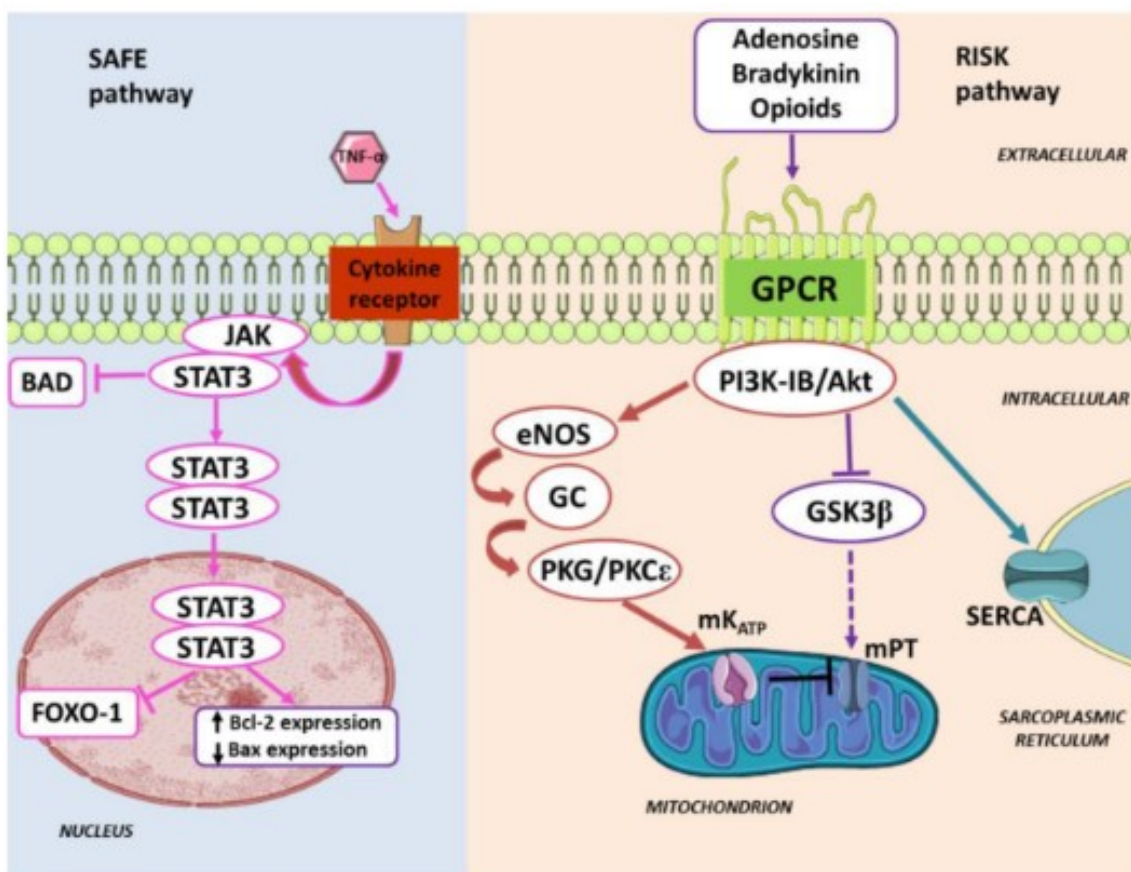
K dosažení kardioprotektivního účinku conditioningu patří zachování mitochondriální funkce působením tří hlavních signalizačních drah, mezi které patří dráha RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase), dráha SAFE (Survivor Activator Factor Enhancement) a dráha aktivace protein kinázy C (PKC). Zatímco při aktivaci dráhy RISK dochází k aktivaci nebo inhibici proteinů, SAFE dráha stimuluje expresi genů ke zmírnění ischemického poškození.

Skupina kináz RISK byla popsána jako sestávající se z kombinace dvou kaskád a to fosfoinositid-3 kinázy (PI3K) (Nagoshi et al., 2005) a mitogenem aktivované protein kinázy, které pokud jsou aktivované v době reperfúze, tak vykazují výrazný kardioprotektivní efekt (Tsang et al., 2004). K aktivaci dráhy RISK dochází po navázání agonisty, mezi které řadíme opioidy, bradykinin, adenosin a další na receptor spřažený s heterotrimérem G-proteinem. PI3K aktivuje proteinkinázu B (Akt), která se podílí na kardioprotekci nejen pomocí fosforylací, ale i modulací mitochondriální morfologie (Ong et al., 2015). Mezi další cíle fosforylace PI3K patří glykogen syntáza kináza 3 (GSK3) (Gross et al., 2004), která pokud je fosforylována a tedy inhibována, tak se podílí na inhibici otevření mPTP (Juhaszova et al., 2004).

Akt může dále fosforylovat endoteliální syntázu oxidu dusnatého (NOS3) na serinu 1176, což vede k její aktivaci a syntéze oxidu dusnatého (NO) z L-argininu (Dimmeler et al., 1999). NO zesiluje svůj signál prostřednictvím guanylátcyklázy, vedoucí k aktivaci proteinkinázy G (PKG) vnější mitochondriální membrány, která aktivuje PKC ϵ (Qiu et al., 1998) intermembránového prostoru mitochondrií (Costa et al., 2005). PKC ϵ fosforylací napomáhá otevření mitochondriálních ATP závislých K⁺ kanálů (mitoK_{ATP}), které se podílejí na inhibici otevírání mPTP (Saurin et al., 2002). PKG se účastní na fosforylaci PLB a zvyšuje tak aktivitu SERCA při zvýšené acidóze kardiomyocytu čímž se podílí na snížení oscilací vápníku a udržení vápníkové homeostázy (Inserte et al., 2014).

Nedávno objevená dráha SAFE se podílí na časně i pozdní fázi IPC prostřednictvím Janusovy kinázy JAK, který je aktivována cytokiny jako jsou interleukin-6 a TNF α (Lacerda et al., 2009). Původně předpokládaný příspěvek TNF α k reperfučnímu poškození byl vyvrácen při pokusech s použitím speciální protilátky TNF α , jejíž podání po fázi ischemie vykazuje snížení I/R poškození (Gao et al., 2008). Po navázání TNF α na TNF receptor 2 dochází k aktivaci transkripčního faktoru STAT3, který následně pozitivně reguluje antiapoptické proteiny jako je Bcl-2 a snižuje množství apoptického Bax (Bolli et al., 2011). STAT3 má i velmi výrazný vliv na funkci mitochondrie, kde se nejen účastní inhibice otevírání mPTP skrz inhibici mCU (Wu et al., 2019), ale zároveň je popsán jako faktor účastnící se modulace mitochondriální morfologie skrz zvýšení exprese proteinu OPA1 (Nan et al., 2017). Zajímavé je, že při studii vzdáleného conditioningu na lidských pacientech byla pozorována větší aktivace STAT5, než STAT3 (Heusch et al., 2012). Schématické znázornění hlavních signalizačních drah RISK a SAFE, které se podílejí na kardioprotekci vyvolané conditioningem představuje obrázek 2.

Je tedy patrné, že ischemický conditioning je odpovědí na ischemický stres vyvolaný krátkými opakovanými ischemiemi a reperfúzemi, který snižuje spotřebu energie a zpožďuje nástup apoptózy buněk způsobené I/R poškozením.



Obrázek 2 : Kardioprotektivní dráhy asociované s conditioningem RISK a SAFE. Dráha RISK zahrnuje aktivaci receptoru spřaženého s G-proteinem (GPCR) aktivujícího proteinkunázu B (Akt), endoteliální NO syntázu (eNOS), guanylátcyklázu (GC) a proteinkinázy G a C (PKG, PKC) ovlivňující mitochondriální ATP senzitivní draslíkový kanál (mK_{ATP}), který se podílí na inhibici mitochondriálních porů (mPT). Dráha SAFE stimuluje zvýšenou expresi proteinů Bcl-2 a sníženou expresi Bax prostřednictvím Janus kinázy (JAK) a aktivátorů transkripce (STAT3). Převzato z Marck et al., 2018.

2.2.3. Hypoxie

Při hypoxii dochází k nerovnováze mezi dodávkou kyslíku a jeho poptávkou ve tkáni. V reakci na chronickou hypoxii, ať již normobarickou, tedy za zachování normálního tlaku vzduchu či hypobarickou stimulující vysokohorské prostředí bylo pozorována snížená velikost infarktu po I/R poškození, spolu se sníženým výskytem komorových arytmií.

Adaptace na hypoxii patří spolu s IPC k nejvíce studovaným kardioprotektivním strategiím, ale doba ochrany pomocí adaptace na chronickou hypoxii je výrazně delší. Kardioprotektivní účinek chronické normobarické hypoxie byl pozorován i 5 týdnů po ukončení adaptace sníženou velikostí infarktu (Neckář et al., 2004). Molekulární mechanismy adaptace na chronickou hypoxii se v současné době velmi intenzivně studují a zdá se, že spolu s IPC využívají shodné signální kaskády, avšak různou efektivitou (Neckář et al., 2002). Tyto signální dráhy zahrnují zejména PKC ϵ (Holzerová et al., 2015) ovlivňující K_{ATP} kanál. Ovlivnění tohoto kanálu na sarkolemě má za následek zkrácení trvání akčního potenciálu, zatím co mitochondriální K_{ATP} kanál ovlivňuje regulaci objemu a Ca²⁺ homeostázu mitochondrií. Indukce PKC je připisována zvýšené produkci NO v důsledku aktivace indukibilní NOS během chronické normobarické hypoxie (Tsibulnikov et al., 2018).

Do adaptace na chronickou hypoxii jsou zapojeny i signální dráhy ovlivňující genovou expresi proteinů, které ovlivňují intracelulární homeostázu kyslíku. Změny exprese těchto proteinů jsou zprostředkovány zejména pomocí transkripčních faktorů HIF1 a HIF2 (Hypoxia Inducible Factor). HIF se skládají ze dvou podjednotek, cytosolické podjednotky α a jaderné podjednotky β , které spolu za příznivých podmínek dimerizují a ovlivňují expresi mnoha desítek genů, jako jsou např. geny pro erythropoetin, indukibilní NOS a dalších, které se účastní regulace homeostázy (Bergeron et al., 1999). Za normoxie dochází ke kovalentní modifikaci HIF α (Srinivas et al., 1999) enzymem z rodiny prolylhydroxyláz (PHD) (Jaakkola et al., 2001), která má 3 isoformy a to PHD1, PHD2 a PHD3. Hydroxylace HIF α usnadňuje navázání von Hippel-Lindau supresorového proteinu, což vede k proteasomální degradaci HIF α podjednotky (Maxwell et al., 1999). K tomu ovšem nedochází za hypoxie, kdy kvůli nedostatku kyslíku jako substrátu pro PHD nejsou lysinové zbytky HIF α hydroxylovány a HIF α se může translokovat do jádra a spolu s HIF β zahajovat genovou expresi vazbou na hypoxii responzivní elementy v promotorech cílových genů (Jiang et al., 1996). Studie s represí genu pro PHD2, která vykazuje nejvyšší specifitu k HIF1 α prokázala významnou kardioprotekci v myším modelu (Natarajan et al., 2006). K expresi podjednotky HIF β , která je též označována jako Arnt1 dochází konstitutivně a její aktivita není ovlivněna hladinou kyslíku v buňce (Huang et al., 1996). Mezi induktory HIF patří i ROS, které nejenom zvyšují hladiny HIF α , ale též se účastní inhibice degradace PHD (Niecknig et al., 2012). Při chronické hypoxii byla popsána úloha HIF při regulaci metabolismu glukózy prostřednictvím HIF-AMPK dráhy aktivující PGC1 α jako klíčový regulátor buněčného metabolismu (Gu et al., 2018). Studie thymocytů naznačují i roli v udržování intracelulární

homeostázy Ca^{2+} založené na HIF závislém zvýšení exprese genu pro SERCA (Neumann et al., 2005).

V souvislosti s HIF nelze nezmínit, že průkopnické práce Williama G. Kaelina, Petera Ratciffa a Gregga Semenzy popisující jak buňky cítí a přizpůsobují se dostupnosti kyslíku byly v loňském roce oceněny Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019).

2.2.4 Adaptace na fyzickou zátěž

Průměrná fyzická aktivita je obecně považována za vhodnou prevenci kardiovaskulárních chorob a bylo též prokázáno, že snižuje rizikové faktory jako jsou vysoký krevní tlak, obezitu či rezistence vůči inzulínu (Shephard et al., 1999; Lohmann et al., 1978). Navíc bylo zjištěno, že cvičení zvyšuje odolnost srdce k I/R poškození ať již formou pravidelných tréninků či krátkodobé akutní zátěže. Zvýšená fyzická aktivita a vytrvalostní trénink snižují klidovou srdeční frekvenci, která pokud je zvýšená, bývá spojována se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních příhod. Experimentální práce popisují 25% pokles velikosti infarktu po dlouhodobé adaptaci na fyzickou zátěž (Brown et al., 2003), kdy kardioprotekce trvá až 9 dní po ukončení cvičení (Lennon et al., 2004), doposud však nebyl popsán přesný mechanismus protekce. Relativně nové studie naznačují zapojení více různých faktorů při kardioprotekci vyvolané fyzickou zátěží, mezi které patří zvýšení hladin SOD, zvýšení exprese sarkolemálních K_{ATP} kanálů (Brown et al., 2005), zvýšení hladin metabolitů NO (Calvert et al., 2011) a zvýšená plasmatická hladina neureglinu (NRG). NRG je transkripční faktor podílející se na regulaci absorpce glukózy v myocytech, který se během oxidačního stresu podílí na aktivaci PI3K/Akt dráhy (Fukazawa et al., 2003). Plasmatické hladiny NRG-1 β u lidí korelují se cvičební kapacitou a lze ho tak využít jako markeru kardiovaskulární zdatnosti (Moondra et al., 2009). Při pokusech s potkany adaptovanými na fyzickou zátěž v kombinaci s vystavením chronické normobarické hypoxii bylo pozorováno, že pravidelný trénink během adaptace na hypoxii poskytuje stejný protektivní fenotyp jako vystavení samotné chronické hypoxii (Alánová et al., 2017).

Závěrem lze říci, že fenomény conditioningu ať již aplikované přímo na srdce jako cílový orgán, nebo i jako vzdálený preconditioning (Kerendi et al 2005), nebo vzdálený postconditioning (Song et al., 2016) vykazují silnou kardioprotekci, stejně tak jako adaptace na hypoxii a fyzickou zátěž. I přes obrovský pokrok, ke kterému došlo během posledních 30

let při snaze o popsání signálních drah účastnících se kardioprotekce vyvolané těmito režimy, přesné mechanismy signální transdukce nejdou dodnes plně objasněny. Porozumění přenosu signálu nám pomůže vysvětlit i zmírnit poškození způsobené rizikovými faktory.

2.3. Úloha beta adrenergických receptorů v kardioprotektivních režimech

Mezi nejdůležitější modulatory kardiovaskulárního systému patří beta adrenergní receptory (β AR), které přenášejí signály sympatického nervového systému do kardiomyocytů. Jedná se o membránové receptory které se po vazbě endogenního ligandu jako je adrenalin nebo noradrenalin stabilizují v aktivní konformaci a dochází k jejich spřažení s heterotrimerními G-proteiny, což vede ke konformační změně a disociaci nyní aktivních podjednotek α a komplexu $\beta\gamma$ (Rockman et al., 2002). Aktivace β 1AR představuje primární mechanismus zvyšování srdeční odpovědi při stresu, avšak chronická aktivace těchto receptorů hraje i důležitou roli v patologických stavech srdce (Engelhardt et al., 1999).

