UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Studijní program: Fyziologie živočichů

Mgr. Veronika Tibenská

Vliv chladové adaptace na aktivaci adrenergních a tyroidních signálních drah v myokardu potkana

The role of cold acclimation in activation of adrenergic and thyroid signalling pathway in rat myocardium

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení autora

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, dne …….

Mgr. Veronika Tibenská

Prohlášení školitele

Jménem všech spoluautorů prohlašuji, že Mgr. Veronika Tibenská podstatně přispěla k tvorbě článků, které jsou součástí této disertační práce. Podílela se aktivně na publikovaných experimentech u svých obou prvoautorských publikací, také na interpretaci dat a přípravě rukopisů.

V Praze, dne

.....

doc. RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Poďakovanie

V prvom rade by som sa chcela poďakovať svojej školiteľke doc. RNDr. Jitke Žurmanovej PhD. za odbornú pomoc, vedenie, ochotu, starostlivosť a individuálny prístup. Za všetky jej cenné rady a pripomienky. A neposlednom rade za to, že mi pred rokmi dala šancu a verila vo mňa. Taktiež sa chcem poďakovať doc. RNDr. Olge Novákovej, CSc. za cenné konzultácie počas spisovania mojich oboch prvoautorských publikácií.

Ďalej by som chcela poďakovať RNDr. Barbare Elsnicovej PhD. za pomoc pri mojich imunofluorescenčných začiatkoch, spracovanie snímok, za jej trpezlivosť a neustály úsmev na tvári. Takisto RNDr. Daniele Horníkovej PhD. za pomoc a trpezlivosť v mojich laboratórnych začiatkoch. RNDr. Lucii Hejnovej PhD. za prípravu pokusu merania aktivity adenylátcyklázy a za jej ochotu.

Veľmi pekne by som chcela poďakovať celému kolektívu laboratória svalovej fyziológie za úžasnú a priateľskú pracovnú atmosféru. Konkrétne najmä Mgr. Anete Marvanovej, mojej laboratórnej dvojičke, s ktorou sme všetkým prešli spolu a navzájom sa povzbudzovali a dodávali si silu. A všetkým ostatným, s ktorými sme sa za tieto roky stali nielen spolužiaci, ale aj priatelia.

Ďakujem nekonečne svojej rodine, babičkám za podporu a starostlivosť a že vo mňa veria každý deň. Mojim rodičom za ich lásku a starostlivosť, ste mi veľkou oporou a vzorom. Mamine, vzoru ženskej sily, odhodlania, štýlu a mojej osobnej Wonder Woman. Ocinovi, môjmu vzoru rozvážnosti, pokoja a ktorý ma naučil, že keď nejde o život, nejde o nič.
Môjmu bratovi, môjmu doživotnému vzoru, ktorého cesta ma inšpiruje každý deň a sledujem ju s obrovským úžasom.

Dlhoročným kamarátom, že sú tu stále aj napriek všetkému vždy pre mňa.

Ďakujem Tomáš Cigáň za to, že si. Nekonečne. Každý deň.

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore Grantovej Agendy Univerzity Karlovej – GAUK 641216.

ABSTRAKT

Navzdory pokrokom vo výskume a terapii sú kardiovaskulárne ochorenia stále najčastejšou príčinou úmrtí na celom svete. Objasnenie endogénneho protektívneho mechanizmu môže zlepšiť farmakologické intervencie pre liečbu srdcových ochorení. Chladová adaptácia alebo otužovanie predstavuje dobrý potenciál pre zníženie kardiovaskulárneho rizika a z literatúry vyplýva, že v tkanivách stimuluje β-adrenergný a tyroidný systém. Zároveň je adrenergný systém v srdci jedným z hlavných regulátorov srdcovej činnosti. Tieto signálne dráhy však prekvapivo doteraz neboli na proteínovej úrovni v srdci študované a v súčasnej literatúre neexistujú takmer žiadna práca zaoberajúca sa touto témou. Naše doterajšie výsledky ukázali zníženú veľkosť infarktu navodením ischemického poškodenia u chladovo adaptovaných potkanov (CA) pri 8 °C, 5 týždňov a následného vrátenia do normotermálnych podmienok na 2 týždne (CAR). Cieľom tejto dizertačnej práce je stanoviť mieru zapojenia adrenergného systému v myokarde v priebehu adaptácie po 3 dňoch, 10 dňoch, 5 týždňoch CA a následnej CAR na úrovni všetkých troch izoforiem β-adrenergných receptorov (β-ARs) a ich signálnych dráh. Výsledky ukazujú v kardioprotektívnych režimoch CA a CAR nezmenenú signalizáciu β1-AR-Gs-adenylátcykláza-proteínkináza A, ktorej dlhodobá aktivácia je pre kardiomyocyty detrimentálna. Dôležitým výsledkom je preukázaná aktivácia β2-AR-proteinkinázy B (Akt) v CAR a potenciálne aj aktivácia β3-AR, ktoré sa spájajú s mnohými cyto- a kardioprotektívnymi mechanizmami. Tieto výsledky prinášajú prvý a jedinečný pohľad na molekulárny mechanizmus chladovej adaptácie a jej vplyvu na srdce.

Kľúčové slová: chladová adaptácia, potkan, srdce, adrenergná a tyroidná signalizácia

ABSTRACT

Despite advances in research and therapy, cardiovascular diseases are still the leading cause of death worldwide. A closer understanding of the endogenous protective mechanism may improve pharmacological interventions for the treatment of heart diseases. Cold acclimation or hardening has strong potential for reducing cardiovascular risk and the literature shows that it stimulates the β-adrenergic and thyroid systems in tissues. At the same time, the adrenergic system in the heart is one of the main regulators of cardiac activity. However, these signaling pathways have surprisingly not been studied at the protein level in the heart yet, and no studies can be found on the subject matter in current literature. Our results show a reduced infarct size induced by ischemic injury in cold-acclimated rats (CA) at 8 ° C for 5 weeks and then returning to normothermic conditions for 2 weeks (CAR). The aim of this dissertation is to determine, the degree of involvement of the adrenergic system in the myocardium during acclimation after 3 days, 10 days, 5 weeks of CA and subsequent CAR at the level of all three β-adrenergic receptor isoforms (β-ARs) and their signaling pathways. The results show unchanged signaling of β1-AR-Gs-adenylyl cyclase-protein kinase A in the cardioprotective regimes CA and CAR, whose long-term activation is detrimental for cardiomyocytes. An important result is the demonstrated activation of β2-AR-protein kinase B (Akt) in CAR and potentially the activation of β3-AR, which are associated with many cyto- and cardioprotective mechanisms. These results provide a first and unique insight into the molecular mechanism of cold acclimation and its effect on the heart.

Key words: cold acclimation, rat, heart, adrenergic and thyroid signaling

OBSAH

ZOZNAM SKRATIEK ... 9
ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ ... 12
1 ÚVOD ... 13
2 PREHĽAD LITERATÚRY ... 15
2.1 Tepelná homeostáza ... 15
2.1.1 Akútna reakcia na chlad ... 16
2.1.2 Chladová adaptácia ... 21
2.2 Katecholamíny ... 25
2.3 Adrenergné receptory ... 28
2.2.1 Alfa adrenergné receptory ... 29
2.4 Beta-adrenergné receptory ... 31
2.3.1 Beta 1 adrenergný receptor ... 32
2.3.2 Beta 2 adrenergný receptor ... 34
2.3.3 Beta 3 adrenergný receptor ... 39
2.4 Tyroidné hormóny ... 43
2.4.1 Tyroidné hormóny a chladová adaptácia ... 46
3 CIELE PRÁCE ... 48
4 METODIKA ... 49
4.1 Experimentálny model ... 49
4.1.1 Akútny chlad ... 49
4.2 Proteínová analýza ... 50
4.2.1 Odber tkaniva ... 50
4.2.2 Spracovanie tkaniva (príprava hrubej membránovej frakcie) ... 51
4.2.3 SDS-PAGE a Western blot analýza ... 52
4.3 Stanovenie aktivity adenylátcyklázy ... 54
4.3.1 Odber tkaniva ... 54
4.3.2 Aktivita adenylátcyklázy ... 55
4.4 Kvantitatívna imunofluorescenčná analýza ... 55
4.4.1 Odber tkaniva ... 55
4.4.2 Spracovanie tkaniva a príprava vzoriek ... 56
4.4.3 Imunoznačenie vzoriek ... 56
4.5 Štatistická analýza ... 57
5 VÝSLEDKY ... 58
5.1 Akútny chlad ... 59
5.1.1 Beta ARs a akútna chladová expozícia ... 59

5.2 Chronický chlad 63
5.2.1 Beta1 ARs signálna dráha 64
5.2.2 Beta2 ARs signálna dráha 67
5.2.3 Beta3 ARs signálna dráha 71
5.2.4 Tyroidné receptory 73
6 DISKUSIA 75
7 ZÁVER 88
8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY 90
Prílohy 127

ZOZNAM SKRATIEK

AA	kyselina arachidónová
AC	adenylátcykláza
ACTH	adenokortikotropný hormón
ATP	adenozíntrifosfát
ARs	adrenergné receptory
BAT	hnedé tukové tkanivo
BMPs	kostný morfogenický faktor
CA	chladová adaptácia
CaMKII	Ca^{2+}/calmodulin dependentná kináza II
cAMP	cyklický 3´,5´-adenosinmonofosfát
CAR	regresná skupina po chladovej adaptácii
cGMP	cyklický 3,5,guanozín monofosfát
COMT	katechol-O-metyltransferáza
COX	cyklooxygenáza
cPLA2	cytozolická fosfolipáza A2 alpha
CREB	cAMP- responzívny element viažuci proteín
CRH	adenokortikotropín stimulujúci hormón
cTnI	srdcový troponín I
DAG	diacylglycerol
DIO1/2/3	deiodináza typu I, II a III
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ERK1/2	mitogénom aktivovaná proteínkináza 1 a 2
FGF21	rastový faktor fibroblastov
Gi	inhibičný G proteín
GPCR	receptory spriahnuté s G proteínmi
GRK/β-ARK	kináza s G-proteínmi spriahnutých receptorov/kináza β-adrenergného receptoru
Gs	stimulačný G proteín
GSK-3	glykogén syntáza kináza 3
Gαi	alpha podjednotka inhibičného G proteínu
Gαs	α podjednotka stimulačného G proteínu
H_2O_2	peroxid vodíku

Hsp	proteíny tepelného šoku
ICER	cAMP indukovaný včasný represor
I/R	ischemicko-reperfúzne poškodenie
IP3	inositoltrifosfát
ISO	izoprenalín
L-DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanín
MAO	monoaminooxidáza
MAO-A	monoaminooxidáza A
MAO-B	monoaminooxidáza B
mPTP	mitochondriálny prechodne priepustný pór
nNOS	neuronálna syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
p38	p38 mitogénom aktivovaná proteínkináza
PI3K	fosfoinozitol 3 kináza
PKA	proteínkináza A
PKB/Akt	proteínkináza B
PKC	proteínkináza C
PKG	proteínkináza G
PLB	fosfolamban
PLC	fosfolipáza C
PNMT	fenyletanolamín-N-metyltransferáza
POMC	proopiomelanokortin
ROS	reaktívne formy kyslíka
RyR2	ryanodinový receptor 2
SERCA	ATPáza sarkoplazmatického retikula
T3	3,5,3´-trijodtyronín
T4	tyroxín, 3,5,3´,5´-tetrajodtyronín
THRs	tyroidné receptory
THRα	tyroidný receptor alpha
THRβ	tyroidný receptor beta
THs	tyroidné hormóny
TnI	troponín I
TRP	transient receptor potential

UCPs	uncoupling proteins, odprahujúce proteíny
VDAC	napäťovo závislý aniónový kanál
VEGF-A	vaskulárny endoteliálny faktor A
WAT	biele tukové tkanivo
α1-AR	alpha 1 adrenergný receptor
α2-AR	alpha 2 adrenergný receptor
α-ARs	alpha adrenergné receptory
αMHC	ťažký reťazec myozínu alpha
β1-AR	beta 1 adrenergný receptor
β2-AR	beta 2 adrenergný receptor
β3-AR	beta 3 adrenergný receptor
β-ARs	beta adrenergné receptory
βMHC	ťažký reťazec myozínu beta

ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ

Tibenska V, Benesova A, Vebr P, Liptakova A, Hejnová L, Elsnicová B, Drahota Z, Hornikova D, Galatík F, Kolar D, Vybiral S, Alánová P, Novotný J, Kolar F, Novakova O and Zurmanova JM (2020). Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting β-adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling. *Journal of Applied Physiology*
doi: 10.1152/japplphysiol.00511.

Impact factor: 3.044

Tibenska V, Marvanova A, Elsnicová B, Hejnová L, Vebr P, Novotný J, Kolar F, Novakova O and Zurmanova JM (2020). The cardioprotective effect persisting during recovery from cold acclimation is mediated by the β2-adrenoceptor pathway and Akt activation. *Journal of Applied Physiology*
doi: 10.1152/japplphysiol.00756.2020.

Impact factor: 3.044

1 ÚVOD

Infarkt myokardu patrí celosvetovo k hlavným príčinám úmrtí a je dôsledkom mnohých patológií. Srdce sa dokáže vyrovnať s ischemickým stresom aktiváciou endogénnych ochranných dráh pod vplyvom vonkajších intervencií, ako je conditioning, cvičenie, chronická hypoxia atď. Mnohé protektívne intervencie, ktoré sa javili ako sľubná terapia prevencie infarktu myokardu na zvieracích modeloch, v klinických štúdiách na ľuďoch zlyhali. Preto sú stále potrebné nové stratégie, ktoré chránia srdce pred ischemicko/reperfúznym (I/R) poškodením a sú klinicky aplikovateľné.

Pred piatimi rokmi bol do nášho laboratória zavedený jedinečný kardioprotektívny model chladovej adaptácie na mierny chlad (5 týždňov; 8 ± 1 °C), v ktorom sa výrazne zmenšila veľkosť infarktu myokardu a zvýšila sa mitochondriálna rezistencia na preťaženie vápnikom, bez zjavných vedľajších účinkov, ako je hypertrofia a hypertenzia. Chladová adaptácia je komplexný adaptačný proces, v ktorom hrá významnú rolu adrenergná signalizácia spolu s tyroidným systémom. Tieto signalizácie zaisťujú posun od „trasovej termogenézy“ (teplo produkovaného svalovými kontrakciami) k „netrasovej termogenéze“, kde je teplo produkované termogénnymi orgánmi, najmä hnedým a béžovým tukovým tkanivom. Zmeny v signalizácii adrenergného systému určujú kapacitu netrasovej termogenézy a súčasne majú vplyv na kardiovaskulárny systém.

Tato dizertačná práca je zameraná na štúdium β-adrenergného systému v srdci potkanov, ktorý je v ľavej srdcovej komore reprezentovaný troma izoformami adrenergných receptorov (β-ARs). Beta 1 adrenergné receptory (β1-AR) sú spojené so stimulačnými G proteínmi (Gs) a adenylátcyklázou (AC) a následne je fosforylovaných niekoľko proteínov, ktoré sa podieľajú na spriahnutí excitácie a kontrakcie, homeostáze vápnika a metabolizmu pri zvýšenej záťaži. Stimulácia tejto dráhy je nevyhnutná v akútnej reakcii organizmu na stres, avšak dlhodobá aktivácia je pre srdce detrimentálna.

Beta 2 adrenergné receptory (β2-AR) sú takisto spriahnuté s Gs proteínmi, avšak môžu sa spriahnuť aj s inhibičným G proteínom (Gi), ktorý ovplyvňuje signálne dráhy proteínkinázy B (Akt) a cytozolickej fosfolipázy A2 (cPLA2). Tieto dráhy sú súčasťou protektívnych mechanizmov v srdci. Akt dráha má anti-apoptotické účinky, podieľa sa na proliferácii buniek a chráni mitochondrie pred vyliatím cytochrómu c do cytoplazmy. Významnou signálnou dráhou β-2AR je aktivácia cPLA2, ktorá aktivuje rozsiahlu signalizáciu kyseliny arachidónovej (AA).

Beta 3 adrenergné receptory (β3-AR) tvoria len 3% všetkých β-ARs v srdci, kde sa spájajú s Gi a guanylátcyklázou, čo podporuje negatívne inotropné účinky, ktoré slúžia ako „brzda“ na ochranu srdca pred nadmernou stimuláciou katecholamínmi. Aktivácia β3-AR signálnej dráhy zahŕňa tvorbu oxidu dusnatého a aktiváciu proteínkinázy G (PKG). Aktivácia tejto dráhy je kardioprotektívna, prostredníctvom inhibície mitochondriálneho prechodne priepustného póru (mPTP), zabraňuje srdcovej dysfunkcii a významne zoslabuje pravdepodobnosť aktivácie pro-apoptotických dráh.

V tejto dizertačnej práci predstavíme systematický prehľad expresie a lokalizácie izoforiem β-ARs od nového modelu krátkodobej chladovej expozície (3 a 10 dní; 8 ± 1 °C), až po 5-týždňovú adaptáciu a následné zotavenie po dvoch týždňoch. V preukázanom kardioprotektívnom modeli dlhodobej adaptácie sme sa zamerali na mieru aktivácie kináz spojených s adrenergním systémom.

Táto práca prináša úplne nový prehľad zapojenia jednotlivých zložiek adrenergného systému v priebehu chladovej adaptácie na mierny chlad a pevne verím, že je dobrým štartom k objasneniu molekulárnych mechanizmov podieľajúcich sa na tomto procese.

2 PREHĽAD LITERATÚRY

2.1 Tepelná homeostáza

Udržanie optimálnej telesnej teploty navzdory podmienkam okolitého prostredia je nevyhnutnou funkciou organizmu endotermných živočíchov, vrátane človeka (Janský, 1973). Udržiavanie stálej teploty telesného jadra medzi 36 – 38 °C je nutná podmienka pre normálnu činnosť metabolizmu a priebeh enzymatických reakcií. Telesná teplota je daná výsledkom medzi príjmom, produkciou a výdajom tepla. Rovnováhu medzi týmito dejmi zaisťuje termoregulácia. Termoregulácia ľudského tela je založená na princípe negatívnej spätnej väzby, ktorá udržuje tepelnú homeostázu. Regulačným centrom je hypotalamus, kde sú prijímané a vyhodnocované signály z termoreceptorov (pre prehľad Haman & Blondin, 2017).

Centrálne termoreceptory uložené v hypotalame, mieche, vnútorných orgánoch atď. a sú zastúpené hojnejšie než chladové receptory (Höfler, 1968). Koža hrá významnú termoregulačnú úlohu priamym obmedzením alebo zvýšením tepelných strát, čo je riadené sympatickou inerváciou (pre prehľad Charkoudian, 2003). Ďalšie mechanizmy u človeka súvisia so zvýšením produkcie tepla, buď svalovým trasom alebo v hnedom tukovom tkanive (BAT) (Mendoza & Griffin, 2010). Bolo preukázané, že sa človek na rozdiel od malých živočíchov adaptuje na chlad hypotermným spôsobom. Izolačná adaptácia je spoločná pre človeka aj hlodavce (Janský, 1973).

Vnímanie okolitej teploty sa deje prostredníctvom primárnych aferentných senzorických neurónov ganglií zadných koreňov miechových a trigeminálnych ganglií. Tento mechanizmus teplotnej citlivosti je sčasti riadený niektorými receptormi z rodiny transient receptor potential (TRP), ktoré reagujú na teplotné spektrum chladu pod 18 °C až po teplo nad 52 °C. Do tejto reakcie sú čiastočne zapojené 4 receptory z podrodiny TRPV (vanilloid) receptorov detegujúcich teplo: TRPV4 >25 °C, TRPV3 >31 °C, TRPV1 >43 °C, TRPV2 >52 °C a zástupcovia podrodiny TRPM (melastatin) a TRPA (ankyrin), ktoré detekujú chlad: TRPM8 <28 °C a TRPA1 <18 °C (Bautista et al., 2007; Morrison et al., 2008). Pre aktiváciu a reguláciu TRPA1 receptoru majú zásadný význam vápenaté ióny a bez ich prítomnosti k plnej aktivácii kanálu nedôjde (Zurborg et al., 2007). Chladové signály z periférie sú sprostredkované tenkými myelinizovanými A-δ vláknami (Lumpkin & Caterina, 2007).

V minulosti bol prijímaný model centrálneho „set-pointu“ umiestneného v hypotalame, ktorý riadil termoregulačnú odpoveď na odchýlky od 37,1 °C komplexne (Janský, 1973; Romanovsky, 2007). V súčasnej dobe je stále viac anatomických a farmakologických dôkazov,

že existujú jednotlivé okruhy termoregulácie, ktoré sú nezávislé pre periférnu a centrálnu termorecepciu (pre prehľad Tansey & Johnson, 2015).

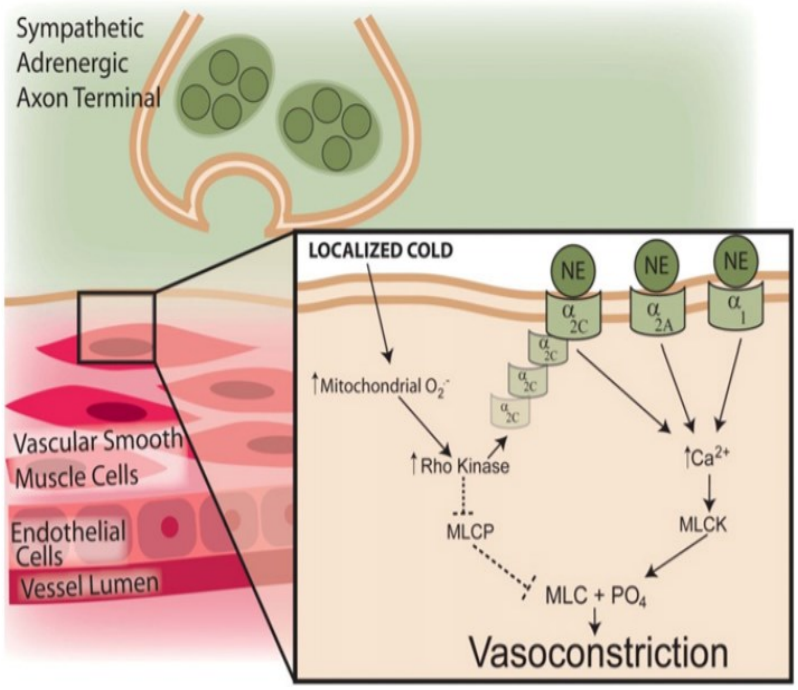
2.1.1 Akútna reakcia na chlad

Pokles periférnej teploty, ktorý vedie k poklesu teploty hlavne pokožky a v prípadoch podchladenia (nechcený pokles teploty telesného jadra pod 35 °C) aj k poklesu teploty jadra tela vyvoláva primárne termoregulačné reakcie, ktoré na jednej strane obmedzujú straty tepla (vazokonstrikcia, piloerekcia u osrstených živočíchov) a na druhej strane vedú k zvýšeniu produkcie tepla organizmom (trasenie – shivering). Tieto reakcie sa tiež nazývajú termoefektorové reakcie. Aferentné signály z kože sú snímané v preoptickej oblasti predného hypotalamu, z ktorého vychádzajú eferentné signály, ktoré spôsobujú vazokonstrikciu ciev kože a/alebo trasenie svalov. Periférna vazokonstrikcia, ako primárna odpoveď na chlad, znižuje prietok krvi v koži, čo vedie ku zníženiu prenosu tepla medzi jadrom tela a povrchom tela (pokožka, podkožný tuk a kostrové svalstvo), a tak zvyšuje tepelnú izoláciu tela (pre prehľad Castellani & Young, 2016).

Ľudské telo si za normálnych podmienok udržuje konštantnú teplotu 35,8 – 37 °C. Pre vyzlečeného človeka je za bazálnych podmienok termoneutrálna teplota vzduchu 28 °C. Z pohľadu termoregulácie sa ľudské telo skladá z dvoch úzko prepojených zložiek: tepelné jadro a tepelný obal. Jadro tvoria všetky orgány s vysokou látkovou premenou, tzn. vnútorné orgány v oblasti hrudníka, brucha a lebky. Jadro je hlavným producentom tepla pri bazálnom metabolizme (asi 70%) a jeho teplota sa pohybuje medzi 36,5 – 37,4 °C. Tepelný obal je povrchová vrstva a býva rôzne široká podľa telesného typu. Obal tvorí pokožka, podkožie a tuková vrstva. Tepelný obal má nestálu teplotu, ktorá sa mení vzhľadom na okolitú teplotu a je nižšia oproti jadru. Pri zdravom jedincovi je ideálny rozdiel medzi teplotou jadra a tepelného obalu 4 °C. Koža má teda teplotu okolo 33 °C (Veicsteinas et al., 1982). Vazokonstrikčná reakcia pri vystavení chladu pomáha spomaliť tepelné straty a chrániť teplotu jadra tela na úkor poklesu teploty periférneho tkaniva. Noradrenalín je primárny neurotransmiter, ktorý predstavuje zhruba 60% reflexnej vazokonstrikcie vyvolanej chladom v cievach kože (pre prehľad Charkoudian, 2010), zatiaľ čo neuropeptid Y zaujíma okolo 20 – 30% (Stephens et al., 2004).

Vazokonstrikcia je primárne sprostredkovaná noradrenalínom a alpha 2 adrenergným receptorom (α2-AR) (Thompson-Torgerson et al., 2008). Ako však pôsobenie chladu pokračuje, za zníženie prietoku krvi v koži zodpovedajú non-adrenergné a neuronálne mechanizmy. Chladová expozícia vedie k zvýšeniu mitochondriálnych reaktívnych foriem

kyslíka, čo spôsobuje zvýšenie Rho kinázy (Thompson-Torgerson et al., 2007, 2008). Zvýšená Rho kináza spôsobuje inhibíciu fosfatázy ľahkého reťazca myozínu, čo umožňuje jeho fosforyláciu a to vedie k vazokonstrikcii. Lokálne ochladenie vyvolá zvýšenie Rho kinázy a tým translokáciu α2C-ARz Golgiho aparátu na plazmatickú membránu a zvyšuje tak citlivosť α2-AR na noradrenalín, schematicky znázornené na obrázku 1 (Thompson-Torgerson et al., 2008).



***Obrázok 1**: Zastúpenie mechanizmov zapojených do vazokonstrikcie po vystavení chladu. Lokálne ochladenie ciev v pokožke spôsobuje zvýšenie reaktívnych foriem kyslíka ($O2^-$) v mitochondriách. To aktivuje RhoA a Rho kinázu, ktoré môžu vyvolať vazokonstrikciu cez 2 dráhy. V dráhe 1 spôsobuje Rho kináza translokáciu receptorov alfa-2C adrenoreceptorov (α_{2c}) z Golgiho aparátu na plazmatickú membránu. α_{2c} rceptory viažu norepinefrín), čo vedie k prítoku vápnika (Ca^{2+}) a fosforylácii ľahkého reťazca myozínu (MLC) pomocou príslušnej kinázy (MLCK). V druhej dráhe zvýšená Rho kináza inhibuje myozínovú fosfatázu ľahkého reťazca (MLCP), ktorá umožňuje, aby kožné cievy zostali zúžené. Prevzaté z (Thompson-Torgerson et al., 2008)*

Chladová expozícia tiež zvyšuje produkciu metabolického tepla u ľudí, čo prispieva k vyrovnaniu tepelných strát. U ľudí je najväčšia termogenéza vyvolaná chladom spôsobená kontraktilnou aktivitou kostrových svalov, tzv. trasením (shivering). Trasenie, ktoré nejde ovplyvniť vôľou, je spontánny opakovaný rytmický sled svalových kontrakcií, počas ktorých sa väčšina vynaloženej metabolickej energie uvoľňuje ako teplo a vykonáva sa málo vonkajšej práce. Môže sa začať okamžite alebo po niekoľkých minútach pôsobenia chladu a je iniciované poklesom teploty kože (Frank et al., 1999). Trasenie sa zvyčajne začína vo svaloch trupu, potom sa šíri do končatín (Bell et al., 1992). Intenzita a rozsah trasenia sa mení v závislosti od chladového podnetu. Keď sa zvýši intenzita trasenia a trasie sa viac svalov, zvýši sa rýchlosť metabolizmu celého tela (Lee, 1983).

Počas chladovej expozície dochádza k zvýšeniu aktivity β1- a β2-AR, ktoré urýchľujú metabolizmus a zvyšuje sa tak produkcia tepla. Stimulácia β1- a β2-AR agonistami u jedincov neadaptovaných na chlad po vystavení akútnemu chladu zvyšuje srdcový tep a zrýchľuje

metabolizmus. Naopak u adaptovaných jedincov k tomuto zrýchleniu nedochádza (Jansky et al., 2008). Stimulácia β1-AR nemala vplyv na srdcovú frekvenciu u neadaptovaných ani adaptovaných jedincov. Podávanie agonistov β1-AR viedlo k zvýšeniu systolického krvného tlaku, ktorý sa viac zvýšil u neadaptovaných jedincov, stimulácia β2-AR nemala na zmenu systolického tlaku vplyv. Pri podávaní agonistov β1- a β2-AR bola znížená teplota kože na prstoch, čo vedie k zvýšeniu krvného tlaku a pritom nedochádza k zrýchleniu srdcového tepu. To naznačuje, že môže dôjsť k perifernej vazokonstrikcii a zapojeniu oboch receptorov v hladkom svalstve ciev na periférii (Janský et al., 2008). Zvýšená aktivita sympatika a objemové preťaženie môže viesť k zvýšenému vzniku aterosklerózy, uvoľňovaniu artériosklerotických plátov a tým aj infarktu myokardu (Manou-Stathopoulou et al., 2015).

Existuje mnoho štúdií, ktoré opisujú zvýšené riziko kardiovaskulárnych ochorení spôsobených akútnym chladom (Davídkovová et al., 2014; Fares, 2013; Ryti et al., 2017). S vysokým vekom vzrastá u ľudí riziko úmrtia na kardiovaskulárne ochorenia, hlavne behom zimných mesiacov, pričom najvyššie počty úmrtí boli pozorované v januári (Sheth et al., 1999). Vplyvom klimatických vĺn na úmrtie spojené s kardiovaskulárnymi chorobami sa zaoberala Hanzlíková vo svojej dizertačnej práci. Prekvapivo, v populácii stredného veku v rozmedzí 25 až 59 rokov relatívne narástla úmrtnosť, najmä na infarkt myokardu. Nutné je ale poznamenať, že v tejto vekovej kategórii bol vplyv chladu na úmrtnosť sledovaný len u mužov, u ktorých je celkovo náchylnosť na kardiovaskulárne ochorenia vyššia. Vzrastajúca úmrtnosť pretrvávala aj po skončení studenej vlny (Hanzlíková, 2015). K sezónnemu kolísaniu dochádza aj u hladiny tyroidných hormónov. Voľná hladina 3,5,3´,5´-tetrajodtyronínu (tyroxín, T4) v sére bola nameraná najvyššia na jar a najnižšia v lete, rovnako ako aj voľný 3,5,3´-trijodtyronín (tyronín, T3). Avšak celkový T3 bol najvyšší v zimnom období a najnižší v lete (Levine et al., 1995). Detrimentálny vplyv akútneho chladu súvisí s jeho intenzitou a dobou trvania, vlhkosťou vzduchu a s ďalšími faktormi (sociálny stres atď.). Líši sa u rôznych druhov organizmov a závisí na kondícii a pohlaví jedinca (Thompson-Torgerson et al., 2008).

Chlad ako nešpecifický stres

Stresová reakcia sa delí na tri fázy: prvou fázou je poplachová reakcia – okamžitá aktivácia sympatoadrenálneho systému a vyplavenie katecholamínov. Zvýši sa krvný tlak, glykogenolýza (hyperglykémia), lipolýza, ktorá dodáva telu metabolické substráty (glukózu, voľné mastné kyseliny) pre svalovú prácu, čím sa telo pripravuje na stratégiu „útok alebo útek“. V tejto fáze sa aktivuje systém adenokortikotropín stimulujúci hormón-adenokortikotropný hormón-kortizol (CRH-ACTH-kortizol) a zvýši sa sekrécia kortizolu (Hannibal & Bishop,

2014). Aktivuje sa aj systém proopiomelanokortin (POMC). POMC vzniká v mozgu vo forme prekurzoru ako pre-POMC. Po odštiepení signálneho peptidu z neho vzniká hlavný produkt adenokortikotropný hormón (ACTH). ACTH stimuluje kôru nadobličiek a podieľa sa a regulácii kortikoidov. Zvýši sa tiež sekrécia vazopresínu a tiež prolaktínu (Rhodes, 2017). Druhá fáza je adaptačná. V tejto fáze prebieha ďalšia aktivácia systémov POMC a CRH-ACTH-kortizol. Zvýšená sekrécia kortizolu spôsobí uvoľnenie mastných kyselín a glycerolu, čím zaisťuje substrát pre energetické reakcie. Avšak, pri chronickom nadbytku kortizolu sa prejavujú jeho vedľajšie účinky ako demineralizácia kostí a katabolizujú sa bielkoviny najmä v spojivovom tkanive. Potláča sa funkcia imunitného systému, znižuje počet eozinofilných leukocytov a lymfocytov, čím sa znižuje rezistencia voči infekciám. V tejto fáze je schopnosť odolávať stresu maximálna. Tretia fáza vyčerpania nastáva, pokiaľ stres pretrváva alebo je príliš silný, prípadne je narušená sekrécia kortizolu, organizmus stresu podlieha (hypotenzia, srdcové zlyhanie, šok; (Trojan, 2003).

Potkan ako experimentálny model chladu

Najčastejším modelom pre štúdium vplyvu chladu na organizmus je laboratórny potkan. Výhodou je dobrá dostupnosť, oproti myšiam, ktoré sú tiež využívané má lepšie adaptívne schopnosti. Expozícia potkanov teplotám do 5 °C je spojovaná s mnohými negatívnymi dopadmi (Nedergaard et al., 1980). Akútny chlad (5 °C) u potkana zvýšil systolický, diastolický aj stredný krvný tlak. Diastolický tlak sa stabilizuje po zhruba 5 týždňoch adaptácie (Sun et al., 1997). Rovnako aj chronický chlad má pri nízkych teplotách obdobné negatívne účinky. Fregly et al. ukázali, že chladová adaptácia pri nízkych teplotách 5 – 6 °C (1 – 3 týždne) vedie rovnako k zvýšeniu krvného tlaku, tachykardii a srdcovej hypertrofii (Fregly et al., 1989). Akútne vystavenie chladu zvyšuje vylučovanie tekutín močom, čo prispieva k poklesu objemu plazmy o 14% (Sun et al., 2003) a tým môže vzrastať viskozita krvi. Narastá množstvo erytrocytov o 3,2%, granulocyty o 14,5%, plazmový fibrinogén o 8,6%, ale množstvo lymfocytov sa znižuje o 7% (Mercer et al., 1999). V našom modeli chladovej adaptácie (10 °C), Marvanová nepozorovala dehydratáciu u potkanov (Marvanova, 2015). Zdá sa, že poškodenie ľadvín a nadľadvín (Xing et al., 2014) môže byť spôsobené zvolenou teplotou adaptácie.

V priebehu akútneho chladu narastá spotreba kyslíku myokardom, zvyšuje sa prietok cievami a aj end-disatolický objem ľavej komory a teda aj index afterloadu. To zaťažuje srdcový sval, zhoršuje prekrvenie myokardu a môže prispieť k náhlemu srdcovému zlyhaniu (Gao et al., 2012). Z metabolického pohľadu akútny chlad zvyšuje metabolizmus glukózy v mnohých tkanivách (Vallerand et al., 1990). Zaujímavé je, že u potkanov, ktoré sú staré 28

dní ubudlo po vystavení chladu (5 °C po dobu 20 dní) množstvo proteínov v kostrovom svale a narástlo množstvo proteínov v srdci. Tieto parametre boli sledované od akútnej po chronickú fázu adaptácie (McAllister et al., 2000). To dokazuje, že pri tejto teplote sa na termogenéze výrazne podieľajú kostrové svaly a rozvíja sa srdcová hypertrofia. Akútna chladová expozícia (5 °C, 5 dní) znížila rýchlosť prírastku proteínov v kostrovom svale, zatiaľ čo ich degradácia sa nemenila. V srdci zvýšila chladová expozícia metabolický obrat proteínov, ako na úrovni degradácie, tak aj syntézy. To vedie k zvýšeniu hmotnosti srdca (Samuels et al., 1996).

Naproti tomu pri dlhodobej adaptácii na chlad v intermitentnom aj kontinuálnom (otužovanie) režime bolo pozorované mnoho pozitívnych účinkov, ktoré boli dobre dokumentované ako u človeka, tak aj na animálnych modeloch (Lesna et al., 2015; Tibenská et al., 2020a; Tibenská et al., 2020b). Adaptácia na chlad zlepšuje imunitnú odpoveď, termoreguláciu, cievnu reaktivitu a má hypolipidemický efekt (Janský et al., 1996). Je zjavné, že výsledky sa budú odvíjať od teploty, v ktorej sú zvieratá adaptované. Adaptácia po dobu 14 dní (4 °C, 6h/deň) vyvolala u potkanov oxidatívny stres kompenzovaný thioredoxínovým systémom (Wang et al., 2015). Podobne intermitentná extrémna chladová expozícia (-5 °C, 3h/deň, 20 dní) zvýšila antioxidačnú kapacitu srdcového tkaniva u potkanov a znížila obsah malondialdehydu v srdci (Emirbekov et al., 1998). Tsibulnikov et al. ukázali zníženie infarktu po 20 dňoch adaptácie (4 °C) a súčasne ukázali rozvinutú hypertenziu s hypertrofiou ľavej časti srdca (Tsibulnikov et al., 2019). Naproti tomu naše výsledky ukázali, že teplota adaptácie vyššia než 7 °C u potkana už nevyvoláva hypertrofiu (Tibenská et al., 2020a). To je v súlade s pozorovaním Shechtman et al., ktorý stanovil prah pokojovej teploty pre rozvoj hypertenzie u potkana medzi 5 a 9 °C (Shechtman et al., 1999), zatiaľ čo prah pokojovej teploty pre aktiváciu produkcie tepla vo svaloch pomocou trasu bol stanovený na 7 °C (Lømo et al., 2020). Z týchto údajov usudzujeme, že chladová expozícia nemusí nutne viesť k hypertrofii srdca a k rozvoju hypertenzie a tieto vedľajšie účinky sú otázkou miery chladového stresu.

Bolo ukázané, že podávanie captoprilu (inhibítor angiotenzín-konverujúceho enzýmu) zabránilo vzniku chladom indukovanej hypertenzie (5 ± 2 °C, 4 týždne), avšak nebol pozorovaný vplyv na hypertrofiu srdca (Shechtman et al., 1991). Tieto výsledky naznačujú, že v chladom indukovanej hypertenzii hrá úlohu angiotenzín II, avšak nesúvisí s hypertrofiou srdca (Fregly et al., 1991).

Môžeme teda zhrnúť, že vplyv krátkodobého extrémneho chladu má negatívny účinok na kardiovaskulárny systém a bolo dokázané, že počas zimného obdobia dochádza častejšie k infarktu myokardu (Sheth et al., 1999), vzniku átriálnej fibrilácie (Frost et al., 2002) a srdcovej hypertenzie (Deshmukh et al., 2012). Vplyvom periférnej vazokonstrikcie a zvýšenej aktivity

sympatika dochádza k zvýšeniu krvného tlaku, čo spôsobí objemové preťaženie srdca (Brennan et al., 1982). Chladová expozícia celého tela zvyšuje pre- aj afterload, ale bez výrazných zmien v inotropii (kontraktilita), tepovej frekvencii alebo v srdcovom výdaji (Wilson & Crandall, 2011). U starších ľudí zvýšenie preloadu a afterloadu počas chladovej expozície prispieva k výraznejšiemu zvýšeniu spotreby kyslíka v myokarde (Manou-Stathopoulou et al., 2015). Nadmerný chlad teda zvyšuje metabolizmus, energetickú spotrebu a aj produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) u neadaptovaných jedincov, čo môže poškodzovať bunkové štruktúry a DNA, pokiaľ nie je aktivovaný antioxidačný systém (Xing et al., 2014).

2.1.2 Chladová adaptácia

Adaptácia človeka na chlad zahŕňa genetické, fyziologické, morfologické alebo behaviorálne reakcie. Hlavné adaptačné reakcie na chlad sú buď izolačné (zvýšenie izolačných vlastností povrchových tkanív a zväčšenie množstva podkožného tuku) alebo metabolické (trasová a netrasová termogenéza) a môžu byť pozitívne (zosilnené) alebo negatívne (tlmené). Niekedy sa pozorujú aj zmiešané reakcie (izolačno-hypotermické, metabolicko-izolačné) (Hammel, 1963). Adaptácia na chlad je závislá na type (vzduch, voda) a intenzite (nepretržitej, prerušovanej) vystavenia chladovému podnetu. Na adaptáciu má vplyv aj množstvo faktorov ako vek, pohlavie, cvičenie, strava, fitnes a zdravie (Makinen, 2010). Adaptácia na chlad môže byť zdedená alebo získaná a obidva typy môžu viesť k morfologickým a/alebo fyziologickým zmenám. Najskôr sa pravdepodobne objavia habituačné reakcie už po niekoľkých vystaveniach chladnému vzduchu alebo vode, ktoré môžu byť jednak lokálne alebo môžu pôsobiť na celé telo (Smolander et al., 2004). Zmeny vo vazokonstrikcii je možné pozorovať po 5 – 10 dňoch opakovanej chladovej expozície. Zvýšenie relatívneho počtu červených krviniek v jednotkovom objeme plazmy nastáva po 11 dňoch chladovej adaptácie (Leppäluoto et al., 2001). Mnohé zo štúdií skúmajúcich adaptáciu na chlad sa domnievajú, že aklimatizačné režimy po dobu dvoch týždňov sú dostatočné na hlavné fyziologické zmeny (Mäkinen, 2006).

Otužovanie má pozitívne účinky na organizmus, moduluje imunitný systém a určité komponenty imunitného systému (leukocyty, monocyty, interleukín-6) sú u otužilcov zvýšené (Qiu et al., 2014). Takisto počty T a B lymfocytov majú zvyšujúci sa trend (Janský et al., 1996). Otužovanie ďalej zvyšuje odolnosť organizmu voči infekciám, čo podporuje aktiváciu imunitného systému a zlepšuje cievnu reaktivitu (Janský et al., 1996; Kralova Lesna et al., 2015). Výsledkom pravidelného zimného plávania je znížená reakcia adrenergného systému na opakované vystavenie chladu a zníženie odpovede tohto systému v periférnom tkanive, kde dochádza k down-regulácii β-ARs (Janský & Janský, 2002). Jansky et al. sledovali u otužilcov

zníženú odpoveď β1- a β2-AR pri podávaní noradrenalínu v zimnej sezóne (Jansky et al., 2008). Otužilci tak majú neskorší nástup trasovej termogenézy, znížený teplotný prah jej nástupu a majú zvýšenú kapacitu netrasovej termogenézy (Jansky & Vybíral, 2000). Pokles adrenergnej odpovede cez β2-AR znižuje u otužilcov srdcovú frekvenciu (Jansky et al., 2008). U otužilcov bola ďalej preukázaná zvýšená koncentrácia noradrenalínu v sére, čím sa mení vyššie spomínaná kapacita netrasovej termogenézy, ale aj kardiovaskulárne funkcie. U kontrolných jedincov po ponorení do chladnej vody nastupuje okamžite trasová termogenéza, naproti tomu u otužilcov nastupuje až po cca 40 minútach, kedy výrazne klesá rektálna teplota. Tá je u otužilcov oproti kontrolám výrazne nižšia, čo svedčí o hypotermickej adaptácii u človeka (Kralova Lesna et al., 2015).

Netrasová termogenéza

U živočíchov adaptovaných na chlad sa teplo tvorí namiesto trasovej termogenézy tzv. netrasovou termogenézou. Prebieha najmä v hnedom tukovom tkanive, ktoré bude opísané v kapitole nižšie. U druhov homoitermých živočíchov, ktoré netvoria BAT, dochádza ku svalovej netrasovej termogenéze (Nowack et al., 2019). Netrasová termogenéza je definovaná ako zvýšenie produkcie metabolického tepla (nad hodnotu bazálneho metabolizmu), ktoré nie je spojené so svalovou kontraktilitou (Mendoza & Griffin, 2010). Tvorba tepla je spojená s oxidáciou živín, ku ktorému dochádza pri syntéze adenozíntrifosfátu (ATP) a pri metabolických reakciách (termogenéza). Úplná oxidácia energetických substrátov sa odohráva na vnútornej mitochondriálnej membráne v procese oxidatívnej fosforylácie v dýchacom reťazci. Protóny (H^+) z redukovaných koenzýmov z citrátového cyklu a β-oxidácie sú transportované cez tri proteínové komplexy dýchacieho reťazca a vytvárajú elektrochemický gradient, ktorý je nevyhnutný pre aktiváciu ATP syntázy a tvorbu ATP. Pokiaľ nedochádza k prechodu protónov mitochondriálnou membránou a komplexom ATP-syntázy, protóny voľne prechádzajú cez uncoupling proteins (UCPs, rozpojovacie/odprahujúce proteíny) a energia elektrochemického gradientu sa uvoľňuje vo forme tepla. Ide o tzv. rozpojenie (uncoupling proces) oxidácie od fosforylácie. Odprahujúce proteíny fungujú ako iónové kanály a ich otvorenie znižuje mitochondriálny membránový potenciál (Busiello et al., 2015; Vucetic et al., 2011). Netrasová termogenéza je v BAT aktivovaná sympatickým nervovým systémom uvoľňovaním noradrenalínu a stimuláciou β adrenergných receptorov (Bachman et al., 2002). V BAT sa exprimujú všetky tri podtypy β-ARs, avšak lipolýza v BAT a netrasová termogenéza sú v zásade sprostredkované β1- a β3-AR a β2-AR hrajú pri riadení týchto metabolických procesov iba malú úlohu. Agonisti β1- a β3-AR boli veľmi účinné na stimuláciu lipolýzy

a termogenézy v BAT , zatiaľ čo agonisti β2-AR aj vo veľmi vysokých dávkach sprostredkovávali len čiastočnú stimuláciu metabolizmu (Bronnikov et al., 1999; D'Allaire et al., 1995).

Fyziologickým dôsledkom aktivity UCP je teda oxidácia „paliva", pričom produktom je teplo, ktoré je vysoko regulované predovšetkým sympatickou stimuláciou, cez β-ARs (Busiello et al., 2015). Odpojenie oxidácie od fosforylácie je sprostredkované rýchlymi zmenami vnútornej aktivity UCP (v priebehu niekoľkých sekúnd), zvýšením množstva UCP v bunke (v priebehu niekoľkých hodín), zvýšením počtu mitochondrií na jeden adipocyt (v priebehu niekoľkých dní) a nakoniec hyperpláziou hnedých adipocytov (v priebehu dní až týždňov) (Strieleman et al., 1985).

Noradrenalín a adrenalín sa viažu na β-ARs na plazmatickej membráne BAT. Aktivácia β-AR-stimulačný G proteín (Gs)-adenylátcykláza (AC) dráhy spustí produkciu cyklického 3´,5´-adenosinmonofosfátu (cAMP) a tá aktivuje proteínkinázu A (PKA), ktorá fosforyluje serínový zvyšok (Ser-563 u potkana a Ser-551 u človeka) na hormón senzitívnej lipáze a tým ju aktivuje (Holm et al., 1987). Hormón senzitívna lipáza uvoľňuje voľné mastné kyseliny z intracelulárnych zásob, tie sa potom transformujú na acyl-CoA a transportujú sa do mitochondrií ako acyl-karnitín. V procese termogenézy voľné mastné kyseliny nepôsobia iba ako substráty pre oxidáciu a následný transport elektrónov dýchacím reťazcom, ale sú tiež spolu s UCP zapojené do procesu odpriahnutia oxidácie od fosforylácie (Sell et al., 2004). Aktivovaný BAT prechádza štrukturálnymi aj funkčnými zmenami, ktoré umožnia vysokú produkciu tepla a ako energetický zdroj využíva glukózu a mastné kyseliny (Vucetic et al., 2011).

Hnedý tuk

Existujú dva typy tukového tkaniva, biele (WAT) a BAT. Oba typy sa líšia funkciou, lokalizáciou, morfologickou stavbou, ale aj reguláciou. WAT slúži ako hlavná zásoba triglyceridov, ktoré sú významným zdrojom energie. BAT je hlavný orgán netrasovej termogenézy, popísanej vyššie, zabezpečujúci odpriahnutie oxidácie od fosforylácie a výrobu tepla (Park, 2014). Boli objavené aj tzv. béžové tukové bunky, ktoré sa vyskytujú vo WAT, najmä v trieslach. Podobajú sa bielym tukovým bunkám, ale sú zároveň schopné aj reagovať na termogénne podnety zvýšenou expresiou termogénnych génov a zvýšenou spotrebou kyslíka. Tieto béžové bunky majú za bazálnych podmienok fenotyp podobný WAT, vrátane veľkých lipidových kvapôčok a vykazujú nedostatočnú expresiu UCP1. Avšak v reakcii na určité podnety ako vystavenie chladu alebo aktiváciou β3-AR sa béžové bunky transformujú na

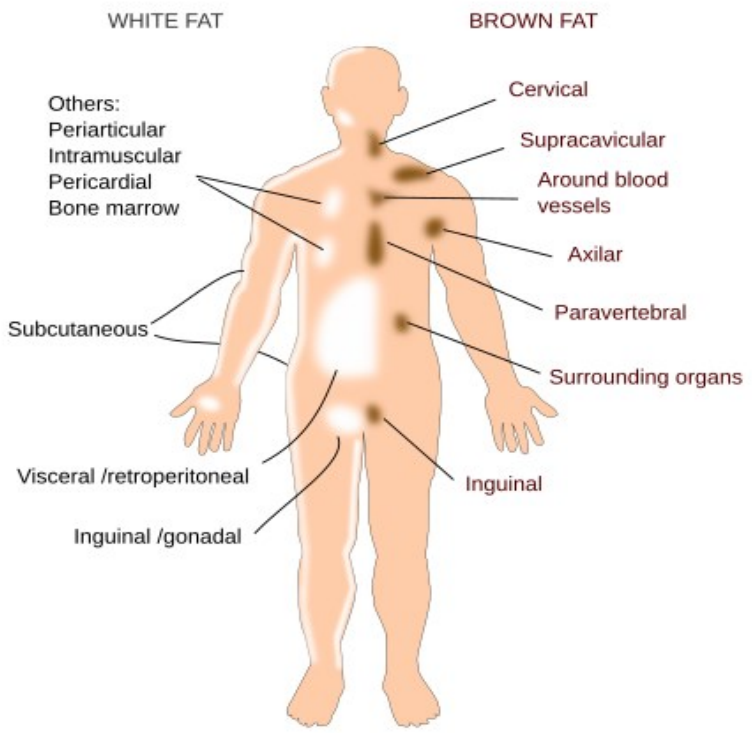
bunky, ktoré majú vlastnosti podobné BAT (malé lipidové kvapôčky a expresia UCP1). Tento proces sa nazýva tzv. hnednutie adipocytov (Barbatelli et al., 2010).

Hnedé tukové tkanivo sa od WAT odlišuje okrem farby, ktorá je pre BAT typická a je spôsobená prítomnosťou väčšieho množstva mitochondrií, aj ontogenetickým pôvodom (Jung et al., 2019). Cytoplazmu BAT označujeme ako granulárnu, aktívne hnedé adipocyty majú uprostred kruhovité jadro a obsahujú tiež veľa malých lipidových kvapôčok. Okrem toho je BAT vysoko vaskularizovaný a inervovaný, čo pravdepodobne umožňuje, aby rýchlo reagoval na aktivitu sympatického nervu a vytvorené teplo bolo rozptýlené v tele cievami. Charakteristickým znakom BAT na molekulárnej úrovni u zvierat i ľudí je vysoká úroveň expresie UCP1, ktorý je aj jeho špecifickým markerom (Golozoubova et al., 2006).

BAT je aj endokrinným orgánom a preukázateľne po termogénnej aktivácii vylučuje endokrinné látky, tzv. batokíny (Villarroya et al., 2017). K batokínom zaraďujeme napr. rastový faktor fibroblastov (FGF21), ktorý umožňuje po vystavení chladu β3-AR agonistom vyvolať tzv. hnednutie adipocytov. FGF21 je jedným z hlavných regulátorov hnedých adipocytov a môže posilňovať funkciu UCP1 v mitochondriách (Cuevas-Ramos et al., 2019). Ďalej sem patrí interleukín-6, ktorý takisto prispieva k hnednutiu tukových buniek a inhibícia interleukín-6 receptorov znižuje funkciu UCP1 v BAT (Kristóf et al., 2019). Inzulínu podobný rastový faktor I je ďalším spomedzi batokínov, napomáha rastu hnedých tukových buniek a môže zvyšovať množstvo prekurzorov hnedých adipocytov, z ktorých sa stanú zrelé hnedé adipocyty (Yamashita et al., 1994). Medzi batokíny patria aj proteíny z rodiny kostných morfogenetických faktorov (BMPs), ktoré aktivujú BAT a môžu upravovať množstvo bielych a hnedých tukových buniek, pretože podporujú vznik hnedých adipocytov z ich prekurzorov. BMPs zosilňujú odpoveď na adrenergnú stimuláciu a v reakcii na noradrenalín dokážu zvyšovať objem BAT (Xue et al., 2014). Pri chladom indukovanej aktivácii BAT dochádza k zvyšovaniu množstva vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru-A (VEGF-A), ďalšieho batokínu. Expresia VEGF-A sa prejavuje zvýšenou permeabilitou ciev a následne aj tvorbou nových ciev, zmnožením buniek, nárastom počtu mitochondrií a s tým súvisiacim zvyšovaním množstva UCP1. VEGF-A má v BAT pozitívny vplyv na oxidatívnu kapacitu mitochondrií (Mahdaviani et al., 2016).

Prítomnosť BAT u človeka je primárne spojovaná s novorodencami. Počas piateho mesiaca gravidity sa začína plodu vyvíjať hnedé tukové tkanivo. Pri narodení majú novorodenci pomerne veľké množstvo BAT a uplatňuje sa u nich noradrenalínom vyvolaná netrasová termogenéza, čo im umožňuje prežiť teplotný šok spojený s pôrodom (Cannon & Nedergaard, 2004). Prítomnosť BAT u novorodencov doplňuje nedostatočne vyvinuté termoregulačné

procesy na úrovni svalového tkaniva, ktoré nie je dostatočné na trasovú termogenézu (Merklin, 1974). Do nedávnej doby panoval názor, že BAT sa vyskytuje iba u novorodencov a že v dospelosti vymizne. V súčasnosti bolo niekoľkokrát dokázané, že BAT sa vyskytuje aj u dospelých jedincov a to najmä v oblasti medzi lopatkami a pozdĺž chrbtice, krku, hrudi a v okolí obličiek, schematicky znázornené na obrázku 2 (Ouellet et al., 2012; Sacks & Symonds, 2013; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Keď je aktivovaná termogenéza, zásoby BAT sa zväčšujú hypertrofickými a hyperplazickými procesmi (Cannon & Nedergaard, 2004).



Obrázok. 2: *Ukážka distribúcie bieleho (white fat) a hnedého (brown fat) tukového tkaniva u dospelého človeka. Hnedý tuk sa u dospelých jedincov nachádza v oblasti medzi lopatkami a pozdĺž chrbtice, krku, hrudi a v okolí obličiek. Prevzaté z (Gesta et al., 2007)*

2.2 Katecholamíny

Vystavenie organizmu akútnemu chladu, ktorý pôsobí ako stresor, ale rovnako ako adaptácia na chlad, je spojený so zmenami v hladinách katecholamínov a odpovedi ich receptorov (Avakian et al., 1984; Jansky et al., 2008). Bolo preukázané, že chronický intermitentný chladový stres zvyšuje citlivosť osy hypotalamus-hypofýza-nadobličky u potkanov, čo následne zvyšuje odpoveď katecholamínov na ďalšie stresové podnety (pre prehľad Ma & Morilak, 2005). Uvoľnenie katecholamínov spustí počas stresovej reakcie veľké množstvo ochranných a adaptačných reakcií ktoré zvyšujú dostupnosť kyslíka, energetických substrátov a celkovo mobilizujú organizmus na vysoký fyzický výkon. Súčasťou týchto reakcií je zvýšená

vazokonstrikcia a zvýšené zrážanie krvných doštičiek, čo znižuje riziko vykrvácania. To bolo pozorované u zvierat vystavených chladu ako negatívny jav (Saeki et al., 2017).

Syntéza katecholamínov

Katecholamíny (noradrenalín a adrenalín) sú ligandy adrenergného systému, prítomné všade v organizme. Bezprostredným prekurzorom katecholamínov je tyrozín. Konverzia tyrozínu, ktorý je syntetizovaný z fenylalanínu v pečeni (alebo pochádza z potravy) na noradrenalín, nastáva 4 nasledujúcimi krokmi: hydroxylácia tyrozínu tyrozínhydroxylázou za vzniku 3,4-dihydroxyfenylalanínu (L-DOPA), ktorý je rýchlosť limitujúcim krokom v biosyntetickej dráhe katecholamínov. Nasleduje dekarboxylácia katalyzovaná DOPA-dekarboxylázou a vzniká dopamín. Pomocou dopamín-β-hydroxylázy vzniká noradrenalín (Végh et al., 2016).

Noradrenalín je syntetizovaný v presynaptických vačkoch postgangliových adrenergných neurónoch sympatika a v centrálnej nervovej sústave, predovšetkým v neurónoch z jadra *locus coeruleus* (Bylund & Bylund, 2014). Okrem toho sa noradrenalín uvoľňuje aj z chromafínnych buniek drene nadobličiek pod stimuláciou splachnického nervu (Eade & Wood, 1958).

Adrenalín je hlavným produktom drene nadobličiek a predstavuje až 80% katecholamínov a mimo drene sa netvorí. Adrenalín je produkovaný chromafínnymi bunkami. Syntéza je rovnaká ako pri noradrenalíne, avšak v bunkách drene nadobličiek je navyše prítomný enzým fenyletanolamín-N-metyltransferáza (PNMT), ktorý pridáva metylovú skupinu na noradrenalín a vzniká tak adrenalín. PNMT je cytoplazmatický enzým, ktorý je exprimovaný v bunkách drene nadobličiek obsahujúcich adrenalín a v niektorých neurónoch mozgového kmeňa a retiny, ktoré využívajú adrenalín ako neurotransmiter (Gnegy, 2012).

Jednotlivé katecholamíny sa za stresových podmienok uvoľňujú rozdielne. Toto uvoľňovanie je špecificky riadené jadrami centrálneho nervového systému v mozgovej kôre, hypotalame a mieche. Stimulácia splanchnických nervov a nikotínových alebo muskarínových receptorov spôsobujú selektívne uvoľňovanie adrenalínu a noradrenalínu. To pripravuje telo na stratégiu „útok alebo útek“ (Edwards & Jones, 1993). Zvyšuje sa srdcová frekvencia, kontrakcia myokardu a krvný tlak; prietok krvi sa primárne presmeruje do kostrového svalstva, aby bolo telo pripravené vykonávať intenzívnu činnosť. Takto telo reaguje na rôzne stresory, vrátane ťažkej hypoglykémie, krvácanie, chladovej expozície, akútneho infarktu myokardu alebo iných závažných stresových stavov (de Diego et al., 2008).

Degradácia katecholamínov

Katecholamíny cirkulujú v plazme vo voľnej väzbe s albumínom a sú rýchlo metabolizované v rámci jednotiek minút dvoma oddelenými metabolizujúcimi systémami. Jeden systém pomocou katechol-O-metyltransferázy (COMT) a druhý pomocou monoaminooxidázy (MAO) premieňa katecholamíny na neaktívne metabolity (Gnegy, 2012). COMT katalyzuje meta-O-metyláciu cirkulujúceho adrenalínu a noradrenalínu v pečeni, obličkách a aj v efektorových bunkách. Jeho účinkom vzniká z noradrenalínu normetanefrín, z adrenalínu metanefrín. MAO sa nachádza na vonkajšej strane mitochondriálnej membrány vo väčšine tkanív, vo vysokej miere najmä v pečeni obličkách, črevách, žalúdku, ale aj v srdci. Účinkom MAO vzniká z adrenalínu alebo noradrenalínu kyselina 3,4-dihydroxymandľová alebo alkohol 3,4-dihydroxyfenylalkohol (Cesura, 2007)

Monoaminoaxidáza a myokard

Existujú dve izoformy MAO – monoaminooxidáza A (MAO-A) a monoaminooxidáza B (MAO-B). MAO-A má vysokú afinitu k noradrenalínu a hrá významnú úlohu v regulácii intraneuronálneho metabolizmu noradrenalínu. MAO-A všeobecne metabolizuje tyramín, noradrenalín, serotonín a dopamín (a ďalšie menej klinicky významné látky) (Gaweska & Fitzpatrick, 2011). MAO-A je spájaný v súvislosti so srdcom ako významný zdroj reaktívnych foriem kyslíka. V závislosti na dostupných koncentráciách substrátu sú ROS produkované MAO-A schopné spúšťať samostatné signálne dráhy vedúce k bunkovej proliferácii, hypertrofii a apoptóze (Maurel et al., 2003). Pomocou farmakologického a genetického prístupu sa dokázalo, že hypertrofia indukovaná noradrenalínom je tiež čiastočne sprostredkovaná ROS generovaným MAO-A mechanizmom (Kaludercic et al., 2014). Použitím neonatálnych potkaních a dospelých myších kardiomyocytov sa zistilo, že noradrenalín pôsobí čiastočne nezávisle na väzbe α- alebo β-adrenergných receptorov (Luo et al., 2001). Samotná stimulácia aktivity MAO-A je dostatočná na spustenie hypertrofie myocytov, nezávisle od aktivácie receptora. Naviac, špecifická inhibícia MAO-A v srdciach myší vystavených tlakovému preťaženiu je schopná úplne zabrániť oxidačnému stresu, apoptóze, dysfunkcii ľavej komory a remodelácii (Kaludercic et al., 2010). Viaceré štúdie sledovali MAO-A ako jeden z hlavných proteínov v rôznych modeloch srdcového zlyhania potkanov vyvolaných objemovým preťažením (Petrak et al., 2011), tlakovým preťažením (Lairez et al., 2009) alebo infarktom myokardu (Bianchi et al., 2005).

Naproti tomu, MAO-B metabolizuje hlavne dopamín (a ďalšie menej klinicky významné látky). Rozdiely medzi substrátovou selektivitou týchto dvoch enzýmov sa klinicky

využívajú pri liečbe špecifických porúch. Pri liečbe depresie sa zvyčajne používajú inhibítory MAO-A a pri Parkinsonovej chorobe inhibítory MAO-B (Nolen et al., 1993; Riederer & Laux, 2011). Ak je MAO-B inhibovaná, potom je k dispozícii viac dopamínu pre správnu neuronálnu funkciu, najmä pri Parkinsonovej chorobe (Mallajosyula et al., 2009). Ukázalo sa tiež, že aktivita MAO-B hrá úlohu pri poškodení srdca vyvolanom stresom (Kaludercic et al., 2014). Pri nedostatku MAO-B bolo zabránené dilatácii ľavej komory a funkčnej dekompenzácii v srdciach vystavených tlakovému preťaženiu a aktivácia MAO-B spôsobuje niekoľko významných nepriaznivých účinkov (Sturza et al., 2013). Inhibícia MAO-B vedie k zníženej tvorbe peroxidu vodíku (H_2O_2) a aldehydov, ktoré by inak mohli synergizovať a spôsobiť dysfunkciu mitochondrií (Jenner, 2012).

Počas degradácie substrátu MAO tvorí H_2O_2, aldehydy a amoniak (Kaludercic et al., 2014), čo predstavuje zdroj ROS v srdci, najmä za stresových podmienok. Zvýšenie expresie MAO-A môže ako zdroj ROS v srdci viesť k spontánnemu mitochondriálnemu poškodeniu. ROS generovaný MAO-A pri ischemicko-reperfúznom poškodení (I/R) inhibuje sfingozínkinázu, čo vedie k akumulácii ceramidu a apoptóze kardiomyocytov (Pchejetski et al., 2007). Štúdia Villeneuve et al. ukázala, že nadmerná expresia MAO-A v srdci bola sprevádzaná ultraštrukturálnymi defektmi srdcových mitochondrií, vyčerpaním ATP a nakoniec viedla k nekróze kardiomyocytov a srdcovému zlyhaniu (Villeneuve et al., 2013). Je zaujímavé, že starnúce kardiomyocyty vykazovali výrazné zvýšenie aktivity MAO-A (95-násobné) a je známe, že starnutie je hlavným rizikovým faktorom srdcového zlyhania (Kaludercic et al., 2014).

2.3 Adrenergné receptory

Adrenergné receptory (ARs) viažu endogénne katecholamíny ako adrenalín a noradrenalín. Radia sa do početnej rodiny receptorov spriahnutých s G-proteínmi (GPCR). Sú veľmi podobné bakteriálnemu rhodopsínu, podľa neho sa radia do skupiny GPCR rhodopsínového typu – class A (Costanzi, 2012). Katecholamíny pôsobia cez dve hlavné skupiny receptorov. Alfa adrenergné (α-ARs) a beta adrenergné (β-ARs) receptory. Obidve tieto skupiny sa ďalej delia na α1-, α2-AR a β1-, β2- a β3-AR. Niektoré štúdie naznačili, že v srdci môže byť prítomný aj štvrtý adrenergný receptor „β4-AR“ (Granneman, 2001; Kaumann & Molenaar, 1997). Jeho prítomnosť zatiaľ nebola potvrdená. Táto klasifikácia je založená na relatívnej väzbe agonistov a antagonistov (tabuľka 1). Každý z týchto receptorov sa vyznačuje určitou odlišnosťou

v signalizácii, účinku, spojeniu s inými špecifickými ligandmi, ale aj svojim zastúpením v tele (pre prehľad Lohse et al., 2003; Oliver et al., 2019).

ARs	Ligand a jeho afinita	Výskyt receptoru v srdci	% zastúpenie v srdci
α1-AR	Noradrenalín > adrenalín	kardiomyocyty, koronárne cievy	11% (z celkového ARs)
α2-AR	Noradrenalín > adrenalín	koronárne cievy	8% (z celkového ARs)
β1-AR	Izoprenalín > adrenalín = noradrenalín	komory, predsiene, kardiomyocyty	70% (z celkového β-ARs)
β2-AR	Izoprenalín > adrenalín >> noradrenalín	komory, predsiene, T-tubuly, kaveoly v kardiomyocytoch	27% (z celkového β-ARs)
β3-AR	Izoprenalín = noradrenalín > adrenalín	komory, predsiene, endotel koronárnych ciev	3% (z celkového β-ARs)

Tabuľka 1: Väzba jednotlivých AR k ligandom a ich výskyt v srdci(upravené podľa (Lohse et al., 2003; Jensen et al., 2009).

2.2.1 Alfa adrenergné receptory

Adrenergný receptor α1

Adrenergný receptor α1 (α1-AR) sa vyskytuje v troch podtypoch α1A-, α1B- a α1D-AR (Jensen et al., 2011). V ľudských srdciach, ale aj u hlodavcov sú α1A-AR a α1B-AR exprimované predovšetkým v kardiomyocytoch, zatiaľ čo α1D-AR najmä v bunkách hladkého svalstva koronárnych ciev. α1A-AR pravdepodobne reguluje dráhy prežitia buniek a prispieva ku kontraktilnej funkcii. Funkcia α1B-AR je menej istá, aj keď sa zdá, že reguluje veľkosť srdca po narodení. Aktivácia α1D-AR vedie ku koronárnej vazokonstrikcii, najmä pri absencii fungujúceho endotelu (Jensen et al., 2009).

α1-AR zaisťuje mobilizáciu vápnika a membránových fosfolipidov. Tento receptor je spriahnutý s Gq heterotrimérnymi proteínmi. Prostredníctvom Gq proteínu sa aktivuje fosfolipáza Cβ a tá katalyzuje hydrolýzu a premenu membránových fosfolipidov na inositoltrifosfát (IP3) a diacylglygerol (DAG), ktorý fungujú ako sekundárny posli. IP3 rýchlo zvyšuje koncentráciu vápnika v cytoplazme a DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC). α1-AR typicky sprostredkovávajú vo vaskulárnom tkanive vazokonstrikciu (Jensen et al., 2014).

Niekoľko štúdií naznačuje, že α1-AR sú cytoprotektívne a pôsobia protikladne k β1-AR. Farmakologická aktivácia α1-AR in vitro môže chrániť bunky pred apoptózou

fosforyláciou anti-apoptoického Bcl2 a mitogénom aktivovanej proteínkinázy 1 a 2 (ERK 1/2), ktoré regulujú rôzne cytoprotektívne účinky (Iwai-Kanai et al., 1999; Wright et al., 2008). Aktivácia ERK sprostredkovaná α1-AR je signálnou cestou zapojenou do vzniku fyziologickej hypertrofie (Xiao et al., 2001).

Kultivované myšie kardiomyocyty, ktoré boli α1A- a α1B-KO po rôznych toxických stimuloch vykazovali výrazne zvýšenú aktiváciu nekrózy a apoptózy. Výsledky naznačujú, že táto protekcia je sprostredkovaná α1A-AR, ale nie α1B-AR (Huang et al., 2007).

V zlyhávajúcom srdci sú α1-AR na rozdiel od β1-AR na bazálnej úrovni alebo je ich exprimácia dokonca zvýšená. Zvýšená mRNA α1-AR bola pozorovaná aj u potkanov vystavených tlakovému preťaženiu (Rokosh et al., 1996). Údaje z klinických štúdií pacientov s hypertenziou, ktorým bol podávaný α1-AR blokátor, sledovali až dvojnásobný nárast srdcového zlyhania oproti kontrolným jedincom (Stafford et al., 2004). Nedávna analýza tiež naznačila zvýšený výskyt rizika hospitalizácií so srdcovým zlyhaním u pacientov užívajúcich α-blokátory, bez súčasnej β-blokády (Dhaliwal et al., 2009). Spoločne tieto objavy naznačujú, že aktivácia α1-AR môže zmierniť toxické účinky dlhodobej β-AR aktivácie v hyperadrenergickom prostredí, najmä pri srdcovom zlyhaní. Kardioselektívna aktivácia α1-AR môže teda predstavovať nový prístup k liečbe srdcového zlyhania, avšak stále nie je dostatočne preštudovaná.

Adrenergný receptor α2

Alfa 2 adrenergný receptor je spojený s inhibičným G proteínom (Gi). U hlodavcov sa skladá z troch vysoko homológnych podtypov, α2A-, α2B- a α2C- AR a u ľudí aj α2D-AR (Ruuskanen et al., 2004). Podtypy α2A- a α2C-AR sa nachádzajú hlavne v centrálnom nervovom systéme. α2B-AR sa vyskytujú častejšie na hladkých svaloch ciev a pôsobia pri vazokonstrikcii, vrátane koronárnych artérii, avšak rozsah tohto účinku môže byť obmedzený a môže byť negovaný vazodilatačným účinkom β2-AR (Elliott, 1997; Sun et al., 2002; Woodman & Vatner, 1987).

α2-AR sú členmi rodiny receptorov spojených s G proteínom, všetky 3 podtypy inhibujú AC, čo zase znižuje hladiny cAMP. To inhibuje uvoľňovanie noradrenalínu a utlmuje adrenergnú signalizáciu. Aktivácia tejto negatívnej spätnoväzbovej reakcie môže tiež spôsobiť zníženie srdcovej frekvencie a krvného tlaku (Buerkle & Yaksh, 1998). Uvoľňovanie noradrenalínu zo srdcových sympatických nervových zakončení je riadené presynaptickými α2A-AR a α2C-AR. Delécia obidvoch týchto podtypov α2-AR vedie k hypertrofii srdca a srdcovému zlyhaniu v dôsledku chronicky zvýšeného uvoľňovania noradrenalínu do krvi, ako aj zvýšenej sekrécie noradrenalínu a adrenalínu z drene nadobličiek (Brede et al., 2002, 2003).

Niektoré štúdie naznačujú, že inhibícia α2-AR v sympatických neurónoch môžu byť ochranná počas vývoja srdcového zlyhania tým, že obmedzí množstvo noradrenalínu stimulujúceho β-ARs v kardiomyocytoch (Brede et al., 2002; Perrino & Rockman, 2007). Agonisti α2AR môžu tlmiť srdcový a obličkový sympatický tonus pri srdcovom zlyhaní, avšak jeden pri klinických skúškach zlyhal, pretože zvyšoval úmrtnosť práve na srdcové zlyhanie (Cohn et al., 2003). V súčasnej dobe sú v klinických skúškach využívaní iní agonisti α2-AR, ktorí vykazujú utlmenie sympatoadrenergného systému bez vedľajších komplikácii (Duncan et al., 2018).

2.4 Beta-adrenergné receptory

β-ARs patria do triedy s GPCR, triedy A rodopsínu podobných receptorov. Sprostredkujú rôznorodé signálne dráhy väzbou syntetických a biologických ligandov. Do rodiny β-ARs patrí β1-AR, β2-AR a β3-AR, ktoré sa líšia podľa afinity k adrenalínu a noradrenalínu (viď tabuľka 1; (Costanzi, 2012). Každá izoforma je kódovaná vlastným genóm, ktoré sa líšia prítomnosťou intrónov. β1- a β2-AR obsahujú gény bez intrónov, oproti tomu β3-AR môže obsahovať 2 až 3 intróny (Collins et al., 1989). Čo sa týka štruktúry, najvýznamnejší rozdiel je v oblasti intracelulárneho C-konca, ktorý obsahuje aminokyselinové sekvencie dôležité v procese desenzitizácie receptorov. Kináza s G-proteínmi spriahnutých receptorov (GRK) je jednou z hlavných kináz v procese desenzitizácie a preferenčne fosforyluje β-ARs práve na C-konci. U β3-AR je tento úsek kratší, pričom β1-AR a β2-AR ho majú v plnej dĺžke. Z tohto možno predpokladať, že u β3-AR neprebieha desenzitizácia vo významnej miere (Grazia Perrone & Scilimati, 2010; Penn & Benovic, 1994).

Väzba ligandu na β-ARs nespôsobuje špecifickú zmenu konformácie. Ligandy môžu byť špecifické, čiastočne špecifické alebo nešpecifické. Príkladom nešpecifických antagonistov je izoprenalín, propranolol a timolol. Špecifickým antagonistom β1-AR sú metaprolol, atenolol a bisoprolol, nazývané aj beta-blokátory (Wachter & Gilbert, 2012). Čiastočne špecifickým antagonistom β2-AR je ICI 118 551 (Varma et al., 1999). ICI 118 551sa viaže aj na β1- a β3-AR, ale k β2-AR má až 100 krát vyššiu afinitu (O'Donnell & Wanstall, 1980). Selektívny agonista β3-AR je BLR 37344 (Bond & Clarke, 1988), avšak v súčasnej dobe sa zistilo, že pozitívny inotropný účinok BRL 37344 môže byť sprostredkovaný stimuláciou β1- a β2-AR (Pott et al., 2003).

V ľudskom srdci je percentuálny pomer β1-AR:β2-AR v predsieňach zhruba 60 – 70% ku 30% a okolo 70 – 80% ku 20 – 30% v komorách (Brodde & Michel, 1999). V sinoatriálnom uzle je hustota β1-AR 3-krát vyššia ako v predsieňach a hustota β2-AR 2,5-krát vyššia ako

v pravej predsieni (Rodefeld et al., 1996). Všetky typy β-ARs sú schopné zvyšovať kontraktilitu srdca tzv. klasickou dráhou cez stimulačný G-proteín. β2-AR a β3-AR stimulujú okrem nej aj neklasickú dráhu cez inhibičné G-proteíny, ktorá sa podieľa na protektívnych mechanizmoch v srdcovom tkanive behom dlhodobej stimulácie. Ak katecholamínová stimulácia trvá dlhšiu dobu, postupne dochádza k desenzitizácii β1-AR a postupnému preorientovaniu z klasickej signálnej dráhy na neklasickú (pre prehľad Lohse et al., 2003).

2.3.1 Beta 1 adrenergný receptor

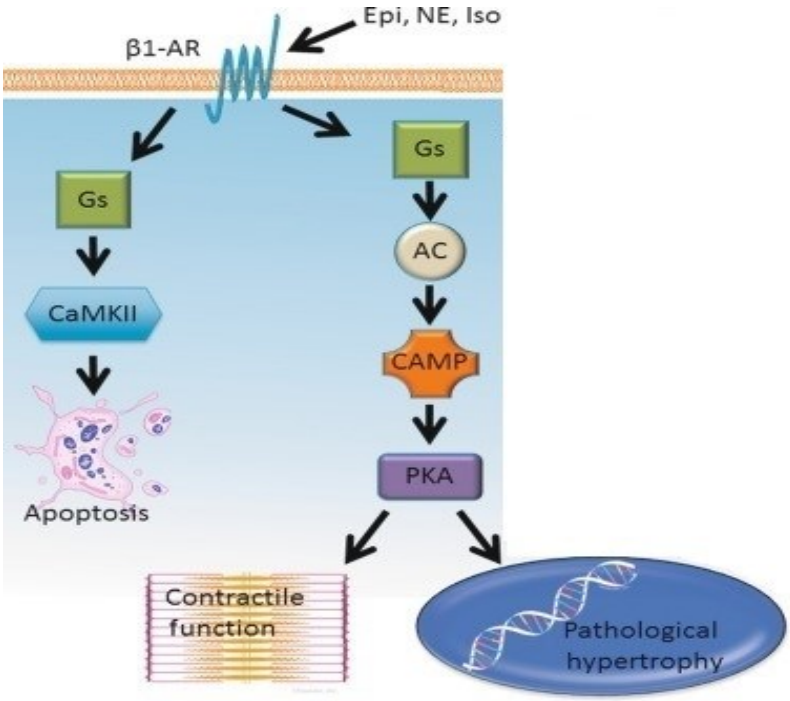
Adrenergný receptor β1-AR tvorí 7 transmembránových slučiek sa skladá z 477 aminokyselín, je kódovaný génom (*Adrb1*), ktorý neobsahuje žiadne intróny a nachádza sa na chromozóme 10q24→q26 (Yang-Feng et al., 1990). β1-AR je v organizme takmer všadeprítomný a je spriahnutý so stimulačným G proteínom. V zdravom srdci sa vyskytuje rovnomerne na cytoplazmatickej membráne kardiomyocytov. Primárne je exprimovaný v komorách a predsieňach srdca, kde zvyšuje srdcový výdaj, v sinoatriálnom uzle zvyšuje tepovú frekvenciu (chronotropný účinok), zvyšuje kontraktilitu (inotropný účinok), a vedenie v atrioventrikulárnom uzle (Brodde et al., 1986). Mimo pľúc, pečene a kostrových svalov sa β1-AR nachádza v bielom a hnedom tukovom tkanive, kde sprostredkuje spolu s β3-AR lipolýzu (Sennitt et al., 1998).

Beta1 adrenergný receptor v srdci

Klasická stimulačná dráha aktivovaná predovšetkým β1-AR a β2-AR je zodpovedná za zvýšený/pozitívny chronotropný, inotropný a lusitropný účinok katecholamínov na srdcové tkanivo. Adrenergná stimulácia má pozitívny ionotropný efekt na úrovni homeometrickej i heterometrickej regulácie srdcovej kontraktility (pre prehľad Madamanchi, 2007). Prvým efektorom tejto dráhy je Gs proteín. Jeho aktivovaná podjednotka α (Gαs) stimuluje AC, ktorá zvyšuje hladinu druhého posla, cyklický adenosinmonofosfát (AHLQUIST, 1948). Molekula cAMP stimuluje proteinkinázu A, ktorá fosforyluje viacero rôznych substrátov esenciálnych pre srdcové funkcie. Medzi substráty PKA patrí predovšetkým napäťovo riadený Ca^{2+} kanál L-typu, ktorého fosforylácia spôsobuje zvýšený tok Ca^{2+} iónov do bunky. Ďalej fosforyluje srdcový ryanodinový receptor 2 (RyR2), na seríne (Ser 2808), čo zvyšuje väzobnú afinitu Ca^{2+} k RyR a tým zvyšuje pravdepodobnosť otvárania RyR. Zdá sa, že miera fosforylácie bude kľúčová (Shan et al., 2010). PKA ďalej fosforyluje Na^{+} a K^{+} kanály. Fosfolamban (PLB) je ďalším dôležitým substrátom PKA. Pokiaľ nie je fosforylovaný znižuje rýchlosť reabsorpcie Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula inhibíciou ATPázy sarkoplazmatického retikula (SERCA) a deinhibičná fosforylácia PLB skracuje relaxáciu. PKA ďalej fosforyluje troponin I (TnI), čo

znižuje senzitivitu troponínového komplexu a následne aj kontraktilného aparátu a uľahčuje tak uvoľnenie Ca^{2+} z myofilament a zvyšuje rýchlosť relaxácie (pre prehľad Ramirez-Correa & Murphy, 2007). Fosforylácia týchto kľúčových proteínov Ca^{2+} kanál L typu, TnI a PLB má za následok zvýšenie kontraktility (Freedman & Lefkowitz, 2004).

V zlyhávajúcom srdci adrenergné receptory pomáhajú udržiavať srdcový výdaj zvýšením kontraktility a srdcového rytmu (Haber et al., 1993; Hasking et al., 1986; Swedberg et al., 1984). Klasická dráha spúšťa reakciu bunky na akútny stres, kedy je treba zvýšiť srdcový výkon a takéto zvýšenie je prospešné. Dlhodobá aktivácia tejto dráhy ma detrimentálne účinky na kardiomyocyty. V zlyhávajúcom srdci klesá počet β1-ARs až o polovicu, zatiaľ čo β2-AR a β3-AR sa zvyšujú (Bristow et al., 1986; Brodde et al., 1986). Downreguláciu β1-AR môžeme pozorovať jednak na plazmatickej membráne, ale aj na úrovni mRNA (Engelhardt et al., 1999). Pri dlhodobej aktivácii katecholamínmi, PKA aktivovaná cAMP-responzívny element viažuci proteín (CREB), ktorý aktivuje expresiu cAMP indukovaného včasného represoru (ICER). Tento proteín znižuje expresiu anti-apoptotického proteínu Bcl2 a tým jeho anti-apoptotické účinky (Lee et al., 2013). Ďalším mechanizmom je zvýšená aktivácia Ca^{2+}/kalmodulín dependentnej kinázy II (CaMKII) vplyvom zvýšenej koncentrácie Ca^{2+} v cytoplazme. To vedie k vyliatiu cytochrómu c z mitochondrie, čo stimuluje apoptózu buniek, graficky znázornené na obr. 3 (Feng & Anderson, 2017).