V srdci savců byly identifikovány 3 různé podtypy β AR, a to β 1, β 2 a β 3 kódované odlišnými geny *Adrb 1-3*. β AR vykazují různé afinity k ligandům, které umožňují variabilní aktivaci každého subtypu (pro přehled (Taylor, 2007)). Dominantní zastoupení (přibližně 70%) patří β 1 receptorům, které jsou spojeny výhradně s odpovědí stimulační podjednotky G- proteinu $G_{\alpha s}$ stimulující adenylátcyklázu (AC), zatím co β 2 receptory, které jsou ve zdravém srdci zastoupeny 27 % mohou být spojeny jak se stimulačním proteinem $G_{\alpha s}$, tak inhibičním proteinem $G_{\alpha i}$ (Xiao et al., 1995). Za fyziologického stavu jsou jejich funkce primárně synergistické, kdy β 2 receptory nacházíme primárně v T-tubulech společně s LTCC (Schobesberger et al., 2016), zatím co β 1AR jsou distribuovány po celém sarkolemálním povrchu (Nikolaev et al., 2006). To by mohlo vysvětlovat rozdílnou účinnost vazby těchto receptorových podtypů, kdy byla pozorována několikanásobně vyšší účinnost produkce cAMP po stimulaci β 2AR než u β 1AR (Levy et al., 1993). Nicméně s ohledem na denzitu β AR se zdá, že β 2AR nestimulují kontraktilitu myokardu účinněji než β 1AR. Navíc nedávné práce popisují přítomnost β 1AR ve všech kardiomyocytech, zatím co β 2 a β 3 subtypy jsou v myocytech zastoupeny zhruba 5 % (Myagmar et al., 2017).

β 1AR hrají dominantní úlohu při zvyšování srdeční chronotropie a ionotropie. K tomuto pozitivnímu účinku dochází aktivací AC zvyšující hladiny cyklického AMP (cAMP) a stimulující PKA po aktivaci receptoru. Katalytická podjednotka PKA následně fosforyluje proteiny zapojené do modulace intracelulárních hladin vápníku jako jsou LTCC, PLB, RyR ale i mnoho dalších (Gerhardstein et al., 1999; Marx et al., 2000). Tyto proteiny se pak během srdečního selhání podílejí na změnách kontraktility kardiomyocytů. Bylo též zaznamenáno, že prodloužená aktivace β 1AR způsobuje přechod od PKA k signalizaci

závislé na CAMK-II., která se též podílí na změnách kontraktility kardiomyocytů (Wang et al., 2004). Účast signalizace pomocí CAMK-II po aktivaci β 1AR byla též pozorována při kardiomyocytární hypertrofii *in vitro* (Engelhardt et al., 1999).

β 1AR a že β 2AR mohou též aktivovat receptorové kinázy G-proteinů β GRK, kromě aktivace PKA. Po stimulaci β AR agonistou interagují volné $\beta\gamma$ podjednotky heterotrimerního G-proteinu s β GRK (Pitcher et al., 1992), čímž se β GRK dostávají do blízkosti transmembránových β AR. Následná fosforylace β AR pomocí β GRK snižuje afinitu receptorů pro stimulační G-protein. Ke zvýšené expresi β GRK dochází během srdečního selhání a dochází tak ke snížení přenosu signálu β AR (Choi et al., 1997). Zároveň prodloužená stimulace β 2AR způsobuje fosforylaci tohoto receptoru pomocí protein kinázy A, což umožňuje přesmyk od stimulačního G α proteinu k inhibičnímu G α (Daaka et al., 1997), který má tlumivý účinek na aktivitu AC a účastní se kardioprotekce cestou aktivace PI3K a Akt (Zhu et al., 2001). Prostřednictvím β 2 receptorů je též popsána aktivace endoteliální NOS vedoucí ke zvýšení produkce NO v cévním systému (Ferro et al., 1999). Bylo též navrženo, že protektivní efekt zprostředkovaný conditioningem může být indukován stimulací β 2AR (Tong et al., 2005).

Kvantitativně jsou v srdci nejméně zastoupeny β 3AR, kterým jsou připisovány protektivní účinky a aktivují dráhy inhibičního G-proteinu. Tyto receptory se tak podílejí na negativním ionotropním účinku v srdci prostřednictvím zvýšené produkce NO cestou PI3K a Akt a snižování hladin ROS. Cytoplasmatický konec C-konec β 3AR navíc postrádá cílové aminokyselinové sekvence pro fosforylaci (Liggett et al., 1993) pomocí PKA a β GRK, díky tomu jsou tyto receptory méně citlivé na desensitizaci při hyperstimulaci. Nedávné práce též popisují účast zvýšené exprese β 3AR v prevenci srdeční fibrózy (Hermida et al., 2018).

Během srdečního selhání dochází k výrazně snížené expresi β 1AR a zvýšené expresi β 3AR (Bristow et al., 1989), zatímco hladiny β 2AR zůstávají nezměněny. Zajímavé však je, že dlouhodobá kalorická restrikce plně zvrátila snížení hladin β 1AR způsobené srdečním selháním a vedla k normalizaci hladin tohoto subtypu AR (De Lucia et al., 2018).

Antagonisté β AR, neboli β -blokátory patří mezi nejpoužívanější látky při léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Jedná se o kompetitivní inhibitory katecholaminů, jejichž společný mechanismus účinku je založený na blokádě β AR. K objevu prvního β -blokátoru propranololu (pronethalolu), který výrazně snižoval morbiditu u pacientů s anginou pectoris došlo již v roce 1964 (Prichard et al., 1964). Dnes je využití β -blokátorů rozšířeno na léčbu

hypertenze, srdečních arytmií a je doporučováno u pacientů s ischemickou chorobou srdeční jako kardioprotektivní (Newby et al., 2016). Metoprolol je selektivní antagonist β_1 AR, který snižuje aktivaci AC a PKA a tím zpomaluje přístup vápenatých iontů ke kontraktilnímu aparátu kardiomyocytů. Při podání této látky pacientům před reperfúzí byla popsána snížená velikost infarktu (Ibanez et al., 2013). Navíc mohou selektivní β_1 blokátory podporovat zvýšení exprese β_3 AR pokud jsou podávány po infarktu myokardu (Cannavo et al., 2017), čímž dochází ke zvýšení kardioprotektivní signalizace tohoto subtypu adrenergických receptorů (Sharma et al., 2008). Shoda mezi velkými klinickými studiemi prokázala pozitivní účinky léčby s užitím selektivních β_1 blokátorů u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními (Waagstein et al., 1993; Hjalmarson et al., 1999).

3. Cíle diplomové práce

V závislosti na popsaných mechanismech I/R poškození a mechanismech kardioprotekce s jejich vztahem k signalizaci pomocí β adrenergických receptorů je cílem této diplomové práce zjistit:

1. Vliv jednodenní chladové expozice na velikost ischemicko-reperfúzního poškození srdce
2. Úlohu metoprololu v kardioprotektivním účinku chladové adaptace po 5 týdnech vystavení chladu a následných dvou týdnech zotavení

4. Materiál a metody

4.1. Použitá zvířata

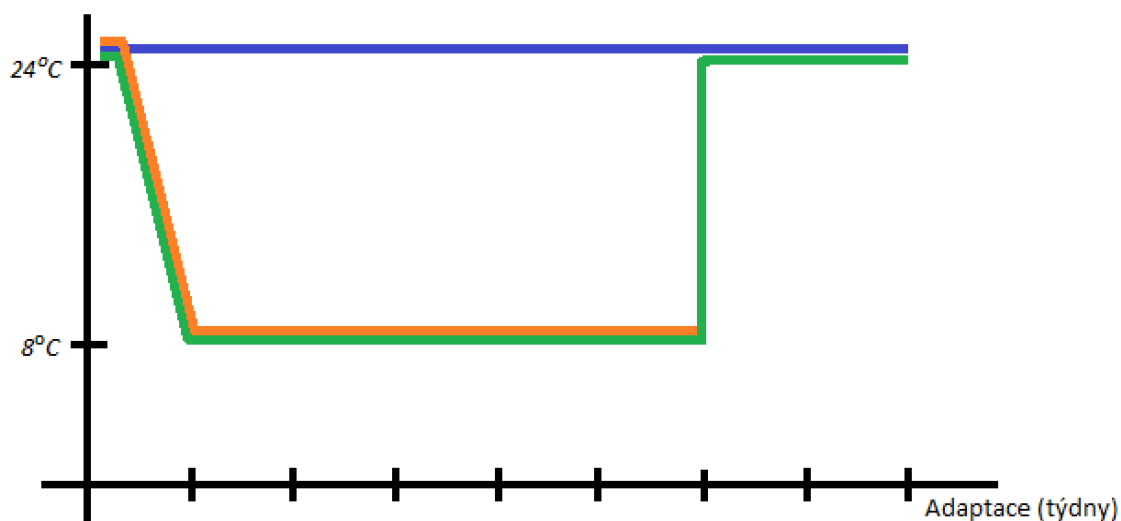
V diplomové práci jsme použili potkani kmene Wistar s počáteční hmotností 200 ± 1 g od dodavatele Velaz s.r.o. pro chronické adaptace a pro akutní experiment potkany o váze 360 ± 8 g. Potkani byli chováni v páru, ve standardních akváriích s normální podestýlkou za konstantních podmínek světla a tmy 12/12. Zvířata byla krmena standardní dietou ST1 *ad libitum*, se stálým přístupem k vodě.

4.1. Průběh chladové adaptace

V první části diplomové práce byli potkani náhodně rozděleni do dvou skupin, kontrolní a experimentální po 20 zvířatech v každé skupině. Kontrolní skupina byla po dobu pokusu chována za stálých tepelných podmínek 24 ± 1 °C, zatím co pokusná skupina byla umístěna na 24 hodin do chladové komory, kde byli vystaveni teplotám 8 ± 1 °C.

Ve druhé části diplomové práce byli potkani rozděleni do 3 skupin po 40 zvířatech. Kontrolní skupina byla po dobu celého pokusu chována při standardních tepelných podmínkách 24 ± 1 °C. Druhá skupina byla po dobu jednoho týdne postupně adaptována na chlad a následujících 5 týdnů chována při 8 ± 1 °C. Poslední, regresní skupina byla chována stejně jako chladově adaptovaní, ale po uplynutí 5 týdnů chladové adaptace byli potkani navraceni do místnosti s teplotou 24 ± 1 °C. Potkani byli pravidelně monitorováni měřením

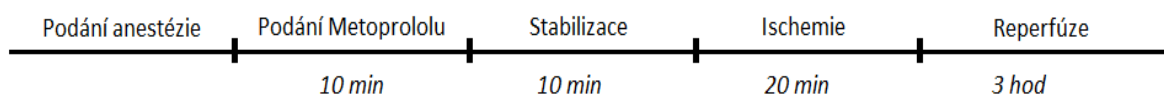
rektální teploty, aby bylo prokázáno, že v průběhu chladové adaptace nedochází k jejich podchlazení. Průběh chladové adaptace je pro přehled znázorněn obrázkem 3.



Obrázek 3: Průběh chladové adaptace. Modrá linie představuje kontrolní skupinu vystavenou $24 \pm 1^\circ \text{C}$ po dobu celého experimentu. Oranžová linie představuje chladově adaptované potkany, kteří byli vystaveni 5 týdnů teplotám $8 \pm 1^\circ \text{C}$. Zelenou linií znázorněna regresní skupina potkanů, která po uplynutí 5týdenní chladové adaptace byla navrácena do $24 \pm 1^\circ \text{C}$ na 2 týdny. Upraveno dle Marvanová, 2015.

4.2. Podání metoprololu

Ve druhé části diplomové práce byla polovina skupiny kontrolní, chladové i regresní intraperitoneálně (50 mg / kg) ošetřena Metoprololem (Apotex Europe B.V., Leiden, Nizozemsko), β_1 selektivním antagonistou 20 minut před okluzí koronární arterie dle časového schématu na obrázku 4.



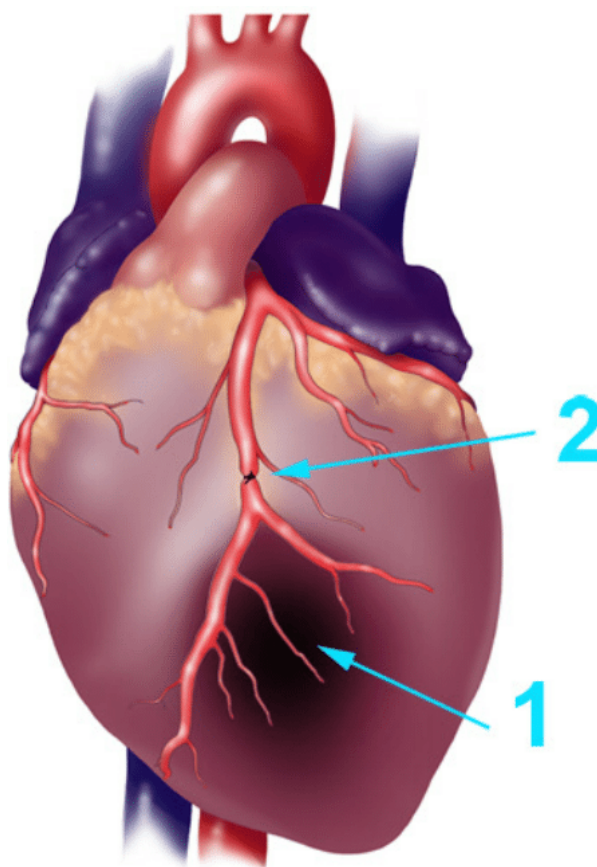
Obrázek 4 : Časová osa znázorňující průběh experimentálního protokolu I/R poškození *in vivo* s podáním metoprololu.

Tato zvířata byla následně podrobena protokolu I/R poškození *in vivo*.

4.3. Metoda ischemicko-reperfúzního poškození *in vivo*

Každý potkan byl zvážen den před pokusem a dle naměřené váhy byl v den experimentu uveden do hluboké anestezie intraperitoneální injekcí Thiopentalu (60 mg/kg). Poté byli potkani umístěni na operační stůl, kde byli fixováni v poloze na zádech. Rektální tělesná teplota byla monitorována po celou dobu operačního zákroku a udržována v rozmezí 36- 37,5 °C, aby nedocházelo ke kardioprotektivní hypotermii, která by znehodnotila výsledky pokusu. Heparinizovaná kanyla byla zavedena do pravé arterie carotis communis pro monitorování krevního tlaku v průběhu operace s použitím PowerLab a LabChartPro software. Obdobně byl po dobu zákroku nahráván záznam tří svodového EKG, ze kterého byla následně stanovena srdeční frekvence.

Tupou preparací byla odhalena průdušnice, pro následnou tracheotomii s intubací a napojením na ventilátor (Ugo Basile, Itálie). Potkan byl ventilován mechanickou ventilací s frekvencí dýchání 60-70 nádechů/min, za objemu 1,2 ml/100 g tělesné hmotnosti po celou dobu zákroku. Následně byla provedena totakotomie, rozevření mezižebří pomocí rozvěrače na levé straně hrudníku, která umožnila přístup k srdci. Srdce bylo pomocí pinzet zbaveno perikardu k odhalení umístění levé přední sestupné (LAD – Left anterior descending) koronární arterie. Okluze LAD byla provedena použitím zahnuté jehly s hedvábným vláknem 5/0 (Chirmax, Vitrex Česká republika), která byla zavedena přibližně 1-2 mm od počátku LAD. Konce hedvábného vlákna byly volně protaženy polyethylenovou trubičkou a rána byla sterilně kryta. Následovala 10minutová stabilizace, po které byla vyvolána regionální ischemie zatažením volných konců hedvábného vlákna a jejich zajištění pomocí svorky. Správnost zatažení ligatury

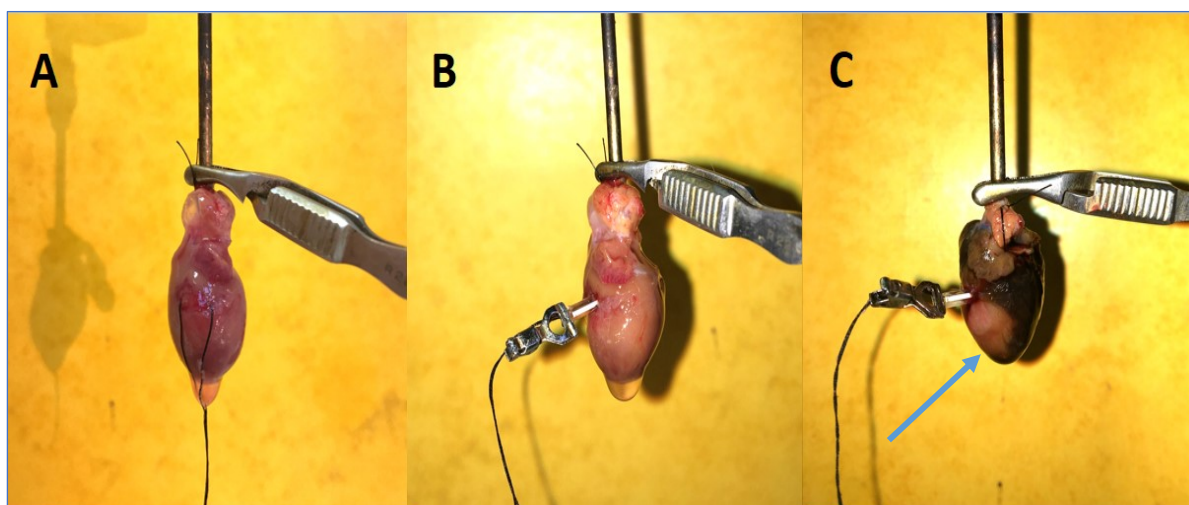


Obrázek 5: Srdce s okluzí LAD. 1- Oblast distálně od okluze se stává ischemickou. 2- místo okluze přibližně 1-2 mm od počátku LAD. Převzato z Wu et al., 2010.

je možné ověřit pomocí typického poklesu krevního tlaku a změn na záznamu EKG. Tato fáze ischemie byla udržována po dobu 20 minut a po jejím uplynutí byla ligatura opět povolena a polyetylenová trubička sňata. Hrudník byl následně uzavřen za současného odsání přebytečného vzduchu a potkan byl odpojen od ventilace. Spontánně dýchající zvířata byla přenesena na vyhřívanou dečku, kde byla monitorována jejich tělesná teplota následující 3 hodiny reperfúze. Okluze LAD s ischemickou oblastí je pro přehled znázorněna obrázkem 5.