Obrázok. 3: *Signálna dráha β1-AR v zlyhávajúcom srdci. β1-adrenergné receptory sú stimulované epinefrínom (epi), norepinefrínom (NE) a izoprenalínom (Iso). Sú spojené s Gs, ktorý aktivuje AC, cAMP a PKA. Chronická aktivácia tejto dráhy stimuluje kontraktilnú funkciu a spôsobuje patologickú hypertrofiu. Okrem toho β1-AR účinkuje prostredníctvom Gs a Ca^{2+} kalmodulín-dependentnej proteínkinázy (CaMKII), čím zvyšuje množstvo Ca^{2+} v bunke, čo vedie k apoptóze. Prevzaté z (Berthiaume et al., 2016).*

2.3.2 Beta 2 adrenergný receptor

Beta 2 adrenergný receptor je trasnsmembránový proteín, ktorý sa skladá z 413 aminokyselín a je kódovaný génom *Adrb2*. *Adrb2* sa nachádza na chromozóme 5q31→q32 a neobsahuje žiadne intróny (Yang-Feng et al., 1990). V zdravom srdci sa β2-AR nachádzajú najmä v T-tubuloch a v kaveolách cytoplazmatickej membrány. V komorách a predsieňach sa nachádza oproti β1-AR len v menšej miere. Aktivácia β2-AR má dilatačné účinky na malé vencovité tepny a zvyšuje perfúziu srdca. Tento mechanizmus je potrebný pri stratégii „útok alebo útek". Podobne ako β1-AR zvyšuje srdcový výdaj a zvyšuje tepovú frekvenciu (Emrick et al., 2010). Dominantne je exprimovaný v pľúcach, hladkej svalovine dýchacích ciest a bronchov. (Johnson, 2006), ktorých stav ovplyvňuje pravú komoru. Nová klinická štúdia skúmala vplyv β2-AR na termogenézu v ľudskom BAT. Ich výsledky ukazujú, že na rozdiel od hlodavcov, kde sa BAT aktivuje cez β3-AR signálnu dráhu, sa BAT z medzilopatkovej oblasti u ľudí aktivuje β2-AR signálnou dráhou (Blondin et al., 2020). Mirabegron, špecifický β3-AR agonista stimuloval temogenézu v BAT až v maximálnych povolených koncentráciách a zároveň spôsoboval nežiaduce kardiovaskulárne účinky (zvýšená srdcová frekvencia a systolický tlak) (Baskin et al., 2018). Mirabegdon vo vysokých koncentráciách vykazuje nízku špecificitu k β3-AR, teda výsledky skôr odrážajú všeobecnú β-ARs stimuláciu. Blondin et al. pozorovali, že na úrovni mRNA je v ľudskom BAT najviac zastúpeným receptorom β2-AR a po stimulácii noradrenalínom sa ešte zvyšuje. Pomocou „RNAscope" in situ hybridizácie dokázali, že *Adrb2* je koexprimovaný spolu s *UCP1* pomocou stimulácie noradrenalínom v hnedých adipocytoch, zatiaľ čo *Adrb3* nebol detegovaný. Ďalej použili β2-AR knock-out ľudské hnedé adipocyty, tu pozorovali zníženie mRNA *UCP1* a zníženie odpovede na stimuláciu na noradrenalínom, zatiaľ čo u β1-AR (*Adrb1*) a β3-AR (*Adrb3*) knock-out boli tieto parametre nezmenené (Blondin et al., 2020). Tieto dôkazy naznačujú, že existujú isté rozdiely v expresii génov zodpovedných za termogenézu a morfológiu hnedých adipocytov in vivo medzi hlodavcami a ľuďmi (de Jong et al., 2019).

Beta2 adrenergný receptor v srdci

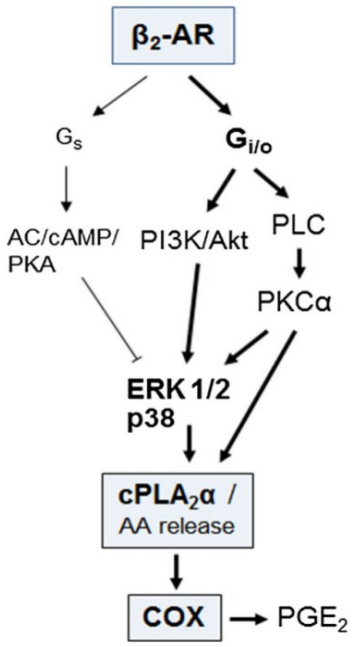
Druhý majoritný ARs v srdci je β2-AR, v srdci a je zastúpený zhruba 30%. V srdci sa môže spriahnuť jednak so stimulačným G proteínom a aj s inhibičným G proteínom (s podtypmi Gαi1/2 a Gαi3) a tak aktivovať rozdielne signálne dráhy. Väzba β2-AR na Gs proteín aktivuje klasickú dráhu ako pri β1-AR. Následná signalizácia cAMP je u β1-AR a β2-AR rozdielna. Signalizácia sprostredkovaná β2-AR je lokálna, zatiaľ čo signalizácia cAMP sprostredkovaná β1-AR je globálna (Kuschel et al., 1999). Štúdie preukázali, že kaveolín 3 hrá rozhodujúcu

úlohu pri lokalizácii β2-adrenoreceptorov a nimi sprostredkovanej signalizácie cAMP v dospelých kardiomyocytoch, konkrétne v T-tubuloch a kaveolách (Calaghan & White, 2006). To umožňuje spoločnému druhému poslovi cAMP vykonávať selektívne funkcie bez toho, aby spôsobovalo globálny efekt (Woo et al., 2015). Posledné dôkazy u potkanov však preukázali, že funkčná signalizácia β2-AR-Gs-AC-cAMP sa vyskytuje takmer výlučne na sarkoléme komorových myocytov (Cros & Brette, 2013).

Zvýšená hladina aktivuje PKA a jej cieľové proteíny. Zaujímavé je, že PKA fosforyluje spätnou väzbou samotné β2-AR a vyvoláva heterológnu desenzitizáciu. Tá slúži ako sprostredkovateľ odpojenia β2-AR od Gs a súčasné „prepnutie“ na Gi a následnú aktiváciu Gi signálnej dráhy (Daaka et al., 1997). Fosforylácia PKA na Ser261, 262, 345 a 346 vedie ku zníženiu účinnosti väzby receptora na Gs a znižuje produkciu cAMP v reakcii na ďalšiu stimuláciu. Gi signálne dráhy sú zapojené do prevencie škodlivých účinkov nadmernej stimulácie β1-AR (Daaka et al., 1997; Hausdorffs et al., 1989) .

Väzba receptoru s Gi spôsobí uvoľnenie aktivovanej Gαi podjednotky, ktorá inhibuje aktivitu AC a Gβγi podjednotku. Aktivovaná Gαi aktivuje fosfoinositol-3-kinázu (PI3K). PI3K, ktorá patrí do rodiny lipidových kináz a sa podieľa na regulácii rôznych bunkových funkcií vrátane bunkového rastu, prežitia a signálnej transdukcie (pre prehľad Rameh & Cantley, 1999). Aktivita PI3K je tiež úzko spojená s útlmom funkcie β-AR, čo vedie k zníženiu kontraktility (Crackower et al., 2002). Aktivovaná PI3K konvertujú fosfatidylinozitid-4,5-bifosfát na fosfatidylinozitid 3,4,5-trifosfát, ktorý funguje ako druhý posol a zvyšuje hladiny rôznych efektorov. Napríklad PI3K-1, ktorá následne aktivuje rôzne kinázy, vrátane proteínkinázy B (PKB/Akt) (Burgering & Coffer, 1995).

Ďalej sú v krátkosti opísané jednotlivé proteíny zapojené do β2-AR-Gi signalizácie v srdci, graficky znázornené na obrázku 4.



Obrázok 4: *Zjednodušená schéma ukazujúca prepojenie medzi signalizáciou β2-AR a dráhou cPLA2a/COX/PGE2 v myokarde. Prepínanie β2-AR z Gs na Gi /o vedie k aktivácii PI3K a /aleboPLC. PLC štiepi fosfatidylinozitol 4,5-bisfosfát na diacylglycerol (DAG) a inositol 1,4,5-trisfosfát (IP3).Aktivita ERK1/2 a p38 je možné zvýšiť fosforyláciou, ktorá je sprostredkovaná PI3K aj PKCα. Naproti tomu signalizácia cez cAMP/PKA môže znížiť aktiváciu týchto MAPK. ERK1/2 a p38 a aj PKCα stimulujú cPLA2a a uvoľňovanie AA, ktoré slúži ako substrát pre COX a tvorbu PGE2. AA kyselina arachidónová; AC adenylátcykláza; β2-AR; cPLA2α cytozolická fosfolipáza A2α; COX cyklooxygenáza; MAPK mitogénom aktivované proteínkinázy; PGE2 prostaglandín E2; PKA proteínkináza A; PKCα proteínkináza Cα; PLC fosfolipáza C (Micova et al., 2016).*

Proteínkináza B/Akt

V srdci sa nachádzajú všetky tri izoformy proteínkinázy B/Akt a majoritné zastúpenie majú PKBα/Akt1 a PKBβ/Akt2 (Matsui & Rosenzweig, 2005). K plnej aktivácii Akt je nutná fosforylácia na Ser473 na C-terminálnej hydrofóbnej časti Akt (Sarbassov et al., 2005). Akt v bunke ovplyvňuje mnoho bunkových procesov, ktoré hrajú významnú úlohu v protektívnych mechanizmoch. Medzi tieto procesy patrí aj regulácia energetického metabolizmu, hlavne cez glukózový transportér 4, čím je regulovaný vstup glukózy do buniek a jej ďalšie využitie v glykolýze či pri syntéze glykogénu (Calera et al., 1998). Zároveň sa Akt podieľa na riadení proliferácie, raste i prežívaní bunky (Evans-Anderson et al., 2008; Zhou et al., 2000). Tiež reguluje apoptotickú dráhu cez niektoré pro- a anti-apoptotické proteíny (Bcl2, BAD, Bax) a tak chráni mitochondrie a bunku pred vyliatím cytochrómu c do cytoplazmy (Datta et al., 1997; Kolar et al., 2017; Yao et al., 2014). Plne aktivovaná Akt je následne schopná fosforylovať ďalšie kinázy v signálnych dráhach, napríklad glykogén syntázu kinázu 3 (GSK-3) (Hermida et al., 2017).

Glykogén syntáza kináza 3β

V súčasnosti poznáme 2 izoformy glykogén syntázy kinázy 3 a to GSK-3α a GSK-3β, obe môžu byť fosforylované Akt (GSK-3α na Ser21 a GSK-3β na Ser9) (Cross et al., 1995). Najviac študovanou izoformou v súvislosti s poškodením myokardu je GSK-3β, ktorá negatívne reguluje génovú expresiu a syntézu proteínov a je dôležitým negatívnym regulátorom srdcovej hypertrofie (Badorff et al., 2005). Fosforylácia GSK-3β na Ser9 pomocou Akt vedie k inhibícii

otvorenia mitochondriálneho prechodne priepustného póru (mPTP) (Gomez et al., 2008). Aktivovaná GSK-3β tiež napomáha naviazaniu Bax na napäťovo závislý aniónový kanál (VDAC), tým že VDAC fosforyluje. Tým znemožní naviazanie hexokinázy, ktorá tak chráni integritu mitochondrií. Po fosforylácii je GSK-3β inhibovaná, a tak nemôže brániť interakcii hexokinázy s VDAC (Pastorino et al., 2005). GSK-3β sa tak môže podieľať na kardioprotekcii spojenej s mitochondriami (Shah et al., 2014; Sharma et al., 2018).

Proteínkináza Cα

β2-AR v srdci skrz Gi dráhu aktivuje proteínkinázu C alpha (PKCα) a cez fosforyláciu na Ser657 riadi dĺžku jej pôsobenia. PKC je kináza fosforylujúca proteíny na seríne a threoníne (Ser/Thr kináza). Poznáme celkom 12 izoenzýmov PKC, ktoré sa delia na základe štrukturálnych a funkčných rysov do troch podskupín (Steinberg, 2012). PKCα patrí do skupiny klasických PKC kináz, ktoré majú štyri konzervované oblasti (C1 – C4) a hrá dôležitú úlohu pri regulácii kontraktility myokardu (Braz et al., 2004). PKCα ovplyvňuje fosforyláciu SERCA2 na Thr17 (Ogurusu et al., 1990) a inhibičného proteínu PLB na Ser16, čo mení obsah Ca^{2+} v cytoplazme. PKCα sa aktivuje zvýšením intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} a/alebo pomocou lipidových signalizačných molekúl (Colyer, 1998). Preto trvalé zvyšovanie srdcovej inotropie je spojené s väčšími množstvami Ca^{2+} alebo s neuroendokrinnými stresovými signálmi môžu potenciálne aktivovať PKCα v srdci, čo má za následok tlmiaci účinok na srdcovú kontraktilitu (Braz et al., 2004). Dôležitým funkčným dôsledkom PKCα sprostredkovanej fosforylácie (Ser198) srdcového troponínu I (cTnI) in vivo je znížená kontraktilita na začiatku a zvýšená relaxácia počas β2-adrenergnej stimulácie (Kooij et al., 2013; Sakthivel et al., 2005). Aktivácia PKCα a zvýšenie jej expresie bolo pozorované pri hypertrofii, dilatovanej kardiomyopatii a ischemickom poškodení (Dorn & Force, 2005). Otázka je, či je to príčina alebo kompenzačný mechanizmus. Pri srdcovom zlyhaní sa expresia a aktivácia PKCα v ranom štádiu nezmenila, aktivácia a expresia narastala až v konečnom štádiu (Belin et al., 2007). Napriek tomu bola pozorovaná jej aktivácia v kardioprotektívnom mechanizme adaptácie na hypoxiu (Micova et al., 2016). Rozdiely v expresii a lokalizácii izoforiem PKC môžu byť závislé od veku a živočíšneho druhu. Zmeny expresie PKC pri rôznych ochoreniach môžu byť ovplyvnené štádiom a príčinou jednotlivých ochorení (pre prehľad Kooij et al., 2011).

Mitogénom aktivovaná proteínkináza 1a 2

Stimulácia β1-AR alebo β2-AR je schopná aktivovať mitogénom aktivovanú proteínkinázu 1 a 2 (ERK1 a ERK2) vo viacerých bunkových typoch, vrátane srdcových myocytov (Daaka et al., 1997; Vidal et al., 2012). Účinok β2-AR, ale nie β1-AR na ERK je výrazne oslabený liečením pertussis toxínom, čo naznačuje, že ERK je následným cieľom signálnej dráhy β2-AR-Gi (Chesley et al., 2000). ERK1 aj ERK2 sú príbuzné proteín-serín/treonínové kinázy, ktoré sa zúčastňujú signálnej kaskády, ktorá sa niekedy označuje aj ako kaskáda proteínkinázy aktivovanej mitogénom (MAPK kaskáda) (pre prehľad Wortzel & Seger, 2011). Signálna dráha ERK1/2 podporuje prežitie buniek duálnym mechanizmom zahŕňajúcim posttranslačnú modifikáciu a inaktiváciu bunkovej smrti a zvýšenú transkripciu „survival" génov (Kolch, 2005). Aktivácia ERK podporuje prežívanie kardiomyocytov v reakcii na tlakové preťaženie (Li et al., 2009), infarkt myokardu (Yeh et al., 2017) a oxidačný stres (Tanaka et al., 2001) a je stimulovaná hypoxiou (Micova et al., 2016). ERK tiež interferuje s pro-apoptotickou aktivitou mitochondrií a aktivuje anti-apoptotické molekuly (Allan et al., 2003).

Proteínkináza aktivovaná p38 mitogénom α

Proteínkinázu aktivovanú p38 mitogénom (p38) v kardiomyocytoch fosforyluje Gi a následne PI3K a tým sa proteínová dráha aktivuje (Xiao, 2001). p38 je aktivovaná fosforyláciou na treoníne (Thr180) a tyrozíne (Tyr182) (Tanoue & Nishida, 2003). V srdci je dráha p38 zapojená do regulácie hypertrofie myocytov, zápalu, energetického metabolizmu, kontraktility, proliferácie a apoptózy (Yokota & Wang, 2016). Existujú 2 podtypy, p38α a p38β, ktoré majú pri apoptóze opačnú úlohu. Zatiaľ čo p38α má pro-apoptotickú úlohu prostredníctvom aktivácie p53, p38β má anti-apoptotickú úlohu prostredníctvom inhibície tvorby ROS (Kim et al., 2006). Inhibícia izoformy α, ale nie β viedla k zvýšeniu životaschopnosti a ochrany buniek (Saurin et al., 2000). V reakcii na stres p38 aktivuje prostredníctvom malého GTP fosforyláciu malých proteínov tepelného šoku (Hsp 25/27) (Rouse et al., 1994). Nadmerná expresia Hsp 27 v kardiomyocytoch dospelých potkanov preukázala ochranu buniek pred ischemickým poškodením. Fosforylácia Hsp27 zvyšuje odolnosť bunky proti tepelnému a oxidačnému stresu (Lavoie et al., 1995).

Cytozolická fosfolipáza A2α

Cytozolická fosfolipáza A2 (cPLA2α) je aktivovaná submikromolárnou koncentráciou Ca^{2+} a plne je aktivovaná fosforyláciou pomocou MAPK kináz, najmä ERK1/2 a p38 (fosforylácia na Ser505) a tým sa translokuje z cytozolu do intracelulárnych membrán. Následne rozoznáva sn-2 acylovú väzbu fosfolipidov a tú hydrolyzuje za vzniku kyseliny arachidónovej (AA), ktorá

funguje ako dôležitá signálna molekula alebo môže byť metabolizovaná na rôzne bioaktívne eikosanoidy (Burke & Dennis, 2009). AA uvoľnená pomocou cPLA2α môže slúžiť ako substrát pre cyklooxygenázy 1 a 2 (COX-1 a COX-2) a ich dráhy, ktoré vedú k tvorbe prostaglandínu E2. Lipoxygenáza premieňa AA na leukotriény a hydroxyeikosatriénové kyseliny. AA sa tiež metabolizuje na epoxyeikosatriénové kyseliny (Jenkins et al., 2009). cPLA2α znižuje β2-AR-AC-PKA vyvolanú Ca^{2+} signalizáciu v potkaních kardiomyocytoch, prostredníctvom obmedzenia fosforylácie endotelovej syntázy oxidu dusnatého a fosfolambanu (Ait-Mamar et al., 2005). Zvýšená aktivácia cPLA2α za stresových podmienok súvisí so znížením β1-AR a odpojením β2-AR od Gs-AC a zvýšenou väzbou β2-AR na Gi proteín a aktiváciou dráhy fosfolipáza C (PLC)-cPLA2α-COX-2 (Kozlovski et al., 2015; Pavoine et al., 2003).

V zlyhávajúcom srdci sa mení pomer β1-AR:β2-AR z 80:20 na 60:40 (Bristow et al., 1986, 1993). Srdce prepne do ochranného režimu znížením kardiotoxickej signalizácie β1-AR a zvýšením kardioprotektívnej signalizácie β2-AR. Aktivácia signalizácie β2-AR-Gi chráni srdce pred škodlivými účinkami nadmernej stimulácie dráhy β1-AR-Gs. Dôležité je, že zosilnená signalizácia β2-AR-Gi krížovo inhibuje signalizáciu cAMP-PKA sprostredkovanú β1-AR a zároveň aj vlastnú signalizáciu β2-AR-Gs. To prispieva v zlyhávajúcom srdci k dysfunkcii oboch β1-AR aj β2-AR (Brodde et al., 1992; Woo et al., 2015). Aktivácia dráhy β2-AR-Gi bola viackrát preukázaná ako kardioprotektívna, aktivuje anti-apoptotické dráhy a chráni mitochondrie inhibíciou otvárania mPTP póru (pre prehľad Chesley et al., 2000; Lohse et al., 2003). Okrem toho je prepnutie β2-AR na Gi signalizáciu kľúčovým ochranným mechanizmom, ktorý je základom pre stabilizáciu vyvolanú I/R poškodením (Tong et al., 2005).

2.3.3 Beta 3 adrenergný receptor

Adrenergný receptor β3-AR sa skladá z 388 aminokyselín a je kódovaný génom *Adrb3*. *Adrb3* sa nachádza na chromozóme 8p11→8p12 a obsahuje 2 – 3 intróny. Prítomnosť intrónov vedie k predpokladu, že po transkripcii mRNA môže prebiehať alternatívny splicing, ktorý produkuje dve odlišné β3-AR varianty. Vďaka tomu je β3-AR odolnejší voči desenzitizácii/downregulácii vyvolanej agonistami. Tieto divergencie sekvencií tiež podporujú diferenciálnu intracelulárnu signalizáciu (vrátane väzby G proteínu) β3-AR (Evans et al., 1999).

β3-AR je v najväčšej miere exprimovaný v hnedom aj bielom tukovom tkanive, kde zvyšuje lipolýzu a reguluje termogenézu (Krief et al., 1993). V adipocytoch reguluje expresiu UCP v mitochondriách a tak zvyšuje jeho termogénnu funkciu (Ricquier, 2011).

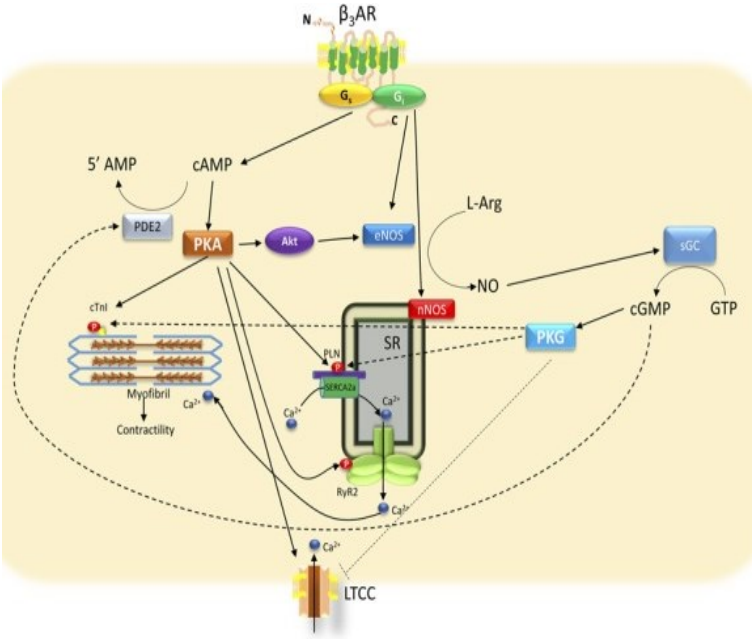
Beta3 adrenergný receptor v srdci

V srdci sa β3-AR exprimujú len minimálne, tvoria 3% z celkového množstva β-ARs. Táto „minoritná“ izoforma v srdci nepodlieha desenzitizácii a v dôsledku toho, v ľudskom zlyhávajúcom myokarde zostávajú hladiny tohto receptora nezmenené alebo dokonca zvýšené. Avšak úlohe β3-AR sa nevenovalo vo výskume toľko pozornosti ako majoritným β1- a β2-AR formám. Dôležitý pri skúmaní β3-AR je aj experimentálny model použitý v štúdiách. Je známe, že u myší gén kódujúci β3-AR podlieha alternatívnemu zostrihu a tvorí β3a-AR a β3b-AR (Evans et al., 1999; Hutchinson et al., 2002). Izoforma β3bAR je spriahnutá s Gαs a aj Gαi proteínmi, pričom izoforma β3a-AR je spriahnutá výlučne s Gs (Sato et al., 2005). Naopak u ľudí v myokarde sú β3-AR spojené so stimulačným aj inhibičným G proteínom, hlavne však s Gi proteínom (Gauthier et al., 1996). β3-AR a jeho signálne dráhy sú považované za modulátory srdcovej funkcie. Na rozdiel od β1- a β2-AR sú β3-AR stimulované pri vysokých koncentráciách katecholamínu a vyvolávajú negatívne inotropné účinky, ktoré slúžia ako „brzda“ na ochranu srdca pred nadmernou stimuláciou katecholamínmi (Niu et al., 2013).

V srdci β3-AR pôsobí na inhibičný G-proteín, ktorý aktivuje syntázu oxidu dusnatého (NOS) a jej dve izoformy endotelovú NOS (eNOS, hojne exprimovaná v ľudských srdcových myocytoch) a neuronálnu NOS (nNOS) (pre prehľad Schena & Caplan, 2019). NOS stimuluje tvorbu oxidu dusnatého (NO). NO aktivuje fosfodiesterázu 2, ktorá rozkladá cAMP a pôsobí tak negatívne na srdcovú kontrakciu. NO aktivuje svoju cieľovú molekulu, rozpustnú guanylylcyklázu. Aktivovaná forma rozpustnej guanylylcyklázy premieňa guanozín trifosfát na cyklický 3,5,guanozín monofosfát (cGMP), ktorý je sekundárny posol natriuretických peptidov a oxidu dusnatého. cGMP aktivuje proteinkinázu G (PKG), ktorá pravdepodobne brzdí hypertrofiu a podporuje prežívanie kardiomyocytov. PKG downstream prostredníctvom β3-AR môže zvyšovať relaxáciu myocytov a pôsobiť negatívne inotropne, pravdepodobne prostredníctvom fosforylácie troponínu I a vápnikového kanálu L typu, graficky znázornené na obrázku 5 (Balligand, 2016; Takimoto, 2012). PKG dependentná fosforylácia PLB môže aktivovať srdcovú SERCA, čím redukuje osciláciu Ca^{2+} počas reoxygenácie a môže chrániť bunku pred preťažením vápnikom a pôsobí antiarytmiticky (Abdallah et al., 2005).

V zlyhávajúcom myokarde sú β3-AR schopné inhibovať aktiváciou $Na^{+}K^{+}$ ATPázy škodlivú akumuláciu Na^{+} v srdcových myocytoch, čím blokujú tvorbu cAMP a následne znižujú aktiváciu cAMP dependentných signálnych dráh. Pôsobením agonistov β3-AR sa zvyšuje aktivita $Na^{+}K^{+}$ ATPázy (Mongillo et al., 2006). Aktivácia NOS a následná tvorba NO v zlyhávajúcom srdci predstavujú hlavný mechanizmus zodpovedný za kardioprotekciu vyvolanú β3-AR. Pri výskume ischemicko/reperfúzneho poškodenia podávanie selektívneho

β3-AR agonistu BRL 37344 pozitívne ovplyvnilo veľkosť infarktu (akútne) a funkciu ľavej komory (chronicky). Takisto dokázali, že za použitia izolovaných kardiomyocytov vystavených hypoxii/reoxygenácii je selektívna stimulácia β3-AR spojená so zvýšením fosforylácie Akt a tvorbou NO. To v kardiomyocytoch spomalilo otvorenie mPTP a tým zlepšila životaschopnosť buniek. Aktivácia β3-AR v srdci je kardioprotektívna prostredníctvom inhibície mPTP a signálnej dráhy PKB/Akt-NOS-NO-cGMP-PKG (García-Prieto et al., 2014). Ďalšia štúdia ukázala, že selektívna stimulácia β3-AR pomocou BRL37344 zabraňuje srdcovej dysfunkcii, významne zoslabuje apoptotické účinky a inhibuje fibrózu aktiváciou eNOS a nNOS, čo zlepšuje funkciu srdca po infarkte myokardu (Niu et al., 2013).



Obr. 5: *Schematické znázornenie aktivácie signalizácie β3-AR v kardiomyocytoch. β3-AR sú naviazané na stimulačné G proteíny (Gs) aj na inhibičné G proteíny (Gi). Aktivácia signálnej dráhy Gi je schopná stimulovať tvorbu cGMP a aktivuje PKG. PKA môže tiež aktivovať proteínkinázu B (Akt) s následnou aktiváciou endotelovej NO syntázy (eNOS). Aktivácia eNOS zvyšuje tvorbu NO, ktorá naopak aktivuje rozpustnú guanylátcyklázu za vzniku aktivácie cGMP a PKG. Okrem toho môže cGMP stimulovať fosfodiesterázu 2 (PDE2) znižovaním hladín cAMP a aktiváciou PKA. β3-AR-Gi signálna dráha aktivuje NOS a jej izoformy eNOS a nNOS umiestneného na sarkoplazmatickom retikulu (SR) (Cannavo & Koch, 2017).*

2.3.4 Desenzitizácia beta adrenergných receptorov

Dlhodobé pôsobenie katecholamínov je pre bunky srdca toxické a vedie k remodelácii, hypertrofii, nekróze či apoptóze. K udržaniu homeostázy disponuje organizmus ochrannými mechanizmami, ktoré zabraňujú škodlivým účinkom chronickej stimulácie (Thomas Eschenhagen, 2008). Toto pôsobenie vedie najskôr k desenzitizácii, teda zníženej schopnosti receptorov reagovať na nadmernú stimuláciu agonistom (Ferguson, 2001). Následne, pokiaľ stimulácia stále pretrváva môže dochádzať k zmenám v signalizačných dráhach, ktoré vedú k fyziologickej adaptácii. Pokiaľ je stimulus neprimeraný (dobou trvania, intenzitou) a adaptácia na dané podmienky nie je postačujúca, môže dochádzať k patologickým zmenám, ktoré sú

asociované s rozvojom fibrózy, s hypertrofiou, apoptózou a zmenou konktraktilných funkcií, čo môže viesť až k srdcovému zlyhaniu (Singh et al., 2001).

Jedným z mechanizmov desenzitizácie je znižovanie počtu receptorov (trvá niekoľko hodín). V dôsledku poklesu syntézy receptorov na úrovni mRNA a súčasnej degradácie, nastane celková down-regulácia. Pre obnovu schopnosti odpovede receptorov je nutná kompletná transkripcia (Kobilka, 1991). Prenos signálu môže byť tiež ukončený následkom odpriahnutia receptorov od signál-prenášajúcich G-proteínov cez rýchly (sekundy až minúty) proces, ktorý vyžaduje fosforyláciu receptorov proteínkinázami (Pitcher et al., 1998). Väzba katecholamínov na β-ARs vedie k zmenám konformácie, kedy sa β-ARs dostanú z bazálneho neaktívneho stavu do vysokoafinitného aktívneho stavu (Goral et al., 2011). Asociácia indukovaného receptoru s Gs proteínom vyústi k stimulácií AC, ktorá katalyzuje tvorbu cAMP. Krátko po aktivácii sa však hladina cAMP znižuje, dokonca môže dôjsť k oddeleniu β-ARs od AC a tým k strate samotných β-ARs (Davies & Lefkowitz, 1983). V desenzitizácii hrajú hlavnú rolu kinázy: PKA a kináza s G-proteínmi spriahnutých receptorov/kináza β-adrenergného receptoru (GRK/β-ARK) (Benovic et al., 1986), ktoré fosforylujú β-ARs. PKA a GRK môžu v závislosti na koncentrácie agonistu vyvolať odlišné desenzitizačné procesy. GRK, ktorá je cAMP nezávislá kináza, prispieva k homológnej desenzitizácii (Gurevich & Gurevich, 2019). Zatiaľ čo PKA, cAMP závislá kináza účinkuje počas heterológnej desenzitizácie. Fosforylácia väzobného miesta pre agonistu sprostredkovaná GRK zvyšuje afinitu receptorov k cytozolickému proteínu β-arrestinu, ktorý sa viaže na receptor a tým bráni jeho spriahnutiu s G-proteínmi (Ferguson, 2001). β-arrestin sa viaže k fosforylovanému receptoru, na ktorého je viazaný ligand (Krasel et al., 2005). Kyslé vnútro internalizovaných vačkov je bohaté na fosfatázy, ktoré defosforylujú β-ARs a recyklujú ich späť na membránu. Takto sa obnoví umlčaná odpoveď, ktorá je definovaná ako resenzitizácia (Wachsman et al., 1997). V cicavčích bunkách prebieha homológna a heterológna desenzitizácia nezávisle (Lohsez et al., 1990). Receptor je fosforylovaný kinázami PKA a GRK v závislosti od koncentrácie ligandu, čo demonštruje aj pokus s izoprenalínom (ISO) na myších srdcových bunkách. PKA fosforyluje β2-AR jednak pri nízkej, tak aj pri vysokej koncentrácii ISO a vyvolá heterológnu desenzitizáciu pri vysokej koncentrácii ISO. PKA vyžaduje aj prítomnosť GRK, oproti tomu GRK môže fungovať aj sama (Liu et al., 2009).

2.4 Tyroidné hormóny

Funkcia tyroidného systému je nevyhnutná pre správny neonatálny vývin a k správnej regulácii metabolizmu. K tvorbe tyrotropín-uvoľňujúceho hormónu dochádza v hypotalame. Následne je sekretovaný do prednej časti hypofýzy, adenohypofýzy a tam dochádza k tvorbe tyrotropínu. Ten pôsobí na štítnu žľazu a dochádza k tvorbe trijodtyronínu a tyroxínu (pre prehľad Jabbar et al., 2017). Konverzia T4 na T3 vyžaduje odstránenie 1 atómu jódu z vonkajšieho kruhu T4 a to je sprostredkované deiodinázami typu I a II (DIO1 a DIO2) (Gereben et al., 2008). DIO1 má oveľa nižšiu afinitu k T4 ako DIO2 a primárne sa exprimuje v pečeni a obličkách. DIO2 je exprimovaný vo väčšej miere a jeho aktivita je zdrojom plazmatického T3 (Escobar-Morreale et al., 1999). Vnútorná kruhová deiodinácia je katalyzovaná deiodinázou typu III (DIO3), premenou T3 na neaktívny metabolit 3,3'-dijódtyronín a s nižšou afinitou T4 na neaktívny metabolit 3,3 ', 5'-trijódtyronín alebo reverzný T3 a tým deaktivuje činnosť hormónov štítnej žľazy. DIO3 je exprimovaný v placente a vo väčšine fetálnych tkanív (Huang, 2005). Krátko po narodení klesá expresia DIO3 na nízku alebo nedetekovateľnú hladinu vo väčšine tkanív, vrátane srdca. U zdravého dospelého človeka je primárne exprimovaná v pokožke a mozgu (Luongo et al., 2019).

V krvi sú tyroidné hormóny (THs) transportované prevažne vo väzbe na plazmatickú bielkovinu a pôsobia cez jadrové tyroidné receptory (THRs), ktoré poznáme v dvoch hlavných izoformách α a β. Tyroidný receptor α (THRα), ktorý sa vyskytuje v podtypoch THRα1, THRα2, THRΔα1 a THRΔα2. THRα2, THRΔα1 a THRΔα2 nie sú schopné viazať T3 a THRΔα1 a THRΔα2 pravdepodobne znižujú transkripčnú činnosť THRα1 (Chassande et al., 1997). Tyroidný receptor β (THRβ), ktorý má podtypy THRβ1, THRβ2 a menej známe THRβ3 a THRΔβ3. THRΔβ3, ktorá nemá DNA väzobnú doménu a funguje ako negatívny antagonista, môže teda naviazať T3, ale sám nie je transkripčne aktívny (Williams, 2000). THRα a THRβ sú si štrukturálne podobné, čo naznačuje, že môžu mať podobné funkcie. Avšak klinický obraz pacientov s mutáciami v THRα je výrazne odlišný od pacientov s mutáciami v THRβ. To teda naznačuje, že izoformy THRs majú odlišné a/alebo komplementárne fyziologické úlohy (Bochukova et al., 2012). Pacienti s mutáciami v THRα sú v praxi len málo opisovanými prípadmi. Majú nízky vzrast, THRα je dôležitý pre správny rozvoj kostí. Pacienti majú vážne tráviace problémy, nižšie IQ, spomalené reflexy, spomalenú srdcovú frekvenciu a zvýšenú hladinu cholesterolu (Safer et al., 1999; van Mullem et al., 2012). Mutácie THRβ sa prejavujú zvýšenou koncentráciou hormónov štítnej žľazy v krvi a cieľové tkanivá majú zníženú citlivosť k ich príjmu (Ono et al., 1991). Klinicky sa mutácie THRβ prejavujú zväčšením strumy,

zvýšeným krvným tlakom a zrýchlením srdcovej frekvencie, ďalej poškodením farebného videnia a sluchu. Býva poškodená aj os medzi hypotalamom, hypofýzou a štítnou žľazou a to najmä ich spätná regulácia, čo sa prejavuje vyššie spomínanou zvýšenou koncentráciou THs (Takeda et al., 1992).

Tyroidné hormóny v srdci

Tyroidný systém priamo ovplyvňuje srdcovú činnosť väzbou na nukleárne T3 receptory, čím ovplyvňuje expresiu srdcového génu. T3 môže ovplyvňovať citlivosť sympatického systému a to vedie k hemodynamickým zmenám na periférii, ktoré majú za následok modifikáciu srdcovej kontrakcie (Dillmann, 1990; Ladenson, 1996). Na rozdiel od ľudí (Salvatore et al., 1996), hlodavce neexprimujú DIO2 a v kardiomocytoch tak nedochádza k premene T4 na T3 (Croteau et al., 1996; Everts et al., 1996). V srdci potkana je až 40% T3 viazané na receptor THRα1, 40% na THRβ1 a zvyšných 20% je viazaných na receptor THRβ2 (Wiersinga, 2010). Odchýlky od normálneho stavu (eutyreóza), označujeme ako hypertyreóza (nadbytok) a hypotyreóza (nedostatok) môžu viesť k rozvoju srdcovo-cievnych ochorení a až k srdcovému zlyhaniu (Gerdes & Iervasi, 2010).

T3 výrazne skracuje diastolickú relaxáciu, srdce relaxuje rýchlejšie (pozitívna lusitropia), zatiaľ čo diastola je pri hypotyroidných stavoch predĺžená (Mintz et al., 1991). THs majú ďalej pozitívny chronotropný a bathmotropný efekt (zvyšujú srdcovú frekvenciu a dráždivosť) (Biondi et al., 2002). Gén kódujúci SERCA2 je výrazne citlivý na T3 (Hartong et al., 1994). Na kultivovaných srdcových myocytoch bolo dokázané zvýšenie transkripcie *Serca2* indukované T3 (Rohrer et al., 1991). mRNA kódujúca ryanodínový receptor v srdci je tiež výrazne regulovaná THs (Arai et al., 1991). Zvýšený počet ryanodínových receptorov vedie k zvýšeniu uvoľňovania vápnika zo sarkoplazmatického retikula počas systoly a pravdepodobne z veľkej časti zodpovedá za zvýšenú systolickú kontraktilnú aktivitu hypertyroidného srdca. Na transkripčnej aj post-transkripčnej úrovni sú cez THs regulované aj Na^+K^+ ATPáza, sodno – vápnikový výmenník a napäťovo riadené draslíkové kanály (Gick et al., 1990; Ojamaa et al., 1999).

Hypertyreóza zvyšuje celkovú syntézu bielkovín v kardiomyocytoch, čo vedie k zvýšeniu hmotnosti srdca a k miernemu stupňu srdcovej hypertrofie, čo prispieva k zvýšeniu kontraktilného stavu (Klein & Hong, 1986). Ďalej je pri hypertyreóze pozorovaný zvýšený výskyt atriálnych fibrilácii a zvyšuje sa srdcová frekvencia (Fazio et al., 2004). Nedostatok THs sa môže prejaviť zvýšením cholesterolu v krvi, tým aj rozvojom arterosklerózy a fibrózou myokardu (Gerdes & Iervasi, 2010). Hypotyreóza spomaľuje srdcovú frekvenciu a relaxáciu,

zvyšuje krvný tlak a predlžuje sa interval medzi Q a T vlnou a modifikáciou T vlny (Fazio et al., 2004).

U pacientov s akútnym infarktom myokardu klesajú koncentrácie T3 v sére asi o 20% (Franklyn et al., 1984). Pacienti so srdcovým zlyhaním majú v sére tiež nízke koncentrácie T3, pokles je úmerný stupňu srdcového zlyhania. Na zvieracom modeli srdcového zlyhania bola výrazne pozorovaná zvýšená srdcová DIO3, ktorá degraduje T3 na T2 (Wassen et al., 2002). Nie je známe, či zmeny metabolizmu THs prispievajú k zhoršeniu kardiovaskulárnych funkcií u pacientov so srdcovým zlyhaním. Aplikácia T3 pacientom po infarkte myokardu po dobu troch dní mala za následok anti-apoptotický účinok, ktorý prostredníctvom signalizácie Akt znižoval apoptózu myocytov v area at risk (Lymvaios et al., 2011). Iná štúdia uvádza podobné výsledky, kde sledovali u pacientov aj zníženú aktiváciu p38 kinázy (Pantos et al., 2009). Kardioprotektívny účinok THs je spojený s aktiváciou pro-survival dráh, zahŕňajúce signálne kaskády PI3K-Akt-PKC, expresie, fosforylácie a translokácie proteínov Hsp70 a Hsp27 a potlačenie signalizácie p38 (Pingitore et al., 2016).

Tyroidné hormóny a beta adrenergné receptory

Hormóny štítnej žľazy majú v srdci kardiostimulačné účinky, ktoré sú podobné ako katecholamínmi sprostredkovanej sympatickej stimulácie β-adrenergných receptorov (Bilezikian & Loeb, 1983; Handberg, 1984). Účinná liečba hypertyreózy zahŕňa použitie farmakologickej blokády β-ARs, čo naznačuje, že β-ARs hrajú dôležitú úlohu v patogenéze hypertyreózy (Utiger, 1984).

T3 zvyšujú citlivosť myokardu k adrenergnému systému zvyšovaním počtu adrenergných receptorov (von Hafe et al., 2019). T3 pôsobí rozdielne na indukciu mRNA *Adrb1* a *Adrb2* v potkaních myocytoch. T3 spôsobuje štvornásobnú indukciu *Adrb1* mRNA, ale pri *Adrb2* mRNA nebola pozorovaná žiadna významná zmena (Bahouth, 1991). Po zvýšení *Adrb1* mRNA dochádza k 3-násobnému zvýšeniu hustoty srdcových β1-AR, ktoré pretrváva 48 hodín (Bahouth et al., 1997). Naproti tomu sa β2-AR po podaní T3 významne nezvýšia. To naznačuje, že v srdcovom tkanive je *Adrb1* citlivý na T3, zatiaľ čo *Adrb2* je ovplyvnený len minimálne. Hypotyreóza je spojená so zníženou a hypertyreóza so zvýšenou hustotou β-ARs v predsieňach. Up-regulácia β-ARs je pravdepodobne založená na zvýšenej transkripcii príslušného génu, ktorého transkripcia je pod reguláciou THs (Fox et al., 1985).

Liečba hypotyroidných potkanov hormónmi štítnej žľazy viedla k 3-násobnému zvýšeniu hladín Gαs v predsieňach a bol pozorovaný iba mierny nárast Gαi proteínu (Bahouth, 1991). V komorovom myokarde bol posun od hypotyreózy k hypertyreóze spojený so

zníženými hladinami proteínu Gαi a bez zmeny hladín Gαs. Tieto výsledky všeobecne ukazujú, že hoci hormóny štítnej žľazy modulujú expresiu jednotlivých G-proteínov odlišne v predsieňach a komorách, zvýšený pomer Gαs/Gαi je bežnou reakciou na THs v predsieňach aj komorách (Levine et al., 1990).

Keď boli potkany s hypotyreózou vystavené chladu, mali signifikantne zvýšenú aktivitu dopamín-β-hydroxylázy, ktorá sa podieľa na syntéze katecholamínov. Autori dospeli k záveru, že nedostatočná aktivita štítnej žľazy počas vystavenia chladu vedie ku kompenzačnému zvýšeniu syntézy katecholamínov nadobličkami. Ďalej hypotyreóza vedie k 3-násobnému zníženiu hustoty β-ARs v BAT s nezmenenou afinitou receptorov pre ligand. Dva dni po injekcii T3 hypotyroidným potkanom sa v BAT obnovila hustota β-ARs (Rubio et al., 1995). Podobne ako je uvedené vyššie v myokarde, u potkanov s hypotyreózou klesá hustota β1-AR v hnedom tuku, zatiaľ čo hustota β2-AR zostáva na úrovni typickej pre eutyroidné zvieratá (Rubio, Raasmaja, & Silva, 1995). Hypotyreóza viedla ďalej k zníženiu schopnosti noradrenalínu a agonistov β3-AR indukovať syntézu cAMP v BAT. To naznačuje, že nedostatok hormónov štítnej žľazy nielenže narúša expresiu β1-AR, ale tiež spôsobuje pokles aktivity AC v BAT (Rubio, Raasmaja, & Silva, 1995).

2.4.1 Tyroidné hormóny a chladová adaptácia

Tyroidné hormóny modulujú termogenézu priamo zmenou funkčnosti a rýchlosti transkripcie UCP1. Tyroidné hormóny a sympatický adrenergný systém regulujú mnohé fyziologické procesy, ktoré sú potrebné pre normálnu termogenézu a chladovú adaptáciu. Interakcie medzi THs a sympatickým nervovým systémom prebiehajú prostredníctvom α1-AR a β3-AR (Silva, 1995). Aktivácia netrasovej termogenézy cez adrenergnú stimuláciu zahŕňa aj aktiváciu DIO2, čím sa zvyšujú koncentrácie T3 v BAT (Silva & Larsen, 1983). T3 v BAT účinkuje prostredníctvom receptora THRα na zvýšenie signalizácie cez cAMP v reakcii na adrenergnú stimuláciu. T3 je tiež dôležitý aj pre expresiu UCP1 prostredníctvom väzby na receptor THRβ. Obidve funkcie T3 v BAT sú nevyhnutné pre nástup netrasovej termogenézy (Ribeiro et al., 2001). THRβ sprostredkováva stimuláciu UCP1 v BAT, napomáha aktivácii adrenergnej signalizácie a tým sa zvýšuje hladina DIO3 (de Mena et al., 2010). Hypertyroidné myši sa vyznačovali zväčšením BAT, zvýšenou oxidáciou mastných kyselín a zosilnenou metabolickou aktivitou. Hypotyroidné myši mali zvýšenú génovú expresiu β3-AR v BAT a vysoké množstvo noradrenalínu v krvnej plazme (Weiner et al., 2016).

Už v roku 1950 sa preukázalo, že potkany bez štítnej žľazy prežijú iba niekoľko dní pri teplote 1,5 °C, zatiaľ čo eutyroidné zvieratá prežijú a nakoniec sa chladu prispôsobia (Sellers

& You, 1950). U hypotyroidných myší sa vyvinula ťažká hypotermia pri 4 °C počas 8 hodín, zatiaľ čo eutyroidné zvieratá mali nižší pokles teploty a vystavenie chladu znášali lepšie (Ribeiro et al., 2001). Ukázalo sa, že krátkodobé vystavenie chladu u králikov zvyšuje T3 v sére, čo je podobné pozorovaniam pri hypertyreóze. Krátkodobé vystavenie chladu (4 °C, 10 dní) u hypertyroidných spôsobila zvýšenie aktivity SERCA2a. Zmeny funkčného stavu srdca, spotreby kyslíka a aktivity SERCA2a zistené počas krátkodobého vystavenia králika chladu (4 °C) (Ketzer et al., 2009), sa nepozorovali po dlhodobej adaptácii na chlad (4 °C, 7 týždňov), kde boli tiež pozorované zvýšenie premeny T4 na T3 (Mustafa & Elgazzar, 2014). Nepretržité vystavenie chladu (4 °C, 24 h/deň, 4 týždne) viedlo k zvýšeniu hladín T3 v sére (Maslov et al., 2016). Iná štúdia sledovala hladiny THs u potkanov vystavených akútnemu chladu (4 °C, 2h), chronickému chladu (4 °C, 10 dní) a intermitentnému chladu (4 °C, 2 h/deň, 10 dní), kedy sledovali hladiny THs priebežne každý deň. V počiatočných fázach sa hladiny THs zvyšovali po 4tý deň, na 10ty deň však začali u skupiny vystavenej chronickému a intermitentnému chladu klesať. U skupiny vystavenej intermitentnému chladu bola hladina T3 nižšia ako u kontrolnej skupiny (Quintanar-Stephano et al., 1991).

Dochádza k sezónnemu kolísaniu hladiny tyroidných hormónov počas roku. Voľný T4 v sére má najvyššiu na jar a najnižšiu v lete a rovnako aj voľný T3. Avšak celkový T3 má najvyššiu hladinu v zimnom období a najnižšiu v lete (Levine et al., 1990). Po adaptácii na chlad bolo u ľudí pozorované zvýšenie hladín T3 a T4 v krvi (Eastman et al., 1974). Toto zvýšenie THs bolo potvrdené aj vo viacerých ďalších štúdiách (Hackney et al., 1995; HEFCO et al., 1975; Levine et al., 1995). U obyvateľov miest neboli zistené významné rozdiely v hladinách hormónov štítnej žľazy a koncentráciách THs medzi letom a zimou. Ukázalo sa, že dlhodobé vystavenie ľudského tela chladu v kombinácii s ťažkou fyzickou námahou vedie k zvýšeniu sérových hladín T3 pri súčasnom znížení koncentrácie T4 (Krylov & Tigranian, 1986). Podobne Kralova Lesna pozorovala u otužilcov vyššie hladiny T3 v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zistilo sa, že adaptácia na chlad spôsobila zlepšenie kardiovaskulárnych rizikových faktorov. Bolo zistené zníženie pomeru apolipoproteínu B/apolipoproteínu A1 a zníženie plazmatickej hladiny homocysteínu u otužilcov, čo poukazuje na pozitívny vplyv adaptácie na chlad (Kralova Lesna et al., 2015).

Adaptácia na chlad teda vedie k prechodnému zvýšeniu hladín T3 a T4 u ľudí a aj u zvierat. Pozorované zmeny hladín hormónov štítnej žľazy sú s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobené zvýšenou premenou týchto hormónov. Chladová expozícia trvajúca mesiac alebo viac môže spôsobiť zníženie koncentrácie celkového a voľného T3 v ľudskej krvi v dôsledku zvýšeného klírensu tohto hormónu (pre prehľad Tsibulnikov et al., 2020).

3 CIELE PRÁCE

1. Stanovenie expresie a kolokalizácie β-ARs so sarkolémou a expresie G-proteínov v myokarde potkana vystaveného akútnemu chladu (8 ± 1 °C) po dobu 3 dní a 10 dní
2. Stanovenie expresie a kolokalizácie β-ARs so sarkolémou a expresie G-proteínov v myokarde potkana adaptovaného na chlad (8 ± 1 °C, 5 týždňov) a následnej regresie (24 ± 1 °C, 2 týždne)
3. Stanovenie miery zapojenia jednotlivých proteínov β2-ARs signálnej dráhy v myokarde potkana adaptovaného na chlad (8 ± 1 °C, 5 týždňov) a následnej regresie (24 ± 1 °C, 2 týždne)
4. Stanovenie expresie a lokalizácie THRα1 a THRβ1 v myokarde potkana adaptovaného na chlad (8 ± 1 °C, 5 týždňov) a následnej regresie (24 ± 1 °C, 2 týždne)

4 METODIKA

4.1 Experimentálny model

Experimentálne zvieratá boli dospelé (16 týždňov staré) samce laboratórneho potkana kmeňa Wistar (Velaz s.r.o.) pre akútny pokus a 8 týždňov staré pre chronický pokus. Priemerné hmotnosti zvierat z akútnej aj chronickej adaptácie sú uvedené v príslušných tabuľkách. Zvieratá mali voľný prístup k vode a ku štandardnej laboratórnej diéte režim 12 hod. svetlo/12 hod. tma. Chované boli vo dvojiciach, aby bolo zabránené sociálnemu stresu a v klietke mali podstielku. So zvieratami sa zaobchádzalo v súlade s *„Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"* publikovaným *„US National Institutes of Health"* (NIH Publication, 8th edition, revised 2011) a bola schválená Komisiou pre etické zaobchádzanie so zvieratami Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej v Prahe a Ministerstvom Zemědělstva ČR.

4.1.1 Akútny chlad

Zvieratá zaradené do pokusu akútneho chladu boli po týždni oddychu v teplote 24 ± 1 °C náhodne rozdelené do dvoch experimentálnych skupín a kontrolnej skupiny. Jedna skupina bola umiestnená do chladovej komory s teplotou 8 ± 1 °C po dobu 3 dní (označená ako 3D, n=6), druhá skupina bola v teplote 8 ± 1 °C ponechaná po dobu 10 dní (označená ako 10D, n=8), poslednou bola kontrolná skupina ponechaná 10 dní v teplote 24 ± 1 °C (označená ako C_Akut, n=6). (Schéma 1).

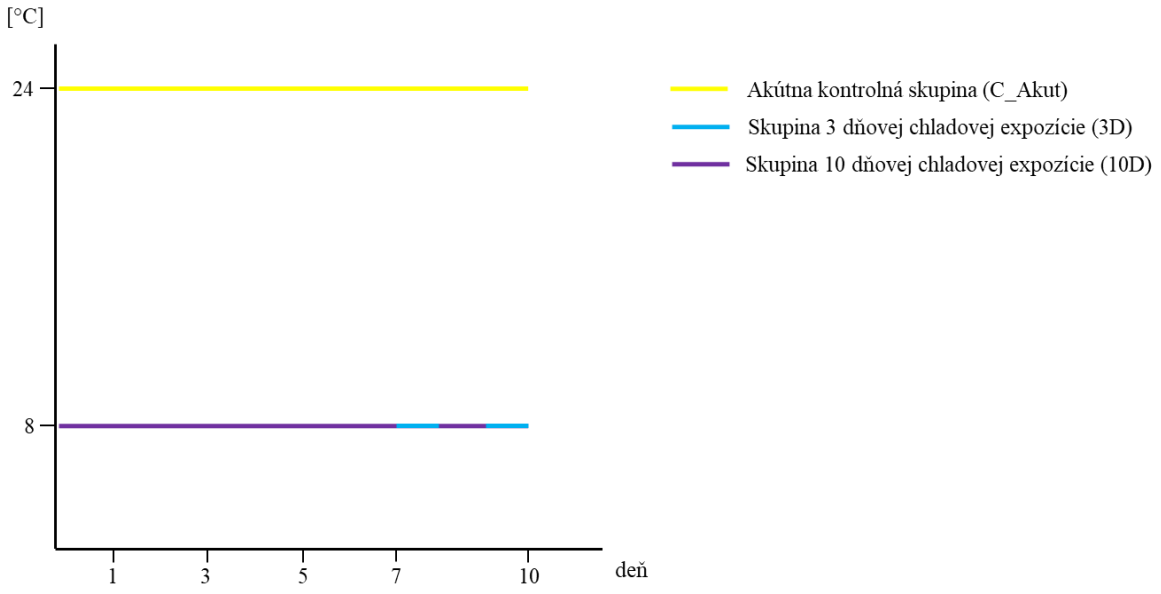


***Schéma 1**: Grafické znázornenie experimentálneho modelu akútnej chladovej expozície. Skupiny akútnej chladovej expozície v 8 ± 1 °C po dobu 3 dní (3D) a v 8 ± 1 °C 10 dní (10D) a kontrolnej skupiny v 24 ± 1 °C po dobu 10 dní (Cont_Akut).*

4.1.2 Chronický chlad

Zvieratá zaradené do pokusu chronickej chladovej adaptácie boli rozdelené do dvoch experimentálnych skupín a do kontrolnej skupiny. Skupina adaptovaná na chronický chlad (označená ako CA), spolu s regresnou skupinou (označenou ako CAR) boli počas prvého týždňa postupne adaptované v chladovej komore pri teplote 8 ± 1 °C 8 hodín za deň. Po prvom týždni boli ponechané pri teplote 8 ± 1 °C ďalšie 4 týždne kontinuálne (CA, n=8). Regresná skupina bola následne po 5 týždňovej adaptácii na chlad ponechaná pri teplote 24 ± 1 °C zvyšné 2 týždne (CAR, n=8). Kontrolná skupina bola pri teplote 24 ± 1 °C 7 týždňov (Cont, n=8).

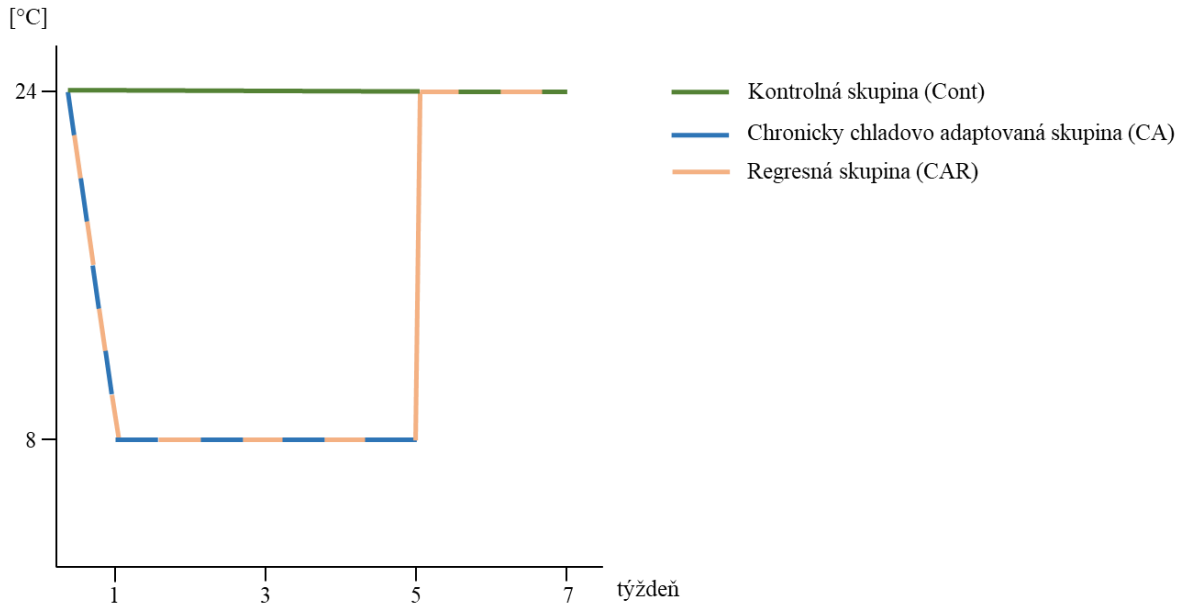


***Schéma 2**: Grafické znázornenie experimentálneho modelu chronickej chladovej adaptácie. Skupiny chronickej chladovej adaptácie v 8 ± 1 °C po dobu 5 týždňov (CA, regresnej skupiny v 8 ± 1 °C 5 týždňov a následne v 24 ± 1 °C ďalšie 2 týždne (CAR) a kontrolnej skupiny v 24 ± 1 °C po dobu 7 týždňov (Cont).*

4.2 Proteínová analýza

4.2.1 Odber tkaniva

Zvieratá boli uvedené do hlbokej anestézy thiopentalom (60 mg/kg, i.p.), následne im boli odobrané srdcia, ktoré boli premyté vo vychladenom fyziologickom roztoku a boli rozdelené na ľavú komoru, pravú komoru a septum. Potom boli vhodené do tekutého dusíka, čím sa zabezpečilo ich rýchle zamrazenie a zabránilo následným zmenám v tkanive. Všetky časti srdca boli odvážené pomocou analytických váh a uskladnené v tekutom dusíku až do doby spracovania tkaniva.

4.2.2 Spracovanie tkaniva (príprava hrubej membránovej frakcie)

Boli pripravené dva druhy pufrov: TMES a TME. TMES roztok: 10(-3) M (20 mM TRIS, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose; pH 7.4) spolu s proteázami a inhibítormi fosfatáz (cOMPLETE and PhosSTOP, Sigma-Aldrich). TME roztok je rovnaký ako vyššie uvedený TMES, bez pridania sacharózy. Ľavé komory sŕdc boli za sterilných podmienok a pri zachovaní nízkej teploty zhomogenizované. Srdcia boli vybrané z tekutého dusíka a prenesené do pripravených vychladených trecích misiek, kde boli pomocou tĺčiku rozdrvené na jemný prášok. Prášok bol následne prenesený do vychladených skúmaviek s ¾ predpokladaného objemu TMES pufru. Skúmavky s napipetovaným pufrom boli vopred zvážené na analytických váhach, po pridaní opakovane a na základe presnej hmotnosti tkaniva bol doplnený finálny objem v pomere 1:5 (tkanivo (mg):TMES (µl)). Vzorky boli na ľade homogenizované v homogenizátore (teflón, sklo) 1 minútu. Po zhomogenizovaní boli stočené v centrifúge (Hettich, Universal 32R) na 2100 RPM (390 x g) po dobu 10 min. a pri teplote 4 °C. Po stočení bol odobratý supernatant I do vopred vychladených čistých skúmaviek. Pelet bol opätovne homogenizovaný v rovnakom objeme TMES v sklenenom homogenizátore na ľade po dobu 1 minúty. Po centrifugácii bol supernatant II spojený s už odobraným supernatantom I. Následne boli oba supernatanty prenesené do špeciálnych centrifugačných skúmaviek a boli presne odvážené (na mg) a centrifugované v ultracentrifúge (Beckman, rotor Ti50.2) na 23 500 RPM (68 000x g) po dobu 30 minút pri teplote 4 °C. Vzniknutý supernatant bol odobraný, pelet bol resuspendovaný v TME roztoku v pomere 1:1,5 (pelet (počítané ako mg pôvodného tkaniva):TME (µl)) a následne im bolo zmerané množstvo proteínov. Vo vzorkách bola stanovená koncentrácia proteínov podľa Bradfordovej s využitím komerčného setu (BioRad). Na zostrojenie kalibračnej krivky bol použitý hovädzí sérový albumín v koncentráciách 25, 50, 100, 200, 400, 800 a 1000 ng/µl, ako blank bola použitá redestilovaná voda. Vzorka bola rozriedená v redestilovanej vode v pomere 1:25 (vzorka (µl):redestilovaná voda (µl)). 10 µl takto rozriedenej vzorky bolo napipetované do 96 jamkovej doštičky vždy v tripletoch. Ku vzorkám bolo pridaných 250 µl Bradfordovho činidla, prebehla inkubácia a bola meraná absorbancia na prístroji Varioscan (Thermo Scientific). Koncentrácia proteínov bola odčítaná z kalibračnej krivky. Následne boli pripravené aliquoty vzoriek rozdelené do mikroskúmaviek a uskladnené v -80 °C.

4.2.3 SDS-PAGE a Western blot analýza

Elektroforéza

Ku každej vzorke bolo pridané SLB, DTT a TME v požadovanej koncentrácii s ohľadom na koncentráciu proteínov. Na elektroforézu bol pripravený 12% polyakrylamidový deliaci gél a 5% zaostrovací gél (Príloha 1). Medzitým boli vzorky umiestnené na 5 min do termostatu pri teplote 100 °C, čím došlo k denaturácií proteínov. Gély boli zostavené do príslušnej aparatúry a zaliate vnútorným elektródovým roztokom (Príloha 2). Do každého gélu bol nanesený štandard Precision plus protein standard (BioRad) na sledovanie príslušnej molekulovej hmotnosti proteínu. Do zvyšných jamiek boli napipetované všetky vzorky v koncentrácii (20ug – 40ug proteínu na jamku). Po nanesení vzoriek bola zostavená zvyšná aparatúra, zaliata elektródovým roztokom a spustená elektroforéza. Program začínal na konštantnom napätí 100V a po prechode čela elektroforézy do zaostrovacieho gélu bolo zvýšené napätie na konštantných 150V. Pred koncom elektroforézy bolo napätí zvýšené na 200V, kvôli lepšiemu zaostreniu proteínov. Elektroforéza trvala 60 – 90 min podľa veľkosti sledovaných proteínov.

Western blot

Pred koncom elektroforezy boli pripravené nitrocelulózové membrány (0,2 mm, Bio-Rad) a aktivované v TOWBIN roztoku (Príloha 3). Po dokončení elektroforézy k nim boli pridané gély. Následne bola zostavená aparatúra na Wet blot (BioRad), s dôrazom na odstránenie všetkých bublín medzi membránou a gélom. Western blot prebiehal v chladničke s dodatočným chladením, pri konštantnom napätí 100V po dobu 60 – 90 min.

Imunodetekcia

Po skončení blotovania boli membrány premyté v TTBS roztoku (Príloha 4). Následne boli membrány zablokované pomocou 5% sušeného mlieka rozpusteného v TTBS po dobu 1 hodiny. Tým sa zabránilo nešpecifickému naviazaniu primárnej protilátky. Po blokácii boli membrány premyté 3 x 5 min v TTBS a následne boli značené primárnou protilátkou proti príslušnému proteínu, riedenie primárnej a sekundárnej protilátky je uvedené v tabuľke 2. Primárna protilátka bola značená cez noc v chladničke pri 4 °C za stáleho kolísania.

Primárna protilátka	Riedenie	Sekundárna protilátka (2˚AB)	Riedenie (2˚AB)
β1-ARs (bs-0498R); Bioss	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
β2-ARs (bs-0947R); Bioss	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
β3-ARs (bs-1063R); Bioss	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
Gαs; pripravená podľa (Ihnatovych et al., 2001)	1:3000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
Giα1/2; (Ihnatovych et al., 2001)	1:3000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
Giα3; (Ihnatovych et al., 2001)	1:2000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
ERK 1/2 (4695S); Cell Signaling	1:2000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
pERK 1/2 (Thr202/Tyr204) 4377S; Cell Signaling	1:2000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
PKCα (P4334); Sigma-Aldrich	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
pPKCα (Ser657) sc377565; Santa Cruz Biotechnology	1:500	anti-mouse (31432); Invitrogen	1:5000 v TTBS
Akt (sc-8312); Santa Cruz Biotechnology	1:2000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
pAkt (Ser473) 9271S, Cell Signaling	1:2000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
cPLAα (2832S); Cell Signaling	1:500	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:2500 v TTBS
p-cPLAα (Ser505) 2831S; Cell Signaling	1:500	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:2500 v TTBS
PKG-1 (3248S); Cell Signaling	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:2500 v TTBS
PKA (sc-365615); Santa Cruz Biotechnology	1:500	anti-mouse (31432); Invitrogen	1:2500 v TTBS
pPKA (Thr198) sc-32968; Santa Cruz Biotechnology	1:500	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:2500 v TTBS
p38α (sc-535); Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
p-p38α (Thr 180/Tyr 182) sc-17852-R, Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS

THRα1 (PA1-211A); Thermo Fisher Scientific	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
THRβ1 (PA1-213A); Thermo Fisher Scientific	1:1000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
GAPDH (5174S); Cell Signaling	1:2000	anti-rabbit (A9169); Sigma-Aldrich	1:5000 v TTBS
β aktín (sc-1616); Santa Cruz Biotechnology	1:5000	anti-goat (sc-2033); Santa Cruz Biotechnology	1:5000 v TTBS

Tabuľka 2: Riedenie primárnych a sekundárnych protilátok

Po inkubácii v primárnej protilátke boli membrány opäť premyté 3 x 5 min v TTBS. Následne boli inkubované v sekundárnej protilátke 1 hod pri izbovej teplote (Tabuľka 2). Po hodinovej inkubácií boli membrány premyté 3x5 min v TTBS a nasledovala detekcia proteínov. Detekcia prebiehala pomocou konjugácie sekundárnej protilátky s enzýmom peroxidázy. V reakcii dochádza k premene chemiluminiscenčného substrátu (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific Pierce) na nestabilný produkt, ktorý sa stabilizuje vyžiarením kvanta svetla. Na membrány bolo nanesených 400 µl chemiluminiscenčného substrátu a vyvolané pomocou programu Image-Reader LAS 4000 (Genetica, FujiFilm). Pre kvantifikáciu dát z Image-Reader LAS 4000 bola využitá densitometria a následne boli všetky dáta spracované v programe QuantityOne (BioRad). Ako kontrola nanášky boli membrány nafarbené roztokom Ponceau S. Všetky vzorky pre jednotlivé protilátky boli analyzované niekoľkokrát a vzniknutý priemer bol využitý k štatistickému hodnoteniu.

4.3 Stanovenie aktivity adenylátcyklázy

Enzymatická aktivita adenylátcyklázy bola stanovená pomocou rádioaktívne značeného ATP-[α-^{32}P]ATP. Pre získanie [α-^{32}P]cAMP bola použitá adsorpčná chromatografia, kde stacionárnou pevnou fázou bol neutrálny oxid hlinitý. Ten adsorbuje multivalentné nukleotidy, pričom monovalentné (ako cAMP) prepúšťa. Účinnosť kolóny bola zistená pomocou [^{3}H]cAMP, ktorý bol prítomný v reakčnej zmesi. Vo všetkých vzorkách bola stanovená bazálna a forskolínom indukovaná enzýmová aktivita AC.

4.3.1 Odber tkaniva

Bola pripravená hrubá membránová frakcia ako je uvedené vyššie (kapitola 4.2.2). Rozdielny bol krok homogenizovania. Tkanivo bolo na vopred vychladenom kovovom bločku na ľade nožničkami nastrihané na jemnú hmotu. Takto pripravené tkanivo bolo homogenizované v homogenizátore (Ultratourax) po dobu 1 minúty. Následne sa pokračovalo rovnako ako je vyššie uvedené.

4.3.2 Aktivita adenylátcyklázy

Aktivita adenylátcyklázy bola stanovená meraním premeny [α-^{32}P]ATP (Amersham Biosciences, UK) na [^{32}P]cAMP. Vzorky (20 µg) boli inkubované v reakčnej zmesy obsahujúcej 48 mM Tris pufr (pH 7,4), 2 mM MgCl2, 0,1 mM EDTA, 20 µM GTP, 0.8 mg/ml BSA, 40 µM 3-isobutyl-1-methylxanthin, 5 mM fosfoenolpyruvát, 3.2 U pyruvát kinázy, 100 mM NaCl, 0.1 mM cAMP a 15 000 cpm [^{3}H]cAMP (Amersham Biosciences, UK) v celkovom objeme 100 µl. Okrem stanovenia bazálnej aktivity AC bola jej enzýmová aktivita modulovaná rôznymi stimulátormi (10 µM izoprenalín, 10 µM forskolín, 10 mM MnCl2, 100 µM GTPγS a 10 mM NaF) pre posúdenie funkčného stavu jednotlivých proteínov signálnej dráhy. AC bola aktivovaná buď priamo svojim kofaktorom Mn^{2+} alebo prostredníctvom forskolínu, ktorý stimuluje ako AC, tak Gs proteíny, či cez stimuláciu β-ARs izoprenalínom. Aktivácia AC cez Gs bola stimulovaná tiež použitím GTPγS a NaF. Vzorky boli preinkubované po dobu 1 min. v reakčnej zmesi s alebo bez stimulátorov pri teplote 30 °C. Reakcia bola spustená pridaním 10 µl 0,4 M ATP spolu s 2 000 000 cpm [α-^{32}P]ATP, inkubácia prebiehala po dobu 20 minút pri 30 °C. Reakcia bola zastavená pridaním 200 µl 0,5 M HCl a zahrievaním zmesi na teplotu 100 °C po dobu 5 minút. Vzorky boli neutralizované 200 µl 1,5 M imidazolom. Separácia novo vzniknutého [^{32}P]cAMP, vyprodukovaného prostredníctvom AC behom reakcie od ostatných nukleotidov, bola stanovená pomocou kolonovej chromatografie za použitia oxidu hlinitého. Zistené množstvo [^{32}P]cAMP v každej prefiltrovanej skúmavke bolo korigované na výťažnosť [^{3}H]cAMP použitého ako vnútorný štandard. Rádioaktivita bola zmeraná na kvapalnom scintilačnom detektore TriCarb 2910TR LSC (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

4.4 Kvantitatívna imunofluorescenčná analýza

4.4.1 Odber tkaniva

Srdce bolo operatívne vyňaté a zavesené na Langendorfovu aparatúru, kde bolo perfundované relaxačným TYRODE roztokom (Príloha 5). Následne bolo na Langendorfovej aparatúre fixované roztokom 4% paraformaldehydu (PFA v PBS) po dobu 4min. a rozpolené na apex a bázu. Srdce bolo uložené do skúmaviek so 4% PFA na 3 hodiny a následne cez noc do kryoprotektívneho roztoku 20 mM sacharózy v PBS (Príloha 6). Na druhý deň bolo rozdelené na septum, pravú a ľavú predsieň a rozdelené na 3 menšie časti, ktoré boli zamrazené v tekutom dusíku a uložené v -80 °C na ďalšie analýzy.

4.4.2 Spracovanie tkaniva a príprava vzoriek

Jednotlivé časti boli prenesené na suchom ľade do kryocutu (Leica CM3050), ktorý bol cez noc vytemperovaný na -20 °C. V kryotóme boli pomocou kryo-média Tissue-Tek (Sakura) primrazené na terčík a nakrájané na 10 µm hrubé rezy a prenesené na podložné sklíčka (Life Technologies) a obkrúžené voskovým perom PAP PEN (Life Technologies). Voskové pero označilo miesto prenesenia preparátu a zároveň zabezpečilo, aby sa aplikované roztoky udržali na správnom mieste priamo na preparáte. Takto pripravené podložné sklíčka boli umiestnené do PBS, aby sa zabránilo vyschnutiu preparátov pred ich samotným značením.

4.4.3 Imunoznačenie vzoriek

Preparáty boli fixované v čistom metanole vychladenom na -20 °C po dobu 10 minút a následne inkubované v 1% SDS po dobu 10 minút. Sklíčka boli premyté 3 x 5 minút v PBS a následne zablokované blokačným 10% donkey sérom v PBS (0,3% Triton X-100, 1% BSA, 0,3 M glycín and donkey anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich) po dobu 90 minút, aby sa zabránilo naviazaniu nešpecifických väzieb. Sklíčka boli opäť prepláchnuté 3 x 5 min v PBS a cez noc v chladničke pri 4 °C značené primárnou protilátkou. β1-AR (bs-0498R; Bioss) v riedení 1:200, β2-AR (bs-0947R; Bioss) v riedení 1:200, β3-AR (bs-1063R; Bioss) v riedení 1:200, THRα1 (PA1-211A) v riedení 1:200, THRβ1 (PA1-213A) v riedení 1:200 v 1% SDS v PBS.

Na druhý deň boli sklíčka opätovne premyté 3 x 5 min v PBS a následne inkubované s donkey anti-rabbit IgG konjugovanou Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) po dobu 1 hodiny v riedení 1:200 v 1% SDS v PBS pri izbovej teplote. Opäť boli premyté 3 x 5 min v PBS a sarkoléma bola vizualizovaná pomocou Alexa Fluor 647 konjugátu WGA (Thermo Fisher Scientific) po dobu 10 min v riedení 1:200 v 1% SDS v PBS. Nakoniec bolo pridané krycie médium ProLong Gold Antifade Reagent obsahujúci marker pre zviditeľnenie jadier 4′,6-diamidino2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen), čím boli vizualizované jadrá. Kryostatové rezy boli prikryté krycím sklíčkom a uchované pri 4 °C. Ku každej protilátke bola pripravená pozitívna aj negatívna kontrola. Pozitívna kontrola bola pripravená ako je vyššie uvedené, ale bol vynechaný krok primárnej protilátky a namiesto nej, boli sklíčka ponechané cez noc v 4 °C v PBS. Ďalej bola na sklíčka aplikovaná rovnako aj sekundárna protilátka a WGA. Negatívna kontrola bola pripravená ako je uvedené vyššie ale bez primárnej aj sekundárnej protilátky, rezy boli vždy inkubované len v PBS.

Snímanie obrázkov

Imunopozitivita β1-AR, β2-AR, β3-AR, THRα1 a THRβ1 bola sledovaná pomocou invertovaného fluorescenčného mikroskopu Olympus IX81 (Olympus) vybaveného osvetľovacou jednotkou MT20, plne motorizovaným stolčekom (Märzhäuser Wetzlar) a CCD kamerou (Hamamatsu - Orca C4742-80-12AG). Z každého rezu bolo zhotovených 10 snímok pomocou 20 x NA1,2 Plan-Apochromat objektívom s nulovým ziskom a 1 x 1 binning. A následne takisto 10 snímok pomocou 60x NA1,2 C- UPLSAPO objektívom s nulovým ziskom a 1 x 1 binning. Kombinácia filtrov pre jednotlivé kanály bola nastavená nasledovne: DAPI - trojpásmová sada 69002-ET-DAPI/FITC/TexasRed® (Chroma Technology Corp.) ex. 350 nm (šírka pásma 50 nm), 457 nm (šírka pásma 22 nm), β-ARs a THRs (Alexa Fluor 488) - fluorescenčná kocka U-MWIBA3 (Olympus), WGA (TMR) - fluorescenčná kocka U-MWIGA3 (Olympus).

Analýza obrázkov

Analýza obrázkov bola spracovaná pomocou softvéru s otvoreným zdrojovým kódom FIJI (Schindelin et al., 2012). Obrázky boli kalibrované podľa objektívnych charakteristík a režimu snímania podľa vyššie uvedených objektívov. Fluorescenčné pozadie a šum bol redukovaný pomocou Gaussovho filtru aplikovaným pred výpočtom Mandersovho M1 korelačného koeficientu pomocou pluginu vo FIJI software.

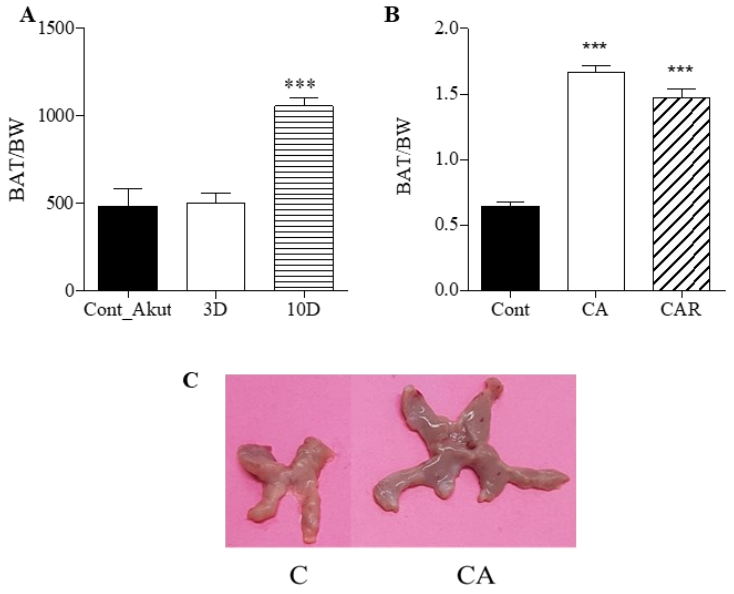
4.5 Štatistická analýza

Počet vzoriek v experimentálnych skupinách sa líšil podľa zaradeniu počtu zvierat do danej skupiny. Pre skupinu akútnej chladovej expozície: Western blot n=6, kvantitatívna imunofluorescenčná analýza n=6. Pre skupinu chladovej adaptácie: Western blot n=8, kvantitatívna imunofluorescenčná analýza n=6. Všetky uvedené dáta sú prezentované ako priemer ± SEM.

Štatistické rozdiely medzi skupinami boli stanovené one way ANOVA testom s Tukey post-testom v prípade metódy Western blot. Imunofluorescenčná analýza bola hodnotená Manders M1 korelačným koeficientom. Hodnoty * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ boli považované za štatisticky významné.

5 VÝSLEDKY

Adaptáciu potkanov na chlad v akútnom aj chronickom chlade sme overili meraním hmotnosti BAT v interskapulárnej oblasti potkana. Hmotnosť BAT bola vztiahnutá na celkovú hmotnosť zvieraťa (body weight, BW) a vyjadrená ako pomer BAT/BW (Obrázok 6). V skupine akútnej chladovej expozície sme nezistili rozdiel u 3D, zatiaľ čo u 10D bol signifikantný nárast o 119% hmotnosti BAT/BW v porovnaní s kontrolnou skupinou (Cont_Akut) (Obrázok 6A). V CA aj CAR sme zistili signifikantný nárast, v CA o 158% a v CAR o 136% v porovnaní s kontrolnou skupinou (Cont) (Obrázok 6B).



Obrázok. 6: *Účinok pôsobenia akútnej chladovej expozície a chladovej adaptácie a následnej regresie na tvorbu BAT (A, B). Bola stanovená hmotnosť BAT v pomere k celkovej hmotnosti (BW) vo vzorkách akútnej chladovej expozície po dobu 3 dni (3D) a 10 dní (10D) a kontrolnej skupiny (Cont_Akut). Tiež vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

Reprezentatívne obrázky (C) BAT vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA).