4.4. Barvení a fixace srdcí

Po uplynutí 3hodinové reperfúze došlo k znovuotevření hrudníku v oblasti processus xiphoideu a vyjmutí srdce, které bylo zavěšeno za aortu a pevně přichyceno ke kovové kanyle na 20 ml stříkačce s heparinizovaným fyziologickým roztokem o pokojové teplotě a promýváno do té doby, dokud nevytéká čistý efluent. Ligatura okluze LAD byla znovu protažena polyetylenovou trubičkou a utažena, aby nedošlo k obarvení tkáně oblasti ohrožení. Následné promytí srdce 5% roztokem manganistanu draselného ve vodě obarvilo nezasaženou oblast srdce. Po povolení ligatury bylo srdce znovu promýváno fyziologickým roztokem do vytékání čistého efluentu. Průběh barvení srdce je znázorněn obrázkem 6. Dále bylo srdce sňato z aparatury, lehce vysušeno filtračním papírem a mraženo po dobu 1 hodiny při -20°C . Po zmražení bylo srdce vyjmuté z mrazáku a pomocí žiletky krájeno na 1 mm řezy kolmo k podélné ose. Z jednoho srdce lze takto připravit 6-9 řezů.

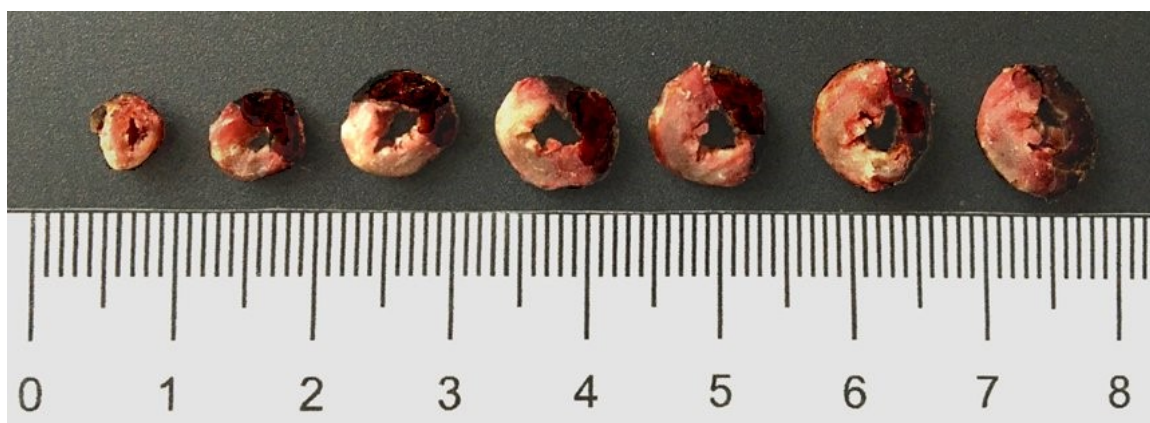


Obrázek 6: Znárodnění jednotlivých kroků barvení srdce. A- Srdce promývané fyziologickým roztokem do vytékání čistého efluentu. B- Srdce se zataženou ligaturou koronární arterie, která brání obarvení oblasti ohrožení. C- Srdce promyto 5% roztokem manganistanu draselného. Modrá šipka ukazuje na oblast ohrožení AaR, vyživovanou zataženou koronární arterií, která nebyla obarvena.

Usmrceným potkanům byla z oblasti mezi lopatkami vyňata hnědá tuková tkáň (BAT), která byla důkladně očištěna od ostatních tkání a mražena v tekutém dusíku pro následné analýzy.

4.4. Analýza velikosti ischemicko-reperfúzního poškození

Pro analýzu I/R poškození byly řezy srdcí barveny v předem připraveném a důkladně rozmíchaném 0,1% roztoku 2,3,5- trifenylnitrotetrazolium chloridu (TTC) ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Řezy byly takto inkubovány po 20 minut při 37°C ve vodní lázni. Princip barvení spočívá ve vyvolání barevné reakce pomocí dehydrogenáz přítomných ve viabilních kardiomyocytech, kdežto nekrotické oblasti obarveny nejsou a zůstávají světlé. Následně byly řezy z roztoku TTC vyňaty a umístěny do lahviček s 4% roztokem formaldehydu a na 72 hodin umístěny do lednice. Po uplynutí třídní lhůty byly řezy vyjmuty z lahviček, lehce osušeny filtračním papírem a byly jim odstříženy stěny pravé komory. Jednotlivé řezy levých komor pak byly fotografovány pomocí fotoaparátu Nikon D5100 s objektivem Sigma 105 mm F2.8 Makro pro následnou analýzu pomocí počítačové planimetrické metody. Na snímcích řezů se hodnotila velikost oblasti zasažení (AaR) levé komory a procentuální zastoupení velikosti infarktu (IS) v této oblasti vyjádřené jako IS/AaR. Obrázek 7 znázorňuje obarvené řezy srdce s odstříženou pravou komorou připravené na fotografování.



Obrázek 7: Fixované řezy levé komory před focením pro planimetrickou analýzu velikosti infarktu. Tmavá část řezů představuje oblast viabilní obarvenou pomocí 5% roztoku manganistanu draselného. Červeně je obarvena oblast ohrožení pomocí TTC. Bílé oblasti představují infarkt, kde nedošlo k obarvení pomocí TTC.

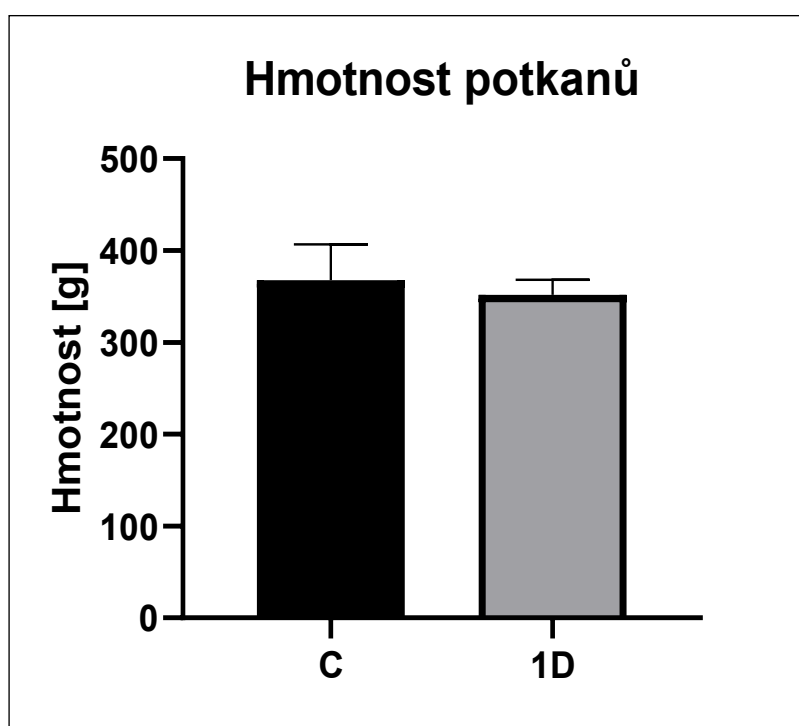
4.5. Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky získané při zpracování této práce byly vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism 8.0. Statistická analýza mezi dvěma skupinami byla počítána pomocí t-testu. Docházelo-li k porovnání rozdílů více hodnot bylo využito analýzy ANOVA. Za statisticky významnou hodnotu je považována hodnota $p < 0,05$.

5. Výsledky

5.1. Vliv jednodenního chladu na I/R poškození srdce potkana

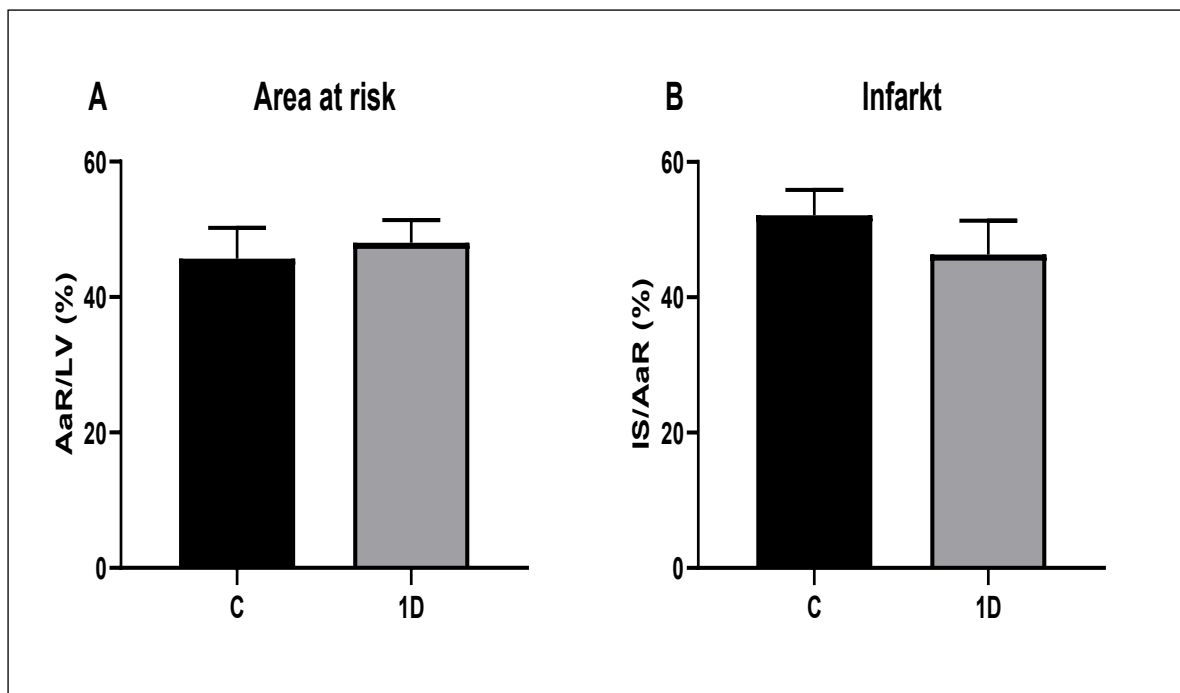
Kontrolní i experimentální skupina zvířat byla vážena v den experimentu. Výsledky znázorňuje graf 1, kdy mezi skupinami nebyl prokázán významný rozdíl. Průměrné hodnoty tělesné hmotnosti činily pro kontrolní skupinu 368 ± 14 g a pro skupinu vystavenou chladu 352 ± 6 g.



Graf 1 : Hmotnosti potkanů v den experimentu. Mezi skupinami kontrolní (C; n=8) a skupinou vystavenou chladu (1D, n=8) nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr \pm S.E.M.

Velikost infarktu vyjádřená jako procentuální podíl nekrotické tkáně z oblasti ohrožení (AaR). U obou skupin, kontrolní i experimentální se velikost oblasti ohrožení AaR nelišily a dosáhly průměrné hodnoty 46 ± 5 % LV pro kontrolní skupinu a 48 ± 3 % LV pro skupinu vystavenou chladu. Velikost infarktu mezi kontrolními zvířaty a zvířaty 24 hodin vystavenými chladu se statisticky neliší. Průměrná velikost infarktu u kontrolní skupiny představuje 50 ± 3 % oblasti ohrožení AaR, zatím co u skupiny vystavené chladu průměrně

46 ± 5 % oblasti ohrožení AaR. Výsledky znázorněné v grafu č. 2 dokládají, že mírný chlad nemá detrimetální vliv na srdce ani po prvním dni adaptace.



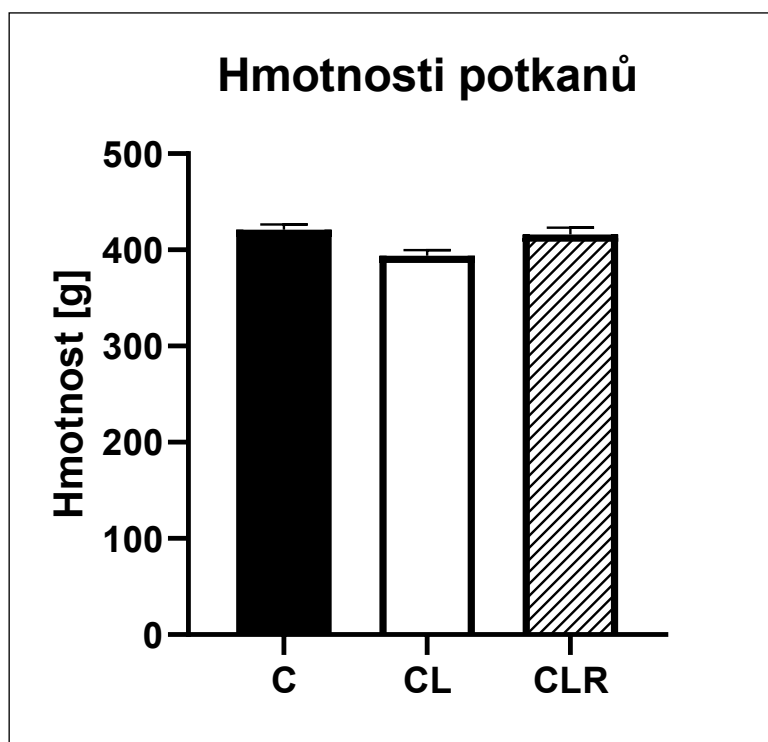
Graf 2: Vliv jednodenní expozice chladu na velikost infarktu myokardu. Kontrolní skupina potkanů (C; n=8) byla chována za standardních teplotních podmínek $24 \pm 1^\circ\text{C}$ a porovnána s experimentální skupinou (1D; n=8), která byla vystavena teplotě $8 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin. A: Velikost oblasti ohrožení (AaR) vyjádřená v procentech levé komory (LV). B: Vztah mezi velikostí infarktu (IS) a oblastí ohrožení (AaR) je vyjádřen v procentech. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm S.E.M.

5.2. Vliv metoprololu na I/R chladově adaptovaného potkana

Druhým cílem diplomové práce bylo stanovit vliv akutního podání metoprololu na velikost I/R poškození u kontrol a chronicky adaptovaných potkanů po 5 týdnech a následném zotavení 2 týdny (regresní skupina).

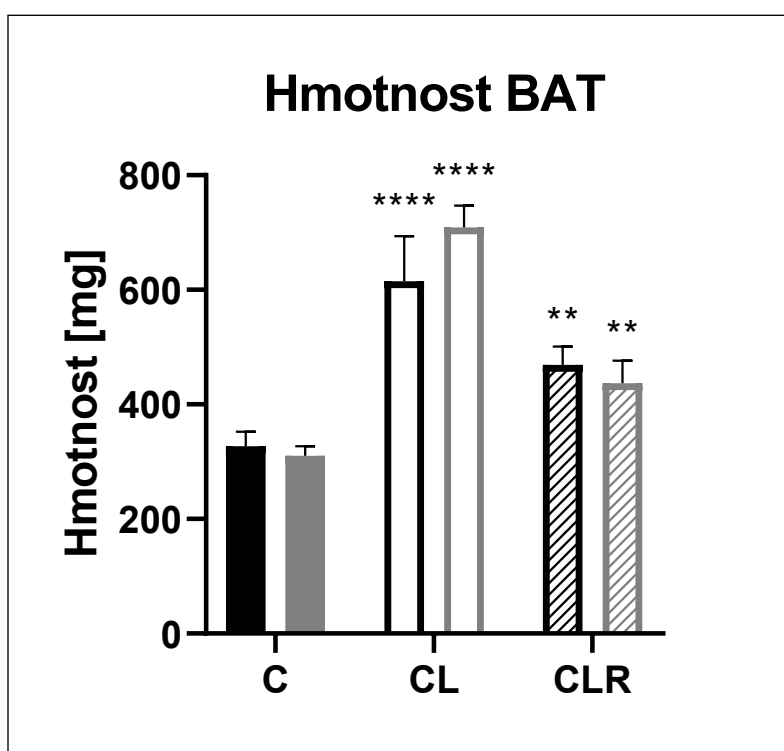
5.2.1. Hmotnosti zvířat

Zvířata rozdělena do jednotlivých skupin byla průběžně vážena v průběhu chladové adaptace. Hmotnosti zvířat den před experimentem jsou znázorněny v grafu 3, kde nebyl zjištěn významný rozdíl hmotností mezi jednotlivými skupinami. Průměrné hodnoty hmotností potkanů činily 421 ± 6 g pro kontrolní skupinu, 394 ± 6 g pro skupinu chladově adaptovanou a 416 ± 7 g pro skupinu regresní. Rozdíly hmotností mezi jednotlivými skupinami nedosahovaly statisticky významného rozdílu.



Graf 3 : Hmotnosti potkanů po skončení chladové adaptace (CL, 5 týdnů $8 \pm 1^\circ\text{C}$; $n=16$) a po následujících dvou týdnech v kontrolních podmínkách (CLR, 2 týdny $24 \pm 1^\circ\text{C}$; $n=16$) ve srovnání s kontrolní skupinou (C; $n=16$). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm S.E.M.

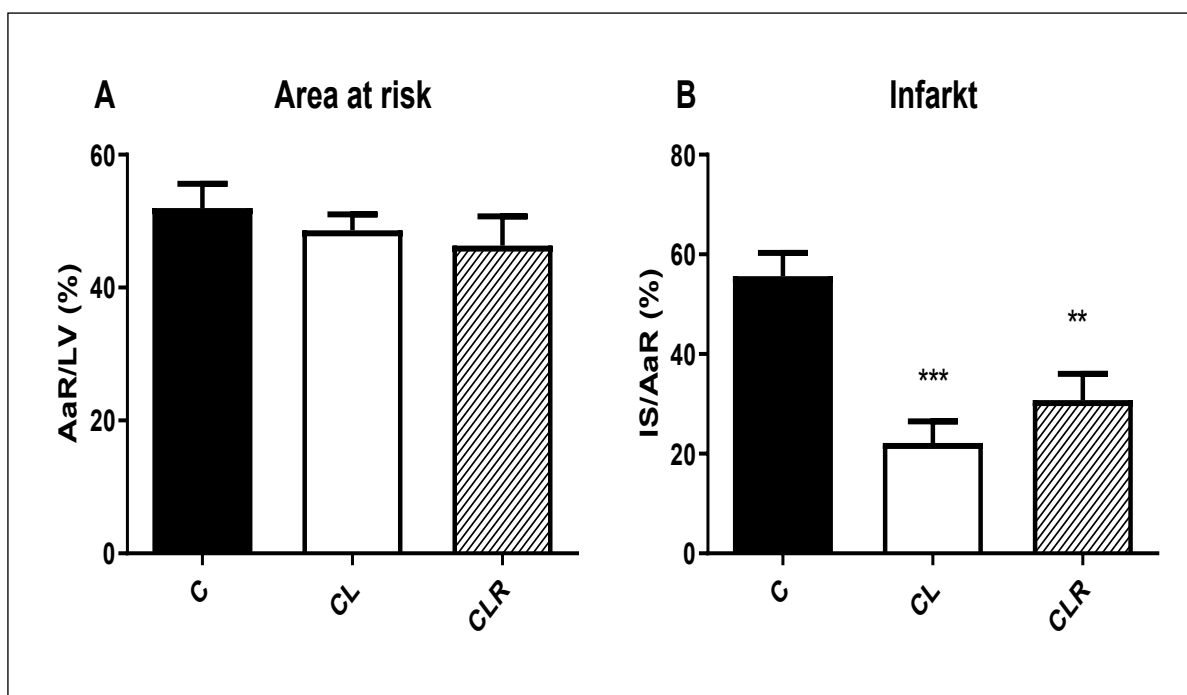
Hmotnosti odebraného hnědého tuku jsou vyobrazeny v grafu 4, kde pro kontrolní skupinu, činí 326 ± 25 mg bez metoprololu a 311 ± 16 mg s podaným metoprololem. Tento rozdíl nevykazuje statisticky významnou odchylku. U skupiny chladově adaptovaných potkanů byl zaznamenán významný, téměř dvojnásobný nárůst hmotnosti BAT, který činil $611 \pm 56,39$ mg bez metoprololu a 709 ± 38 mg při akutním podání metoprololu. Rozdíl hmotnosti BAT u chladově adaptovaných potkanů bez a s podáním metoprololu nedosahoval statisticky významného rozdílu. Významný nárůst hmotnosti BAT byl zachován i u skupiny regresní, kde hodnoty činily 469 ± 32 mg u chladových kontrol a 431 ± 35 mg s podáním metoprololu. Mezi hmotnostmi BAT regresních potkanů bez metoprololu a s podáním metoprololu nebyl významný rozdíl. Hmotnost BAT u regresních potkanů činí 140 % hmotnosti BAT kontrolní skupiny.



Graf 4 : Hmotnosti BAT potkanů po skončení chladové adaptace (CL, 5 týdnů $8 \pm 1^\circ\text{C}$; $n=16$; **** $p<0,0001$) a po následujících dvou týdnech v kontrolních podmínkách (CLR, 2 týdny $24 \pm 1^\circ\text{C}$; $n=16$; ** $p<0,0037$) ve srovnání s kontrolní skupinou (C; $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $n=16$). Šedou barvou jsou rozlišeny hmotnosti BAT potkanů s akutním podáním metoprololu. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm S.E.M. BAT izoloval Mgr.Bc. Pavel Vebr.

5.2.2. Vliv chladové adaptace na I/R poškození

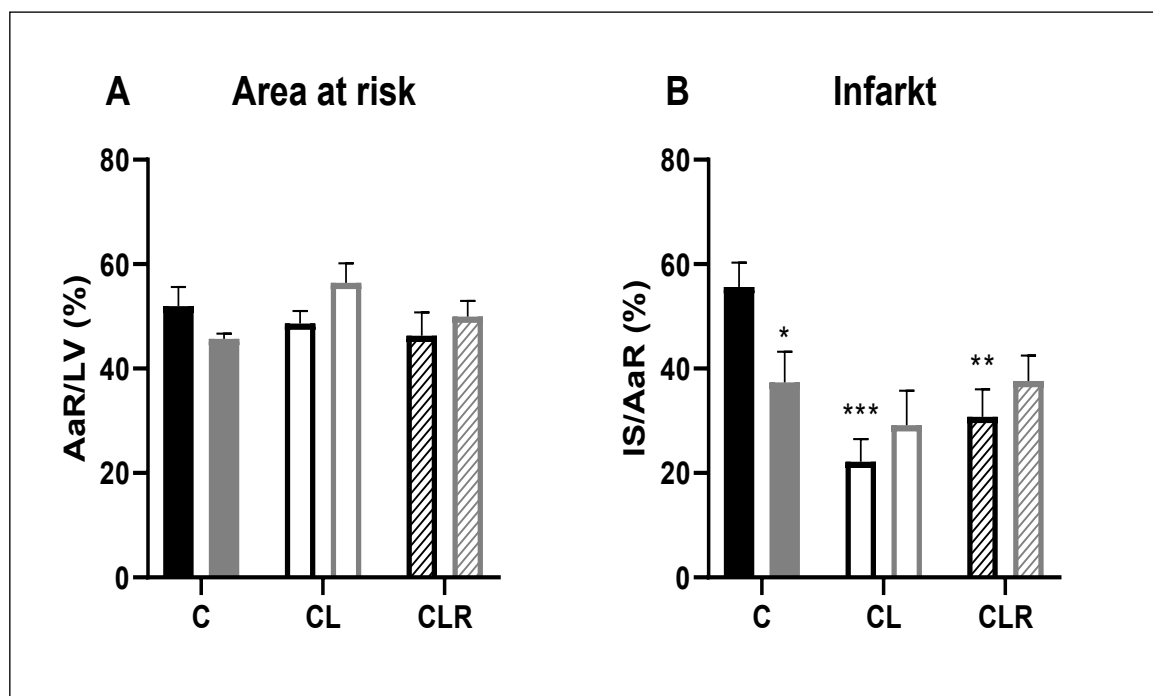
Mezi kontrolní, chladově adaptovanou a regresní skupinou se velikost AaR nelišila, hodnoty byly následující: pro kontrolní skupinu představují průměrnou velikost $52 \pm 4 \%$, pro chladově adaptovanou skupinu $49 \pm 2 \%$ a pro regresní skupinu $46 \pm 4 \%$ zasažení LV. Tato data, která nevykazují statisticky významné rozdíly, nám umožňují porovnání velikosti infarktu, vyjádřeného jako procentuální zastoupení oblasti ohrožení AaR. U kontrolní skupiny představuje infarkt $56 \pm 5 \%$ AaR. Analýza velikostí infarktu mezi jednotlivými skupinami odhalila významný kardioprotektivní účinek chladové adaptace, kde velikost infarktu klesla na $22 \pm 4 \%$ AaR, tedy 60% pokles velikosti infarktu ve srovnání s kontrolní skupinou. Významnou kardioprotekci vykazuje i regresní skupina, kde je velikost infarktu $31 \pm 5 \%$ AaR, a představuje tedy 45% snížení velikosti infarktu v porovnání s kontrolní skupinou. Naměřené výsledky jsou znázorněny grafem 5.



Graf 5 : Vliv chladové adaptace na velikost infarktu myokardu. Kontrolní skupina potkanů (C, n=8) byla chována za standardních teplotních podmínek $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Chladově adaptovaná skupina potkanů (CL, n=8), byla po dobu 5 týdnů vystavena teplotě $8 \pm 1^\circ\text{C}$ spolu se skupinou regresní (CLR, n=8), která po uplynutí 5 týdnů expozice chladu byla na 2 týdny navrácena do standardních teplotních podmínek $24 \pm 1^\circ\text{C}$. A: Zastoupení ohrožené oblasti Area at risk (AaR) levé komory (LV) v procentech. B: Vztah mezi velikostí infarktu (IS) a oblastí ohrožení (AaR) je vyjádřen v procentech. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm S.E.M. ***p < 0,0002; **p < 0,0032

5.2.3. Vliv metoprololu na I/R poškození chladově adaptovaných potkanů

Rozdíly ve velikosti oblasti ohrožení u potkanů ošetřených metoprololem nečinily statisticky významné rozdíly, kde představovaly 46 ± 1 % levé komory u kontrolní skupiny, 56 ± 4 % u chladově adaptované a 50 ± 3 % levé komory u regresní skupiny zvířat. Tato data, která nečiní statisticky významný rozdíl umožňují porovnání velikosti infarktu. Velikost infarktu u kontrolní skupiny po podání metoprololu činí 37 ± 6 % oblasti ohrožení. Podání metoprololu tedy snížilo velikost infarktu o 34 % u kontrolní skupiny potkanů. Podání této látky nemělo statisticky významný vliv na velikost infarktu u chladově adaptovaných ani regresních potkanů, kde průměrné velikosti infarktu činily 29 ± 9 % oblasti ohrožení pro chladové potkany a 38 ± 5 % pro regresní potkany. Výsledky jsou znázorněny grafem 6.



Graf 6: Vliv podání metoprololu na velikost infarktu myokardu. Kontrolní skupina potkanů (C, n=16) byla chována za standardních teplotních podmínek $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Chladově adaptovaná skupina potkanů (CL, n=16) byla po dobu 5 týdnů vystavena teplotě $8 \pm 1^\circ\text{C}$ spolu se skupinou regresní (CLR, n=16), která po uplynutí 5 týdnů expozice chladu byla na 2 týdny navrátna do standardních teplotních podmínek $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Polovina každé skupiny byla intraperitoneálně ošetřena metoprololem. A: Zastoupení ohrožené oblasti Area at risk (AaR) levé komory (LV) v procentech. B: Vztah mezi velikostí infarktu (IS) a oblastí ohrožení (AaR) je vyjádřen v procentech. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm S.E.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0032$; *** $p < 0,0002$

6. Diskuze

Ve své diplomové práci jsem navázala na diplomovou práci Mgr. Anety Marvanové a Mgr. Bc. Pavla Vebra a mým cílem bylo zjistit, jaký vliv má mírný jednodenní chlad a zda je v kardioprotektivním mechanismu chronické adaptace na chlad zapojena signalizační dráha β 1AR. Moje výsledky ukázaly, že akutní jednodenní vystavení chladu nemění velikost infarktu po podrobení potkanů I/R poškození *in vivo*. Potvrdila jsem kardioprotektivní vliv po 5týdenní chladové adaptaci a snížení infarktu o 60 %. Stejně tak jsem ukázala, že takto navozená kardioprotekce přetrvává nejméně 2 týdny po návratu potkanů do kontrolních podmínek a infarkt zůstává snížen o 45 %. Následné podání metoprololu ukázalo, že inhibice β 1 adrenergických receptorů neměla vliv na velikost infarktu ani u chladově adaptovaného potkana, ani po dvou týdnech regrese, avšak snížila velikost infarktu u kontrolních zvířat o 34 %. Tyto výsledky jsou součástí publikace, která dále ukazuje, že tento nový kardioprotektivní model chladové adaptace nemění aktivitu adenylylcyklázy ani po stimulaci přes jednotlivé stupně této signální dráhy.