5.1 Akútny chlad

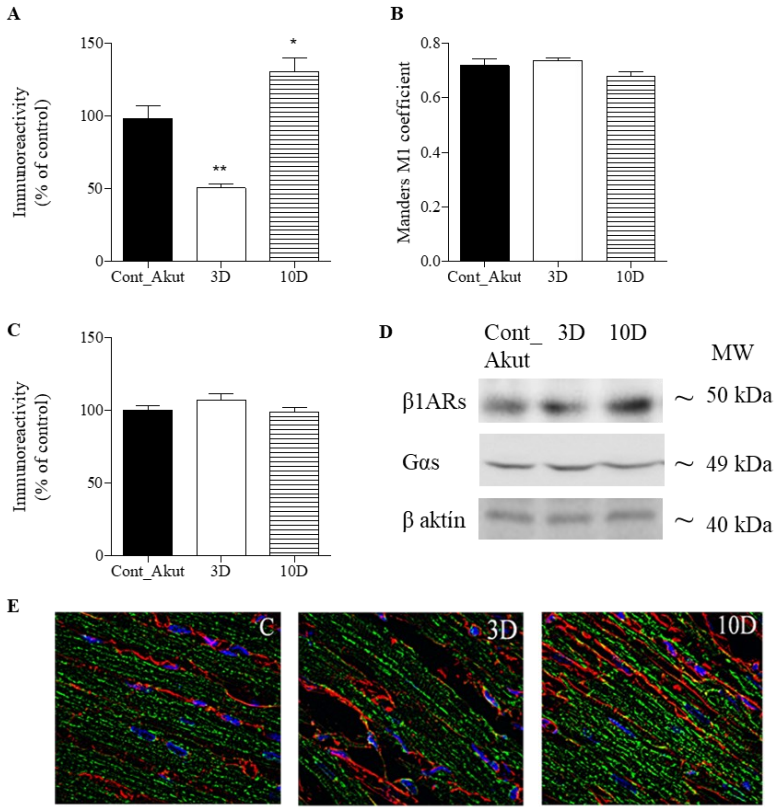
	Cont_Akut	3D	10D
Hmotnosť a hmotnostné parametre			
BW (g)	356 ± 17	387 ± 6	371 ± 5
BAT (mg)	278 ± 30	351 ± 27	414 ± 43*
BAT/BW	0.77 ± 0.66	0.95 ± 0.07	1.12 ± 0.11*
RT (°C)	37.0 ± 0.07	36.7 ± 0.08	36.9 ± 0.09
HW (mg)	901 ± 29	1035 ± 30*	1079 ± 35**
LV/BW	1.48 ± 0.09	1.52 ± 0.03	1.64 ± 0.10
RV/BW	0.53 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.58 ± 0.04
HW/BW	2.55 ± 0.12	2.68 ± 0.07	2.91 ± 0.10

Tabuľka 3: *Účinok pôsobenia akútnej chladovej expozície na základné hmotnostné parametre, srdcovú frekvenciu a hodnotu krvného tlaku. BW - telesná hmotnosť; BAT - hnedé tukové tkanivo, RT - rektálna teplota; HW - hmotnosť srdca; LV - ľavá komora; RV - pravá komora vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont_Akut) a po akútnej chladovej expozícii po dobu 3 dní (3D) a 10 dní (10D); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

5.1.1 Beta ARs a akútna chladová expozícia

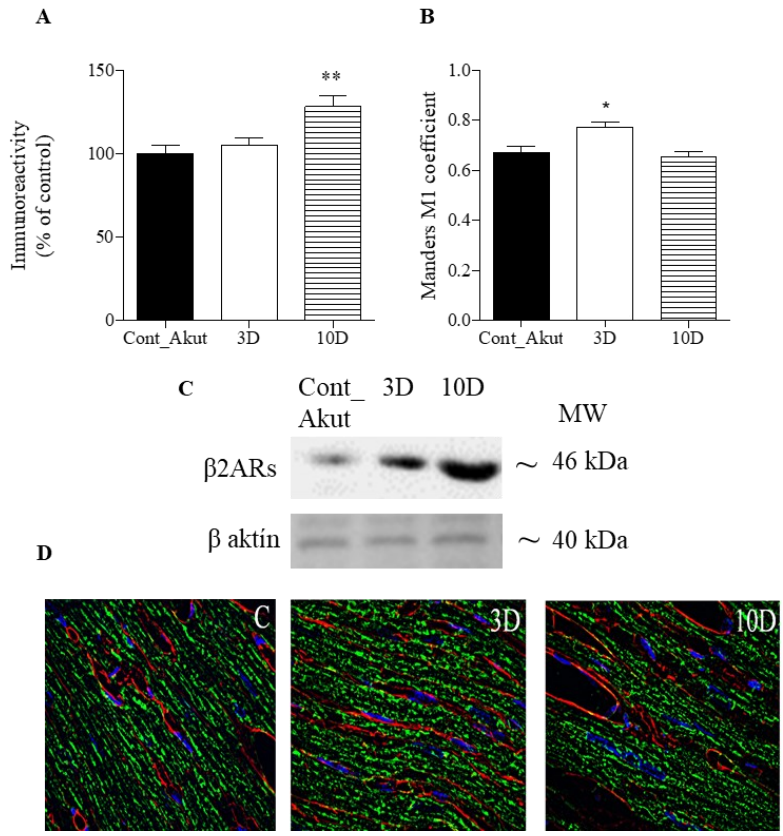
Sledovali sme vplyv pôsobenia akútnej chladovej expozície po dobu 3 dní (3D) a 10 dní (10D) na expresi a kolokalizaci β1-AR so sarkolémou pomocou western blotu a imunofluorescencie v uvedenom poradí.

Zistili sme pokles β1-AR o 50% v 3D a nárast o 30% v 10D (Obrázok 7A) proti kontrole v hrubej membránovej frakcii. Na úrovni kolokalizácie β1-AR so sarkolémou sme nedetekovali žiadne signifikantné zmeny (Obrázok 7B). Podobne sa signifikantne nemenila ani proteínová expresia Gαs v 3D ani 10D v porovnaní s kontrolnou skupinou (Obrázok 7C).



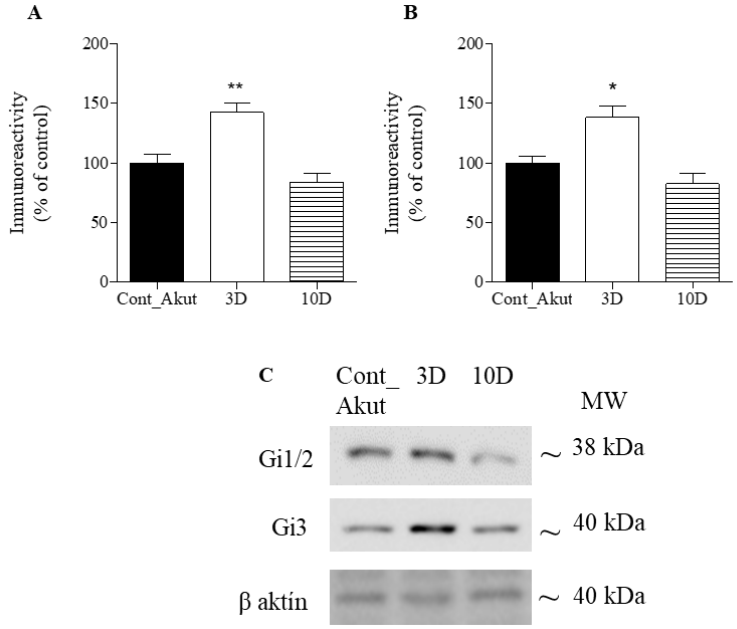
Obrázok 7: *Účinok pôsobenia akútnej chladovej expozície na expresiu a sub-celulárnu distribúciu β1-ARs a Gαs v myokarde potkana. Relatívna proteínová expresia β1-ARs (A) a Gαs (C) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=6) a kolokalizácia β1-ARs (B) so sarkolémou kvantifikované pomocou M1 Mandersovho korelačného koeficientu (n=5) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont_Akut), skupiny po akútnej chladovej expozícii po dobu 3 dni (3D) a 10 dní (10D). Reprezentatívne bandy β1-ARs, Gαs a β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (D) a mikrofotografie pozdĺžnych kryo-rezov ľavej komory značené protilátkami proti β1-ARs (zelené) a sarkoléma značená pomocou WGA (červené); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

Sledovali sme vplyv pôsobenia akútnej chladovej expozície na β2-AR. Proteínová expresia vzrástla o 28% v 10D, zatiaľ čo v 3D sa nemenila (Obrázok 8A). Kolokalizácia so sarkolémou vzrástla naopak v 3D o 15% a v 10D sa nemenila (Obrázok 8B) v porovnaní s kontrolnou skupinou.



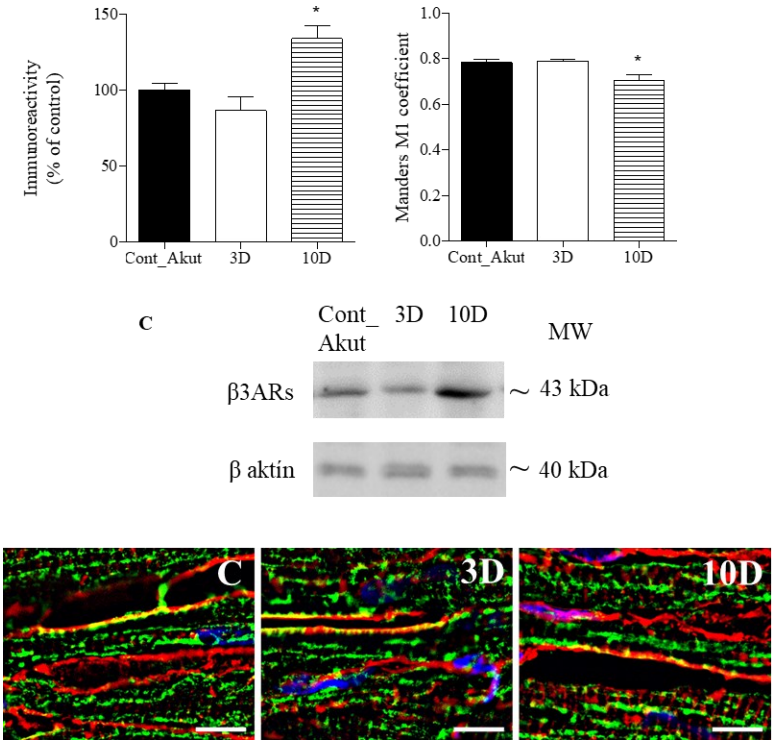
Obrázok 8: *Účinok pôsobenia akútnej chladovej expozície na expresiu a sub-celulárnu distribúciu β2-ARs. Relatívna proteínová expresia β2-ARs (A) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=6) a kolokalizácia β2-ARs (B) so sarkolémou kvantifikované pomocou M1 Mandersovho korelačného koeficientu (n=5) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont_Akut), skupiny po akútnej chladovej expozícii po dobu 3 dni (3D) a 10 dní (10D). Reprezentatívne bandy β2-ARs a β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (D) a mikrofotografie pozdĺžnych kryo-rezov ľavej komory značené protilátkami proti β2-ARs (zelené) a sarkoléma značená pomocou WGA (červené); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

Proteínová expresia Gαi1/2 a Gαi3 (Obrázok 9A a 9B) proteínov bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV. Sledovali sme podobný trend nárastu v 3D. Gαi1/2 sa zvýšila o 42% a Gαi3 o 38% v 3D a v 10D sa nemenila.



Obrázok 9: *Účinok pôsobenia akútnej chladovej expozície na expresiu Gαi1/2 a Gαi3. Relatívna proteínová expresia Gαi1/2 (A) a Gαi3 (B) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=6) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont_Akut), skupiny po akútnej chladovej expozícii po dobu 3 dni (3D) a 10 dní (10D). Reprezentatívne bandy Gαi1/2, Gαi3 a β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (C); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

Sledovali sme vplyv pôsobenia akútnej chladovej expozície na β3-AR. Expresia β3-AR sa zvyšovalo o 27% v 10D, zatiaľ čo v 3D sa nemenila (Obrázok 10A). Naproti tomu pomocou kvantitatívnej imunofluorescenčnej analýzy sme nedetekovali žiadne signifikantné zmeny v kolokalizácii β3-AR so sarkolémou v 3D, ale pokles v 10D o 10% (Obrázok 10B) v porovnaní s kontrolnou skupinou.



Obrázok 10: *Účinok pôsobenia akútnej chladovej expozície na expresiu a sub-celulárnu distribúciu β3-ARs. Relatívna proteínová expresia β3-ARs (A) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=6) a kolokalizácia β3-ARs (B) so sarkolémou kvantifikované pomocou M1 Mandersovho korelačného koeficientu (n=5) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont_Akut), skupiny po akútnej chladovej expozícii po dobu 3 dni (3D) a 10 dní (10D). Reprezentatívne bandy β3-ARs a β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (D) a mikrofotografie pozdĺžnych kryo-rezov ľavej komory značené protilátkami proti β3-ARs (zelené) a sarkoléma značená pomocou WGA (červené); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

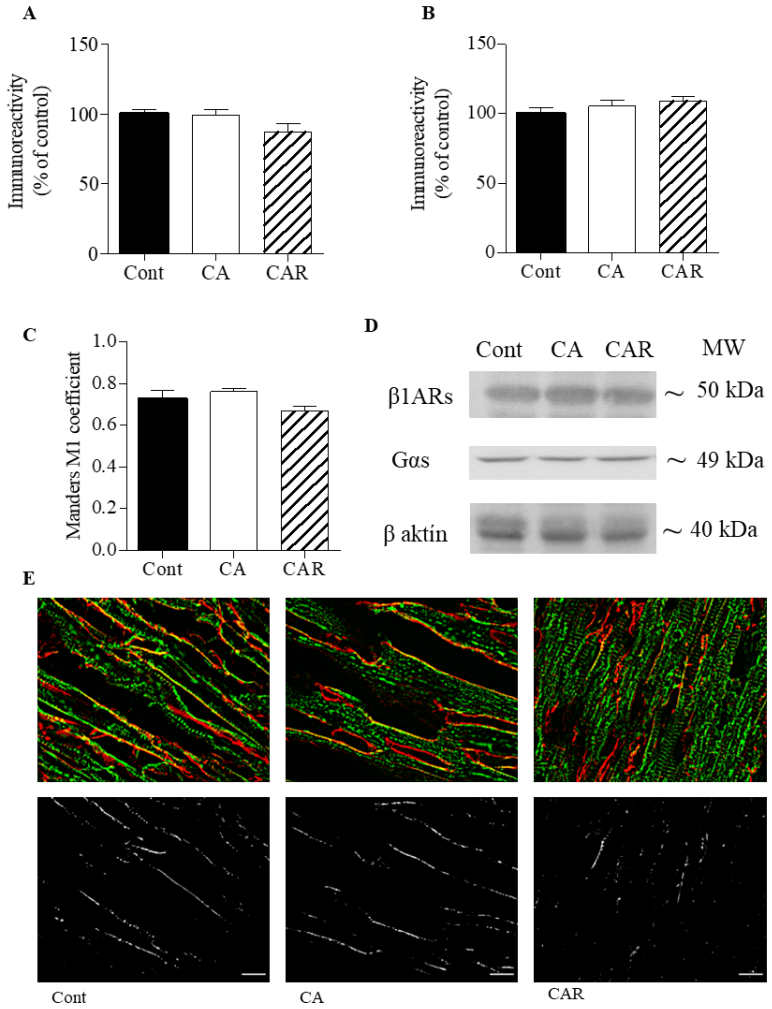
5.2 Chronický chlad

	Cont	CA	CAR
Hmotnosť a hmotnostné parametre			
BW (g)	359 ± 22	357 ± 30	373 ± 12
BAT (mg)	230 ± 33	594 ± 54***	543 ± 98***
BAT/BW	0.64 ± 0.1	1.67 ± 0.20***	1.47 ± 0.30***
RT prvý týždeň (°C)	37.4 ± 0.1	37.1 ± 0.10	-
RT 2hý až 5ty týždeň (°C)	37.0 ± 0.3	37.1 ± 0.40	36.9 ± 0.30
HW (mg)	975 ± 26.6	1007 ± 20.9	961 ± 24.5
LV/BW	1.65 ± 0.10	1.77 ± 0.03	1.62 ± 0.10
RV/BW	0.53 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.48 ± 0.02
HW/BW	2.72 ± 0.10	2.82 ± 0.10	2.58 ± 0.10

Tabuľka 4: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na základné hmotnostné parametre, srdcovú frekvenciu a hodnotu krvného tlaku. BW - telesná hmotnosť; BAT - hnedé tukové tkanivo, RT - rektálna teplota; HW - hmotnosť srdca; LV - ľavá komora; RV - pravá komora vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

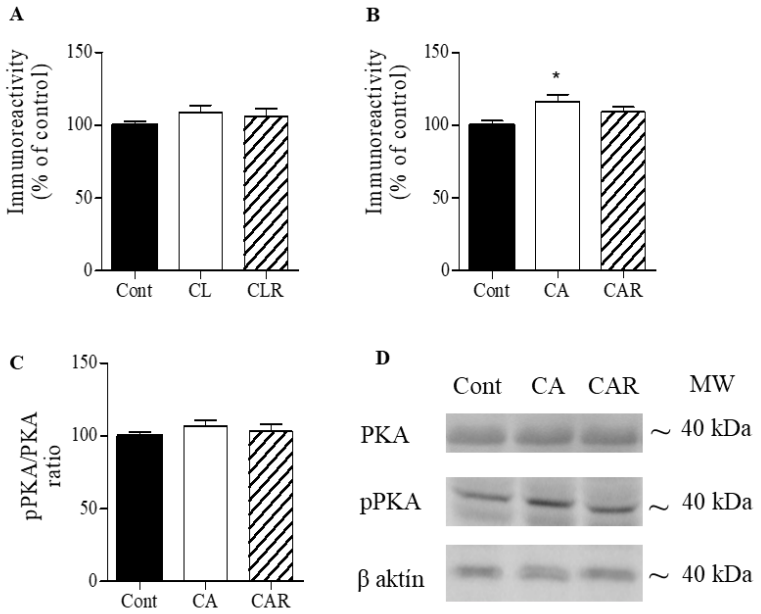
5.2.1 Beta1 ARs signálna dráha

Vplyv pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na β1-AR a Gαs. Pomocou Western blot a kvantitatívnej imunofluorescenčnej analýzy sme nedetekovali žiadne signifikantné zmeny (Obrázok 11A,C) v CA ani CAR skupine. Podobne sa signifikantne nemenila ani proteínová expresia Gαs v CA ani CAR (Obrázok 11B).



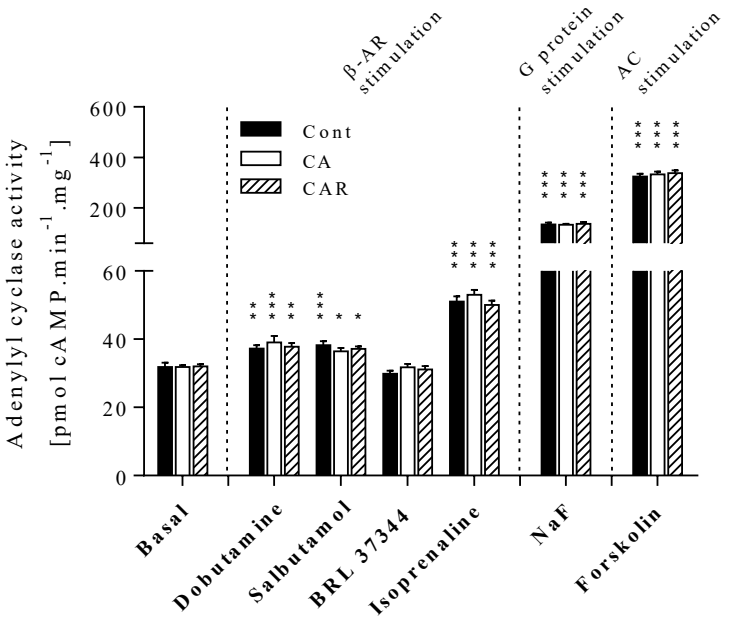
Obrázok 11: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu a sub-celulárnu distribúciu β1-AR a Gαs v myokarde potkana. Relatívna proteínová expresia β1-AR (A) a Gαs (B) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) a kolokalizácia β1-AR (C) so sarkolémou kvantifikované pomocou M2 Mandersovho korelačného koeficientu (n=5) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy β1-AR, Gαs a β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (D) a mikrofotografie pozdĺžnych kryo-rezov ľavej komory značené protilátkami proti β1-AR (zelené) a sarkoléma značená pomocou WGA (červené). Čierno-biele obrázky reprezentujú kolokalizačnú pixel map (E). Stupnica mierky = 10 µm; hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

Proteínová expresia PKA sa v CA ani CAR signifikantne nemenila (obrázok 12A), fosforylácia pPKA (Thr198) v CA skupine vzrástla o 17% (Obrázok 12B). Pomer pPKA/PKA sa u oboch experimentálnych skupín signifikantne nemenil (Obrázok 12C).



Obrázok 12: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu PKA a pPKA (Thr198) v myokarde potkana. Relatívna proteínová expresia PKA (A) a pPKA (B) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti PKA a pPKA (Thr198) a pomocou β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (C); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

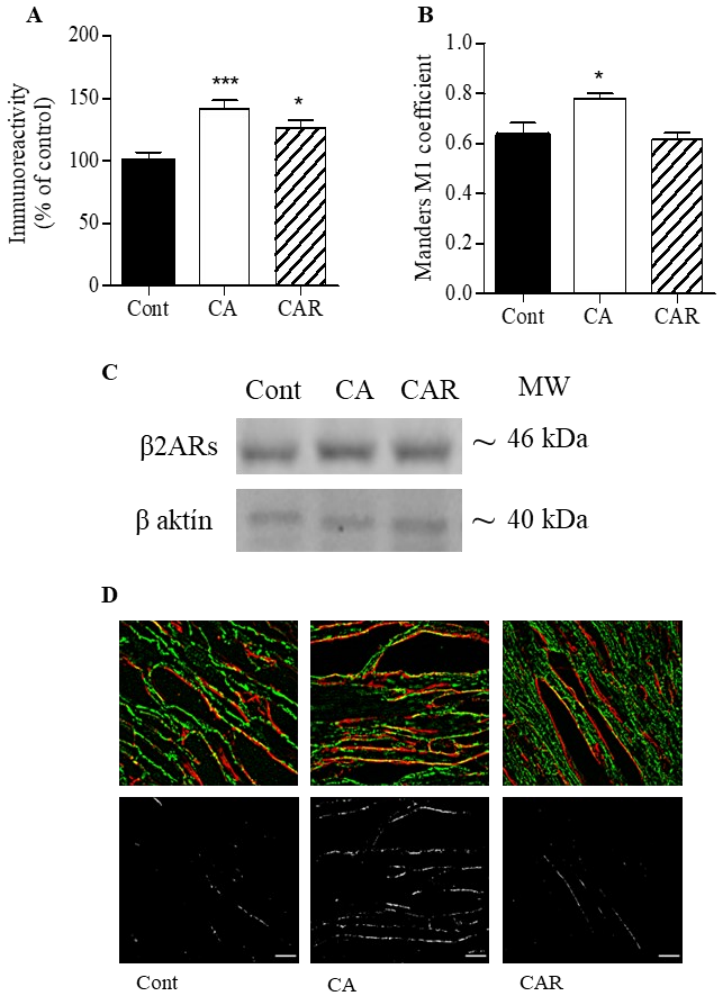
Aktivita adenylátcyklázy bola meraná ako bazálna a následne pomocou vybraných agonistov β-ARs vo všetkých experimentálnych skupinách. Bazálna aktivita AC sa signifikantne nelíšila medzi skupinami. Dobutamín (selektívny β1-AR agonista) a solbutamol (selektívny β2-AR agonista) zvýšil aktivitu adenylátcyklázy o 16 a 19% bez rozdielu medzi skupinami. BLR37344 (selektívny β3-AR agonista) aktivitu nemenil oproti bazálnej hodnote ani v jednej skupine. Izoprenalín (nešpecifický β-ARs agonista) zvýšil aktivitu AC o 61% v oboch experimentálnych skupinách i kontrole. NaF (aktivátor G proteínov) zvýšila aktivitu AC takmer štvornásobne v CA a CAR skupinách, a rovnako aj v kontrole. Forskolín (priamy aktivátor AC) zvýšil aktivitu AC až desaťnásobne tiež vo všetkých experimentálnych skupinách (Obrázok 13). Tieto signifikantné zmeny boli však spôsobené divergentným efektom, kedy β-ARs aktivuje viacero Gαs a tie aktivujú ďalšie AC. Nesledovali sme však žiadne zmeny v reakcii na vybraných agonistov medzi skupinami.



Obrázok 13: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na aktivitu adenylátcyklázy. Bola stanovená bazálna aktivita adenylátcyklázy a následne po stimulácii špecifickými β-ARs agonistami: dobutamín pre β1-ARs, solbutamol pre β2-AR a BLR37344 pre β3-AR a izoprenalín ako nešpecifický β-ARs agonista. Ako aktivátor G proteínov bol použitý NaF a ako aktivátor AC bol použitý forskolín (n=6) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR); hodnoty sú priemerné ± SD, * p <0,05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. bazálna aktivita adenylátcyklázy.*

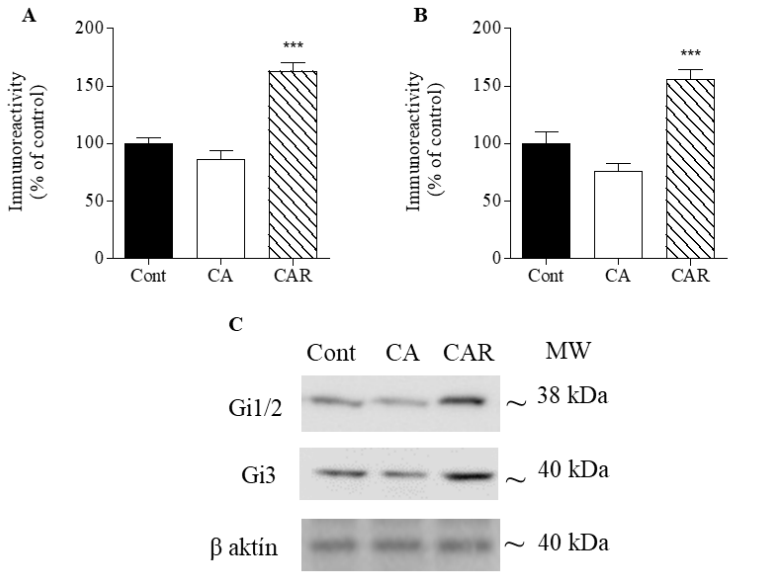
5.2.2 Beta2 ARs signálna dráha

Proteínová expresia β2-AR vzrástla v CA o 40% a zostala zvýšená aj v CAR a to o 26% (obrázok 14A) oproti kontrolnej skupine. Pomocou kvantitatívnej imunofluorescenčnej analýzy sme detekovali nárast kolokalizácie β2-AR so sarkolémou v CA skupine o 16%, v CAR skupine sme nedetekovali žiadne zmeny vzhľadom na kontrolnú skupinu (obrázok 14B).



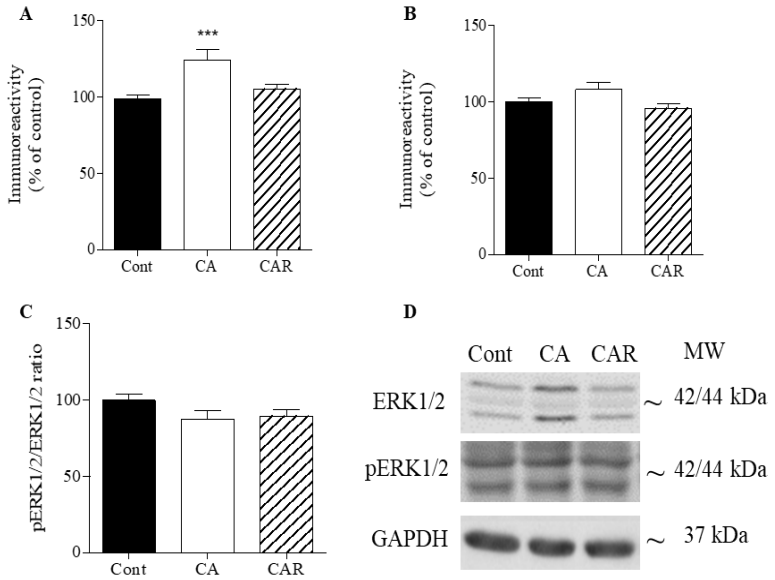
Obrázok 14: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu a sub-celulárnu distribúciu β2-AR v myokarde potkana. Relatívna proteínová expresia β2-AR (A) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) a kolokalizácia β2-AR (B) so sarkolémou kvantifikované pomocou M2 Mandersovho korelačného koeficientu (n=5) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti β2-ARs a pomocou β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (C). Reprezentatívne bandy (C) a mikrofotografie pozdĺžnych kryo-rezov ľavej komory značené protilátkami proti β2-AR (zelené) a sarkoléma značená pomocou WGA (červené). Čierno-biele obrázky reprezentujú kolokalizačnú pixel map (D). Stupnica mierky = 10 µm; hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola.*

Proteínová expresia Gαi1/2 a Gαi3 bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV. U oboch proteínov sme pozorovali podobný trend, kedy v CA skupine sme zaznamenali mierny trend k poklesu a v skupine CAR zvýšenie. Gαi1/2 sa zvýšil v CAR o 62% a Gαi3 o 55% oproti kontrolnej skupine (obrázok 15A, B).



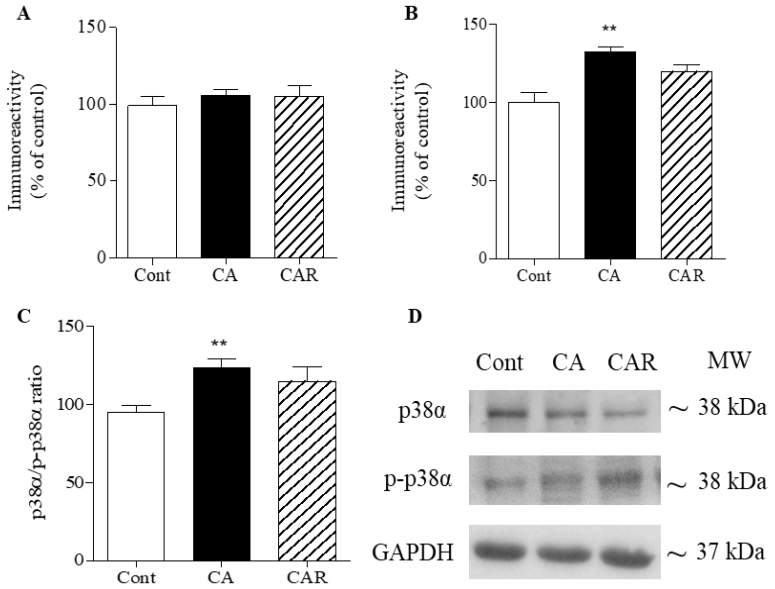
Obrázok 15: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu Gαi1/2 a Gαi3 proteínov. Relatívna proteínová expresia Gαi1/2 (A) a Gαi3 (B) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti Gαi1/2 a Gαi3 a pomocou β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (C); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola.*

Relatívna proteínová expresia ERK1/2 (Obrázok 16A), pERK1/2(Thr202/Tyr204) (Obrázok 16B) a pomer pERK1/2/ERK1/2 (Obrázok 16C) bola stanovená v cytozolovej frakcii LV. Expresia ERK1/2 stúpala v CA skupine o 26%, v CAR sa nemenila. Fosforylácia pERK1/2 (Thr202/Tyr204) a následne pomer pERK1/2/ERK1/2 sa v oboch experimentálnych skupinách signifikantne nemenil.



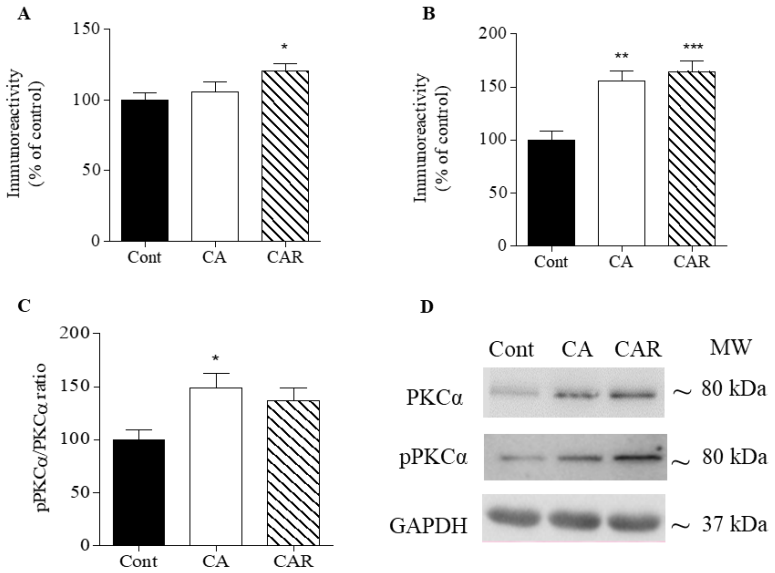
Obrázok 16: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu ERK1/2 a pERK1/2 (Thr202/Tyr204). Relatívna proteínová expresia ERK1/2 (A), pERK1/2 (B) a pomer pERK1/2/ERK1/2 (C) bola stanovená v cytozolovej frakcii LV (n=8) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti ERK1/2 a pERK1/2 (Thr202/Tyr204) a pomocou GAPDH ako kontroly nanášky proteínov (D); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola.*

Relatívna proteínová expresia p38α (Obrázok 17A), p-p38α(Thr 180/Tyr 182) (Obrázok 17B) a pomer p-p38α/p38α (Obrázok 17C) bola stanovená v cytozolovej frakcii LV. Proteínová expresia p38α sa signifikantne nemenila v oboch experimentálnych skupinách. Fosforylácia p-p38α (Thr 180/Tyr 182) a následne pomer p-p38α/p38α stúpal v CA skupine o 32% a o 23%, v CAR sa nemenil vzhľadom na kontrolnú skupinu.



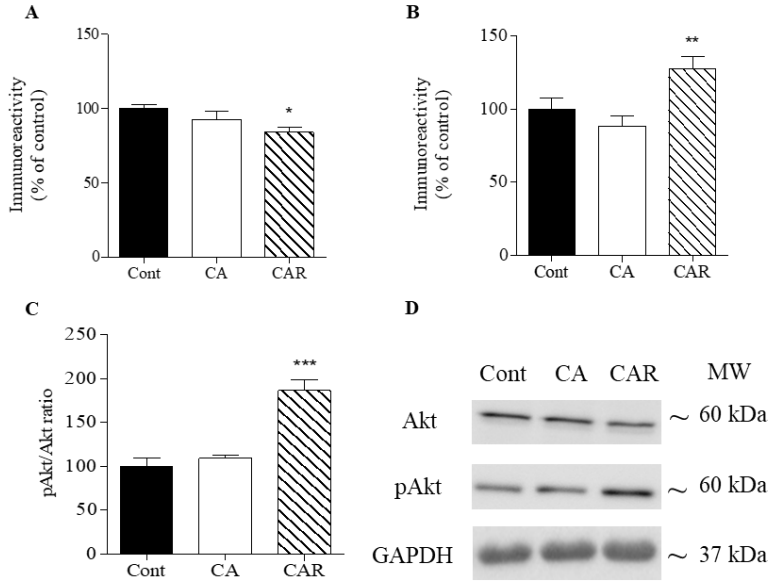
Obrázok 17: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu p38α a p-p38α (Thr 180/Tyr 182). Relatívna proteínová expresia p38α (A), p-p38α (B) a pomer p-p38α/p38α (C) bola stanovená v cytozolovej frakcii LV (n=8) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov(CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti p38α a p-p38α (Thr 180/Tyr 182) a pomocou GAPDH ako kontroly nanášky proteínov (D); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola.*

Relatívna proteínová expresia PKCα (Obrázok 18A), pPKCα(Ser657) (obrázok 18B) a pomer pPKCα/PKCα (obrázok 18C) bola stanovená v cytozolovej frakcii LV. Expresia PKCα sa v CA skupine signifikantne nemenila, v CAR stúpala o 20%, fosforylácia pPKCα (Ser657) stúpala v oboch experimentálnych skupinách v CA o 55% a v CAR o 64%. Pomer pPKCα/PKCα stúpal v CA skupine o 48% oproti kontrolnej skupine.



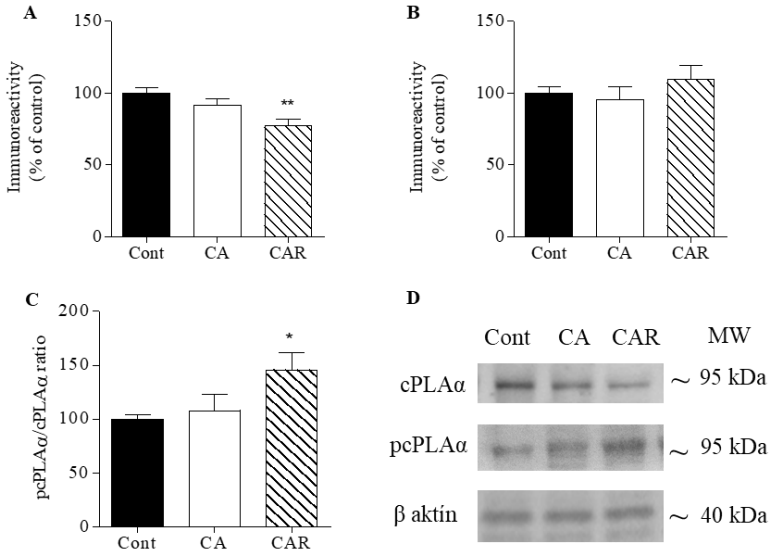
Obrázok 18: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu PKCα a pPKCα (Ser657). Relatívna proteínová expresia PKCα (A), pPKCα (B) a pomer pPKCα/PKCα (C) bola stanovená v cytozolovej frakcii LV (n=8) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti PKCα a pPKCα (Ser657) a pomocou GAPDH ako kontroly nanášky proteínov (D); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola.*

Relatívna proteínová expresia Akt (Obrázok 19A), pAkt(Ser473) (Obrázok 19B) a pomer pAkt/Akt (Obrázok 19C) bola stanovená v cytozolovej frakcii LV. Proteínová expresia Akt sa v CA nemenila, v CAR klesala o 16%, fosforylácia pAkt (Ser473) sa rovnako v CA nemenila, ale naopak v CAR skupine stúpala o 27%. Pomer pAkt/Akt sa následne nemenil v CA a v CAR stúpal až o 86% vzhľadom ku kontrolnej skupine.



Obrázok 19: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu Akt a pAkt (Ser473). Relatívna proteínová expresia Akt (A), pAkt (B) a pomer pAkt/Akt (C) bola stanovená v cytozolovej frakcii LV (n=8) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti Akt a pAkt (Ser473) a pomocou GAPDH ako kontroly nanášky proteínov (D); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola.*

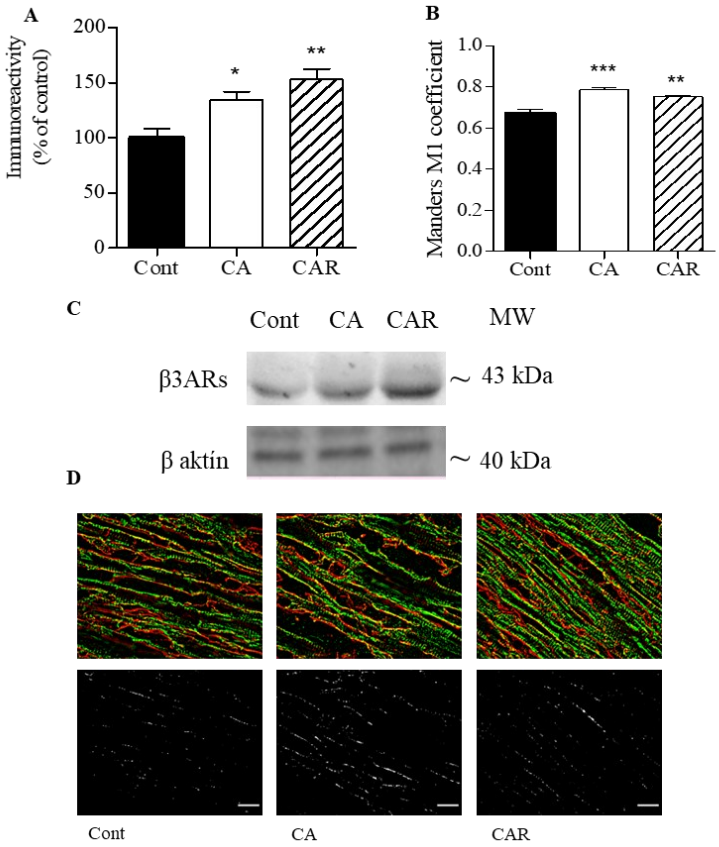
Relatívna proteínová expresia cPLAα (Obrázok 20A), pcPLAα(Ser505) (obrázok 20B) a pomer pcPLAα/cPLAα (obrázok 20C) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV. Expresia cPLAα sa nemenila v CA skupine, v CAR klesala o 23%, fosforylácia pcPLAα (Ser505) sa nemenila v oboch experimentálnych skupinách. Následne pomer pcPLAα/cPLAα sa nemenil v CA, ale v CAR stúpal o 45% v porovnaní s kontrolnou skupinou.



Obrázok 20: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu cPLAα a pcPLAα (Ser505). Relatívna proteínová expresia cPLAα (A), pcPLAα (B) a pomer pcPLAα/cPLAα (C) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti cPLAα a pcPLAα (Ser505) a pomocou β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (D); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola.*

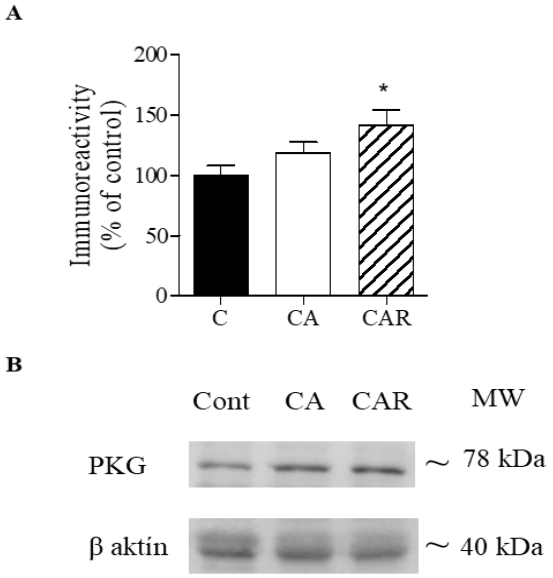
5.2.3 Beta3 ARs signálna dráha

Vplyv pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na β3-AR expresiu a kolokalizáciu. Proteínová expresia vzrástla v chladovo adaptovanej skupine o 34% a zostala zvýšená aj v regresnej skupine a to o 52% (obrázok 21A) oproti kontrolnej skupine. Pomocou kvantitatívnej imunofluorescenčnej analýzy sme detekovali nárast v CA skupine o 18%, v CAR o 12% vzhľadom na kontrolnú skupinu (obrázok 21B).