Srovnáme-li velikost infarktu u našeho nového modelu, s ostatními kardioprotektivními strategiemi, tak lze pozorovat, že nejstudovanější kardioprotektivní strategie IPC snížila velikost infarktu u potkanů až o 44 % oproti kontrolní skupině (Neckář et al., 2002). Tato data jsou v souladu s pracemi četných laboratoří zabývajících se IPC při kterých byl pozorován 40-55% pokles ve velikost infarktu myokardu v závislosti na použitém experimentálním protokolu (Zhao et al., 2003; Zhang et al., 2014; Akbari et al., 2019). Obdobné výsledky při snížení velikosti infarktu využitím IPC se podařilo získat i při použití jiných druhů pokusných zvířat, jako jsou prasata (Grund et al., 1970; Schulz et al., 2005), či králíci (Jung et al., 2000). Vystavení potkanů mírné kontinuální normobarické hypoxii po dobu 3 týdnů snížilo u takto adaptovaných zvířat velikost infarktu o 32 % oproti kontrolám (Alánová et al., 2017). Významné snížení velikosti infarktu vykazuje též adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii stimulující vysokohorský tlak ekvivalentní nadmořské výšce 7000 m.n.m, které byli potkani vystaveni celkem 35krát a to 8 hodin denně po 5 dní v týdnu. Při této adaptaci bylo pozorováno 31% snížení velikosti infarktu. Tato kardioprotekce prokazatelně přetrvává minimálně 5 týdnů po ukončení adaptace, kdy bylo pozorováno snížení infarktu přibližně o 11 % oproti normoxickým kontrolám (Neckář et al., 2004). Rovněž adaptace intermitentní hypoxii, které byli potkani vystaveni 8 hodin denně po tři týdny vykazuje silnou kardioprotekci, při které bylo pozorováno 26% snížení velikosti

infarktu (Kasparova et al., 2015). Takto navozená kardioprotekce se však nezdá být silnější než protekce vyvolaná kontinuální chronickou normobarickou hypoxií, kde byl pozorován větší pokles ve velikosti infarktu. Zároveň adaptace na intermitentní hypoxii, které byli potkani vystaveni 23 hodin denně po tři týdny nevykazuje kardioprotekci, naopak byl zaznamenán 5% nárůst ve velikosti infarktu oproti normoxické kontrolní skupině (Kasparova et al., 2015). Zajímavé též je, že kardioprotektivní efekt adaptace na intermitentní hypoxii stimulující vysokohorské prostředí, které byli potkani vystaveni 8 hodin denně, 5 dní v týdnu se nezdá být aditivní s kardioprotekcí navozenou pomocí IPC (Neckář et al., 2002). Potkani adaptovaní na fyzickou zátěž nuceným během o rychlosti 25-30 m/min a to 10-50 minut denně po dobu 5 dní a následných 2 dnech odpočinku vykazovali 18% snížení velikosti infarktu myokardu ve srovnání s kontrolní skupinou (Alánová et al., 2017). Obdobných výsledků, tedy 20% snížení velikosti infarktu bylo docíleno pětidenní adaptací potkanů, na fyzickou zátěž o mírné intenzitě, která byla simulována 40 minutovým cvičením, kdy 12 minut představovala zátěž při 70 % $V_{O_{max}}$ (Ramez et al., 2019). Avšak při adaptaci potkanů na fyzickou zátěž o vysoké intenzitě, které bylo docíleno cvičením potkanů 5 po sobě jdoucích dnů 40 minut, kdy 12 minut představovala zátěž 85-90% $V_{O_{max}}$ bylo zaznamenáno až 34% snížení velikosti infarktu (Ramez et al., 2019), tedy obdobné snížení velikosti infarktu, jaké bylo pozorováno při adaptaci potkanů na chronickou normobarickou hypoxii. Kardioprotektivní fenotyp adaptace na fyzickou zátěž se však také nejeví jako aditivní adaptaci na chronickou normobarickou hypoxii (Alánová et al., 2017). Chladová adaptace použitá při zpracování této diplomové práce snížila u potkanů velikost infarktu o 60 %. U potkanů, kteří byli po chladové adaptaci navraceni do kontrolních podmínek na 2 týdny byla pozorována snížená velikost infarktu o 45 % oproti kontrolní skupině, což potvrzuje přetrvávající kardioprotekci velkého rozsahu. S ohledem na výše popsaná pozorování lze model mírné chladové adaptace řadit mezi kardioprotektivní režimy, které výrazně snižují velikost infarktu. U takto navozené protekce je navíc snížená velikost infarktu pozorovatelná ještě minimálně 2 týdny po návratu potkanů do kontrolních podmínek, což bylo prokázáno jak pokusy *ex vivo* (Vebr, 2016), tak *in vivo* (Tibenská et al., 2018) i v této práci.

V naší práci jsme ukázali, že chladová adaptace nemění aktivitu adenylylcyklázy a zvyšuje β_2 a β_3 receptory v membránové frakci (Tibenská et al., 2020). Kardiovaskulární systém reaguje na vystavení stresoru, jako je chlad prostřednictvím adrenergních receptorů. V komorovém myokardu jsou zastoupeny všechny 3 subtypy β AR, β_1 , β_2 a β_3 . Ve zdravém

srdci je poměr β AR1: β 2AR přibližně 4:1 s minimálním zastoupením β 3AR, avšak zastoupení β 1AR při srdečním selhání klesá (Bristow et al., 1989). β 1AR jsou spřaženy s heterotriménními G-proteiny, kdy aktivace těchto receptorů vede ke zvýšení intracelulárních hladin cAMP pomocí AC a následné aktivaci PKA. Chronická aktivace β 1AR je považována za škodlivou, doprovázející hypertrofii a srdeční selhání. Naproti tomu chronická aktivace β 2AR je považována za protektivní (Zhang et al., 2010). Je důležité však zmínit, že záleží jednak na délce, ale též i na intenzitě stimulace jednotlivých subtypů AR. Úloha β AR byla prokázána v kardioprotektivním režimu adaptace na hypoxii, kdy bylo pozorováno snížení poměru β 1AR: β 2AR (Mardon et al., 1998) spolu se sníženou aktivitou AC (Hrbasová et al., 2003). Tyto změny jsou považovány za protektivní při vystavení akutní ischemii myokardu. V naší práci jsme ukázali, že v levé komoře chladově adaptovaných potkanů nebyly zaznamenány změny v expresi β 1AR a PKA, avšak byla pozorována zvýšená translokace β 2 i β 3AR na sarkolemu (Tibenská et al., 2020).

Léčba pomocí β 1 blokátorů je využívána po celém světě při léčbě srdečního selhání, neboť snižuje dopad nepříznivých účinků chronické stimulace β 1AR, která má zásadní význam v patogenezi tohoto stavu. V této práci byl použit jako β 1 blokátor metoprolol. Ačkoli je metoprolol selektivní pro β 1AR, jeho vysoké dávky ztrácí kardiospecifitu a mohou zprostředkovat relaxaci cév aktivací periferních β 2AR (Yamamoto et al., 2019). Dávka metoprololu v této práci tak odpovídala odborné literatuře a činila 50 mg/kg. Mírný pokles srdeční frekvence, který je pro účinek tohoto léku typický byl pozorován téměř okamžitě po jeho podání, kdy tepová frekvence z průměrných 378 bpm na průměrných 322 bpm, avšak nebyl pozorován výrazný pokles v arteriálním krevním tlaku, který by naznačoval působení metoprololu prostřednictvím β 2AR (Yamamoto et al., 2019). Intraperitoneální podání metoprololu 20 minut před okluzí koronární arterie výrazně snížilo velikost infarktu o 34 % u kontrolních potkanů. Tyto výsledky jsou v souladu se studií METOCARD-CNIC, popisující snížení velikosti infarktu u pacientů po intravenózním podání metoprololu před reperfúzí (Ibanez et al., 2013). V naší práci však intraperitoneální podání metoprololu nemělo vliv na kardioprotekci vyvolanou chladovou adaptací, kde byla pozorována obdobná velikost infarktu u chladově adaptovaných i regresních skupin potkanů. Tyto výsledky naznačují, že signalizace pomocí β 1AR nemá zásadní vliv na kardioprotektivní fenotyp vyvolaný chladovou adaptací, ačkoli β 1AR hrají důležitou roli při vývoji NST a aktivaci BAT. V naší práci jsme ukázali nezměněnou funkci adenylylcyklázy během chladové adaptace v levé komoře myokardu (Tibenská et al., 2020). Tyto výsledky

jsou značně rozdílné od pozorování adaptace na chronickou hypoxii, která je též spojována s kardioprotekcí, nicméně při ní byla popsána snížená funkce adenylylcyklázy (Hrbasová et al., 2003) za nezměněných hladin β AR. Tyto výsledky by mohly naznačovat, že během obou kardioprotektivních režimů dochází k aktivaci odlišných intracelulárních signálních drah. Nezměněná funkce adenylylcyklázy vede k aktivaci PKA, která fosforylací ovlivňuje proteiny klíčové pro kontrakci myocytů, ale fosforylací může též ovlivňovat β 2AR a tím jejich přesmyk k protektivní signalizaci, která je zprostředkována inhibičním G-proteinem. Zajímavé je, že kombinované účinky metoprololu spolu s β 2 agonistou vykazují lepší výsledky než užití samotného β 1 blokátoru při omezení velikosti infarktu (Ahmet et al., 2005) i při léčbě potkanů vystavených chronickému stresu (Sun et al., 2014).

Při vystavení potkanů chronickému stresu byla v myokardu potkana pozorována zvýšená exprese i zvýšená hladina proteinu β 3AR (Laukova et al., 2014). Tato data jsou v souladu se zvýšenou expresí tohoto subtypu AR v myokardu chladově adaptovaného potkana (Tibenská et al., 2020). Signalizace pomocí β 3AR indukuje negativní ionotropní účinek, který je zprostředkován NOS (Gauthier et al., 1998) a obecně považován za kardioprotektivní. Avšak v pracích, které se zabývají kardioprotekcí zprostředkovanou β 3AR se často setkáváme s nesjednocenými a často i protichůdnými výsledky, což je zřejmě způsobeno využitím odlišných β 3 agonistů, jejich rozdílným dávkováním a využitím různých zvířecích modelů. V práci Salieho, podání agonisty β 3AR BRL37344 (5 μ g/kg) snížilo velikost infarktu o 50 % pak-li že byl podán 10 minut před vyvoláním ischemie, avšak podání této látky 10 minut před reperfúzí snížilo velikost infarktu o 65 % (Salie et al., 2019). Ve stejné práci pak podání BRL37344 během prvních 10 minut reperfúze snížilo velikost infarktu o 55 % (Salie et al., 2019). Podání BRL37344 myším (5 μ g/kg) před reperfúzí snížilo velikost infarktu jen o 34 % (Niu et al., 2014). Podání BRL37344 prasatům před reperfúzí snížilo velikost infarktu o 21% (5 μ g/kg) (García-Prieto et al., 2014), avšak využití látky Mirobegaronu, selektivního β 3 agonisty (v dávkách 5, 10, 50, and 500 μ g/kg) podaného před reperfúzí nemělo žádný vliv na velikost infarktu u prasete (Rossello et al., 2018). Navíc bylo pozorováno, že β 2 a β 3AR se vyskytují pouze na malém procentuálním zastoupení kardiomyocytů ve zdravém srdci (Myagmar et al., 2017). Změny v signalizaci β 2AR spolu se zvýšenou expresí β 3AR receptorů vlivem chladové adaptace by mohly významně přispívat ke kardioprotekci způsobené tímto režimem, nicméně je třeba dalších výzkumů, aby byl molekulární mechanismus kardioprotekce vyvolané chladovou adaptací plně objasněn.

Akutní vystavení chladu vyvolává u živočichů reakce, které mají minimalizovat tepelné ztráty jako jsou periferní vazokonstrikce, piloerекce a oslabení pocitů žízně (Stephens et al., 2001). V reakci na periferní vazokonstrikci dochází k redistribuci objemu plasmy, jejíž objem je mírně snížen (Kenefick et al., 2004). Tyto reakce jsou zprostředkovány zvýšenou hladinou katecholaminů, zejména noradrenalinu, kdy bylo pozorováno že plasmatické hladiny noradrenalinu stoupají již po 5 minutách vystavení chladu (O'Malley et al., 1984), což odráží aktivaci sympatického nervového systému v reakci na chlad. Pokud působení chladu přetrvává po delší dobu, dochází k produkci tepla pomocí svalového třesu. Jedná se o svalové záškuby, které začínají ve svalech trupu a poté se rozšiřují i do končetin (Bell et al., 1992). Intenzita a rozsah kontrakcí závisí na závažnosti chladového stresu. Tato třesová termogeneze je v průběhu chladové adaptace nahrazena netřesovou termogenezí (NST) po aktivaci BAT pomocí adrenergických receptorů (Foster et al., 1979).

BAT představuje unikátní orgán, nejen díky své termogenní aktivitě schopné produkovat velké množství tepla, ale též i díky strategickému umístění kolem velkých cév, ledvin a míchy. Je známo, že značné množství BAT přetrvává i u lidí až do dospělosti a to zejména u žen (Cypess et al., 2009). V souladu s potřebou přizpůsobit se teplotním podmínkám, je BAT velmi plastická tkáň, kdy po několika hodinách aktivace chladem dochází ke zvětšování zásobních úložišť BAT hypertrofickými a hyperplastickými procesy (Pro přehled (Cannon & Nedergaard, 2004)). Aktivace BAT též indukuje expresi inducibilní NOS (Nisoli et al., 1997), což by mohlo přispět ke zvýšenému průtoku krve, který je nezbytný pro trofickou adaptaci BAT během chladové adaptace. BAT se aktivuje téměř okamžitě po vystavení organismu chladu a to zejména skrz aktivaci adrenergických receptorů, především subtypů $\beta 1AR$ a $\beta 3AR$ (Riis-Vestergaard et al., 2020). Dráha signální transdukce vede přes zvýšení intracelulárních hladin cAMP a PKA, vedoucí k fosforylaci řady proteinů jako je hormon senzitivní lipáza (Holm et al., 1987). Volné mastné kyseliny pak slouží jako substráty pro termogenezi a jsou popsány jako aktivátory UCP1 (Cunnungham et al., 1986). UCP1 je hlavní efektor NST, který se hojně nachází ve vnitřní mitochondriální membráně adipocytů BAT, kde umožňuje odpojení oxidativní fosforylace prostřednictvím regulovaného úniku protonů zpět do mitochondriální matrix za uvolnění tepla. Zvýšená transkripce UCP1 je detekovatelná již během pár minut po vystavení organismu chladu (Ricquier et al., 1984). Vedle BAT, je UCP1 exprimován v tzv. běžových adipocytech, které jsou rozptýleny v bílé tukové tkáni. Pod vlivem sympatického nervového systému v chladové adaptaci, kdy dochází k uvolnění noradrenalinu dojde přes aktivaci βAR ke

stimulaci exprese UCP1, ale též ke při stimulaci běžových adipocytů v procesu “zhnědnutí“ (Wu et al., 2012).

Při zpracování diplomové práce byl použit model postupné mírné chladové adaptace, kdy jsou potkani chováni v teplotách $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Tento model byl vyvinut na našem pracovišti před 7 lety a jako první jsme ukázali jeho kardioprotektivní účinek bez vedlejších negativních vlivů jako je hypertenze a srdeční hypertrofie. V modelech chladové adaptace se kterými se setkáme v odborné literatuře autoři převážně používají nízkých teplot v rozmezí $3 - 4^\circ\text{C}$, které často způsobují zvýšený krevní tlak a hypertrofii levé komory (Sun et al., 1997; Fregly et al., 1989). Dále v důsledku použití příliš nízkých teplot dochází k poškození ledvin a dehydrataci organismu. Model mírné chladové adaptace předchází hypertrofii levé komory, jak ve své diplomové práci prokázala Aneta Marvanová. Dále také tento model předchází poškození ledvin což bylo potvrzeno analýzou moči (Marvanová, 2015). V této práci jsme prokázali signifikantní zvýšení BAT v mezilopatkové oblasti o 187 % po 5 týdnech adaptace na chlad při $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Hmotnost BAT u regresních potkanů vykazovala pokles oproti potkanům chladově adaptovaným, kde jejich hmotnost vykazovala 144% hmotnosti BAT kontrolních potkanů. Zvýšení hmotnosti BAT u chladových skupin potkanů je v souladu s pracemi četných laboratoří, které se zabývají vlivem chladové expozice na orgány (Wang et al., 2015) a svědčí tak o úspěšné adaptaci na chlad (Bukowiecki et al., 1982; Ogawa et al., 1992; Xing et al., 2014). Všichni zmiňovaní autoři využívali pro studium chladové adaptace vystavení potkanů 4°C . Ogawa zaznamenal 175% nárůst hmotnosti BAT v mezilopatkové oblasti u chladově adaptovaných potkanů po 4 týdnech adaptace, což nepředstavuje významný rozdíl oproti hmotnosti BAT chladově adaptovaných potkanů naměřené v této práci po 5 týdnech adaptace (Ogawa et al., 1992). Tato data svědčí o úspěšné chladové adaptaci a rozvoji NST po 5 týdnech vystavení mírnému chladu $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Kontrolní skupiny potkanů ve výše zmíněných pokusech byly chovány při 25°C . Bukowiecki zaznamenal hmotnost BAT kontrolních potkanů v pokusu necelých 290 mg (Bukowiecki et al., 1982). Tyto hmotnosti jsou nižší než hmotnosti BAT kontrolních potkanů naměřené v této práci, kde hodnoty u kontrolních potkanů činí průměrně 319 mg. Tento rozdíl by mohl být způsoben odlišným pohlavím potkanů v pokusech, či nižší celkovou hmotností zvířat, které autoři použili. Hmotnost zvířat ve zmiňovaných pokusech se pohybovala v rozpětí 250–300 g, avšak autoři neuvádějí hmotnostní poměr BAT/hmotnost potkanů. Tedy rozdíl v celkové hmotnosti potkanů by mohl vysvětlovat rozdílné hodnoty BAT u kontrolních skupin potkanů.

Ohledně expozice chladu a jeho vlivu na kardiovaskulární systém se většina studií zaměřuje na akutní expozici, která je chápána jako rizikový faktor a to zejména u žen (L Ullevig et al., 2018). Mnoho studií popisuje též korelaci mezi akutní expozicí chladu úmrtností v zimním období. Výsledky v této práci odhalují, že akutní vystavení potkanů chladu v zimním období na 24 hodin nemá vliv na velikost infarktu, která byla shodná s kontrolní skupinou. Tyto výsledky, které nevykazují detrimentální vliv akutní expozice chladu na velikost I/R poškození mohou být způsobeny mírnějším modelem vystavení chladu, který nevykazuje tolik negativních patofyziologických vlivů jako modely využívající teploty 4 °C, jak bylo popsáno výše.

Dlouhodobá chladová adaptace naopak vykazuje řadu příznivých účinků na organismus jako je zlepšená imunitní odpověď, zlepšená vaskulární reaktivita a nedávno byla popsána i jako možná prevence mozkové mrtvice (Peng et al., 2018). Ohledně vlivu chladové adaptace na I/R poškození není v současné době dostatek odborné literatury, vzhledem k tomu že chladová adaptace jako kardioprotektivní režim je naprosto nový model. Pozitivní vliv mírné chladové adaptace na srdce popisují ve svých diplomových pracích Mgr. Aneta Benešová a Mgr. Bc. Pavel Vebr, kteří poprvé ukázali snížení ve velikosti I/R poškození při použití tohoto režimu (Marvanová, 2015; Vebr, 2016). V souladu s jejich pracemi jsou i tyto výsledky, které potvrzují výrazný pokles ve velikosti infarktu u chladově adaptovaných potkanů, který činí 60% snížení oproti kontrolám při využití modelu 5týdenní postupné mírné chladové adaptace.

Úbytek tělesné hmotnosti nebo snížený přírůstek tělesné hmotnosti u potkanů může být známkou zvýšeného energetického výdeje proti příjmům, ale i následkem bolesti, stresu a nepohodlí (Hau, 2010). Při zpracování této práce nebyly zaznamenány významné rozdíly hmotností mezi jednotlivými skupinami, a to ani při akutním, ani při chronickém vystavení chladu, přestože je známo, že sympatický nervový systém prostřednictvím noradrenalinu hraje ústřední roli v reakci organismu na stres. Obdobná váha u skupin chladových, regresních i kontrolních v chronickém pokusu by mohla být způsobena modelem mírné chladové adaptace využívající teplot 8 ± 1 °C.

K předcházení sociálního stresu u potkanů bylo docíleno chováním potkanů v páru. Při protokolu I/R poškození *in vivo* s následnou analýzou velikosti infarktu byli potkani z jedné klece též anestetizováni najednou, aby zvýšená srdeční frekvence, zvýšená sekrece hormonů a změna tělesné teploty, které se vyskytují u krátkodobého sociálního stresu nezkreslovaly výsledky pokusu (Sgoifo et al., 1999). V našich podmínkách byla potkanům pravidelně

měřena rektální teplota, která se pohybovala v rozmezí 36 - 37,5 °C dokazující, že v průběhu experimentu nedocházelo k podchlazení potkanů, což svědčí o mírnosti této adaptace.

7. Závěr

Model mírné chladové adaptace, jako nový kardioprotektivní režim, který byl využit při zpracování této práce prokazatelně snižuje velikost infarktu při I/R poškození *in vivo* v srdci chladově adaptovaného potkana. Tato významná endogenní protekce přetrvává minimálně i po následující dva týdny, kdy byla rovněž pozorovatelná signifikantně snížená velikost infarktu. Tyto výsledky ukazují, že model mírné chladové adaptace patří mezi silné kardioprotektivní režimy. Zároveň, při akutním 24 hodinovém vystavení potkanů chladu bylo prokázáno, že tato expozice nemá vliv na velikost I/R poškození, kdy byla pozorována obdobná velikost infarktu experimentální i kontrolní skupiny.

K prokázání chladové adaptace při teplotách $8 \pm 1^\circ\text{C}$, což je teplota vyšší, než se kterými se setkáváme v odborné literatuře, sloužil odběr a vážení mezilopatkové BAT, jako klíčového orgánu netřesové termogeneze. U chladových skupin potkanů byl významný nárůst této tkáně oproti skupinám kontrolním, což svědčí o úspěšném průběhu chladové adaptace při těchto teplotách. Při využití modelu mírné chladové adaptace bylo již v minulosti prokázáno, že nezpůsobuje hypertrofii srdce, ani jiné patologické stavy, které se vyskytují při chladové adaptaci za využití nižších teplot.

Aktivace β_1 adrenergických receptorů, které v srdci představují až 70% všech β AR, představuje primární mechanismus zvyšování ionotropie a chronotropie při stresu. Blokáda tohoto subtypu AR pomocí antagonisty metoprololu patří mezi často využívané postupy při léčbě kardiovaskulárních onemocnění v klinické praxi. Bylo pozorováno, že chladová adaptace nemění zastoupení β_1 AR v srdci potkana. Při zpracování této práce byl potkanům podáván metoprolol intraperitoneálně v dávce 50 mg/kg. Tato dávka výrazně snížila velikost infarktu po I/R poškození u kontrolních potkanů chovaných při 24°C . Podání metoprololu však nemělo vliv na velikost I/R poškození myokardu u chladově adaptované ani u regresní skupiny potkanů. Tyto výsledky naznačují, že tento subtyp AR nemá primární úlohu v kardioprotekci vyvolané chladovou adaptací. Během chladové adaptace byla v odborné literatuře popsána zvýšená exprese β_3 AR v srdci potkana. Tento subtyp receptorů má klíčovou roli v BAT a aktivaci NST. Zvýšená translokace β_2 a β_3 AR na sarkolemu spolu se změnou poměru $\beta_1:\beta_2$ AR by mohly mít zásadní význam při kardioprotekci vyvolané chladovou adaptací.

Tato práce poskytuje zajímavé výsledky o vlivu chladové adaptace na srdce spolu s účinky β_1 adrenergní signalizace. Zároveň také nabízí možné směry ve výzkumu, které by mohly pomoci odhalit doposud neznámý molekulární mechanismus kardioprotekce vyvolané tímto režimem.

Seznam použité literatury

- Abdallah, Y., Kasseckert, S. A., Iraqi, W., Said, M., Shahzad, T., Erdogan, A., ... Ladilov, Y. (2011). Interplay between Ca²⁺ cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(11), 2478–2485. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01249.x>
- Ahmet, I., Lakatta, E. G., & Talan, M. I. (2005). Pharmacological stimulation of β 2-adrenergic receptors (β 2AR) enhances therapeutic effectiveness of β 1AR blockade in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. *Heart Failure Reviews*, 10(4), 289–296. <https://doi.org/10.1007/s10741-005-7543-3>
- Akbari, Z., Esmailidehaj, M., Avarand, E., Shariati, M., & Pourkhalili, K. (2019). Ischemic Preconditioning Efficacy Following Anabolic Steroid Usage: A Clear Difference Between Sedentary and Exercise-Trained Rat Hearts. *Cardiovascular Toxicology*, 19(4), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s12012-018-9497-4>
- Alánová, P., Chytilová, A., Neckář, J., Hrdlika, J., Míová, P., Holzerová, K., ... Myocardial, K. F. (2017). Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *J Appl Physiol*, 122, 1452–1461. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00671>
- Alánová, P., Chytilová, A., Neckář, J., Hrdlička, J., Míčová, P., Holzerová, K., ... Kolář, F. (2017). Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 122(6), 1452–1461. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00671.2016>
- Ausma, J., Dispersyn, G. D., Duimel, H., Thoné, F., Ver Donck, L., Allessie, M. A., & Borgers, M. (2000). Changes in ultrastructural calcium distribution in goat atria during atrial fibrillation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(3), 355–364. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.1090>
- Avkiran, M., & Marber, M. S. (2002, March 6). Na⁺/H⁺ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: Progress, problems and prospects. *Journal of the American College of Cardiology*. *J Am Coll Cardiol*. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)01693-5](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01693-5)
- Barnoy, S., Zipser, Y., Glaser, T., Grimberg, Y., & Kosower, N. S. (1999). Association of calpain (Ca²⁺-dependent thiol protease) with its endogenous inhibitor calpastatin in myoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 74(4), 522–531. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19990915\)74:4<522::AID-JCB2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19990915)74:4<522::AID-JCB2>3.0.CO;2-I)
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M. A., & Bernardi, P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18558–18561. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500089200>

- Becker, L. B. (2004, February 15). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*. Oxford Academic. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.10.025>
- Bell, D. G., Tikuisis, P., & Jacobs, I. (1992). Relative intensity of muscular contraction during shivering. *Journal of Applied Physiology*, 72(6), 2336–2342. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.6.2336>
- Bergeron, M., Yu, A. Y., Solway, K. E., Semenza, G. L., & Sharp, F. R. (1999). Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4159–4170. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00845.x>
- Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabó, I., & Zoratti, M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 2934–2939. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1737749>
- Bers, D. M. (2002, January 10). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/415198a>
- Betts, R., Weinsheimer, S., Blouse, G. E., & Anagli, J. (2003). Structural determinants of the calpain inhibitory activity of calpastatin peptide B27-WT. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7800–7809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208350200>
- Birnbaum, Y., Hale, S. L., & Kloner, R. A. (1997). Ischemic Preconditioning at a Distance. *Circulation*, 96(5), 1641–1646. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.5.1641>
- Bolli, R., Stein, A. B., Guo, Y., Wang, O. L., Rokosh, G., Dawn, B., ... Xuan, Y. T. (2011). A murine model of inducible, cardiac-specific deletion of STAT3: Its use to determine the role of STAT3 in the upregulation of cardioprotective proteins by ischemic preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(4), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.01.002>
- Braasch, W., Gudbjarnason, S., Puri, P. S., Ravens, K. G., & Bing, R. J. (1968). Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs. *Circulation Research*, 23(3), 429–438. <https://doi.org/10.1161/01.RES.23.3.429>
- Bristow, M. R., Hershberger, R. E., Port, J. D., Minobe, W., & Rasmussen, R. (1989). Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Molecular Pharmacology*, 35(3).
- Brittsan, A. G., Ginsburg, K. S., Chu, G., Yatani, A., Wolska, B. M., Schmidt, A. G., ... Kranias, E. G. (2003). Chronic SR Ca²⁺-ATPase inhibition causes adaptive changes in cellular Ca²⁺ transport. *Circulation Research*, 92(7), 769–776. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000066661.49920.59>
- Brown, D. A., Chicco, A. J., Jew, K. N., Johnson, M. S., Lynch, J. M., Watson, P. A., &

- Moore, R. L. (2005). Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *Journal of Physiology*, 569(3), 913–924. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.095729>
- Brown, D. A., Jew, K. N., Sparagna, G. C., Musch, T. I., & Moore, R. L. (2003). Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *Journal of Applied Physiology*, 95(6), 2510–2518. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00487.2003>
- Bukowiecki, L., Collet, A. J., & Follae, N. (1982). Brown adipose tissue hyperplasia: A fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 5(6). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1982.242.6.e353>
- Calvert, J. W., Condit, M. E., Aragón, J. P., Nicholson, C. K., Moody, B. F., Hood, R. L., ... Lefer, D. J. (2011). Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of $\beta(3)$ -adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circulation Research*, 108(12), 1448–1458. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.241117>
- Cannavo, A., Rengo, G., Liccardo, D., Pun, A., Gao, E., George, A. J., ... Koch, W. J. (2017). $\beta 1$ -Blockade Prevents Post-Ischemic Myocardial Decompensation Via $\beta 3$ AR-Dependent Protective Sphingosine-1 Phosphate Signaling. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(2), 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.020>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004, January). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Chen, M., Won, D. J., Krajewski, S., & Gottlieb, R. A. (2002). Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29181–29186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204951200>
- Chen, Q., & Vazquez, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria-Central role of complex III BioEnergetics 2014 View project MCFA oxidation in liver View project Charles Hoppel Case Western Reserve University. *Article in Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304854200>
- Choi, D. J., Koch, W. J., Hunter, J. J., & Rockman, H. A. (1997). Mechanism of β -adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased β -adrenergic receptor kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(27), 17223–17229. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.17223>
- Cohen, M. V., Yang, X. M., & Downey, J. M. (2007). The pH hypothesis of postconditioning: Staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*, 115(14), 1895–1903. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675710>
- Condrelli, G., Morisco, C., Latronico, M. V. G., Claudio, P. P., Dent, P., Tschlis, P., ...

- Napoli, C. (2002). TNF- α signal transduction in rat neonatal cardiac myocytes: definition of pathways generating from the TNF- α receptor. *The FASEB Journal*, *16*(13), 1732–1737. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0419com>
- Costa, A. D. T., Garlid, K. D., West, I. C., Lincoln, T. M., Downey, J. M., Cohen, M. V., & Critz, S. D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation Research*, *97*(4), 329–336. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000178451.08719.5b>
- Crompton, M., Ellinger, H., & Costi, A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J* (Vol. 255).
- Cunningham, S. A., Wiesinger, H., & Nichols, D. G. (1986). Quantification of fatty acid activation of the uncoupling protein in brown adipocytes and mitochondria from the guinea-pig. *European Journal of Biochemistry*, *157*(2), 415–420. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09683.x>
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., ... Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1509–1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the β 2-adrenergic receptor to different g proteins by protein kinase A. *Nature*, *390*(6655), 88–91. <https://doi.org/10.1038/36362>
- De Lucia, C., Gambino, G., Petraglia, L., Elia, A., Komici, K., Femminella, G. D., ... Rengo, G. (2018). Long-term caloric restriction improves cardiac function, remodeling, adrenergic responsiveness, and sympathetic innervation in a model of postischemic heart failure. *Circulation: Heart Failure*, *11*(3). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004153>
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, *399*(6736), 601–605. <https://doi.org/10.1038/21224>
- Duncan, D. J., Yang, Z., Hopkins, P. M., Steele, D. S., & Harrison, S. M. (2010). TNF- α and IL-1 β increase Ca²⁺ leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium*, *47*(4), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.02.002>
- Eliseev, R. A., Gunter, K. K., & Gunter, T. E. (2002). Bcl-2 sensitive mitochondrial potassium accumulation and swelling in apoptosis. *Mitochondrion*, *1*(4), 361–370. [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(01\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(01)00039-3)
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., & Lohse, M. J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in β 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(12), 7059–7064.