Obrázok 21: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu a sub-celulárnu distribúciu β3-AR v myokarde potkana. Relatívna proteínová expresia β3-AR (A) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) a kolokalizácia β3-AR (B) so sarkolémou kvantifikované pomocou M2 Mandersovho korelačného koeficientu (n=5) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti β3-ARs a pomocou β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (C). Reprezentatívne mikrofotografie pozdĺžnych kryo-rezov ľavej komory značené protilátkami proti β3-AR (zelené) a sarkoléma značená pomocou WGA (červené). Čierno-biele obrázky reprezentujú kolokalizačnú pixel map (D). Stupnica mierky = 10 µm; hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

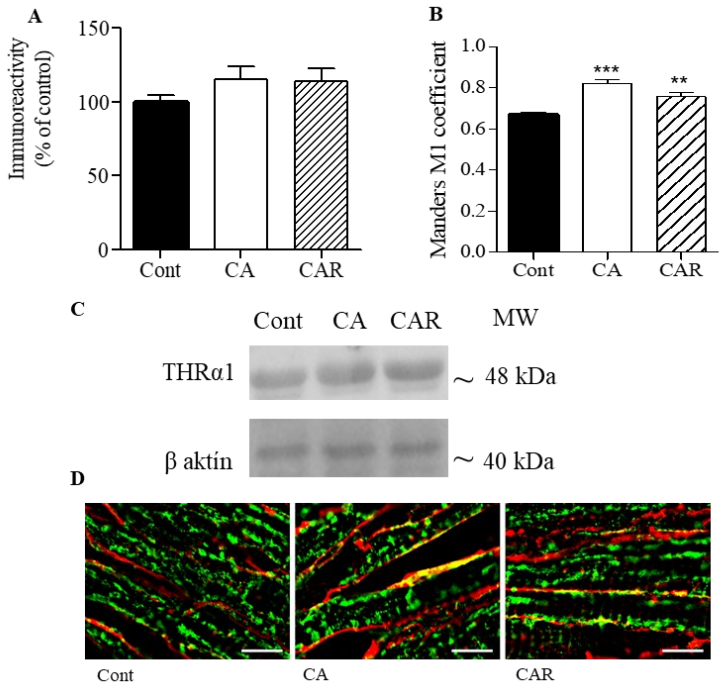
Proteínová expresia PKG bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV. V CAR sme pozorovali nárast o 41% oproti kontrolnej skupine (obrázok 22A).



Obrázok 22: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu PKG v myokarde potkana. Relatívna proteínová expresia PKG bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti PKG a pomocou β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (B); hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

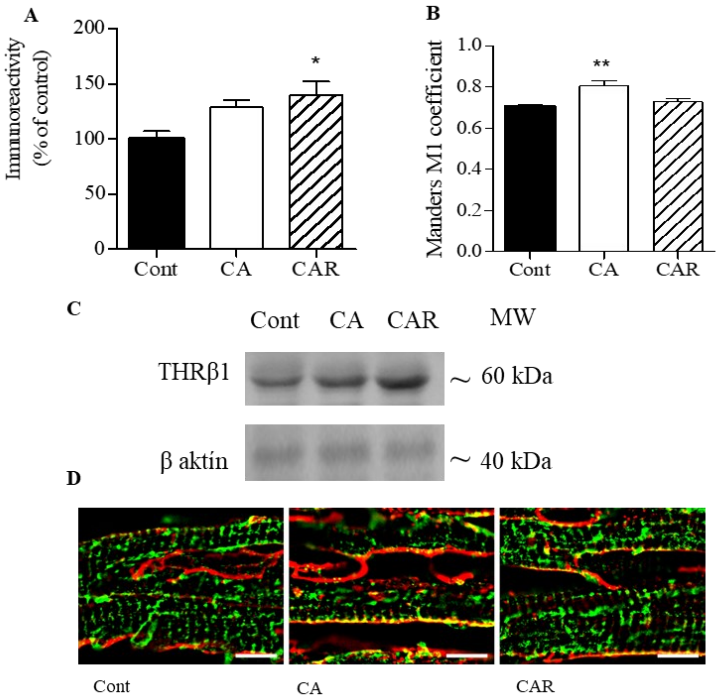
5.2.4 Tyroidné receptory

Vplyv pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na THRα1. Proteínová expresia sa v oboch experimentálnych skupinách nemenila (obrázok 23A). Pomocou kvantitatívnej imunofluorescenčnej analýzy sme detekovali nárast kolokalizácie THRα1 so sarkolémou v CA o 23%, v CAR o 13% vzhľadom na kontrolnú skupinu (obrázok 23B).



Obrázok 23: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu a sub-celulárnu distribúciu THRα1 v myokarde potkana. Relatívna proteínová expresia THRα1 (A) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) a kolokalizácia THRα1 (B) so sarkolémou kvantifikované pomocou M2 Mandersovho korelačného koeficientu (n=5) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti THRα1 a pomocou β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (C). Reprezentatívne mikrofotografie pozdĺžnych kryo-rezov ľavej komory značené protilátkami proti THRα1 (zelené) a sarkoléma značená pomocou WGA (červené) (D). Stupnica mierky = 10 μm; hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

Vplyv pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na THRβ1 sa prejavil na úrovni proteínovej expresie v hrubých membránach v CAR, kde došlo k nárastu o 28% (obrázok 24A). Pomocou kvantitatívnej imunofluorescenčnej analýzy sme detekovali nárast kolokalizácie THRβ1 so sarkolémou o 15% v CA, zatiaľ čo v CAR sa kolokalizácia nelíšila od kontrolnej skupiny (obrázok 24B).



Obrázok 24: *Účinok pôsobenia chladovej adaptácie a následnej regresie na expresiu a sub-celulárnu distribúciu THRβ1 v myokarde potkana. Relatívna proteínová expresia THRβ1 (A) bola stanovená v hrubej membránovej frakcii LV (n=8) a kolokalizácia THRβ1 (B) so sarkolémou kvantifikované pomocou M2 Mandersovho korelačného koeficientu (n=5) vo vzorkách kontrolnej skupiny (Cont), skupiny po chladovej adaptácii (CA) a následnom vrátení do teploty 24 °C po dobu 2 týždňov (CAR). Reprezentatívne bandy značené protilátkami proti THRβ1 a pomocou β aktínu ako kontroly nanášky proteínov (C). Reprezentatívne mikrofotografie pozdĺžnych kryo-rezov ľavej komory značené protilátkami proti THRβ1 (zelené) a sarkoléma značená pomocou WGA (červené) (D). Stupnica mierky = 10 μm; hodnoty sú priemerné ± SD, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. kontrola*

6 DISKUSIA

Signálne dráhy adrenergných receptorov hrajú významnú rolu v odpovedi na chlad a v protekcii srdca. Preto som sa práve týmito spojeniami zaoberala v tejto dizertačnej práci v súvislosti s novo objaveným kardioprotektívnym modelom chladovej adaptácie (Marvanova, 2015; Vebr, 2016; Tibenska et al., 2018; Tibenská et al., 2020a). Táto práca nadväzuje na zistenia Marvanovej a Vebra, ktorí ukázali významný kardioprotektívny efekt adaptácie na chlad ako ex vivo (Vebr, 2016), tak aj in vivo (Marvanova, 2015; Tibenska et al., 2018). Zaoberá sa štúdiom adrenergného systému v ľavej komore potkana v priebehu akútneho a chronického vystavenia miernemu chladu (8 ± 1 °C) a následne aj dva týždne po návrate do normotermných podmienok.

Náhle vystavenie chladu, najmä v zimných mesiacoch, môže u ľudí vyvolať tzv. chladový šok, ktorý zvyšuje pravdepodobnosť vzniku arytmií a infarktu myokardu (Kriszbacher et al., 2009). Tento detrimentálny efekt môže byť spojený so skutočnosťou, že akútne vystavenie chladu vedie k zníženiu objemu plazmy, čo následne zvyšuje hustotu krvných elementov a riziko vzniku trombózy. Bolo tiež zistené, že dochádza k zvýšeniu množstva cholesterolu v plazme. Tieto zmeny boli výraznejšie u vyššej vekovej kategórie, u ktorej významne vzrástlo riziko kardiovaskulárnych príhod. Zdá sa, že týmto negatívnym účinkom je možné predísť nastavením vhodného režimu adaptácie alebo otužovaním organizmu. U otužilcov bolo preukázané, že akútna expozícia chladu naopak zvyšuje antioxidačné enzýmy v plazme a znižujú sa markery nebezpečia vzniku kardiovaskulárnych ochorení (Kralova Lesna et al., 2015; Vybíral et al., 2000). Naviac, Liptáková vo svojej diplomovej práci skúmala vplyv 1 dňového chladu na veľkosť infarktu myokardu. Nepozorovala žiadne zmeny oproti kontrolnej skupine (Liptáková, 2020). To naznačuje, že aj akútne vystavenie miernemu chladu nie je pre srdce detrimentálne.

Dôležitým adaptačným mechanizmom je tvorba hnedého tuku u malých živočíchov. V našom modeli miernej chladovej adaptácie (8 ± 1 °C) sme pozorovali signifikantný nárast množstva hnedého tukového tkaniva, po 10 dňoch. Zatiaľ čo po 3 dňoch chladovej expozície zmeny jeho hmotnosti ešte neboli signifikantné. Hmotnosť sa signifikantne nezmenila po päť týždňovej CA ani CAR v porovnaní s 10D. Štúdie vykonané na izolovaných hnedých adipocytoch naznačujú, že β3-AR hrá dôležitú úlohu v aktivácii BAT (Zhao et al., 1998). Avšak myši s knockoutom β3-AR nemali významný problém v procese adaptívnej reakcie na chlad (Susulic et al., 1995). Tieto zvieratá vykazujú zvýšenú reguláciu β1- (nie β2-) AR, čo naznačuje, že buď β3-AR nie je pre termogenézu kritický, alebo že jeho absencia je kompenzovaná

zvýšením expresie receptora β1-AR, prípadne inak (Atgié et al., 1997). Cielená inaktivácia génu β1-AR podporovala hypotermiu a zrýchlenie energetického výdaja v reakcii na vystavenie chladu bolo značne limitované. Niekoľko ďalších štúdií uskutočňovaných na myšiach s β1KO ukázalo, v týchto modeloch možno nájsť kompenzačné mechanizmy, napr. zvýšenie expresie mRNA β3-AR v BAT (Atgié et al., 1997; Rohrer, 1998). Z týchto výsledkov vyplýva, že β1- a β3-AR sú spoločne dôležité pre aktiváciu BAT a netrasovú termogenézu po chladovej adaptácii.

U ľudí, ktorí sa na jednu hodinu po dobu siedmych za sebou nasledujúcich dní ponorili do studenej vody (14 °C), sa významne znižovala trasová termogenéza, ktorá nastupovala neskôr a zároveň sa zvyšovala kapacita netrasovej termogenézy (Gordon et al., 2019). Tento jav pozoroval už Janský v roku 1996 (Jansky et al., 1996). Brazaitis et al. skúmali časový priebeh chladovej expozície, kedy skúmali vybrané fyziologické a psychologické markery probandov, ktorí boli ponorení každý deň do 14 °C vody po dobu 170 minút, celkovo 20 dní. Od šiesteho dňa chladovej expozície subjekty pociťovali menšie nepohodlie a pocit chladu a až po 16. deň expozície nepozorovali zmeny rektálnej teploty ani teploty kože. Čo podľa autorov naznačuje posun smerom k izolačno-metabolickému typu adaptácie (Brazaitis et al., 2014). Izolačný typ adaptácie vedie k trvale nižším stratám tepla, jedincom sa zvyšuje vrstva podkožného tuku a zlepšuje sa periférna vazomotorika. Metabolická adaptácia sa vyznačuje normálnou rektálnou teplotou a rozvíja sa tu netrasová termogenéza (Bittel, 1987). Tieto údaje naznačujú, že 6. respektíve 7. deň v tejto štúdii môže byť prahový bod pre termoregulačný posun od trasovej k netrasovej termogenéze (Brazaitis et al., 2014).

V súčasnej literatúre chýbajú informácie o vplyve akútneho chladu na odolnosť srdca k ischémii a všeobecne informácií o zmenách v signalizácii pod vplyvom chladu je veľmi málo. Marvanová zistila, že 3D a 10D chladová expozícia znižuje veľkosť infarktu (nepublikované dáta). Výsledky v tejto dizertačnej práci naznačujú významnú úlohu Gαi signalizácie v 3D, kedy sme pozorovali zvýšenie oboch izoforiem Gαi1/2 aj Gαi3, zároveň sme v 3D pozorovali zvýšenú kolokalizáciu β2-AR so sarkolémou. Avšak v 10D došlo k návratu na kontrolnú hladinu. To naznačuje odlišný kardioprotektívny mechanizmus v 3D a 10D, v 3D je to pravdepodobne β2-AR-Gi dráha. Zvýšenie Gi a zároveň zníženie počtu β-ARs môže byť spôsobené heterológnou desenzitizáciou receptora, zároveň Gαi potláča AC aktivitu (Eschenhagen, 1993). Izoformy Gi proteínov sa spájajú s rôznymi cyto- a kardioprotektívnymi signálnymi dráhami. Gi proteíny sa podieľajú na prenose kaveolínu do mitochondrií a tým zvyšujú odolnosť mitochondrií voči stresu (Wang et al., 2014) a po špecifickej inhibícii Gi

signalizácie v modeli I/R poškodenia sa výrazne zväčšila veľkosť infarktu myokardu (Degeorge et al., 2008).

Možné mechanizmy protekcie akútneho chladu študovala Vítková vo svojej diplomovej práci na úrovni apoptotických markerov. Ukázala, že expresia kaspázy 8 sa nemenila oproti kontrole po 3D, podobne ako pomer Bax/Bcl2 (Vítková, 2018). Tieto výsledky sú v kontraste so zistením autorov Cong et al., ktorí sledovali zvýšenie pro-apoptotického proteínu Bax v intermitentnom modeli extrémnej chladovej adaptácie (-20 °C na 4 hod denne po dobu 1 a 2 týždňov) u myši (Cong et al., 2018). Tento rozdiel je pravdepodobne zapríčinený rozdielnym modelom adaptácie.

Naše výsledky ukazujú pokles expresie proteínov β1-AR v 3D skupine až o 50% a naopak jeho nárast na kontrolnú hladinu po 10D. Na základe týchto výsledkov predpokladáme desenzitizáciu tohto receptora po 3D, pretože konštitutívna stimulácia β-ARs, ktorá trvá až niekoľko hodín, môže viesť k zníženiu počtu receptorov na plazmatickej membráne v dôsledku internalizácie receptorov do transportných vačkov (Stadel et al., 1983). Ide o homológnu desenzitizáciu β-ARs, kedy sú inhibované väzby β-ARs na ich G proteíny a zároveň sa znižuje β-ARs z bunkového povrchu a ukončuje sa tým tvorba cAMP (Shi et al., 2017). To môže viesť aj k oddeleniu od Gαs signálnej kaskády, ktorého expresia sa v 3D ani v 10D nemenila. Obnovenie funkcie β-ARs po downregulácii môže trvať až niekoľko dní (Bouvier et al., 1989). V myokarde boli β-ARs identifikované v dvoch frakciách: sarkolemálnej frakcii a vezikulárnej (pravdepodobne intracelulárnej) frakcii. V intracelulárnej frakcii sú funkčne neoddelené od AC, zatiaľ čo v povrchovej sarkolemálnej frakcii môžu aktivovať cAMP (Maisel et al., 1985). Práve táto rozdielna regulácia prenosu β-ARs v myokarde mohla prispieť k rôznym výsledkom, ktoré sme sledovali na úrovni expresie a kolokalizácie β1-AR.

Podobné výsledky boli publikované v režime krátkodobej adaptácie na hypobárickú hypoxiu (5 dní), kde bola pozorovaná znížená celková hustota β-ARs pomocou väzobných štúdií, čo bolo zapríčinené znížením pomeru β1-AR:β2-AR. Zároveň bola sledovaná aj znížená produkcia cAMP. Podobne našim výsledkom v tejto štúdii sledovali nezmenenú expresiu Gαs a zvýšenú expresiu Gαi2. Tieto zmeny autori rovnako pripisujú desenzitizácii (Mardon et al., 1998). V kardioprotektívnom modeli akútneho cvičenia (behanie v kolese 60 min/deň, celkovo 7 dní) sledovali zníženie veľkosti infarktu myokardu o 34% a zároveň sledovali zvýšenú expresiu eNOS, čo viedlo k zvýšenej regulácii iNOS (Akita et al., 2007). Calvert et al. zistili, že aktivácia eNOS a tvorba NO v reakcii na cvičenie sú čiastočne sprostredkované stimuláciou β3-AR. Pozorovali významné zvýšenia expresie β3-AR v myokarde, zatiaľ čo expresia β1-AR a β2-AR sa nemenila (Calvert et al., 2011). Myši s knock-outovaným β3-AR vykazovali po

cvičení zhoršenie srdcových funkcií a bola u nich sledovaná znížená expresia eNOS a iNOS (Moens et al., 2009).

V 10D sme sledovali nárast expresie β1-AR pomocou metodiky Western blot v hrubej membránovej frakcii, avšak IF analýza nepreukázala žiadne zmeny. Zdá sa teda, že zvýšené totálne množstvo receptorov, je skôr vo vačkoch a nie je translokované na sarkolému. Bolo ukázané, že receptory môžu byť po desenzitizácii recyklované späť na plazmatickú membránu (resenzitizácia) alebo úplne degradované v lyzozómoch (downregulácia). Resenzitizácia je funkčne oddelený proces od desenzitizácie, a môže prebiehať počas stimulácie alebo počas pokojového stavu. Ide o proces, kedy sa desenzitizovaný receptor obnovuje, aby bol pripravený odpovedať na ďalšie biologické stimuly a sprostredkovávať signálne dráhy (Wachsman et al., 1997). Po 10D, kde sa takisto znižovala veľkosť infarktu (Marvanová, nepublikované dáta), sme pozorovali nárast β2-AR aj β3-AR v hrubej membránovej frakcii, avšak nepotvrdili sme zvýšenú translokáciu na membránu. To by odpovedalo nálezom v chronickom chlade, kde boli obe zvýšené ako v CA, tak aj v CAR (Tibenská et al., 2020a). Zdá sa, že kardioprotektívne dráhy, spojené s β2-AR aj β3-AR sa začínajú aktivovať postupne, s adaptáciou na chlad a tvorbou BAT a zohrávajú v tomto procese svoju dôležitú úlohu (viac nižšie).

Záverom tejto kapitoly môžeme povedať, že vo viacerých štúdiách je akútny chlad uvádzaný ako detrimentálny, najmä v súvislosti s kardiovaskulárnym systémom (Cong et al., 2018; Kriszbacher et al., 2009; Ryti et al., 2017). Súčasne, celosvetovo je zaznamenaný vyšší výskyt úmrtí v súvislosti s kardiovaskulárnymi choreniami práve počas zimného obdobia (Fares, 2013; Liu et al., 2015). V našom modeli miernej krátkodobej chladovej expozície po dobu 3D a 10D sme nepozorovali žiadne negatívne dôsledky, ale naopak kardioprotekciu, ktorá je pravdepodobne spojená so zmenami v adrenergnej signalizácii srdca a kardioprotektívny mechanizmus sa môže medzi týmito dvoma expozíciami líšiť. Nie sú však jasné podrobnosti aktivácie jednotlivých signálnych dráh, ktoré sú v tomto procese zapojené a ako postupne v tomto procese zohrávajú svoju úlohu. Preto je nutné ich ďalej preskúmať, čomu sa budeme v našom laboratóriu naďalej venovať. Zo všetkých vyššie uvedených údajov usudzujeme, že vystavenie akútnemu chladu a jeho vplyv na srdce silne závisí na zvolenej teplote a dobe expozície.

Adrenergné signálne dráhy a chladová adaptácia

Otužovanie má pozitívne účinky na ľudský organizmus, zvyšuje odolnosť voči infekciám, podporuje aktiváciu imunitného systému a zlepšuje cievnu reaktivitu. Reakcia na chlad je sprostredkovaná β-ARs. β1- a β2-AR sú zodpovedné za zvyšovanie rýchlosti metabolizmu

u adaptovaných jedincov. U otužilcov (oblečení iba v plaveckom oblečení, za termoneutrálnych podmienok), ktorým bol podávaný intravenózne 10 min. β1- a β2-AR agonista bol preukázaný pokles adrenergnej odpovede kardiovaskulárneho systému, cez β2-AR bola znížená srdcová frekvencia (Jansky et al., 2008). Výsledky tejto dizertačnej práce ukázali, že signálna dráha β1-AR-Gs-PKA sa v CA ani CAR nemení, β2-AR a β3-AR rastú v CA a CAR a obe izoformy Gi proteínov sú exprimované v CAR.

β1-AR sa v srdci viažu výhradne na stimulačný G proteín, následne je aktivovaná AC, ktorá zvyšuje hladiny cAMP a stimuluje PKA. Katalytická podjednotka PKA následne fosforyluje cieľové proteíny zapojené do modulácie intracelulárnych hladín vápniku napr. Ca^{2+} kanál typu L, RyR2 a PLB, a tým sa skracuje relaxácia (Lohse et al., 2003). Táto aktivácia je zodpovedná za zvýšený chronotropný, inotropný a lusitropný efekt katecholamínov na srdce a je nevyhnutná pri akútnej reakcii srdca na stres (Ramirez-Correa & Murphy, 2007). Dlhodobá aktivácia tejto dráhy sa podieľa na zmenách kontraktility kardiomyocytov, spočiatku stimuláciou, potom znížením kontraktility (Feng & Anderson, 2017). Na zníženie dopadu nepriaznivých účinkov chronickej stimulácie β1-AR sa v praxi využívajú beta-blokátory, napr. metoprolol, ktorý môže zabrániť hyperaktivácii dráhy PKA a tak zoslabiť rýchlosť vyčerpávania kyslíka a energetického substrátu v postihnutých kardiomyocytoch počas ischémie (Bullock et al., 1985; Freemantle et al., 1999). V našej práci sme ukázali, že podanie selektívneho antagonistu β1-AR, metoprololu neovplyvnilo kardioprotekciu vyvolanú CA a CAR (Tibenská et al., 2020a). Toto pozorovanie môže naznačovať, že β1-AR nehrajú hlavnú úlohu v kardioprotekcii vyvolanej CA a to aj napriek tomu, že sú dôležité v procese netrasovej termogenézy (Cannon & Nedergaard, 2004).

Blokáda β-ARs propranololom preukázala dôležitosť týchto receptorov pri vývoji hypertenzie (Prichard & Gillam, 1969; Weissinger, 1984). Nezmenená signalizácia AC sprostredkovanej cez β-ARs po CA, môže byť vysvetlením absencie hypertenzie v našom kardioprotektívnom modeli (Tibenská et al., 2020a; Tibenská et al., 2020b). V štúdiách chladovej adaptácie, ktoré používajú nízke teploty 3 – 4 °C, sa často stretávame s vedľajšími účinkami ako hypertenzia a hypertrofia ľavej komory (Fregly et al., 1989; Sun et al., 1997). Pri rozvoji hypertenzie v chlade hrá pravdepodobne rolu ustajnenie zvierat a ďalšie stresové faktory. Usudzujeme, že stres vyvolaný individuálnym ustajnením pri adaptácii na chlad môže mať u potkanov nepriaznivý vplyv na kardiovaskulárny systém a vyvolať hypertenziu sprevádzanú ireverzibilnou komorovou hypertrofiou (Spruill, 2010; Sun et al., 1997).

Naša štúdia ukázala zvýšenú translokáciu β2-AR na sarkolému v CA (Tibenská et al., 2020a), avšak podanie jeho inhibítoru ICI-118551 nepotvrdilo rolu v kardioprotekcii vyvolanou

CA (Tibenská et al., 2020b). Mierne zvýšenie fosforylovaného PKA pozorované po CA v našej práci môže súvisieť s duálnou funkciou enzýmu v adrenergnej signalizácii. Okrem stimulácie AC je druhou dôležitou funkciou PKA sprostredkovaná fosforylácia β2-ARs. Touto fosforyláciou sa zoslabí afinita β2-ARs ku Gαs a zosilní sa väzba na Gi-proteíny a aktivácia s nimi spojených dráh (Daaka et al., 1997). Iné štúdie tvrdia, že fosforylácia β2-ARs je sprostredkovaná G proteín receptorovou kinázou, ktorá tiež podporuje väzbu β2-AR na Gi (Liu et al., 2009; Wang et al., 2008). Woo et al. naznačujú, že okrem fosforylácie hrá rozhodujúcu úlohu pri selektivite väzby β2-AR na G proteín aj vnútorná štrukturálna vlastnosť a špecifické interakcie medzi ligandom a zvyškom Tyr-308 β2-AR (Woo et al., 2009, 2014). Pozorované zvýšenie expresie a asociácie β2-AR so sarkolémou po CA môže naznačovať aktiváciu dráh súvisiacich s β2-AR-Gi spojených s prežitím buniek a anti-apoptotickými účinkami na kardiomyocyty (Chesley et al., 2000). S tým súvisia aj výsledky apoptotických markerov v miernom chronickom chlade, ktoré vo svojej diplomovej práci skúmala Pospíšilová. V jej práci sa kaspáza 3 nemenila, kaspáza 8 v CA klesala a ďalší pro-apoptotický faktor ASK1 klesal v CAR. Zníženie alebo nezmenená expresia génov aktivovaných oxidatívnym stresom potvrdzuje zníženú aktivitu ROS a tým ukazuje pozitívny vplyv chladovej adaptácie a následnej regresie. Ďalej bol stanovený aj pomer Bax/Bcl2, ktorý je všeobecne uznávaným ukazovateľom spúšťania apoptózy. Tento pomer klesal v CA aj CAR, čo naznačuje zníženie pravdepodobnosti apoptózy po CA a CAR (Pospíšilová, 2017).

Všeobecne je väzba β2-AR-Gi považovaná za kardioprotektívnu, aktiváciou anti-apoptotických dráh (Zhu et al., 2001) a aj jej dlhodobá aktivácia je dobre tolerovaná. Ukázalo sa, že u transgénnych myší β2-AR a väzba na Gαi2 hrá podstatnú úlohu v chronickej signalizácii a zlepšuje prežívanie buniek a zmierňuje rozvinutie srdcovej patológie. Naproti tomu väzba β2-AR na Gαi3 znižuje aktivitu Ca^{2+} kanálu. Zdá sa, že kardioprotektívny mechanizmus dlhodobého cvičenia je sprostredkovaný najmä β3-AR (Calvert et al., 2011). Avšak Zhang et al. pozorovali v modeli dlhodobo cvičiacich potkanov (postupné zvyšovanie intenzity plávania od 30 do 180 min./denne, 8 týždňov) zvýšenú expresiu a fosforyláciu Akt a rovnako aj GSK-3β. Je známe, že PI3K-Akt je v srdci regulovaná β2-AR-Gi signálnou kaskádou. A podávanie špecifického PI3K inhibítoru v tomto modeli úplne zrušilo kardioprotektívne účinky adaptácie na cvičenie (Zhang et al., 2007). Aj keď transgénna nadmerná expresia β2-AR spočiatku zvyšuje kontraktilitu, u týchto myší sa časom vyvinula kardiomyopatia, pričom jej závažnosť súvisí s množstvom β2-AR. Nadmerná expresia β1-AR a β2-AR je teda schopná vyvolať toxické účinky na srdce, aj keď β1-AR na oveľa nižšej úrovni expresie (5-násobne zvýšenie

expresie), v porovnaní s β2-AR (100-násobne zvýšenie expresie) (Engelhardt et al., 1999; Liggett et al., 2000). Toto sú však trvalé aktivácie, ktoré sú detrimentálne.

Naproti tomu fyziologické aktivácie, ktoré majú prechodný charakter majú protektívne účinky. Aktivácia a spojenie β2-AR s Gi stimuluje signálnu dráhu skrz PI3K a následne Akt. Naše výsledky ukazujú silnú aktiváciu tejto dráhy v CAR, ale nie však v CA (Tibenská et al., 2020b). Jednak na úrovni expresie podtypov Gi proteínu – Gαi1/2 a Gαi3. A na úrovni fosforylovaného Akt, fosforylácia na Ser473 sa považuje za rozhodujúci krok v jej aktivácii, pretože stabilizuje kinázovú doménu v jej aktívnej konformácii (Hanada et al., 2004). Okrem iných pro-survival účinkov aktivácia expresie Akt chráni bunky pred oxidačným stresom a apoptózou inhibíciou otvárania mPTP, čo prispieva ku kardioprotektívnemu účinku vyvolanému CAR voči vápnikovému preťaženiu (Hanada et al., 2004). Vo výskume na izolovaných kardiomyocytoch vystavených hypoxii/reoxygenácii bolo preukázané, že selektívna stimulácia β3-AR je spojená so zvýšením fosforylácie Akt a tvorbou NO. V kardiomyocytoch sa aktivuje Akt-eNOS-NO dráha, ktorá spomaľuje otváranie mPTP a tým zlepšuje životaschopnosť buniek. Aktivácia srdcového β3-AR vyvoláva ochranu inhibíciou mPTP signálnou dráhou závislou od Akt-NOS-NO-cGMP-PKG (García-Prieto et al., 2014).

Signalizácia PI3K-Akt negatívne reguluje GSK-3β, a tak sa môže podieľať na kardioprotekcii spojenej s mitochondriami vyvolanom prevenciou otvorenia mPTP (Juhaszova et al., 2009; Nishihara et al., 2007; Shah et al., 2014; Sharma et al., 2018). V našej štúdii sme publikovali, že expresia, fosforylácia a lokalizácia GSK-3β v mitochondriálnom kompartmente neboli ovplyvnené ani CA, ani CAR (Tibenská et al., 2020b). Toto zistenie môže vylúčiť GSK-3β ako cieľ Akt v kardioprotektívnom mechanizme vyvolanom CA. Ďalej sme ukázali, že CA aj CAR vedú k zvýšenej mitochondriálnej rezistencii na vápnikové preťaženie (Tibenska et al., 2020a). Zdá sa, že mechanizmus vedúci k ochrane mitochondrií po CAR sa líši od mechanizmu, ktorý sa uplatňuje v CA. V CAR výsledky naznačujú zapojenie β2-AR-Gi-Akt a na mieru prípadného zapojenia dráhy β3-AR-Akt-NOS-NO-cGMP-PKG je nutné ďalšie skúmanie. Zdá sa však, že zapojenie dráhy cez β3-AR zohráva úlohu najmä v CA.

V srdci súvisí s aktiváciou β2-AR aj aktivácia tzv. stresových kináz. ERK1/2 a p38 kinázy prenášajú signály do jadra v reakcii na bunkové stresy, ako sú zápalové cytokíny (IL-1β a TNF-α), ischémia, tepelný šok a genotoxický stres (Force et al., 1996). V srdci potkana sme v CA pozorovali nárast na úrovni fosforylovaného p38α a rovnako aj pomeru p-p38α/p38α, nie však v CAR (nepublikované výsledky). Mnoho štúdií spája aktivitu p38 v srdci s reakciou na ischemicko-reperfúzne poškodenie a sledovalo zvýšenie p38 v zlyhávajúcom srdci (Kaiser et al., 2004; Kumphune et al., 2010; Sy et al., 2008). Niektoré štúdie však ukazujú, že signalizácia

p38 v myokarde je prospešná (Maulik et al., 1998; Tenhunen, Soini, et al., 2006; Weinbrenner et al., 1997). Pravdepodobne však pri aktivácii p38 fungujú alternatívne cesty, ktoré vytvárajú práve tieto odlišné účinky (Lochner et al., 2003). V niektorých publikáciách je diskutovaná možná úloha p38 v srdci v regulácii expresie UCP2, ktorá je sprostredkovaná faktorom CREB (Selimovic et al., 2008; Tenhunen, Rysä, et al., 2006). UCP2 je jedným z hlavných antioxidačných proteínov v mitochondriách a jeho expresia spomaľuje produkciu ROS a pomáha udržiavať ich hladinu (Fink et al., 2005). UCP2 ďalej v kardiomyocytoch pôsobí anti-apoptoticky (Turner et al., 2010) a zvyšuje odolnosť myokardu voči ischémii (McLeod et al., 2005). Signálna dráha p38-CREB-UCP2 v srdci ale vyžaduje ďalšie analýzy. Cao et al. vo svojej štúdii ukazujú, že na bunkovej úrovni je p38 v BAT základným regulátorom signálnej kaskády expresie UCP1 sprostredkovanej β-ARs. p38 reguluje transkripciu génu UCP1 prostredníctvom koordinovanej aktivácie nukleárnych faktorov. Aktivácia UCP1 regulovaná cAMP vyžaduje fosforyláciu p38 (Cao et al., 2004). p38 ďalej v BAT fosforyluje PGC1α a zvyšuje aj jeho celkovú expresiu. PGC1α je spojovaný s procesom netrasovej trermogénezy a je silne indukovaný chladom (Lin et al., 2005).

V reakcii na stres je p38 kináza aktivovaná prostredníctvom malého GTP viažuceho proteínu MAK kinázy, MEKK1 a MKK3, MKK4 a MKK6. p38 kináza aktivuje mitogénom aktivovanú proteínkinázu aktivovanú proteínkinázou-2, ktorá fosforyluje malé heat shock proteíny Hsp25/Hsp27 (Nagarkatti & Sha'afi, 1998). V našom modeli miernej chladovej adaptácie sme sledovali zvýšenú expresiu p-p38α, naše ďalšie nepublikované výsledky ukazujú rovnako zvýšenú expresiu celkového Hsp27 v CA. Nadexpresia Hsp27 v kardiomyocytoch dospelých potkanov preukázala ochranu buniek pred ischemickým poškodením (Martin et al., 1997). Ukázalo sa, že odolnosť proti tepelnému a oxidačnému stresu je spojené so zvýšením fosforylovanej formy Hsp27 a nie nefosforylovanej formy (Landry et al., 1991). Preto je nutné v budúcnosti stanoviť aj fosforylovanú formu Hsp27 v CA aj CAR.

Dôležitým našim nálezom je zvýšená aktivácia PKCα vplyvom chladu. PKCα je v myocytoch základným regulátorom srdcovej kontraktility. To bolo dokázané aj na pokuse s myšami deficitnými na PKCα, ktoré boli hyperkontraktilné, zatiaľ čo myši s nadexpresiou PKCα hypokontraktilné (Braz et al., 2004). Medzi proteíny, ktoré fosforyluje patrí SERCA2, GRK2 a cTnI, teda proteíny spojené s moduláciou srdcovej kontraktility (Liu & Molkentin, 2011). V našom modeli miernej chladovej adaptácie sme pozorovali nárast p-PKCα a pomeru p-PKCα/PKCα. Podobne aj Mičová et al. sledovali v modeli kardioprotektívnej hypoxie zvýšenie celkovej aj fosforylovanej PKCα (Micova et al., 2016). PKCα nebola v súvislosti s chladom v srdci študovaná, existujú dôkazy, že aspoň čiastočne prispieva k fosforylácii

TRPM8, receptora ktorý sa aktivuje chladom (<28 °C) a látkami ako mentol (aktívna zložka mäty piepornej), icilín a eukalyptol, ktoré vyvolávajú pocit chladu (Peier et al., 2002). Táto fosforylácia bola študovaná v súvislosti so signalizáciou bolesti v neurónoch a mechanizmus, ktorým aktivácia PKC vedie k inhibícii TRPM8, nie je úplne objasnený (Liu & Qin, 2005).

Kinázy ERK1/2 a p38 fosforylujú cPLA2α, ktorá spolu so zvýšením intracelulárneho vápnika zabezpečí jej úplnú aktiváciu a riadi tak translokáciu cPLA2α z cytozolu na membrány. Celková cPLA2α klesala v CA a pomer p-cPLA2α/cPLA2α narástol v CAR. Podobne ako v podmienkach hypoxie, kde expresia p-cPLA2α rástla oproti normoxickej skupine (Micova et al., 2016). cPLA2α uvoľňuje arachidonát z membránových fosfolipidov a vzniká tak voľná kyselina arachidonová. Biologický význam AA spočíva v tom, že je sama signálnou molekulou, ale je tiež prekurzorom eikosanoidov, ktoré vznikajú troma rôznymi enzýmami, medzi ktoré patrí aj cyklooxygenáza (Stenson & Parker, 1979). V srdci sa COX vyskytuje v dvoch izoformách, COX-1 a COX-2. Tie sa líšia funkciou, lokalizáciou v bunke a štrukturálne v aktívnom mieste enzýmu. Zatiaľ čo COX-1 je exprimovaná v srdci za účelom udržiavania homeostázy, COX-2 môže slúžiť ako mediátor zápalových odpovedí, keďže jej zvýšená aktivita bola pozorovaná v súvislosti s patologickými stavmi (Patrono, 2016; Zidar et al., 2009). Naše predbežné výsledky (nepublikované dáta) ukazujú, že COX-1 sa nemení v CA ani CAR, ale COX-2 rastie významne v CAR, čo nadväzuje na výsledky cPLA2α. Rovnaké výsledky boli pozorované v srdci u potkanov vystavených hypoxickým podmienkam, u ktorých bola pozorovaná nezmenená COX-1 a nárast COX-2 (Micova et al., 2016). Madsen et al. sledovali COX-1 aj COX-2 v BAT aj WAT u myší po vystavení krátkodobému chladu (4 – 6 °C, 1 až 6 dní) a pozorovali zvýšenú expresiu oboch izoforiem. Ďalej sledovali expresiu UCP1 v BAT a WAT po podaní špecifického inhibítora COX a umiestnení myší do 4 °C. Táto inhibícia iba mierne zoslabila chladom podmienenú expresiu UCP1 v BAT, ale takmer úplne zabránila expresii UCP1 vo WAT (Madsen et al., 2010).

Z našich výsledkov je jasné, že zapojenie β2-AR v procese chladovej adaptácie zohráva dôležitú úlohu, pravdepodobne sú však jednotlivé proteíny aktivované rozdielne v CA a CAR. Ďalej je zrejmé, že kardioprotektívny účinok CA a CAR nebude sprostredkovaný iba β2-AR signálnou dráhou, aj keď je veľmi zaujímavá svojím zapojením.

Úloha β3-AR v kardioprotekcii vyvolanej chladom nie je zanedbateľná (Tibenská et al., 2020a). β3-AR je minoritným receptorom v srdci, jeho rola je často opomínaná, avšak jeho zmeny sa spájajú s mnohými adaptačnými mechanizmami (pre prehľad Salie et al., 2019). V srdci bol β3-AR skúmaný len minimálne, bol objavený v hnedých adipocytoch a hrá dôležitú úlohu v procese chladovej adaptácie. V hnedom tukovom tkanive reguluje spolu s β1-AR

katecholamínmi indukovanú expresiu UCP v mitochondriách, ktorý rozpriahne oxidačný reťazec od produkcie ATP a protónový gradient je využitý pre tvorbu tepla (Cypess et al., 2015). Jednou z oblastí záujmu spojenou s β3-AR viac ako dve desaťročia je stimulácia energetického výdaja BAT a spotreby živín prostredníctvom aktivácie β3-AR (Virtanen et al., 2009). β3-AR a BAT boli skúmané aj v súvislosti s obezitou a ich aktivácia vedie k zlepšeniu glukózovej tolerancie a uvoľňovaniu adipokínov, ktoré priaznivo regulujú metabolizmus (Bartelt et al., 2010). Ukázalo sa, že selektívna farmakologická aktivácia β3-AR má výrazný vplyv na morfológiu a metabolizmus tukového tkaniva. Dlhodobé liečenie obéznych hlodavcov agonistami β3-AR redukuje tukové zásoby a zlepšuje inzulínovú rezistenciu vyvolanú obezitou, ako aj uľahčuje tvorbu hnedých adipocytov z WAT („hnednutie adipocytov“) (Himms-Hagen et al., 1994).

β3-AR chýbajú fosforylačné miesta a sú tak rezistentné na PKA-sprostredkovanú fosforyláciu (Kayki Mutlu et al., 2018) a preto u β3-AR obvykle neprebieha krátkodobá desenzitizácia. My sme sledovali nárast v CA aj CAR jednak na úrovni expresie, ale aj kolokalizácie so sarkolémou (Tibenská et al., 2020a). Dlhodobá stimulácia receptoru s β3-AR agonistami viedla k zníženiu signalizácie závislej na cAMP. Zároveň bola pozorovaná aj znížená aktivita AC a čiastočne aj znížená expresia Gs (Michel-Reher & Michel, 2013), v našom modeli sme sledovali nezmenenú aktivitu týchto proteínov. V tukovom tkanive je β3-AR spriahnutý s Gs, v srdci prevažne s Gi. β3-AR je jedinečný v tom, že sa môže vzájomne spriahnuť ako s Gs, tak aj s Gi bez fosforylácie. Na rozdiel od β2-AR, ktoré sa primárne spájajú s Gs a až fosforylácia a zmena konformácie umožní spojenie s Gi (Liggett et al., 1993). β3-AR sa aktivuje pri vysokých koncentráciách katecholamínov a vyvoláva negatívny inotropný účinok, ktorý antagonizuje aktivitu β1- a β2-AR a táto aktivácia slúži ako „brzda“ pri nadmernej stimulácii sympatiku (Niu et al., 2013). Signalizácia β3-AR cez Gi hrá dôležitú úlohu pri zoslabení hypertrofickej remodelácie inhibovaním vápnikového preťaženia (Hammond & Balligand, 2012). Myši s nadmernou expresiou β3-AR špecifickou pre kardiomyocyty mali zníženú hypertrofiu ľavej komory v porovnaní s myšami WT v reakcii na chronické podávanie izoprenalínu (Belge et al., 2007). Z tohto hľadiska je β3-AR pravdepodobne kompenzačným mechanizmom pri srdcovom zlyhaní, ktorého cieľom je znížiť dopady vyvolané predĺženou sympatickou aktivitou (Moens et al., 2010). To je v súlade s našimi výsledkami, v našom modeli miernej chladovej adaptácie sme nesledovali hypertrofiu myokardu u potkanov v CA ani v CAR (Tibenská et al., 2020a; Tibenská et al., 2020b).