<https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.7059>

- Ferré, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Popoli, P., Burgueño, J., Gutiérrez, M. A., ... Ciruela, F. (2002). Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11940–11945. <https://doi.org/10.1073/pnas.172393799>
- Ferro, A., Queen, L. R., Priest, R. M., Xu, B., Ritter, J. M., Poston, L., & Ward, J. P. T. (1999). Activation of nitric oxide synthase by β_2 -adrenoceptors in human umbilical vein endothelium *in vitro*. *British Journal of Pharmacology*, 126(8), 1872–1880. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702512>
- Finkel, T. (2011, July 11). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Foster, D. O., & Frydman, M. L. (1979). Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: The dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(3), 257–270. <https://doi.org/10.1139/y79-039>
- Fregly, M. J., Kikta, D. C., Threatte, R. M., Torres, J. L., & Barney, C. C. (1989). Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *Journal of Applied Physiology*, 66(2), 741–749. <https://doi.org/10.1152/jappl.1989.66.2.741>
- Fujiisg, J., Maruyamasll, K., Tadall, M., & Maclennan\$, D. H. (1969). Expression and Site-specific Mutagenesis of Phospholamban; *The Journal of biological chemistry, Studies of residues involved in phosphorylation and pentamer formation** (Vol. 264).
- Fukazawa, R., Miller, T. A., Kuramochi, Y., Frantz, S., Kim, Y. D., Marchionni, M. A., ... Sawyer, D. B. (2003). Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(12), 1473–1479. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.09.012>
- Gao, X., Zhang, H., Belmadani, S., Wu, J., Xu, X., Elford, H., ... Zhang, C. (2008). Role of TNF- α -induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 295(6), H2242. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00587.2008>
- García-Prieto, J., García-Ruiz, J. M., Sanz-Rosa, D., Pun, A., García-Alvarez, A., Davidson, S. M., ... Ibanez, B. (2014). β_3 adrenergic receptor selective stimulation during ischemia/reperfusion improves cardiac function in translational models through inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology*, 109(4), 422. <https://doi.org/10.1007/s00395-014-0422-0>
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J. N., Khandoudi, N., Bril, A., ... Le Marec, H. (1998). The negative inotropic effect of β_3 -adrenoceptor stimulation is mediated by

- activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *Journal of Clinical Investigation*, 102(7), 1377–1384. <https://doi.org/10.1172/JCI2191>
- Gerhardstein, B. L., Puri, T. S., Chien, A. J., & Hosey, M. M. (1999). Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the $\beta 2$ subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*, 38(32), 10361–10370. <https://doi.org/10.1021/bi990896o>
- Gho, B. C. G., Schoemaker, R. G., Van den Doel, M. A., Duncker, D. J., & Verdouw, P. D. (1996). Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*, 94(9), 2193–2200. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.9.2193>
- Gomez, L., Thibault, H., Gharib, A., Dumont, J. M., Vuagniaux, G., Scalfaro, P., ... Ovize, M. (2007). Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 293(3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01378.2006>
- Griffiths, E. J., Ocampo, C. J., Savage, J. S., Rutter, G. A., Hansford, R. G., Stern, M. D., & Silverman, H. S. (1998). Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 39(2), 423–433. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00104-7)
- Gross, E. R., Hsu, A. K., & Gross, G. J. (2004). Opioid-Induced Cardioprotection Occurs via Glycogen Synthase Kinase β Inhibition during Reperfusion in Intact Rat Hearts. *Circulation Research*, 94(7), 960–966. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000122392.33172.09>
- Grund, F., Sommerschild, H. T., Kirkebøen, K. A., & Ilebekk, A. (1997). Proarrhythmic effects of ischemic preconditioning in anesthetized pigs. *Basic Research in Cardiology*, 92(6), 417–425. <https://doi.org/10.1007/BF00796216>
- Gu, S., Hua, H., Guo, X., Jia, Z., Zhang, Y., Maslov, L. N., ... Ma, H. (2018). PGC-1 α Participates in the Protective Effect of Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia on Cardiomyocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(5), 1891–1902. <https://doi.org/10.1159/000494869>
- Guan, L., Che, Z., Meng, X., Yu, Y., Li, M., Yu, Z., ... Yu, M. (2019). MCU Up-regulation contributes to myocardial ischemia-reperfusion Injury through calpain/OPA-1-mediated mitochondrial fusion/mitophagy Inhibition. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(11), 7830–7843. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14662>
- Halestrap, A. P. (1991). Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic damage. *Biochemical Journal*, 278(3), 715–719. <https://doi.org/10.1042/bj2780715>
- Harden, W. R., Barlow, C. H., Simson, M. B., & Harken, A. H. (1979). Temporal relation between onset of cell anoxia and ischemic contractile failure. Myocardial ischemia and

- left ventricular failure in the isolated, perfused rabbit heart. *The American Journal of Cardiology*, 44(4), 741–746. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(79\)90296-0](https://doi.org/10.1016/0002-9149(79)90296-0)
- Hermida, N., Michel, L., Esfahani, H., Dubois-Deruy, E., Hammond, J., Bouzin, C., ... Balligand, J.-L. (2017). Cardiac myocyte β_3 -adrenergic receptors prevent myocardial fibrosis by modulating oxidant stress-dependent paracrine signaling. *European Heart Journal*, Volume 39, Issue 10, 07 March 2018, Pages 888–898, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx366>
- Hernando, V., Insete, J., Sartório, C. L., Parra, V. M., Poncelas-Nozal, M., & Garcia-Dorado, D. (2010). Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(2), 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.02.024>
- Heusch, G., Musiolik, J., Kottenberg, E., Peters, J., Jakob, H., & Thielmann, M. (2012). STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans: short communication. *Circulation Research*, 110(1), 111–115. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.259556>
- Hjalmarson, A., Goldstein, S., Fagerberg, B., Wedel, H., Waagstein, F., Kjeksus, J., ... Yellen, L. (1999). Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*, 353(9169), 2001–2007. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)04440-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04440-2)
- Holm, C., Fredrikson, G., Cannon, B., & Belfrage, P. (1987). Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: Identification and effect of cold exposure. *Bioscience Reports*, 7(11), 897–904. <https://doi.org/10.1007/BF01119481>
- Holzerová, K., Hlaváčková, M., Žurmanová, J., Borchert, G., Neckář, J., Kolář, F., ... Nováková, O. (2015). Involvement of PKC ϵ in Cardioprotection Induced by Adaptation to Chronic Continuous Hypoxia. *Physiol. Res*, 64, 191–201. Retrieved from www.biomed.cas.cz/physiolres
- Hrbasová, M., Novotny, J., Hejnová, L., Kolář, F., Neckář, J., & Svoboda, P. (2003). Altered myocardial G_s protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *Journal of Applied Physiology*, 94(6), 2423–2432. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00958.2002>
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., & Franklin Bunn, H. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 32253–32259. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.32253>
- Ibanez, B., Macaya, C., Sánchez-Brunete, V., Pizarro, G., Fernández-Friera, L., Mateos, A., ... Fuster, V. (2013). Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial. *Circulation*, 128(14), 1495–1503.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003653>

- Inserte, J., Hernando, V., Ruiz-Meana, M., Poncelas-Nozal, M., Fernández, C., Agulló, L., ... Garcia-Dorado, D. (2014). Delayed phospholamban phosphorylation in post-conditioned heart favours Ca²⁺ normalization and contributes to protection. *Cardiovascular Research*, Volume 103, Issue 4, 1 September 2014, Pages 542–553, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu163>
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., ... Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468–472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>
- Jann Hau, S. J. S. (2010). *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume I, Third Edition: Essential Principles and Practices*. CRC Press. Retrieved from <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Laboratory-Animal-Science-Volume-I-Third-Edition-Essential/Hau-Schapiro/9781420084559>
- Jennings, R. B., Hawkins, H. K., Lowe, J. E., Hill, M. L., Klotman, S., & Reimer, K. A. (1978). Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *The American Journal of Pathology*, 92(1), 187–214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/686146>
- Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A., & Linn, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Archives of Pathology*, 70, 68–78.
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., & Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 17771–17778. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17771>
- Juhaszova, M., Zorov, D. B., Kim, S.-H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K. W., ... Sollott, S. J. (2004). Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(11). <https://doi.org/10.1172/JCI200419906>
- Jung, O., Jung, W., Malinski, T., Wiemer, G., Schoelkens, B. A., & Linz, W. (2000). Ischemic preconditioning and infarct mass: The effect of hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Clinical and Experimental Hypertension*, 22(2), 165–179. <https://doi.org/10.1081/CEH-100100070>
- Kajitani, K., Fujihashi, M., Kobayashi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., & Miki, K. (2008). Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96-Å resolution. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 70(4), 1635–1639. <https://doi.org/10.1002/prot.21855>
- Kasparova, D., Neckar, J., Dabrowska, L., Novotny, J., Mraz, J., Kolar, F., & Zurmanova, J. (2015). Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiological Genomics*, 47(12), 612–620.

<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00058.2015>

- Kenefick, R. W., Hazzard, M. P., Mahood, N. V., & Castellani, J. W. (2004). Thirst sensations and AVP responses at rest and during exercise-cold exposure. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36(9), 1528–1534.
<https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000139901.63911.75>
- Kerendi, F., Kin, H., Halkos, M. E., Jiang, R., Zatta, A. J., Zhao, Z. Q., ... Vinten-Johansen, J. (2005). Remote postconditioning: Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Research in Cardiology*, 100(5), 404–412.
<https://doi.org/10.1007/s00395-005-0539-2>
- Kim, H. E., Du, F., Fang, M., & Wang, X. (2005). Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17545–17550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507900102>
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., & Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972), 360–364.
<https://doi.org/10.1038/nature02246>
- Kodl. (2014). Zprava o zdraví obyvatel České republiky.
- Kroll, K., Decking, U. K. M., Dreikorn, K., & Schrader, J. (1993). Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circulation Research*, 73(5), 846–856. <https://doi.org/10.1161/01.RES.73.5.846>
- L Ullevig, S., Umeda, M., Chung, E., L Sesatty, A., E Samsuhadi, K., & L Fogt, D. (2018). Effects of acute cold exposure on plasma inflammatory and lipid biomarkers related to cardiovascular disease risk. *Journal of Integrative Cardiology*, 4(6).
<https://doi.org/10.15761/jic.1000266>
- Lacerda, L., Somers, S., Opie, L. H., & Lecour, S. (2009). Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovascular Research*, Volume 84, Issue 2, 1 November 2009, Pages 173 - 175, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp298>
- Laukova, M., Tillinger, A., Novakova, M., Krizanova, O., Kvetnansky, R., & Myslivecek, J. (2014). Repeated immobilization stress increases expression of β 3-adrenoceptor in the left ventricle and atrium of the rat heart. *Stress and Health*, 30(4), 301–309.
<https://doi.org/10.1002/smi.2515>
- Lemasters, J., Theruvath, T., Zhong, Z., & Nieminen, a. (2010). Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition in Cell Death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(11), 1395–1401. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.06.009>. Mitochondrial
- Lennon, S. L., Quindry, J., Hamilton, K. L., French, J., Staib, J., Mehta, J. L., & Powers, S. K. (2004). Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *Journal of*

- Applied Physiology, 96(4), 1299–1305. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00920.2003>
- Lesnefsky, E. J., Tandler, B., Ye, J., Slabe, T. J., Turkaly, J., & Hoppel, C. L. (1997). Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 273(3 42-3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.3.h1544>
- Levy, F. O., Zhu, X., Kauman, A. J., & Birnbaumer, L. (1993). Efficacy of β 1-adrenergic receptors is lower than that of β 2-adrenergic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), 10798–10802. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10798>
- Li, X., Liu, M., Sun, R., Zeng, Y., Chen, S., & Zhang, P. (2016, December 1). Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*. Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3877>
- Liggett, S. B., Freedman, N. J., Schwinn, D. A., & Lefkowitz, R. J. (1993). Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric β 3/ β 2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3665–3669. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3665>
- Lim, S. Y., Davidson, S. M., Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2007). Preconditioning and postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research*, 75(3), 530–535. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.022>
- Liu, G. S., Thornton, J., Van Winkle, D. M., Stanley, A. W. H., Olsson, R. A., & Downey, J. M. (1991). Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 84(1), 350–356. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.84.1.350>
- Lohmann, D., Liebold, F., Heilmann, W., Senger, H., & Pohl, A. (1978). Diminished insulin response in highly trained athletes. *Metabolism*, 27(5), 521–524. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(78\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0026-0495(78)90017-3)
- Lv, Y., Ren, Y., Sun, L., Wang, S., Wei, M., & Jia, D. (2013). Protective Effect of Na⁺/Ca²⁺ Exchange Blocker KB-R7943 on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Hypercholesterolemic Rats. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 66(2), 357–363. <https://doi.org/10.1007/s12013-012-9474-7>
- MacLennan, D. H., & Kranias, E. G. (2003, July 1). Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm1151>
- Marber, M. S., Latchman, D. S., Walker, J. Malcolm, & Yellon, D. M. (1993). Cardiac Stress Protein Elevation 24 Hours After Brief Ischemia or Heat Stress Is Associated With Resistance to Myocardial Infarction. Retrieved from *Circulation*. 1993;88:1264-1272.
- Marck, P. V., & Pierre, S. V. (2018, August 9). Na/K-ATPase signaling and cardiac

- pre/postconditioning with cardiogenic steroids. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19082336>
- Mardon, K., Merlet, P., Syrota, A., & Mazière, B. (1998). Effects of 5-day hypoxia on cardiac adrenergic neurotransmission in rats. *Journal of Applied Physiology*, 85(3), 890–897. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.3.890>
- Marvanová, A. (2015). Genová exprese vybraných genů v srdci potkana dlouhodobě adaptovaného na chlad v mírných podmínkách. *Diplomová Práce*, 13–91.
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., & Marks, A. R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101(4), 365–376. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80847-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80847-8)
- Maxwell, P. H., Wlesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., ... Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271–275. <https://doi.org/10.1038/20459>
- Mewton, N., Cung, T. T., Morel, O., Cayla, G., Bonnefoy-Cudraz, E., Rioufol, G., ... Ovize, M. (2015). Rationale and design of the Cyclosporine to Improve Clinical Outcome in ST-elevation myocardial infarction patients (the CIRCUS trial). *American Heart Journal*, 169(6), 758-766.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2015.02.020>
- Montgomery, C., Hamilton, N., & Ianuzzo, C. D. (1991). Effects of different rates of cardiac pacing on rat myocardial energy status. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 102(2), 95–100. <https://doi.org/10.1007/BF00234567>
- Moon, C. M., Kim, Y. H., Ahn, Y. K., Jeong, M. H., & Jeong, G. W. (2019). Metabolic alterations in acute myocardial ischemia-reperfusion injury and necrosis using in vivo hyperpolarized [1-13C] pyruvate MR spectroscopy. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54965-7>
- Moondra, V., Sarma, S., Buxton, T., Safa, R., Cote, G., Storer, T., ... B Sawyer, D. (2009). Serum Neuregulin-1 β as a Biomarker of Cardiovascular Fitness. *The Open Biomarkers Journal*, 2(1), 1–5. <https://doi.org/10.2174/1875318300902010001>
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Retrieved from *Circulation* 74, No. 5, 1124-1136, 1986.
- Mustafa, S. J., Morrison, R. R., Teng, B., & Pelleg, A. (2009). Adenosine receptors and the heart: Role in regulation of coronary blood flow and cardiac electrophysiology. *Handbook of Experimental Pharmacology*. NIH Public Access. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9_6
- Myagmar, B. E., Flynn, J. M., Cowley, P. M., Swigart, P. M., Montgomery, M. D., Thai, K., ... Simpson, P. C. (2017). Adrenergic receptors in individual ventricular myocytes: the

- beta-1 and alpha-1B are in all cells, the alpha-1A is in a subpopulation, and the beta-2 and beta-3 are mostly absent. *Circulation Research*, 120(7), 1103–1115.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310520>
- Nagoshi, T., Matsui, T., Aoyama, T., Leri, A., Anversa, P., Li, L., ... Rosenzweig, A. (2005). PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2128–2138.
<https://doi.org/10.1172/JCI23073>
- Nan, J., Hu, H., Sun, Y., Zhu, L., Wang, Y., Zhong, Z., ... Wang, J. (2017). TNFR2 Stimulation Promotes Mitochondrial Fusion via Stat3- and NF-κB-Dependent Activation of OPA1 Expression. *Circulation Research*, 121(4), 392–410.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311143>
- Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F. D., ... Kharbanda, S. (1999). Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 8144–8149.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8144>
- Natarajan, R., Salloum, F. N., Fisher, B. J., Kukreja, R. C., & Fowler, A. A. (2006). Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation Research*, 98(1), 133–140.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000197816.63513.27>
- Nayler, W. G. (1981). The role of calcium in the ischemic myocardium. *The American Journal of Pathology*, 102(2), 262–270. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7008622>
- Neckář, J., Ošťádal, B., & Kolář, F. (2004). Myocardial Infarct Size-Limiting Effect of Chronic Hypoxia Persists for Five Weeks of Normoxic Recovery. *Physiol. Res*, 53, 621–628. Retrieved from <http://www.biomed.cas.cz/physiolres>
- Neckář, Jan, Papoušek, F., Nováková, O., Ošťádal, B., & Kolář, F. (2002). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Research in Cardiology*, 97(2), 161–167. <https://doi.org/10.1007/s003950200007>
- Neely, J. R., Rovetto, M. J., Whitmer, J. T., & Morgan, H. E. (1973). Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *American Journal of Physiology*, 225(3), 651–658. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1973.225.3.651>
- Neumann, A. K., Yang, J., Biju, M. P., Joseph, S. K., Johnson, R. S., Haase, V. H., ... Turka, L. A. (2005). Hypoxia inducible factor 1α regulates T cell receptor signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 17071–17076. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506070102>
- Newby, L. K. (2016, June 14). Intravenous Beta-Blockers for Cardioprotection in STEMI: The Saga Continues. *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.03.532>

- Niecknig, H., Tug, S., Reyes, B. D., Kirsch, M., Fandrey, J., & Berchner-Pfannschmidt, U. (2012). Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. *Free Radical Research*, 46(6), 705–717. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.669041>
- Nikolaev, V. O., Bünemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M. J., & Engelhardt, S. (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching β 1-adrenergic but locally confined β 2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circulation Research*, 99(10), 1084–1091. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000250046.69918.d5>
- Nisoli, E., Tonello, C., Briscini, L., & Carruba, M. O. (1997). Inducible nitric oxide synthase in rat brown adipocytes: Implications for blood flow to brown adipose tissue. *Endocrinology*, 138(2), 676–682. <https://doi.org/10.1210/endo.138.2.4956>
- Niu, X., Zhao, L., Li, X., Xue, Y., Wang, B., Lv, Z., ... Zheng, Q. (2014). β 3-Adrenoreceptor Stimulation Protects against Myocardial Infarction Injury via eNOS and nNOS Activation. *PLoS ONE*, 9(6), e98713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098713>
- O'Malley, B. P., Cook, N., Richardson, A., Barnett, D. B., & Rosenthal, F. D. (1984). Circulating Catecholamine, Thyrotropin, Thyroid hormone and Prolactin responses of normal subjects to acute cold exposure. *Clinical Endocrinology*, 21(3), 285–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1984.tb03471.x>
- Ogawa, K., Ohno, T., & Kuroshima, A. (1992). Effects of Cold Acclimation on Cold-Induced Changes in Lipid Metabolism of Rat Brown Adipose Tissue. *Japanese Journal of Physiology*, 42(1), 63–73. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.42.63>
- Ong, S. B., Hall, A. R., Dongworth, R. K., Kalkhoran, S., Pyakurel, A., Scorrano, L., & Hausenloy, D. J. (2015). Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology. *Thrombosis and Haemostasis*, 113(3), 513–521. <https://doi.org/10.1160/TH14-07-0592>
- Orchard, C., & Brette, F. (2007). t-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 77(2), 237–244. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm002>
- Parks, R. J., Murphy, E., & Liu, J. C. (2018). Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1782, pp. 187–196). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_11
- Pasdois, P., Parker, J. E., Griffiths, E. J., & Halestrap, A. P. (2011). The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. *Biochemical Journal*, 436(2), 493–505. <https://doi.org/10.1042/BJ20101957>
- Peart, J. N., & Gross, G. J. (2003). Adenosine and opioid receptor-mediated cardioprotection in the rat: evidence for cross-talk between receptors. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(1), H81–H89. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00985.2002>

- Pedrozo, Z., Sánchez, G., Torrealba, N., Valenzuela, R., Fernández, C., Hidalgo, C., ... Donoso, P. (2010). Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(3), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.005>
- Peng, C., Wang, L.-P., Tao, X., Dong, X.-H., Xu, C.-F., Jiang, Y., ... Xie, H.-H. (2018). Preventive Cold Acclimation Augments the Reparative Function of Endothelial Progenitor Cells in Mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(1), 175–191. <https://doi.org/10.1159/000486356>
- Penna, C., Mancardi, D., Raimondo, S., Geuna, S., & Pagliaro, P. (2008). The paradigm of postconditioning to protect the heart: Molecular Medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(2), 435–458. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00210.x>
- Perchenet, L., Hinde, A. K., Patel, K. C. R., Hancox, J. C., & Levi, A. J. (2000). Stimulation of Na/Ca exchange by the β -adrenergic/protein kinase A pathway in guinea-pig ventricular myocytes at 37°C. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 439(6), 822–828. <https://doi.org/10.1007/s004249900218>
- Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., ... Lefkowitz, R. J. (1992). Role of $\beta\gamma$ subunits of G proteins in targeting the β -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science*, 257(5074), 1264–1267. <https://doi.org/10.1126/science.1325672>
- Prichard, B. N. C. (1964, May 9). Hypotensive Action of Pronethalol. *British Medical Journal*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5392.1227>
- Qiu, Y., Ping, P., Tang, X. L., Manchikalapudi, S., Rizvi, A., Zhang, J., ... Bolli, R. (1998). Direct evidence that protein kinase C plays an essential role in the development of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits and that ϵ is the isoform involved. *Journal of Clinical Investigation*, 101(10), 2182–2198. <https://doi.org/10.1172/JCI1258>
- Ramez, M., Rajabi, H., Ramezani, F., Naderi, N., Darbandi-Azar, A., & Nasirinezhad, F. (2019). The greater effect of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Klotho levels and attenuate of myocardial TRPC6 expression. *BMC Cardiovascular Disorders*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12872-019-1090-7>
- Reimer, K. A., Jennings, R. B., & Tatum, A. H. (1983). Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, functional and ultrastructural studies. *The American Journal of Cardiology*, 52(2), 72–81. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(83\)90180-7](https://doi.org/10.1016/0002-9149(83)90180-7)
- Ricquier, D., Mory, G., Bouillaud, F., Thibai, J., & Weissenbach, J. (1984). Rapid increase of mitochondrial uncoupling protein and its mRNA in stimulated brown adipose tissue. *FEBS Letters*, 178(2), 240–244. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80608-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80608-0)
- Riis-Vestergaard, M., Richelsen, B., Bruun J.M., Li, W., Hansen, J.B., Pedersen, S.B. (2020).

- Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of Human Brown Adipocyte Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 105, Issue 4, April 2020, Pages e994–e1005, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz298>
- Rockman, H. A., Koch, W. J., & Lefkowitz, R. J. (2002, January 10). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/415206a>
- Rossello, X., Piñero, A., Fernández-Jiménez, R., Sánchez-González, J., Pizarro, G., Galán-Arriola, C., ... Ibanez, B. (2018). Mirabegron, a Clinically Approved β_3 Adrenergic Receptor Agonist, Does Not Reduce Infarct Size in a Swine Model of Reperfused Myocardial Infarction. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 11(4), 310–318. <https://doi.org/10.1007/s12265-018-9819-8>
- Said, M., Becerra, R., Valverde, C. A., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., Mundiña-Weilenmann, C., ... Mattiazzi, A. (2011). Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): A main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(6), 936–944. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.08.010>
- Sala-Newby, G. B., Freeman, N. V. E., Skladanowski, A. C., & Newby, A. C. (2000). Distinct roles for recombinant cytosolic 5'-nucleotidase-I and -II in AMP and IMP catabolism in COS-7 and H9c2 rat myoblast cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11666–11671. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11666>
- Salie, R., Alsahlin, A. K. H., Marais, E., & Lochner, A. (2019). Cardioprotective Effects of Beta3-Adrenergic Receptor (β_3 -AR) Pre-, Per-, and Post-treatment in Ischemia–Reperfusion. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 33(2), 163–177. <https://doi.org/10.1007/s10557-019-06861-5>
- Sandmann, S., Yu, M., & Unger, T. (2001). Transcriptional and translational regulation of calpain in the rat heart after myocardial infarction \pm effects of AT 1 and AT 2 receptor antagonists and ACE inhibitor. *British Journal of Pharmacology* (Vol. 132). Retrieved from www.nature.com/bjp
- Saurin, A. T., Pennington, D. J., Raat, N. J. H., Latchman, D. S., Owen, M. J., & Marber, M. S. (2002). Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated buffer-perfused mouse hearts. *Cardiovascular Research*, 55(3), 672–680. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00325-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00325-5)
- Schobesberger, S., Wright, P., Tokar, S., Bhargava, A., Mansfield, C., Glukhov, A. V., ... Gorelik, J. (2017). T-tubule remodelling disturbs localized β_2 -adrenergic signalling in rat ventricular myocytes during the progression of heart failure. *Cardiovasc Res*. 2017 Jun 1; 113(7): 770–782. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx074>
- Schulz, R., Gres, P., Konietzka, I., & Heusch, G. (2005). Regional differences of myocardial infarct development and ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*,

100(1), 48–56. <https://doi.org/10.1007/s00395-004-0497-5>

- Sgoifo, A., Koolhaas, J., De Boer, S., Musso, E., Stilli, D., Buwalda, B., & Meerlo, P. (1999). Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(7), 915–923. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00025-1)
- Sharma, V., Parsons, H., Allard, M. F., & McNeill, J. H. (2008). Metoprolol increases the expression of β_3 -adrenoceptors in the diabetic heart: Effects on nitric oxide signaling and forkhead transcription factor-3. *European Journal of Pharmacology*, 595(1–3), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.042>
- Shephard, R. J., & Balady, G. J. (1999). Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation*, 99(7), 963–972. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.7.963>
- Song, Y., Shan, J. G., Xue, Z., Wang, S. Y., Xu, H., Liu, Y., ... Ren, X. (2016). Remote Postconditioning Induced by Trauma Protects the Mouse Heart against Ischemia Reperfusion Injury. Involvement of the Neural Pathway and Molecular Mechanisms. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 30(3), 271–280. <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6661-6>
- Srinivas, V., Zhang, L. P., Zhu, X. H., & Caro, J. (1999). Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor α (HIF- α) proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(2), 557–561. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0878>
- Stephens, D. P., Aoki, K., Kosiba, W. A., & Johnson, J. M. (2001). Nonnoradrenergic mechanism of reflex cutaneous vasoconstriction in men. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 280(4 49-4). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.h1496>
- Sun, Y., Wang, Y., Zhang, L., Xu, C., Liu, Y., Kang, S., ... Sun, H. (2014). Prevention of cardiac events caused by surgical stress in aged rats: Simultaneously activating β_2 -adrenoceptor and inhibiting β_1 -adrenoceptor. *Stress*, 17(4), 373–381. <https://doi.org/10.3109/10253890.2014.915392>
- Sun, Z., Cade, J. R., Fregly, M. J., & Rowland, N. E. (1997). Effect of chronic treatment with propranolol on the cardiovascular responses to chronic cold exposure. *Physiology and Behavior*, 62(2), 379–384. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00033-4)
- Tada, M., Yabuki, M., & Toyofuku, T. (1998). Molecular regulation of phospholamban function and gene expression. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 853, pp. 116–129). New York Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08261.x>
- Taylor, M. R. G. (2007, February 25). Pharmacogenetics of the human beta-adrenergic receptors. *Pharmacogenomics Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500393>
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019 - Press release. (2019). Retrieved February

- 27, 2020, from <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/press-release/>
- Tibenská, V., Benešová, A., Kolář, D., Pospíšilová, B., Hejnová, L., Elsnicová, B., ... Zurmanova, J. M. (2018). Cold acclimation may serve as a novel cardioprotective intervention. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 120, 23. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.05.076>
- Tibenská, V., Benesova, A., Vebr, P., Liptáková, A., Hejnová, L., Elsnicová, B., ... Zurmanova, J. M. (2020). Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting beta-adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling. *Journal of Applied Physiology*, japplphysiol.00511.2019. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00511.2019>
- Tong, H., Bernstein, D., Murphy, E., & Steenbergen, C. (2005). The role of β -Adrenergic Receptor Signaling in Cardioprotection. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3067fje>
- Tsang, A., Hausenloy, D. J., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2004). Postconditioning: A form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circulation Research*, 95(3), 230–232. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000138303.76488.fe>
- Tsibulnikov, S. Y., Maslov, L. N., Naryzhnaya, N. V., Ma, H., Lishmanov, Y. B., Oeltgen, P. R., & Garlid, K. (2018). Role of protein kinase C, PI3 kinase, tyrosine kinases, NO-synthase, K ATP channels and MPT pore in the signaling pathway of the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia. *Gen. Physiol. Biophys*, 37, 537–547. https://doi.org/10.4149/gpb_2018013
- Urmaliya, V. B., Church, J. E., Coupar, I. M., Rose Meyer, R. B., Pouton, C. W., & White, P. J. (2009). Cardioprotection Induced by Adenosine A1 Receptor Agonists in a Cardiac Cell Ischemia Model Involves Cooperative Activation of Adenosine A2A and A2B Receptors by Endogenous Adenosine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 53(5), 424–433. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181a443e2>
- Virani, S. S., Alonso, A., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., ... Tsao, C. W. (2020). Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 141(9), e139–e596. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000757>
- Vebr, Pavel (2016). Univerzita Karlova v Praze, Ischemicko-reperfuz ní poškození srdce u chladově adaptovaných potkanů Ischemia-reperfusion injury in cold acclimated rats. Diplomová práce (2016)
- Waagstein, F., Hjalmarson, A., Swedberg, K., Bristow, M. R., Gilbert, E. M., Camerini, F., ... Goss, F. G. (1993). Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. *The Lancet*, 342(8885), 1441–1446. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92930-R](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92930-R)
- Wang, Wang, Zhu, W., Wang, S., Yang, D., Crow, M. T., Xiao, R.-P., & Cheng, H. (2004).

Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway. *Circulation Research*, 95(8), 798–806. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000145361.50017.aa>

- Wang, Wengong, Yang, X., De Silanes, I. L., Carling, D., & Gorospe, M. (2003). Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 27016–27023. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300318200>
- Wang, X., Che, H., Zhang, W., Wang, J., Ke, T., Cao, R., ... Luo, W. (2015). Effects of mild chronic intermittent cold exposure on rat organs. *International Journal of Biological Sciences*, 11(10), 1171–1180. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12161>
- Wei, S., Ruknudin, A., Hanlon, S. U., McCurley, J. M., Schulze, D. H., & Haigney, M. C. P. (2003). Protein kinase A hyperphosphorylation increases basal current but decreases beta-adrenergic responsiveness of the sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger in failing pig myocytes. *Circulation Research*, 92(8), 897–903. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000069701.19660.14>
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., ... Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
- Wu, L., Tan, J. L., Chen, Z. Y., & Huang, G. (2019). Cardioprotection of post-ischemic moderate ROS against ischemia/reperfusion via STAT3-induced the inhibition of MCU opening. *Basic Research in Cardiology*, 114(5). <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0747-9>
- Wu, Y., Yin, X., Wijaya, C., Huang, M. H., & McConnell, B. K. (2010). Acute myocardial infarction in rats. *Journal of Visualized Experiments*, (48), e2464. <https://doi.org/10.3791/2464>
- Xiao, R. P., Ji, X., & Lakatta, E. G. (1995). Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Molecular Pharmacology*, 47(2).
- Xing, J. Q., Zhou, Y., Chen, J. F., Li, S. Bin, Fang, W., & Yang, J. (2014). Effect of cold adaptation on activities of relevant enzymes and antioxidant system in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(11), 4232–4237.
- Yamamoto, H., Kawada, T., Shimizu, S., Hayama, Y., Shishido, T., Iwanaga, Y., ... Sugimachi, M. (2019). Acute effects of intravenous carvedilol versus metoprolol on baroreflex-mediated sympathetic circulatory regulation in rats. *International Journal of Cardiology*, 285, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.02.062>
- Zhang, J., Liu, X.-B., Cheng, C., Xu, D.-L., Lu, Q.-H., & Ji, X.-P. (2014). Rho-kinase inhibition is involved in the activation of PI3-kinase/Akt during ischemic-preconditioning-induced cardiomyocyte apoptosis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(11), 4107–4114. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550920>

- Zhang, Q., Xiang, J., Wang, X., Liu, H., Hu, B., Feng, M., & Fu, Q. (2010). β 2-adrenoceptor agonist clenbuterol reduces infarct size and myocardial apoptosis after myocardial ischaemia/reperfusion in anaesthetized rats. *British Journal of Pharmacology*, 160(6), 1561–1572. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00813.x>
- Zhao, Z. Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N. P., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 285(2 54-2). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>
- Zhao, Z. Q., Nakamura, M., Wang, N. P., Velez, D. A., Hewan-Lowe, K. O., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2000). Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *Journal of Surgical Research*, 94(2), 133–144. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.6029>
- Zhu, W. Z., Zheng, M., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., Kobilka, B. K., & Xiao, R. P. (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by β 2-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1607–1612. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1607>
- Zuo, S., Li, L. L., Ruan, Y. F., Jiang, L., Li, X., Li, S., ... Ma, C. S. (2018). Acute administration of tumour necrosis factor- α induces spontaneous calcium release via the reactive oxygen species pathway in atrial myocytes. *Europace*, 20(8), 1367–1374. <https://doi.org/10.1093/europace/eux271>