Funkčná expresia β3-AR v ľudskom myokarde sa demonštrovala aplikáciou selektívneho agonistu BRL 37344 (Gauthier et al., 1998). Následne je aktivovaný Gi proteín

a skrze NOS a jej izoformy (eNOS a nNOS) stimuluje tvorbu NO a zvýši sa intracelulárna hladina cGMP. U myší s knockoutom eNOS sa vyvinula systémová a pľúcna hypertenzia a spolu so zvyšujúcim sa vekom myší sa vyvinula aj srdcová hypertrofia (Yang et al., 1999). V modeli ischémie/reperfúzie mali myši s deficitom eNOS zväčšenú veľkosť oblasti infarktu (Scherrer-Crosbie et al., 2001). Aktivácia eNOS je všeobecne modulovaná translokáciou alebo fosforyláciou. Avšak Niu et al. nepozorovali zmenu expresie proteínov eNOS a iNOS po podaní špecifického agonistu BRL 37344. A zároveň pozorovali pokles fosforylácie eNOS, čo naznačuje deaktiváciu eNOS, nie jeho stimuláciu cez β3-AR (Niu et al., 2013). Podobné výsledky sa sledovali u izolovaného zlyhávajúceho myokardu (Napp et al., 2009). Toto možno vysvetliť sprievodnou aktiváciou nNOS v kardiomyocytoch. Delécia génu nNOS bola spojená s vážnejšou remodeláciou ľavej komory a funkčným zhoršením infarktu myokardu u myší, čo naznačuje, že nNOS môže byť tiež zapojený do ochrannej odpovede myokardu (Dawson et al., 2005; Saraiva et al., 2005). Obe formy je preto nutné stanoviť v experimentálnych skupinách miernej chladovej adaptácie. Tieto analýzy momentálne prebiehajú v našom laboratóriu.

Stimulácia β3-AR môže aktivovať SERCA prostredníctvom PKG-závislej fosforylácie fosfolambanu (Abdallah et al., 2005). Ukázalo sa, že β3-/- myši majú zvýšenú expresiu SERCA2a a v kombinácii so zvýšenou fosforyláciou PLB to vedie k zvýšenej aktivite SERCA2a (Ziskoven et al., 2007). Znížená aktivita SERCA2a môže korelovať s vyššou odolnosťou pri nedostatočnom prívode kyslíka (Wagner et al., 1998). V modeli nadmernej expresie β2-AR, zvýšená aktivita SERCA2a môže byť zodpovedná za zvýšenie spotreby energie a ischemické poškodenie (Cross et al., 1999). Aktivácia SERCA prostredníctvom PKG znižuje osciláciu Ca^{2+} a môže tak brániť srdce pred vápnikovým preťažením (Abdallah et al., 2005). Celková PKG rastie v CAR, avšak momentálne nie je k dispozícii fosforylovaná protilátka proti p-PKG, preto nemôžeme dostatočne definovať zapojenie PKG v procese CA a CAR. Na základe týchto údajov predpokladáme, že kardioprotekcia vyvolaná CA môže byť aspoň čiastočne založená na signalizácii β2/β3-AR. Napriek tomu je kontrola aktivity β3-AR v srdci zložitá a regulácia týchto receptorov v súvislosti s postupnou CA si vyžaduje ďalšie dôkladné preskúmanie.

β3-AR sa javí ako sľubný terapeutický cieľ a je potrebné ďalej preskúmať β3-AR-NO signalizáciu v procese CA. Bola opísaná stimulácia β3-AR za rôznych podmienok na produkciu NO prostredníctvom všetkých troch identifikovaných NOS izoforiem a ukázalo sa, že je nevyhnutná pri prevencii vyvolaného tlakovým preťažením (Moens et al., 2010). Celkovo má táto dráha potenciál stať sa dôležitým terapeutickým cieľom pri liečbe srdcového zlyhania a iných porúch súvisiacich s oxidačným stresom.

Tyroidný systém v chlade

V procese chladovej adaptácie je v nadväznosti na adrenergný systém aktivovaný tyroidný systém. Stimulácia β-ARs aktivuje DIO2 a tým zvyšuje aktivitu trijódtyronínu, čím sa oba tieto systémy prepájajú (Carvalho-bianco & Larsen, 2004). Boli sledované hladiny tyroidných hormónov po chladovej adaptácii, kedy viacerí autori mierne potvrdili zvýšenie T3 aj T4 (Kühn et al., 1983; Reed et al., 1994). Fregly et al. pozorovali u potkanov zvýšenie iba T3 v sére, čo ale môže byť spôsobené zvýšenou premenou T4 na T3 (Fregly et al., 1994). Zvýšená premena bola potvrdená aj u králikov adaptovaných na chlad (Mustafa & Elgazzar, 2014). V našom modeli miernej chladovej adaptácie skúmala hladinu tyroidných hormónov vo svojej diplomovej práci Marvanová (Marvanova, 2015), ktorá rovnako sledovala zvýšenie hladiny T3 v sére v CA skupine.

Pôsobenie tyroidných hormónov v procese chladovej adaptácie skúmali aj Bianco et al., myši, ktorým bola operatívne odstránená štítna žľaza boli vystavené teplote 4 °C. Tieto zvieratá netolerovali chlad, mali nefunkčný BAT a tým aj netrasovú termogenézu a podliehali hypotermii (Bianco & Silva, 1987). Viaceré ďalšie štúdie dospeli k záveru, že tyroidné hormóny sú dôležité pre aktiváciu a formovanie BAT a netrasovú termogenézu a BAT je dôležitým zdrojom T3 (pre prehľad Bianco & McAninch, 2013).

Pôsobenie tyroidných hormónov je realizované cez jadrové receptory THRα a THRβ. V našom modeli miernej chladovej adaptácie sme sledovali expresiu THRα1 s tendenciou k nárastu v oboch experimentálnych skupinách CA a CAR. Ďalej sme sledovali ich kolokalizáciu s jadrami, použitím DAPI značenia. Nepozorovali sme žiadne zmeny (výsledky nie sú publikované v tejto dizertačnej práci), avšak ich množstvo na sarkoléme sa signifikantne zvýšilo u oboch režimov. THRα1 je v srdci exprimovaný vo väčšom množstve, ovplyvňuje komorovú repolarizáciu a tým znižuje srdcovú frekvenciu. THRα1 reguluje v srdci ťažký reťazec myozínu α (αMHC), ktorý má vyššiu aktivitu ATPázy. U hlodavcov je transkripcia αMHC aktivovaná T3 a hypotyreóza je spojená s jeho downreguláciou (Franklyn et al., 1989). V hypotyreóze boli na zvieracom modeli pozorované znížené hladiny a aktivity SERCA2 a RyR, naopak aktivita PLB bola zvýšená (Belakavadi et al., 2010). Tieto môžu súvisieť so znížením rýchlosti diastolickej relaxácie. β1-AR a THRα receptory sú pozitívne a negatívne regulované T3, čo podporuje inotropné a chronotropné účinky tyroidných hormónov na srdce (Ojamaa et al., 2000).

Obe izoformy THRs sú prítomné v tukovom tkanive, ale THRα1 je hojnejšia. V primárnej kultúre hnedých adipocytov potkana, expozícia T3 zvýšila THRβ1 a znížila THRα1 (Hernández & Obregón, 1996). Mutácia THRα spôsobuje zvýšenú aktivitu BAT u myší

(Warner et al., 2013). Myši s heterozygotnou mutáciou THRα1 vykazovali zvýšenú termogenézu v dôsledku stimulácie sympatického hnedého tuku, no ich telesná teplota nebola zvýšená. Marrif et al. skúmali myši s deléciou génu *T3Rα*, ktorý kóduje THRα. Myšiam s touto deléciou sa po krátkodobom vystavení chladu znižovala teplota výraznejšie a po akútnom vystavení chladu (6 °C, 16 hodín), narástla hladina UCP1 v BAT a zvýšila sa aktivita DIO2. Po podaní infúzie noradrenalínu sa ich telesná teplota zvýšila výrazne menej oproti kontrolám. To naznačuje, že *T3Rα* poskytuje normálnu adrenergnú odpoveď hnedých adipocytov (Marrif et al., 2005).

V chronickom modeli mierneho chladu sme zistili, že tyroidný receptor β (THRβ1) bol na úrovni expresie proteínu zvýšený v ľavej komore srdca po CAR. Rovnako sme sledovali kolokalizáciu s jadrami, nepozorovali sme žiadne zmeny (výsledky nie sú publikované v tejto dizertačnej práci). Na úrovni kolokalizácie s membránou bol zvýšený v CA (nepublikované výsledky). THRβ1 je v srdci exprimovaný len v menšom množstve a jeho aktivácia zvyšuje srdcovú frekvenciu. THRβ1 v srdci reguluje ťažký reťazec myozínu β (βMHC), ktorého transkripcia je u hlodavcov redukovaná cez T3. V modeli hypotyreózy bola expresia aj transkripcia βMHC zvýšená (Franklyn et al., 1989). Ďalej bola pozorovaná downregulácia SERCA2, ktorá sa takisto zdá byť čiastočne pod kontrolou THRβ1. Downregulácia αMHC pri súčasnej upregulácii βMHC spolu s downreguláciou SERCA2 do istej miery vysvetľuje zníženú srdcovú kontraktilitu spojenú s hypotyreózou (Kinugawa et al., 2001).

V BAT THRβ napomáha aktivácii adrenergnej stimulácie a expresie UCP1 v BAT (de Mena et al., 2010). To autori dokázali podávaním agonistu THRβ (GC-1), ktorý u hypotyroidných myší obnovil normálne množstvo a funkciu UCP1. V izolovaných ľudských adipocytoch indukovala 3 – 10 denná liečba T3 expresiu UCP1, ktorá bola závislá od prítomnosti THRβ (Lee et al., 2012). Zdá sa teda, že izoforma THRα1 je nevyhnutná na udržanie normálnej adrenergnej odozvy BAT a telesnej teploty, zatiaľ čo THRβ1 sprostredkuje expresiu génu UCP1 indukovanú T3 (Trost et al., 2000).

7 ZÁVER

Vplyv chladu na srdce a najmä na aktiváciu signálnych dráh nie je úplne známy a prekvapivo na molekulárnej úrovni ani študovaný. Táto dizertačná práca je v tomto smere jedna z prvých svojho druhu, ktorá skúma zapojenie adrenergného a tyroidného systému v kardioprotekcii vyvolanej miernym chladom.

Po 3 dňoch chladovej expozície 8 °C došlo k nárastu troch izoforiem inhibičných podjednotiek G-proteínu (Gαi 1-3), zatiaľ čo po desiatich dňoch, ani po 5-týždňoch, sa ich hladina už nemení. Je zaujímavé, že po návrate do normotermných podmienok Gαi znovu významne narastajú. Podjednotka α stimulačného G proteínu nebola zmenená ani v ranných, ani v chronických fázach adaptácie. To naznačuje rozdielne zapojenie adrenergných dráh v kardioprotektívnom režime samotnej adaptácie a následného zotavenia. Túto hypotézu sme potvrdili na úrovni β2-AR-Akt signálnej dráhy, ktorá je pravdepodobne kľúčová v kardioprotektívnom mechanizme pretrvávajúcom po chladovej adaptácii, nie však behom adaptácie. Aktivácia Akt chráni bunky pred oxidačným stresom, inhibuje apoptózu a znižuje šancu otvárania mPTP, ktorá bola v našej publikácii priamo potvrdená. Pretrvávajúci kardioprotektívny účinok chladu je tiež sprevádzaný zvýšením cPLA2α, ktorej aktivácia súvisí so znížením β1-AR a zvýšenou väzbou β2-AR na Gi proteín. V samotnom chlade bola aktivovaná p38 kináza, ktorý môže fosforylovať Hsp27. Jeho aktivácia chráni bunku pred tepelným a oxidačným stresom.

Na viacerých úrovniach sme nepozorovali zmeny v aktivácii β1-AR signálnej dráhy vo všetkých sledovaných režimoch začínajúcim 3 dennou adaptáciou. Jej dlhodobá aktivácia vedie k hypertrofii, a má pro-apoptotické účinky. To je v súlade s našimi nálezmi, kedy sme nepozorovali rozvoj hypertrofie u žiadneho modelu. Môžeme teda povedať, že kardioprotekcia v tomto modeli nesúvisí s β1-AR, aj keď v procese chladovej adaptácie hrajú významnú úlohu na iných úrovniach.

V procese chladovej adaptácie veľmi pravdepodobne zohrávajú dôležitú úlohu β3-AR. Pozorovali sme ich zapojenie na úrovni β3-AR-PKG v oboch protektívnych režimoch. Presné zapojenie dráhy však nie je v tejto dizertačnej práci publikované a vyžaduje ďalšie skúmanie.

Tyroidné hormóny termogenézu priamo modulujú zmenou funkčnosti a rýchlosti transkripcie UCP. V srdci tyroidné hormóny účinkujú cez jadrové receptory THRα a THRβ receptor. V srdci potkana je T3 viazaný na THRα1 a THRβ1. THRα1 sa v oboch experimentálnych skupinách nemenil, THRβ1 sa zvýšil v CAR. Zdá sa, že THRα1 je

nevyhnutná na udržanie normálnej adrenergnej odozvy a telesnej teploty, zatiaľ čo THRβ1 sprostredkuje expresiu génu UCP1 indukovanú T3.

Záverom môžeme zhrnúť, že adrenergná signalizácia hrá rolu v kardioprotektívnom režime chladovej adaptácie, pravdepodobne cez signálne dráhy spojené G-inhibičnou podjednotkou. Kľúčom k hlbšiemu porozumeniu molekulárnej príčiny kardioprotektívneho mechanizmu môže byť v budúcnosti špecifická blokácia jednotlivých signálnych dráh. Hľadanie vhodného modelu pre klinické využitie je ďalšou dôležitou úlohou tohoto pracoviska.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Abdallah, Y., Gkatzoflia, A., Pieper, H., Zoga, E., Walther, S., Kasseckert, S., Schäfer, M., Schlüter, K. D., Piper, H. M., Schäfer, C., & Institute. (2005). Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, *66*(1), 123–131. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.007

AHLQUIST, R. P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *The American Journal of Physiology*, *153*(3), 586–600. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586

Ait-Mamar, B., Cailleret, M., Rucker-Martin, C., Bouabdallah, A., Candiani, G., Adamy, C., Duvaldestin, P., Pecker, F., Defer, N., & Pavoine, C. (2005). The cytosolic phospholipase A2 pathway, a safeguard of beta2-adrenergic cardiac effects in rat. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(19), 18881–18890. https://doi.org/10.1074/jbc.M410305200

Akita, Y., Otani, H., Matsuhisa, S., Kyoi, S., Enoki, C., Hattori, R., Imamura, H., Kamihata, H., Kimura, Y., & Iwasaka, T. (2007). Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *292*(5), H2051-9. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01102.2006

Allan, L. A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., & Clarke, P. R. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature Cell Biology*, *5*(7), 647–654. https://doi.org/10.1038/ncb1005

Arai, M., Otsu, K., MacLennan, D. H., Alpert, N. R., & Periasamy, M. (1991). Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circulation Research*, *69*(2), 266–276. https://doi.org/10.1161/01.res.69.2.266

Atgié, C., D'Allaire, F., & Bukowiecki, L. J. (1997). Role of beta1- and beta3-adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *The American Journal of Physiology*, *273*(4), 1136-42. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1136

Avakian, E. V, Horvath, S. M., & Colburn, R. W. (1984). Influence of age and cold stress on plasma catecholamine levels in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, *10*(2), 127–133. https://doi.org/10.1016/0165-1838(84)90051-1

Bachman, E. S., Dhillon, H., Zhang, C.-Y., Cinti, S., Bianco, A. C., Kobilka, B. K., & Lowell, B. B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5582), 843–845. https://doi.org/10.1126/science.1073160

Badorff, C., Seeger, F. H., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2005). Glycogen synthase kinase 3β inhibits myocardin-dependent transcription and hypertrophy induction through site-specific phosphorylation. *Circulation Research*, *97*(7), 645–654. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000184684.88750.FE

Bahouth, S. W. (1991). Thyroid hormones transcriptionally regulate the beta 1-adrenergic receptor gene in cultured ventricular myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(24), 15863–15869.

Bahouth, S. W., Cui, X., Beauchamp, M. J., & Park, E. A. (1997). Thyroid hormone induces beta1-adrenergic receptor gene transcription through a direct repeat separated by five nucleotides. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *29*(12), 3223–3237. https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0549

Balligand, J. L. (2016). Cardiac salvage by tweaking with beta-3-adrenergic receptors. *Cardiovascular Research*, *111*(2), 128–133. https://doi.org/10.1093/cvr/cvw056

Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R., & Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *298*(6), E1244-53. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00600.2009

Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmüller, A., Gordts, P. L. S. M., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., & Heeren, J. (2010). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine*, *17*(2), 200–205. https://doi.org/10.1038/nm.2297

Baskin, A. S., Linderman, J. D., Brychta, R. J., Mcgehee, S., An, E., Cero, C., Johnson, J. W., Mara, A. E. O., Fletcher, L. A., Leitner, B. P., Duckworth, C. J., Huang, S., Cai, H., Garraffo, H. M., Millo, C. M., Dieckmann, W., Tolstikov, V., Chen, E. Y., Gao, F. Cypess, A. M. (2018). Regulation of Human Adipose Tissue Activation , Gallbladder Size , and Bile Acid Metabolism by a b 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Diabetes, 67*, 2113–2125. https://doi.org/10.2337/db18-0462

Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S.-E., & Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, *448*(7150), 204–208. https://doi.org/10.1038/nature05910

Belakavadi, M., Saunders, J., Weisleder, N., Raghava, P. S., & Fondell, J. D. (2010). Repression of cardiac phospholamban gene expression is mediated by thyroid hormone receptor-α1 and involves targeted covalent histone modifications. *Endocrinology*, *151*(6), 2946–2956. https://doi.org/10.1210/en.2009-1241

Belge, C., Sekkali, B., Tavernier, G., Pouleur, A.-C., Bertrand, L., Vanoverschelde, J.-L., Hilfiker-Kleiner, D., Langin, D., & Balligand, J.-L. (2007). Abstract 771: Cardiomyocyte-specific Overexpression Of Beta3-adrenoceptors Attenuates The Hypertrophic Response To Catecholamines In Vivo. *Circulation*, *116*(suppl_16), II_148-II_148. https://doi.org/10.1161/circ.116.suppl_16.II_148-b

Belin, R. J., Sumandea, M. P., Allen, E. J., Schoenfelt, K., Wang, H., Solaro, R. J., & de Tombe, P. P. (2007). Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circulation Research*, *101*(2), 195–204. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.148288

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

Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1986). Beta-adrenergic

receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(9), 2797–2801. https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2797

Berthiaume, J. M., Kirk, J. A., Ranek, M. J., Lyon, R. C., Sheikh, F., Jensen, B. C., Hoit, B. D., Butany, J., Tolend, M., Rao, V., & Willis, M. S. (2016). Chapter 8 - Pathophysiology of Heart Failure and an Overview of Therapies. In L. M. Buja & J. Butany (Eds.), *Cardiovascular Pathology (Fourth Edition)* (Fourth Edi, pp. 271–339). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420219-1.00008-2

Bianchi, P., Kunduzova, O., Masini, E., Cambon, C., Bani, D., Raimondi, L., Seguelas, M., Nistri, S., Colucci, W., Leducq, N., & Parini, A. (2005). Oxidative Stress by Monoamine Oxidase Mediates Receptor-Independent Cardiomyocyte Apoptosis by Serotonin and Postischemic Myocardial Injury.*Circulation 112*, 3297–3305. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.528133

Bianco, A C, & Silva, J. E. (1987). Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, *79*(1), 295–300. https://doi.org/10.1172/JCI112798

Bianco, Antonio C, & McAninch, E. A. (2013). The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homoeostasis. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, *1*(3), 250–258. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70069-X

Bilezikian, J. P., & Loeb, J. N. (1983). The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocrine Reviews*, *4*(4), 378–388. https://doi.org/10.1210/edrv-4-4-378

Biondi, B., Palmieri, E. A., Lombardi, G., & Fazio, S. (2002). Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *87*(3), 968–974. https://doi.org/10.1210/jcem.87.3.8302

Bittel, J. H. (1987). Heat debt as an index for cold adaptation in men. *Journal of Applied Physiology 62*(4), 1627–1634. https://doi.org/10.1152/jappl.1987.62.4.1627

Blondin, D. P., Nielsen, S., Kuipers, E. N., Severinsen, M. C., Jensen, V. H., Miard, S., Jespersen, N. Z., Kooijman, S., Boon, M. R., Fortin, M., Phoenix, S., Frisch, F., Guérin, B., Turcotte, É. E., Haman, F., Richard, D., Picard, F., Rensen, P. C. N., Scheele, C., & Carpentier, A. C. (2020). Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by β2-AR Stimulation. *Cell Metabolism*, *32*(2), 287-300.e7. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.005

Bochukova, E., Schoenmakers, N., Agostini, M., Schoenmakers, E., Rajanayagam, O., Keogh, J. M., Henning, E., Reinemund, J., Gevers, E., Sarri, M., Downes, K., Offiah, A., Albanese, A., Halsall, D., Schwabe, J. W. R., Bain, M., Lindley, K., Muntoni, F., Vargha-Khadem, F., Chatterjee, K. (2012). A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene. *The New England Journal of Medicine*, *366*(3), 243–249. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110296

Bond, R. A., & Clarke, D. E. (1988). Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the alpha- and beta-subtypes. *British Journal of Pharmacology*, *95*(3), 723–734. https://doi.org/10.1111/j.1476-

5381.1988.tb11698.x

Bouvier, M., Collins, S., O'Dowd, B. F., Campbell, P. T., de Blasi, A., Kobilka, B. K., MacGregor, C., Irons, G. P., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1989). Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(28), 16786–16792.

Braz, J. C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., Nairn, A. C., Liggett, S. B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E. G., DePaoli-Roach, A. A., Robbins, J., Hewett, T. E., Bibb, J. A., Westfall, M. V., Molkentin, J. D. (2004a). PKC-α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nature Medicine*, *10*(3), 248–254. https://doi.org/10.1038/nm1000

Brazaitis, M., Eimantas, N., Daniuseviciute, L., Baranauskiene, N., Skrodeniene, E., & Skurvydas, A. (2014). Time course of physiological and psychological responses in humans during a 20-day severe-cold-acclimation programme. *PloS One*, *9*(4), e94698. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094698

Brede, M., Nagy, G., Philipp, M., Sørensen, J. B., Lohse, M. J., & Hein, L. (2003). Differential Control of Adrenal and Sympathetic Catecholamine Release by α2-Adrenoceptor Subtypes. *Molecular Endocrinology*, *17*(8), 1640–1646. https://doi.org/10.1210/me.2003-0035

Brede, M., Wiesmann, F., Jahns, R., Hadamek, K., Arnolt, C., Neubauer, S., Lohse, M. J., & Hein, L. (2002). Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. *Circulation*, *106*(19), 2491–2496. https://doi.org/10.1161/01.cir.0000036600.39600.66

Brennan, P. J., Greenberg, G., Miall, W. E., & Thompson, S. G. (1982). Seasonal variation in arterial blood pressure. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, *285*(6346), 919–923. https://doi.org/10.1136/bmj.285.6346.919

Bristow, M. R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., & Jamieson, S. (1986). Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circulation Research*, *59*(3), 297–309. https://doi.org/10.1161/01.res.59.3.297

Bristow, M. R., Minobe, W. A., Raynolds, M. V, Port, J. D., Rasmussen, R., Ray, P. E., & Feldman, A. M. (1993). Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *The Journal of Clinical Investigation*, *92*(6), 2737–2745. https://doi.org/10.1172/JCI116891

Brodde, O. E., Daul, A., Michel, M. C., & Zerkowski, H. R. (1992). [Importance of beta 2-adrenergic receptors in heart failure]. *Zeitschrift fur Kardiologie*, *81 Suppl 4*, 71–78.

Brodde, O. E., & Michel, M. C. C. N.-C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews*, *41*(4), 651–689.

Brodde, O. E., Schüler, S., Kretsch, R., Brinkmann, M., Borst, H. G., Hetzer, R., Reidemeister, J. C., Warnecke, H., & Zerkowski, H. R. (1986). Regional distribution of beta-

adrenoceptors in the human heart: coexistence of functional beta 1- and beta 2-adrenoceptors in both atria and ventricles in severe congestive cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *8*(6), 1235–1242. https://doi.org/10.1097/00005344-198611000-00021

Bronnikov, G., Bengtsson, T., Kramarova, L., Golozoubova, V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (1999). β1 to β3 Switch in Control of Cyclic Adenosine Monophosphate during Brown Adipocyte Development Explains Distinct β-Adrenoceptor Subtype Mediation of Proliferation and Differentiation1. *Endocrinology*, *140*(9), 4185–4197. https://doi.org/10.1210/endo.140.9.6972

Buerkle, H., & Yaksh, T. L. (1998). Pharmacological evidence for different alpha 2-adrenergic receptor sites mediating analgesia and sedation in the rat. *British Journal of Anaesthesia*, *81*(2), 208–215. https://doi.org/10.1093/bja/81.2.208

Bullock, G. R., Leprán, I., Parratt, J. R., Szekeres, L., & Wainwright, C. L. (1985). Effects of a combination of metoprolol and dazmegrel on myocardial infarct size in rats. *British Journal of Pharmacology*, *86*(1), 235–240. https://doi.org/10.1111/j.14765381.1985.tb09454.x

Burgering, B. M., & Coffer, P. J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, *376*(6541), 599–602. https://doi.org/10.1038/376599a0

Burke, J. E., & Dennis, E. A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of Lipid Research*, *50 Suppl*, S237-42. https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200

Busiello, R. A., Savarese, S., & Lombardi, A. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in Physiology*, *6*, 36.https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00036

Bylund, D. B., & Bylund, K. C. (2014). Norepinephrine. In M. J. Aminoff & R. B. Daroff (Eds.), *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)* (Second Edi, pp. 614–616). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00047-6

Calaghan, S., & White, E. (2006). Caveolae modulate excitation-contraction coupling and beta2-adrenergic signalling in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, *69*(4), 816–824. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.10.006

Calera, M. R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A. K., Birnbaum, M. J., & Pilch, P. F. (1998). Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(13), 7201–7204. https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7201

Calvert, J. W., Condit, M. E., Aragón, J. P., Nicholson, C. K., Moody, B. F., Hood, R. L., Sindler, A. L., Gundewar, S., Seals, D. R., Barouch, L. A., & Lefer, D. J. (2011). Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of β(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., & Koch, W. J. (2017). Targeting β3-adrenergic receptors in the heart: Selective

agonism and β-blockade. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *69*(2), 71–78. https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000444

Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, *84*(1), 277–359. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003

Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V, Bai, X., Floering, L. M., Spiegelman, B. M., & Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(7), 3057–3067. https://doi.org/10.1128/mcb.24.7.3057-3067.2004

Carvalho-Bianco, S. D., & Larsen, P. R. (2004). Thyroid Hormone and Adrenergic Signaling in the Heart. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia 48*(1), 171–175.

Castellani, J. W., & Young, A. J. (2016). Human physiological responses to cold exposure: Acute responses and acclimatization to prolonged exposure. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, *196*, 63–74. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.02.009

Cesura, A. M. (2007). Monoamine Oxidases. In S. J. Enna & D. B. Bylund (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–5). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60497-0

Charkoudian, N. (2003). Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clinic Proceedings*, *78*(5), 603–612. https://doi.org/10.4065/78.5.603

Charkoudian, N. (2010). Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. *Journal of Applied Physiology*, *109*(4), 1221–1228. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00298.2010

Chassande, O, Fraichard, A., Gauthier, K., Flamant, F., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., & Samarut, J. (1997). Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *11*(9), 1278–1290. https://doi.org/10.1210/mend.11.9.9972

Chassande, Olivier, Fraichard, A., Gauthier, K., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., Samarut, J., & Lyon, D. (1997). Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities *Mol Endocrinol., 11*(9), 1278–1290.

Chesley, A., Lundberg, M. S., Asai, T., Xiao, R., Ohtani, S., Lakatta, E. G., & Crow, M. T. (2000). The beta 2 -Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic. *Circulation*, *87*, 1172–1179.

Cohn, J. N., Pfeffer, M. A., Rouleau, J., Sharpe, N., Swedberg, K., Straub, M., Wiltse, C., & Wright, T. J. (2003). Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release moxonidine in patients with heart failure (MOXCON). *European Journal of Heart Failure*, *5*(5), 659–667. https://doi.org/10.1016/s1388-9842(03)00163-6

Collins, S., Bolanowski, M. A., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1989). Genetic regulation of beta-adrenergic receptors. *Annu Rev Physiol, 51:203-15.*

doi:10.1146/annurev.ph.51.030189.001223..

Colyer, J. (1998). Phosphorylation states of phospholamban. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *853*, 79–91. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08258.x

Cong, P., Liu, Y., Liu, N., Zhang, Y., Tong, C., Shi, L., Liu, X., Shi, X., & Liu, Y. (2018). Cold exposure induced oxidative stress and apoptosis in the myocardium by inhibiting the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *BMC Cardiovasc Disord, 15;18*(1):36. doi: 10.1186/s12872-018-0748-x.1–8. https://doi.org/10.1186/s12872-018-0748-x

Costanzi, S. (2012). Homology modeling of class a G protein-coupled receptors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *857*, 259–279. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_11

Crackower, M. A., Oudit, G. Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H.-Y. M., Rybin, V. O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A. J., Benovic, J. L., Kahn, C. R., Izumo, S., … Penninger, J. M. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*, *110*(6), 737–749. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00969-8

Cros, C., & Brette, F. (2013). Functional subcellular distribution of β1- and β2-adrenergic receptors in rat ventricular cardiac myocytes. *Physiological Reports*, *1*(3), e00038. https://doi.org/10.1002/phy2.38

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, *378*(6559), 785–789. https://doi.org/10.1038/378785a0

Cross, H. R., Steenbergen, C., Lefkowitz, R. J., Koch, W. J., & Murphy, E. (1999). Overexpression of the cardiac beta(2)-adrenergic receptor and expression of a beta-adrenergic receptor kinase-1 (betaARK1) inhibitor both increase myocardial contractility but have differential effects on susceptibility to ischemic injury. *Circulation Research*, *85*(11), 1077–1084. https://doi.org/10.1161/01.res.85.11.1077

Croteau, W., Davey, J. C., Galton, V. A., & St Germain, D. L. (1996). Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *The Journal of Clinical Investigation*, *98*(2), 405–417. https://doi.org/10.1172/JCI118806

Cuevas-Ramos, D., Mehta, R., & Aguilar-Salinas, C. A. (2019). Fibroblast Growth Factor 21 and Browning of White Adipose Tissue. *Frontiers in Physiology*, *10*, 37. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00037

Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Franquet Elía, E., Kessler, S. H., Kahn, P. A., English, J., Chatman, K., Trauger, S. A., Doria, A., & Kolodny, G. M. (2015). Activation of human brown adipose tissue by a β3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metabolism*, *21*(1), 33–38. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.009

D'Allaire, F., Atgié, C., Mauriège, P., Simard, P. M., & Bukowiecki, L. J. (1995). Characterization of beta 1- and beta 3-adrenoceptors in intact brown adipocytes of the rat. *British Journal of Pharmacology*, *114*(2), 275–282. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13223.x

Daaka, Y, Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, *390*(6655), 88–91. https://doi.org/10.1038/36362

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, *91*(2), 231–241. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80405-5

Davídkovová, H., Plavcová, E., Kynčl, J., & Kyselý, J. (2014). Impacts of hot and cold spells differ for acute and chronic ischaemic heart diseases. *BMC Public Health*, *14*(1), 480. https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-480

Davies, A. O., & Lefkowitz, R. J. (1983). In vitro desensitization of beta adrenergic receptors in human neutrophils. Attenuation by corticosteroids. *The Journal of Clinical Investigation*, *71*(3), 565–571. https://doi.org/10.1172/jci110801

Dawson, D., Lygate, C. A., Zhang, M.-H., Hulbert, K., Neubauer, S., & Casadei, B. (2005). nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation*, *112*(24), 3729–3737. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.539437

de Diego, A. M. G., Gandía, L., & García, A. G. (2008). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *192*(2), 287–301. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01807.x

de Jong, J. M. A., Sun, W., Pires, N. D., Frontini, A., Balaz, M., Jespersen, N. Z., Feizi, A., Petrovic, K., Fischer, A. W., Bokhari, M. H., Niemi, T., Nuutila, P., Cinti, S., Nielsen, S., Scheele, C., Virtanen, K., Cannon, B., Nedergaard, J., Wolfrum, C., & Petrovic, N. (2019). Human brown adipose tissue is phenocopied by classical brown adipose tissue in physiologically humanized mice. *Nature Metabolism*, *1*(8), 830–843. https://doi.org/10.1038/s42255-019-0101-4

de Mena, R., Scanlan, T. S., & Obregon, M.-J. (2010). The T3 Receptor β1 Isoform Regulates UCP1 and D2 Deiodinase in Rat Brown Adipocytes. *Endocrinology*, *151*(10), 5074–5083. https://doi.org/10.1210/en.2010-0533

Degeorge, B. R., Gao, E., Boucher, M., Vinge, L. E., Martini, J. S., Raake, W., Chuprun, J. K., Harris, D. M., Kim, G. W., Soltys, S., Andrea, D., Degeorge, B. R., Gao, E., Boucher, M., & Vinge, L. E. (2008). Targeted Inhibition of Cardiomyocyte Gi Signaling Enhances Susceptibility to Apoptotic Cell Death in Response to Ischemic Stress *Circulation 117*(11):1378-87. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.752618

Deshmukh, A., Pant, S., Kumar, G., Murugiah, K., & Mehta, J. (2012). Seasonal variation in hypertensive emergency hospitalization. In *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.), 14* (4):269–270). https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2012.00597.x

Dhaliwal, A. S., Habib, G., Deswal, A., Verduzco, M., Souchek, J., Ramasubbu, K., Aguilar, D., Ma, T. S., Jneid, H. M., Bolos, M., & Bozkurt, B. (2009). Impact of alpha 1-adrenergic antagonist use for benign prostatic hypertrophy on outcomes in patients with heart failure. *The American Journal of Cardiology*, *104*(2), 270–275. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.03.030

Dillmann, W. H. (1990). Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *The American Journal of Medicine*, *88*(6), 626–630. https://doi.org/10.1016/0002-9343(90)90530-q

Dorn, G. W. 2nd, & Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(3), 527–537. https://doi.org/10.1172/JCI24178

Duncan, D., Sankar, A., Beattie, W. S., & Wijeysundera, D. N. (2018). Alpha-2 adrenergic agonists for the prevention of cardiac complications among adults undergoing surgery. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *3*(3), CD004126. https://doi.org/10.1002/14651858.CD004126.pub3

Eade, N. R., & Wood, D. R. (1958). The release of adrenaline and noradrenaline from the adrenal medulla of the cat during splanchnic stimulation. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, *13*(4), 390–394. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1958.tb00226.x

Eastman, C. J., Ekins, R. P., Leith, I. M., & Williams, E. S. (1974). Thyroid hormone response to prolonged cold exposure in man. *The Journal of Physiology*, *241*(1), 175–181. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010647

Edwards, A. V, & Jones, C. T. (1993). Autonomic control of adrenal function. *Journal of Anatomy*, *183*(1), 291–307.

Elliott, J. (1997). Alpha-adrenoceptors in equine digital veins: evidence for the presence of both alpha1 and alpha2-receptors mediating vasoconstriction. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *20*(4), 308–317. https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1997.00078.x

Emirbekov, E. Z., L'vova, S. P., & Gasangadzhieva, A. G. (1998). Effect of repeated cold stress on intensity of lipid peroxidation and tissue antioxidant system. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *125*(4), 339–341. https://doi.org/10.1007/BF02499150

Emrick, M. A., Sadilek, M., Konoki, K., & Catterall, W. A. (2010). Beta-adrenergic-regulated phosphorylation of the skeletal muscle Ca(V)1.1 channel in the fight-or-flight response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(43), 18712–18717. https://doi.org/10.1073/pnas.1012384107

Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., & Lohse, M. J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-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

Eschenhagen, T. (1993). G proteins and the heart. *Cell Biology International*, *17*(8), 723–749. https://doi.org/10.1006/cbir.1993.1135

Eschenhagen, Thomas. (2008). β-adrenergic signaling in heart failure—adapt or die. *Nature Medicine*, *14*(5), 485–487. https://doi.org/10.1038/nm0508-485

Escobar-Morreale, H. F., Obregón, M. J., Escobar del Rey, F., & Morreale de Escobar, G. (1999). Tissue-specific patterns of changes in 3,5,3'-triiodo-L-thyronine concentrations in thyroidectomized rats infused with increasing doses of the hormone. Which are the regulatory mechanisms? *Biochimie*, *81*(5), 453–462. https://doi.org/10.1016/s0300-

9084(99)80095-9

Evans-Anderson, H. J., Alfieri, C. M., & Yutzey, K. E. (2008). Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors. *Circulation Research*, *102*(6), 686–694. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.163428

Evans, B. A., Papaioannou, M., Hamilton, S., & Summers, R. J. (1999). Alternative splicing generates two isoforms of the beta3-adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *British Journal of Pharmacology*, *127*(6), 1525–1531. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702688

Everts, M. E., Verhoeven, F. A., Bezstarosti, K., Moerings, E. P., Hennemann, G., Visser, T. J., & Lamers, J. M. (1996). Uptake of thyroid hormones in neonatal rat cardiac myocytes. *Endocrinology*, *137*(10), 4235–4242. https://doi.org/10.1210/endo.137.10.8828482

Fares, A. (2013). Winter cardiovascular diseases phenomenon. *North American Journal of Medical Sciences*, *5*(4), 266–279. https://doi.org/10.4103/1947-2714.110430

Fazio, S., Palmieri, E. A., Lombardi, G., & Biondi, B. (2004). Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Progress in Hormone Research*, *59*, 31–50. https://doi.org/10.1210/rp.59.1.31

Feng, N., & Anderson, M. E. (2017). CaMKII is a nodal signal for multiple programmed cell death pathways in heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *103*, 102–109. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.12.007

Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*, *53*(1), 1–24.

Fink, B. D., Reszka, K. J., Herlein, J. A., Mathahs, M. M., & Sivitz, W. I. (2005). Respiratory uncoupling by UCP1 and UCP2 and superoxide generation in endothelial cell mitochondria. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *288*(1), E71-9. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00332.2004

Force, T., Pombo, C. M., Avruch, J. A., Bonventre, J. V., & Kyriakis, J. M. (1996). Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circulation Research*, *78*(6), 947–953. https://doi.org/10.1161/01.RES.78.6.947

Fox, A. W., Juberg, E. N., May, J. M., Johnson, R. D., Abel, P. W., & Minneman, K. P. (1985). Thyroid status and adrenergic receptor subtypes in the rat: comparison of receptor density and responsiveness. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *235*(3), 715–723.

Frank, S. M., Raja, S. N., Bulcao, C. F., & Goldstein, D. S. (1999). Relative contribution of core and cutaneous temperatures to thermal comfort and autonomic responses in humans. *Journal of Applied Physiology*, *86*(5), 1588–1593. https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.5.1588

Franklyn, J. A., Gammage, M. D., Ramsden, D. B., & Sheppard, M. C. (1984). Thyroid status in patients after acute myocardial infarction. *Clinical Science*, *67*(6), 585–590. https://doi.org/10.1042/cs0670585

Franklyn, J. A., Green, N. K., Gammage, M. D., Alhquist, J. A., & Sheppard, M. C. (1989). Regulation of alpha- and beta-myosin heavy chain messenger RNAs in the rat myocardium by amiodarone and by thyroid status. *Clinical Science*, *76*(5), 463–467. https://doi.org/10.1042/cs0760463

Freedman, N. J., & Lefkowitz, R. J. (2004). Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation *J Clin Invest 113*(10), 1379–1382. https://doi.org/10.1172/JCI200421748.it

Freemantle, N., Cleland, J., Young, P., Mason, J., & Harrison, J. (1999). β Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ*, *318*(7200), 1730–1737. https://doi.org/10.1136/bmj.318.7200.1730

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

Fregly, M. J., Rossi, F., Sun, Z., Tümer, N., Cade, J. R., Hegland, D., & Yürekli, M. (1994). Effect of chronic treatment with prazosin and L-arginine on the elevation of blood pressure during cold exposure. *Pharmacology*, *49*(6), 351–362. https://doi.org/10.1159/000139254

Fregly, M. J., Shechtman, O., van Bergen, P., Reeber, C., & Papanek, P. E. (1991). Changes in blood pressure and dipsogenic responsiveness to angiotensin II during chronic exposure of rats to cold. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *38*(4), 837–842. https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90251-v

Frost, L., Johnsen, S. P., Pedersen, L., Husted, S., Engholm, G., Sørensen, H. T., & Rothman, K. J. (2002). Seasonal variation in hospital discharge diagnosis of atrial fibrillation: a population-based study. *Epidemiology*, *13*(2), 211–215. https://doi.org/10.1097/00001648-200203000-00017

Gao, Z., Wilson, T. E., Drew, R. C., Ettinger, J., & Monahan, K. D. (2012). Altered coronary vascular control during cold stress in healthy older adults. In *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *302*(1), 312-8. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00297.2011

García-Prieto, J., García-Ruiz, J. M., Sanz-Rosa, D., Pun, A., García-Alvarez, A., Davidson, S. M., Fernández-Friera, L., Nuno-Ayala, M., Fernández-Jiménez, R., Bernal, J. A., Izquierdo-Garcia, J. L., Jimenez-Borreguero, J., Pizarro, G., Ruiz-Cabello, J., Macaya, C., Fuster, V., Yellon, D. M., & Ibanez, B. (2014). β3 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., Balligand, J. L., & Le Marec, H. (1998). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *The Journal of Clinical Investigation*, *102*(7), 1377–1384. https://doi.org/10.1172/JCI2191

Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., & Le Marec, H. (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *The Journal of Clinical Investigation*, *98*(2), 556–562. https://doi.org/10.1172/JCI118823

Gaweska, H., & Fitzpatrick, P. F. (2011). Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomolecular Concepts*, *2*(5), 365–377. https://doi.org/10.1515/BMC.2011.030

Gerdes, A. M., & Iervasi, G. (2010). Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine Thyroid Replacement Therapy and Heart Failure. *Circulation*, *122*, 385–393. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.917922

Gereben, B., Zavacki, A. M., Ribich, S., Kim, B. W., Huang, S. A., Simonides, W. S., Zeöld, A., & Bianco, A. C. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine Reviews*, *29*(7), 898–938. https://doi.org/10.1210/er.2008-0019

Gesta, S., Tseng, Y.-H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, *131*(2), 242–256. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004

Gick, G. G., Melikian, J., & Ismail-Beigi, F. (1990). Thyroidal enhancement of rat myocardial Na,K-ATPase: preferential expression of alpha 2 activity and mRNA abundance. *The Journal of Membrane Biology*, *115*(3), 273–282. https://doi.org/10.1007/BF01868642

Gnegy, M. E. (2012). Chapter 14 - Catecholamines. In S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Albers, & D. L. Price (Eds.), *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)* (Eighth Edi, pp. 283–299). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00014-6

Golozoubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2006). UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *291*(2), 350-7. doi: 10.1152/ajpendo.00387.2005.

Gomez, L., Paillard, M., Thibault, H., Derumeaux, G., & Ovize, M. (2008). Inhibition of GSK3β by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*, *117*(21), 2761–2768. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.755066

Goral, V., Jin, Y., Sun, H., Ferrie, A. M., Wu, Q., & Fang, Y. (2011). Agonist-directed desensitization of the β2-adrenergic receptor. *PloS One*, *6*(4), e19282. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019282

Gordon, K., Blondin, D. P., Friesen, B. J., Tingelstad, H. C., Kenny, G. P., Haman, F., Gordon, K., Dp, B., Bj, F., Hc, T., & Gp, K. (2019). *P*assive Properties of Muscle Seven days of cold acclimation substantially reduces shivering intensity and increases nonshivering thermogenesis in adult humans. *J Appl Physiol (1985) 126*(6), 1598-1606. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01133.2018

Granneman, J. G. (2001). The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *280*(2), 199-202. https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.2.E199

Grazia Perrone, M., & Scilimati, A. (2010). β(3)-Adrenoceptor agonists and (antagonists as) inverse agonists history, perspective, constitutive activity, and stereospecific binding. *Methods in Enzymology*, *484*, 197–230. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381298-8.00011-3

Gurevich, V. V, & Gurevich, E. V. (2019). GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 125.

https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00125

Haber, H. L., Simek, C. L., Gimple, L. W., Bergin, J. D., Subbiah, K., Jayaweera, A. R., Powers, E. R., & Feldman, M. D. (1993). Why do patients with congestive heart failure tolerate the initiation of β-blocker therapy? *Circulation*, *88*(4), 1610–1619. https://doi.org/10.1161/01.CIR.88.4.1610

Hackney, A. C., Hodgdon, J. A., Hesslink, R. J., & Trygg, K. (1995). Thyroid hormone responses to military winter exercises in the Arctic region. *Arctic Medical Research*, *54*(2), 82–90.

Haman, F., & Blondin, D. P. (2017). Shivering thermogenesis in humans: Origin, contribution and metabolic requirement. *Temperature*, *4*(3), 217–226. https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1328999

HAMMEL, H. T. (1963). Summary of comparative thermal patterns in man. *Federation Proceedings*, *22*, 846–847.

Hammond, J., & Balligand, J.-L. (2012). Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *52*(2), 330–340. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.029

Hanada, M., Feng, J., & Hemmings, B. A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1697*(1–2), 3–16. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009

Handberg, G. M. (1984). Influence of altered thyroid state on the inotropic potency of isoproterenol--studies with isolated rat left atria paced at different frequencies. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *6*(5), 943–948. https://doi.org/10.1097/00005344-198409000-00031

Hanzlíková, H. (2015). Effects of variability of weather and temperature extremes on cardiovascular diseases. Charles University.

Hartong, R., Wang, N., Kurokawa, R., Lazar, M. A., Glass, C. K., Apriletti, J. W., & Dillmann, W. H. (1994). Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca2+ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(17), 13021–13029.

Hasking, G. J., Esler, M. D., Jennings, G. L., Burton, D., Johns, J. A., & Korner, P. I. (1986). Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*, *73*(4), 615–621. https://doi.org/10.1161/01.cir.73.4.615

Hausdorffs, W. P., Bouvier, M., Dowd, B. F. O., Irons, G. P., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization , *J Biol Chem 264*(21), 12657-65. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63907-9

HEFCO, E., KRULICH, L., ILLNER, P., & LARSEN, P. R. (1975). Effect of Acute Exposure to Cold on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid System. *Endocrinology*, *97*(5), 1185–1195. https://doi.org/10.1210/endo-97-5-1185

Hermida, M. A., Dinesh Kumar, J., & Leslie, N. R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Advances in Biological Regulation*, *65*, 5–15. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.06.003

Hernández, A., & Obregón, M. J. (1996). Presence and mRNA expression of T3 receptors in differentiating rat brown adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *121*(1), 37–46. https://doi.org/10.1016/0303-7207(96)03849-x

Himms-Hagen, J., Cui, J., Danforth, E. J., Taatjes, D. J., Lang, S. S., Waters, B. L., & Claus, T. H. (1994). Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *The American Journal of Physiology*, *266*(4), 1371-82. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.4.R1371

Höfler, W. (1968). Changes in regional distribution of sweating during acclimatization to heat. *Journal of Applied Physiology*, *25*(5), 503–506. https://doi.org/10.1152/jappl.1968.25.5.503

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

Huang, S. A. (2005). Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans. *Thyroid : Official Journal of the American Thyroid Association*, *15*(8), 875–881. https://doi.org/10.1089/thy.2005.15.875

Huang, Y., Wright, C. D., Merkwan, C. L., Baye, N. L., Liang, Q., Simpson, P. C., & O'Connell, T. D. (2007). An alpha1A-adrenergic-extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes. *Circulation*, *115*(6), 763–772. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.664862

Hutchinson, D. S., Bengtsson, T., Evans, B. A., & Summers, R. J. (2002). Mouse beta 3a- and beta 3b-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *British Journal of Pharmacology*, *135*(8), 1903–1914. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704654

Ihnatovych, I., Hejnova, L., Kostrnova, A., Mares, P., Svoboda, P., & Novotny, J. (2001). Maturation of rat brain is accompanied by differential expression of the long and short splice variants of G(s)alpha protein: identification of cytosolic forms of G(s)alpha. *Journal of Neurochemistry*, *79*(1), 88–97. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00544.x

Iwai-Kanai, E., Hasegawa, K., Araki, M., Kakita, T., Morimoto, T., & Sasayama, S. (1999). alpha- and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation*, *100*(3), 305–311. https://doi.org/10.1161/01.cir.100.3.305

Jabbar, A., Pingitore, A., Pearce, S. H. S., Zaman, A., Iervasi, G., & Razvi, S. (2017). Thyroid hormones and cardiovascular disease. *Nature Reviews. Cardiology*, *14*(1), 39–55. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.174

Janský, L. (1973). Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *48*(1), 85–132. https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1973.tb01115.x

Janský, L, Pospísilová, D., Honzová, S., Ulicný, B., Srámek, P., Zeman, V., & Kamínková, J.

(1996). Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *72*(5–6), 445–450.

Jansky, L, & Vybíral, S. (2000). Role of beta adrenoceptors in metabolic and cardiovascular responses of cold exposed humans. *J Therm Biol, 25*(6):437-442. doi: 10.1016/s0306-4565(00)00007-3.

Janský, Ladislav, Vybíral, S., Truba, M., & Okrouhlík, J. (2008). Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. *Eur J Appl Physiol, 104*(2), 131-5. doi: 10.1007/s00421-007-0627-0

Jansky, Ladislav, Vybiral, S., Trubacova, M., & Okrouhlik, J. (2008). Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. *European Journal of Applied Physiology*, *104*(2), 131–135. https://doi.org/10.1007/s00421-007-0627-0

Janský, P., & Janský, L. (2002). Sites and cellular mechanisms of human adrenergic thermogenesis–a review. *Journal of Thermal Biology 27(*4), 269-277 https://doi.org/10.1016/s0306-4565(01)00089-4

Jenkins, C. M., Cedars, A., & Gross, R. W. (2009). Eicosanoid signalling pathways in the heart. *Cardiovascular Research*, *82*(2), 240–249. https://doi.org/10.1093/cvr/cvn346

Jenner, P. (2012). Mitochondria, monoamine oxidase B and Parkinson's disease. *Basal Ganglia*, *2*(4, Supplement), S3–S7. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.baga.2012.06.006

Jensen, B. C., O'Connell, T. D., & Simpson, P. C. (2011). Alpha-1-adrenergic receptors: targets for agonist drugs to treat heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *51*(4), 518–528. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.11.014

Jensen, B. C., O'Connell, T. D., & Simpson, P. C. (2014). Alpha-1-adrenergic receptors in heart failure: the adaptive arm of the cardiac response to chronic catecholamine stimulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *63*(4), 291–301. https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000032

Jensen, B. C., Swigart, P. M., De Marco, T., Hoopes, C., & Simpson, P. C. (2009). alpha 1-Adrenergic receptor subtypes in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation. Heart Failure*, *2*(6), 654–663. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.846212

Johnson, M. (2006). Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *117*(1), 18–24. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.012

Juhaszova, M., Zorov, D. B., Yaniv, Y., Nuss, H. B., Wang, S., & Sollott, S. J. (2009). Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection. *Circulation Research*, *104*(11), 1240–1252. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.197996

Jung, S. M., Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2019). Brown Adipose Tissue Development and Metabolism. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *251*, 3–36. https://doi.org/10.1007/164_2018_168

Kaiser, R. A., Bueno, O. F., Lips, D. J., Doevendans, P. A., Jones, F., Kimball, T. F., & Molkentin, J. D. (2004). Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase

antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(15), 15524–15530. https://doi.org/10.1074/jbc.M313717200

Kaludercic, N., Carpi, A., Nagayama, T., Sivakumaran, V., Zhu, G., Lai, E. W., Bedja, D., De Mario, A., Chen, K., Gabrielson, K. L., Lindsey, M. L., Pacak, K., Takimoto, E., Shih, J. C., Kass, D. A., Di Lisa, F., & Paolocci, N. (2014). Monoamine oxidase B prompts mitochondrial and cardiac dysfunction in pressure overloaded hearts. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*(2), 267–280. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4616

Kaludercic, N., Mialet-Perez, J., Paolocci, N., Parini, A., & Di Lisa, F. (2014). Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *73*, 34–42. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.12.032

Kaludercic, N., Takimoto, E., Nagayama, T., Feng, N., Lai, E. W., Bedja, D., Chen, K., Gabrielson, K. L., Blakely, R. D., Shih, J. C., Pacak, K., Kass, D. A., Di Lisa, F., & Paolocci, N. (2010). Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload. *Circulation Research*, *106*(1), 193–202. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198366

Kara E Hannibal, M. D. B. (2014). Chronic stress, cortisol dysfunction, and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation. In *Physical Therapy*, *94*(12), 1816–1825.

Kaumann, A. J., & Molenaar, P. (1997). Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *355*(6), 667–681.

Kayki Mutlu, G., Arioglu Inan, E., Karaomerlioglu, I., Altan, V. M., Yersal, N., Korkusuz, P., Rocchetti, M., & Zaza, A. (2018). Role of the beta3-adrenergic receptor subtype in catecholamine-induced myocardial remodeling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *446*(1–2), 149–160. https://doi.org/10.1007/s11010-018-3282-3

Ketzer, L. A., Arruda, A. P., Carvalho, D. P., & Meis, L. De. (2009). Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase: heat production and phospholamban alterations promoted by cold exposure and thyroid hormone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol 3*, 556–563. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00302.2009.

Kim, J. K., Pedram, A., Razandi, M., & Levin, E. R. (2006). Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(10), 6760–6767. https://doi.org/10.1074/jbc.M511024200

Kinugawa, K., Yonekura, K., Ribeiro, R. C., Eto, Y., Aoyagi, T., Baxter, J. D., Camacho, S. A., Bristow, M. R., Long, C. S., & Simpson, P. C. (2001). Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, *89*(7), 591–598. https://doi.org/10.1161/hh1901.096706

Klein, I., & Hong, C. (1986). Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart. *The Journal of Clinical Investigation*, *77*(5), 1694–1698. https://doi.org/10.1172/JCI112488

Kobilka, B. (1991). Molecular and cellular biology of adrenergic receptors. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *1*(5), 189–194. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1050-1738(91)90036-E

Kolar, D., Gresikova, M., Waskova-Arnostova, P., Elsnicova, B., Kohutova, J., Hornikova, D., Vebr, P., Neckar, J., Blahova, T., Kasparova, D., Novotny, J., Kolar, F., Novakova, O., & Zurmanova, J. M. (2017). Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *432*(1–2), 99–108. https://doi.org/10.1007/s11010-017-3001-5

Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *6*(11), 827–837. https://doi.org/10.1038/nrm1743

Kooij, V., Stienen, G. J. M., & Velden, J. Van Der. (2011). The role of protein kinase C-mediated phosphorylation of sarcomeric proteins in the heart — detrimental or beneficial ? *Biophys Rev, 3*(3), 107–117. https://doi.org/10.1007/s12551-011-0050-y

Kooij, V., Zhang, P., Piersma, S. R., Sequeira, V., Boontje, N. M., Wijnker, P. J. M., Jiménez, C. R., Jaquet, K. E., dos Remedios, C., Murphy, A. M., Van Eyk, J. E., van der Velden, J., & Stienen, G. J. M. (2013). PKCα-Specific Phosphorylation of the Troponin Complex in Human Myocardium: A Functional and Proteomics Analysis. *PLOS ONE*, *8*(10), 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074847

Kozlovski, V. I., Lomnicka, M., Bartus, M., Sternak, M., & Chlopicki, S. (2015). Anti-thrombotic effects of nebivolol and carvedilol: Involvement of beta2 receptors and COX-2/PGI2 pathways. *Pharmacological Reports, 67*(5), 1041–1047. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.008

Kralova Lesna, I., Rychlikova, J., Vavrova, L., & Vybiral, S. (2015). Could human cold adaptation decrease the risk of cardiovascular disease? *Journal of Thermal Biology*, *52*, 192–198. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.07.007

Krasel, C., Bünemann, M., Lorenz, K., & Lohse, M. J. (2005). Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(10), 9528–9535. https://doi.org/10.1074/jbc.M413078200

Krief, S., Lönnqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., Spronsen, A. Van, Arner, P., Strosberg, A. D., Ricquier, D., & Emorine, L. J. (1993). Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *The Journal of Clinical Investigation*, *91*(1), 344–349. https://doi.org/10.1172/JCI116191

Kristóf, E., Klusóczki, Á., Veress, R., Shaw, A., Combi, Z. S., Varga, K., Győry, F., Balajthy, Z., Bai, P., Bacso, Z., & Fésüs, L. (2019). Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Experimental Cell Research*, *377*(1–2), 47–55. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.02.015

Kriszbacher, I., Bódis, J., Csoboth, I., & Boncz, I. (2009). The occurrence of acute myocardial infarction in relation to weather conditions. In *International journal of cardiology* (Vol. 135, Issue 1, pp. 136–138). https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.01.048

Krylov, I. F., & Tigranian, R. A. (1986). [Hormonal metabolic status of the human body under the conditions of the Far North]. *Kosmicheskaia biologiia i aviakosmicheskaia meditsina*, *20*(5), 85–88.

Kühn, E. R., Bellon, K., Huybrechts, L., & Heyns, W. (1983). Endocrine differences between the Wistar and Sprague-Dawley laboratory rat: influence of cold adaptation. *Hormone and Metabolic Research*, *15*(10), 491–498. https://doi.org/10.1055/s-2007-1018767

Kumphune, S., Bassi, R., Jacquet, S., Sicard, P., Clark, J. E., Verma, S., Avkiran, M., O'Keefe, S. J., & Marber, M. S. (2010). A chemical genetic approach reveals that p38alpha MAPK activation by diphosphorylation aggravates myocardial infarction and is prevented by the direct binding of SB203580. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(5), 2968–2975. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079228

Kuschel, M., Zhou, Y. Y., Cheng, H., Zhang, S. J., Chen, Y., Lakatta, E. G., & Xiao, R. P. (1999). G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(31), 22048–22052.

Ladenson, P. W. (1996). The heart and thyroid disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, *63*(2), 118–125.

Lairez, O., Calise, D., Bianchi, P., Ordener, C., Spreux-Varoquaux, O., Guilbeau-Frugier, C., Escourrou, G., Seif, I., Roncalli, J., Pizzinat, N., Galinier, M., Parini, A., & Mialet-Perez, J. (2009). Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *46*(4), 587–595. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.017

Landry, J., Chrétien, P., Laszlo, A., & Lambert, H. (1991). Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells. *Journal of Cellular Physiology*, *147*(1), 93–101. https://doi.org/10.1002/jcp.1041470113

Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A., & Landry, J. (1995). Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(1), 505–516. https://doi.org/10.1128/mcb.15.1.505

Lee, N. (1983). Environmental impact assessment: a review. *Applied Geography*, *3*(1), 5–27. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0143-6228(83)90003-6

Lee, Y. Y., Moujalled, D., Doerflinger, M., Gangoda, L., Weston, R., Rahimi, A., de Alboran, I., Herold, M., Bouillet, P., Xu, Q., Gao, X., Du, X.-J. & Puthalakath, H. (2013). CREB-binding protein (CBP) regulates β-adrenoceptor (β-AR)-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *20*(7), 941–952. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.29

Leppäluoto, J., Korhonen, I., & Hassi, J. (2001). Habituation of thermal sensations, skin temperatures, and norepinephrine in men exposed to cold air. *Journal of Applied Physiology*, *90*(4), 1211–1218. https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.4.1211

Lesna, I. K., Rychlikova, J., Vavrova, L., & Vybiral, S. (2015). Could human cold adaptation decrease the risk of cardiovascular disease ? *Journal of Thermal Biology*, *52*, 192–198. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.07.007

Levine, M. A., Feldman, A. M., Robishaw, J. D., Ladenson, P. W., Ahn, T. G., Moroney, J. F., & Smallwood, P. M. (1990). Influence of thyroid hormone status on expression of genes

encoding G protein subunits in the rat heart. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(6), 3553–3560.

Levine, M., Duffy, L., Moore, D. C., & Matej, L. A. (1995). Acclimation of a non-indigenous sub-Arctic population: seasonal variation in thyroid function in interior Alaska. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology*, *111*(2), 209–214. https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)00016-z

Li, X.-M., Ma, Y.-T., Yang, Y.-N., Liu, F., Chen, B.-D., Han, W., Zhang, J.-F., & Gao, X.-M. (2009). Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *36*(11), 1054–1061. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05243.x

Liggett, S. B., Freedman, N. J., Schwinn, D. A., & Lefkowitz, R. J. (1993). Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 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

Liggett, S. B., Tepe, N. M., Lorenz, J. N., Canning, A. M., Jantz, T. D., Mitarai, S., Yatani, A., & Dorn, G. W. 2nd. (2000). Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation*, *101*(14), 1707–1714. https://doi.org/10.1161/01.cir.101.14.1707

Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, *1*(6), 361–370. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004

Liptáková Andrea. (2020). Úloha beta 1 adrenergních receptorů v srdci chladově adaptovaného potkana. Charles University.

Liu, B., & Qin, F. (2005). Functional Control of Cold- and Menthol-Sensitive TRPM8 Ion Channels by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Journal of Neuroscience*, *25*(7), 1674–1681. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3632-04.2005

Liu, C., Yavar, Z., & Sun, Q. (2015). Cardiovascular response to thermoregulatory challenges. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *309*(11), 1793-812. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00199.2015

Liu, Q., & Molkentin, J. D. (2011). Protein kinase Calpha as a heart failure therapeutic target. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *51*(4), 474–478. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.004

Liu, R., Ramani, B., Soto, D., De Arcangelis, V., & Xiang, Y. (2009). Agonist dose-dependent phosphorylation by protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase regulates beta2 adrenoceptor coupling to G(i) proteins in cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(47), 32279–32287. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.021428

Lochner, A., Genade, S., Hattingh, S., Marais, E., Huisamen, B., & Moolman, J. A. (2003). Comparison between ischaemic and anisomycin-induced preconditioning: role of p38 MAPK. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, *17*(3), 217–230. https://doi.org/10.1023/a:1026116022552

Lohse, M. J., Engelhardt, S., & Eschenhagen, T. (2003). What is the role of beta-adrenergic

signaling in heart failure? *Circulation Research*, *93*(10), 896–906. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000102042.83024.CA

Lohsez, J., Benovic, L., Caron, G., & Lefkowitz, J. (1990). Pathways of Rapid Receptor Desensitization their contributions. *Biological Chemistry*, *265*(6), 3202–3209.

Lømo, T., Eken, T., Bekkestad Rein, E., & Njå, A. (2020). Body temperature control in rats by muscle tone during rest or sleep. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *228*(2), e13348. https://doi.org/10.1111/apha.13348

Lumpkin, E. A., & Caterina, M. J. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, *445*(7130), 858–865. https://doi.org/10.1038/nature05662

Luo, J., Xie, F., Zhang, W., Ma, X., Guan, J., & Chen, X. (2001). Simvastatin inhibits noradrenaline-induced hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Br J Pharmacol 132*(1), 159-64. doi: 10.1038/sj.bjp.0703792.159–164.

Luongo, C., Dentice, M., & Salvatore, D. (2019). Deiodinases and their intricate role in thyroid hormone homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(8), 479–488. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0218-2

Lymvaios, I., Mourouzis, I., Cokkinos, D. V, Dimopoulos, M. A., & Toumanidis, S. T. (2011). Thyroid hormone and recovery of cardiac function in patients with acute myocardial infarction : a strong association ? *Eur J Endocrinol 165*(1), 107-14. doi: 10.1530/EJE-11-0062

Ma, S., & Morilak, D. A. (2005). Chronic intermittent cold stress sensitises the hypothalamic-pituitary-adrenal response to a novel acute stress by enhancing noradrenergic influence in the rat paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, *17*(11), 761–769. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01372.x

Madamanchi, A. (2007). Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill Journal of Medicine : MJM : An International Forum for the Advancement of Medical Sciences by Students*, *10*(2), 99–104.

Madsen, L., Pedersen, L. M., Lillefosse, H. H., Fjaere, E., Bronstad, I., Hao, Q., Petersen, R. K., Hallenborg, P., Ma, T., De Matteis, R., Araujo, P., Mercader, J., Bonet, M. L., Hansen, J. B., Cannon, B., Nedergaard, J., Wang, J., Cinti, S., Voshol, P., Kristiansen, K. (2010). UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PloS One*, *5*(6), e11391. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011391

Mahdaviani, K., Chess, D., Wu, Y., Shirihai, O., & Aprahamian, T. R. (2016). Autocrine effect of vascular endothelial growth factor-A is essential for mitochondrial function in brown adipocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *65*(1), 26–35. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.09.012

Maisel, A. S., Motulsky, H. J., & Insel, P. A. (1985). Externalization of beta-adrenergic receptors promoted by myocardial ischemia. *Science*, *230*(4722), 183–186. https://doi.org/10.1126/science.2994229

Mäkinen, T. (2006). Human cold exposure, adaptation and performance in a northern climate. In *International Journal of Circumpolar Health*, *65*(4). https://doi.org/10.3402/ijch.v65i4.18118

Makinen, T. M. (2010). Different types of cold adaptation in humans. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, *2*, 1047–1067. https://doi.org/10.2741/s117

Mallajosyula, J. K., Chinta, S. J., Rajagopalan, S., Nicholls, D. G., & Andersen, J. K. (2009). Metabolic control analysis in a cellular model of elevated MAO-B: relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, *16*(3), 186–193. https://doi.org/10.1007/s12640-009-9032-2

Manou-Stathopoulou, V., Goodwin, C. D., Patterson, T., Redwood, S. R., Marber, M. S., & Williams, R. P. (2015). The effects of cold and exercise on the cardiovascular system. *Heart (British Cardiac Society)*, *101*(10), 808–820. https://doi.org/10.1136/heartjnl-2014-306276

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

Marrif, H., Schifman, A., Stepanyan, Z., Gillis, M.-A., Calderone, A., Weiss, R. E., Samarut, J., & Silva, J. E. (2005). Temperature homeostasis in transgenic mice lacking thyroid hormone receptor-alpha gene products. *Endocrinology*, *146*(7), 2872–2884. https://doi.org/10.1210/en.2004-1544

Martin, J. L., Mestril, R., Hilal-Dandan, R., Brunton, L. L., & Dillmann, W. H. (1997). Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation*, *96*(12), 4343–4348. https://doi.org/10.1161/01.cir.96.12.4343

Marvanova, A. (2015). Genová exprese vybraných genů v srdci potkana dlouhodobě adaptovaného na chlad v mírných podmínkách. Charles University.

Maslov, L. N., Tsibulnikov, S. Y., Naryzhnaia, N. V, Ivanov, V. V, & Tsibulnikova, M. R. (2016). [Chronic exposure to cold is adaptation without stress]. *Patologicheskaia fiziologiia i eksperimental'naia terapiia*, *60*(1), 28–31.

Matsui, T., & Rosenzweig, A. (2005). Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI3-kinase and Akt. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *38*(1), 63–71. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.11.005

Maulik, N., Yoshida, T., Zu, Y. L., Sato, M., Banerjee, A., & Das, D. K. (1998). Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2. *The American Journal of Physiology*, *275*(5), 1857-64. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.5.H1857

Maurel, A., Hernandez, C., Kunduzova, O., Bompart, G., Cambon, C., Parini, A., & Francés, B. (2003). Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *284*(4), H1460-7. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00700.2002

McAllister, T. A., Thompson, J. R., & Samuels, S. E. (2000). Skeletal and cardiac muscle protein turnover during cold acclimation in young rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *278*(3), R705-11. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.3.R705

McLeod, C. J., Aziz, A., Hoyt, R. F. J., McCoy, J. P. J., & Sack, M. N. (2005). Uncoupling

proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(39), 33470–33476. https://doi.org/10.1074/jbc.M505258200

Mendoza, K. C., & Griffin, J. D. (2010). Thermoregulation. In G. F. Koob, M. Le Moal, & R. F. Thompson (Eds.), *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* (pp. 400–404). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00169-X

Mercer, J. B., Østerud, B., & Tveita, T. (1999). The Effect of Short-Term Cold Exposure on Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Thrombosis Research*, *95*(2), 93–104. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0049-3848(99)00028-6

Merklin, R. J. (1974). Growth and distribution of human fetal brown fat. *The Anatomical Record*, *178*(3), 637–645. https://doi.org/10.1002/ar.1091780311

Michel-Reher, M. B., & Michel, M. C. (2013). Agonist-induced desensitization of human β3-adrenoceptors expressed in human embryonic kidney cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *386*(10), 843–851. https://doi.org/10.1007/s00210-013-0891

Micova, P., Hahnova, K., Hlavackova, M., Elsnicova, B., Chytilova, A., Holzerova, K., Zurmanova, J., Neckar, J., Kolar, F., Novakova, O., & Novotny, J. (2016). Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A(2)α/cyclooxygenase 2 pathway via β(2)-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *423*(1–2), 151–163. https://doi.org/10.1007/s11010-016-2833-8

Mintz, G., Pizzarello, R., & Klein, I. (1991). Enhanced left ventricular diastolic function in hyperthyroidism: noninvasive assessment and response to treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *73*(1), 146–150. https://doi.org/10.1210/jcem-73-1-146

Moens, A. L., Leyton-Mange, J. S., Niu, X., Yang, R., Cingolani, O., Arkenbout, E. K., Champion, H. C., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Chen, J., Xia, Y., Hale, A. B., Channon, K. M., Halushka, M. K., Barker, N., Wuyts, F. L., Kaminski, P. M., Wolin, M. S., Kass, D. A., & Barouch, L. A. (2009). Adverse ventricular remodeling and exacerbated NOS uncoupling from pressure-overload in mice lacking the beta3-adrenoreceptor. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *47*(5), 576–585. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.06.005

Moens, A. L., Yang, R., Watts, V. L., & Barouch, L. A. (2010). Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *48*(6), 1088–1095. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.02.011

Mongillo, M., Tocchetti, C. G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y.-F., Dostmann, W. R., Pozzan, T., Kass, D. A., Paolocci, N., Houslay, M. D., & Zaccolo, M. (2006). Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circulation Research*, *98*(2), 226–234. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000200178.34179.93

Morrison, S. F., Nakamura, K., & Madden, C. J. (2008). Central control of thermogenesis in mammals. *Experimental Physiology*, *93*(7), 773–797. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.041848

Mustafa, S., & Elgazzar, A. (2014). Influence of chronic exposure to cold environment on

thyroid gland function in rabbits. *Hormone and Metabolic Research, 46*(8), 546–549. https://doi.org/10.1055/s-0033-1363284

Nagarkatti, D. S., & Sha'afi, R. I. (1998). Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *30*(8), 1651–1664. https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0733

Napp, A., Brixius, K., Pott, C., Ziskoven, C., Boelck, B., Mehlhorn, U., Schwinger, R. H. G., & Bloch, W. (2009). Effects of the beta3-adrenergic agonist BRL 37344 on endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and force of contraction in human failing myocardium. *Journal of Cardiac Failure*, *15*(1), 57–67. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2008.08.006

Nedergaard, J., Alexson, S., & Cannon, B. (1980). Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal beta-oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity. *The American Journal of Physiology*, *239*(5), 208-16. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1980.239.5.C208

Nishihara, M., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Yano, T., Naitoh, K., Ohori, K., Hotta, H., Terashima, Y., & Shimamoto, K. (2007). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *43*(5), 564–570. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.08.010

Niu, X., Watts, V. L., Cingolani, O. H., Leyton-mange, J. S., Ellis, C. L., Miller, K. L., Vandegaer, K., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Kass, D. A., & Barouch, L. A. (2013). Cardioprotective Effect of Beta-3 Adrenergic Receptor Agonism: Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase: Beta3-AR prevents cardiac dysfunction through nNOS. *J Am Coll Cardiol. 59*(22), 1979–1987. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.12.046.

Nolen, W. A., Hoencamp, E., Bouvy, P. F., & Haffmans, P. M. (1993). Reversible monoamine oxidase-A inhibitors in resistant major depression. *Clinical Neuropharmacology*, *16 Suppl 2*, S69-76.

Nowack, J., Vetter, S. G., Stalder, G., Painer, J., Kral, M., Smith, S., Le, M. H., Jurcevic, P., Bieber, C., Arnold, W., & Ruf, T. (2019). Muscle nonshivering thermogenesis in a feral mammal. *Scientific Reports*, *9*(1), 6378. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42756-z

O'Donnell, S. R., & Wanstall, J. C. (1980). Evidence that ICI 118, 551 is a potent, highly Beta 2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize Beta-adrenoceptor populations in tissues. *Life Sciences*, *27*(8), 671–677. https://doi.org/10.1016/0024-3205(80)90008-9

Ogurusu, T., Wakabayashi, S., Furukawa, K.-I., Tawada-Iwata, Y., Imagawa, T., & Shigekawa, M. (1990). Protein Kinase-Dependent Phosphorylation of Cardiac Sarcolemmal Ca2+ as Studied with a Specific Monoclonal Antibody1. *The Journal of Biochemistry*, *108*(2), 222–229. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123184

Ojamaa, K., Klein, I., Sabet, A., & Steinberg, S. F. (2000). Changes in adenylyl cyclase isoforms as a mechanism for thyroid hormone modulation of cardiac beta-adrenergic receptor responsiveness. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *49*(2), 275–279. https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)92262-5

Ojamaa, K., Sabet, A., Kenessey, A., Shenoy, R., & Klein, I. (1999). Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific. *Endocrinology*, *140*(7), 3170–3176. https://doi.org/10.1210/endo.140.7.6776

Oliver, E., Jr, F. M., & Ocon, P. D. (2019). Beta-blockers : Historical Perspective and Mechanisms of Action. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 72*(10), 853-862. doi: 10.1016/j.rec.2019.04.006.

Ono, S., Schwartz, I. D., Mueller, O. T., Root, A. W., Usala, S. J., & Bercu, B. B. (1991). Homozygosity for a dominant negative thyroid hormone receptor gene responsible for generalized resistance to thyroid hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *73*(5), 990–994. https://doi.org/10.1210/jcem-73-5-990

Ouellet, V., Labbé, S. M., Blondin, D. P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., Turcotte, E. E., Richard, D., & Carpentier, A. C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(2), 545–552. https://doi.org/10.1172/JCI60433

Pantos, C., Mourouzis, I., Saranteas, T., Clavé, G., Ligeret, H., Noack-Fraissignes, P., Renard, P.-Y., Massonneau, M., Perimenis, P., Spanou, D., Kostopanagiotou, G., & Cokkinos, D. V. (2009). Thyroid hormone improves postischaemic recovery of function while limiting apoptosis: a new therapeutic approach to support hemodynamics in the setting of ischaemia-reperfusion? *Basic Research in Cardiology*, *104*(1), 69–77. https://doi.org/10.1007/s00395-008-0758-4

Park, A. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, *6*(1), 33. https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i1.33

Pastorino, J. G., Hoek, J. B., & Shulga, N. (2005). Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Research*, *65*(22), 10545–10554. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1925

Patrono, C. (2016). Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *82*(4), 957–964. https://doi.org/10.1111/bcp.13048

Pavoine, C., Behforouz, N., Gauthier, C., Le Gouvello, S., Roudot-Thoraval, F., Martin, C. R., Pawlak, A., Feral, C., Defer, N., Houel, R., Magne, S., Amadou, A., Loisance, D., Duvaldestin, P., & Pecker, F. (2003). beta2-Adrenergic signaling in human heart: shift from the cyclic AMP to the arachidonic acid pathway. *Molecular Pharmacology*, *64*(5), 1117–1125. https://doi.org/10.1124/mol.64.5.1117

Pchejetski, D., Kunduzova, O., Dayon, A., Calise, D., Seguelas, M.-H., Leducq, N., Seif, I., Parini, A., & Cuvillier, O. (2007). Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circulation Research*, *100*(1), 41–49. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000253900.66640.34

Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., & Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, *108*(5), 705–715. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00652-9

Penn, R. B., & Benovic, J. L. (1994). Structure of the human gene encoding the beta-adrenergic receptor kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(21), 14924–14930.

Perrino, C., & Rockman, H. A. (2007). Reversal of cardiac remodeling by modulation of adrenergic receptors: a new frontier in heart failure. *Current Opinion in Cardiology*, *22*(5), 443–449. https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e3282294d72

Petrak, J., Pospisilova, J., Sedinova, M., Jedelsky, P., Lorkova, L., Vit, O., Kolar, M., Strnad, H., Benes, J., Sedmera, D., Cervenka, L., & Melenovsky, V. (2011). Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. *Proteome Science*, *9*(1), 69. https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-69

Pingitore, A., Nicolini, G., Kusmic, C., Iervasi, G., Grigolini, P., & Forini, F. (2016). Cardioprotection and thyroid hormones. *Heart Failure Reviews*, *21*(4), 391–399. https://doi.org/10.1007/s10741-016-9545-8

Pitcher, J. A., Freedman, N. J., & Lefkowitz, R. J. (1998). G PROTEIN – COUPLED RECEPTOR KINASES. *Annu Rev Biochem 67*, 653-92. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.653.

Pospíšilová, B. (2017). Energetický metabolismus a apoptotické markery v srdci potkana adaptovaného na chlad. Charles University.

Pott, C., Brixius, K., Bundkirchen, A., Bölck, B., Bloch, W., Steinritz, D., Mehlhorn, U., & Schwinger, R. H. G. (2003). The preferential beta3-adrenoceptor agonist BRL 37344 increases force via beta1-/beta2-adrenoceptors and induces endothelial nitric oxide synthase via beta3-adrenoceptors in human atrial myocardium. *British Journal of Pharmacology*, *138*(3), 521–529. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705065

Prichard, B. N., & Gillam, P. M. (1969). Treatment of hypertension with propranolol. *British Medical Journal*, *1*(5635), 7–16. https://doi.org/10.1136/bmj.1.5635.7

Qiu, Y., Nguyen, K. D., Odegaard, J. I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R. M., Palmiter, R. D., & Chawla, A. (2014). Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*, *157*(6), 1292–1308. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.066

Quintanar-Stephano, J. L., Quintanar-Stephano, A., & Castillo-Hernandez, L. (1991). Effect of the exposure to chronic-intermittent cold on the thyrotropin and thyroid hormones in the rat. *Cryobiology*, *28*(4), 400–403. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0011-2240(91)90047-R

Rameh, L. E., & Cantley, L. C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(13), 8347–8350. https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8347

Ramirez-Correa, G. A., & Murphy, A. M. (2007). Is phospholamban or troponin I the "prima donna" in β-adrenergic induced lusitropy? *Circulation Research*, *101*(4), 326–327. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.158873

Reed, H. L., Quesada, M., Hesslink, R. L. J., D'Alesandro, M. M., Hays, M. T., Christopherson, R. J., Turner, B. V, & Young, B. A. (1994). Changes in serum triiodothyronine kinetics and hepatic type I 5'-deiodinase activity of cold-exposed swine. *The American Journal of*

Physiology, *266*(5 Pt 1), E786-95. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.266.5.E786

Rhodes, M. E. (2017). Chapter 10 - Adrenocorticotropic Hormone. In G. Fink (Ed.), *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology* (pp. 109–116). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802175-0.00010-3

Ribeiro, M. O., Carvalho, S. D., Schultz, J. J., Chiellini, G., Scanlan, T. S., Bianco, A. C., & Brent, G. A. (2001). Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *The Journal of Clinical Investigation*, *108*(1), 97–105. https://doi.org/10.1172/JCI12584

Ricquier, D. (2011). Uncoupling Protein 1 of Brown Adipocytes, the Only Uncoupler: A Historical Perspective. *Frontiers in Endocrinology*, *2*, 85. https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00085

Riederer, P., & Laux, G. (2011). MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology*, *20*(1), 1–17. https://doi.org/10.5607/en.2011.20.1.1

Rodefeld, M. D., Beau, S. L., Schuessler, R. B., Boineau, J. P., & Saffitz, J. E. (1996). Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *7*(11), 1039–1049. https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1996.tb00479.x

Rohrer, D. K. (1998). Physiological consequences of beta-adrenergic receptor disruption. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *76*(11), 764–772. https://doi.org/10.1007/s001090050278

Rohrer, D. K., Hartong, R., & Dillmann, W. H. (1991). Influence of thyroid hormone and retinoic acid on slow sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase and myosin heavy chain alpha gene expression in cardiac myocytes. Delineation of cis-active DNA elements that confer responsiveness to thyroid hormone but not to retinoic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(13), 8638–8646.

Rokosh, D. G., Stewart, A. F., Chang, K. C., Bailey, B. A., Karliner, J. S., Camacho, S. A., Long, C. S., & Simpson, P. C. (1996). Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and in vivo. Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(10), 5839–5843. https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5839

Romanovsky, A. A. (2007). Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *292*(1), R37-46. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00668.2006

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., & Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, *78*(6), 1027–1037. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90277-1

Rubio, A., Raasmaja, A., Maia, A. L., Kim, K. R., & Silva, J. E. (1995). Effects of thyroid hormone on norepinephrine signaling in brown adipose tissue. I. Beta 1- and beta 2-

adrenergic receptors and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate generation. *Endocrinology*, *136*(8), 3267–3276. https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628360

Rubio, A., Raasmaja, A., & Silva, J. E. (1995). Thyroid hormone and norepinephrine signaling in brown adipose tissue. II: Differential effects of thyroid hormone on beta 3-adrenergic receptors in brown and white adipose tissue. *Endocrinology*, *136*(8), 3277–3284. https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628361

Ruuskanen, J. O., Xhaard, H., Marjamäki, A., Salaneck, E., Salminen, T., Yan, Y.-L., Postlethwait, J. H., Johnson, M. S., Larhammar, D., & Scheinin, M. (2004). Identification of Duplicated Fourth α2-Adrenergic Receptor Subtype by Cloning and Mapping of Five Receptor Genes in Zebrafish. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(1), 14–28. https://doi.org/10.1093/molbev/msg224

Ryti, N. R. I., Mäkikyrö, E. M. S., Antikainen, H., Hookana, E., Junttila, M. J., Ikäheimo, T. M., Kortelainen, M.-L., Huikuri, H. V, & Jaakkola, J. J. K. (2017). Risk of sudden cardiac death in relation to season-specific cold spells: a case-crossover study in Finland. *BMJ Open*, *7*(11), e017398. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017398

Sacks, H., & Symonds, M. E. (2013). Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, *62*(6), 1783–1790. https://doi.org/10.2337/db12-1430

Saeki, K., Obayashi, K., & Kurumatani, N. (2017). Platelet count and indoor cold exposure among elderly people: A cross-sectional analysis of the HEIJO-KYO study. *Journal of Epidemiology*, *27*(12), 562–567. https://doi.org/10.1016/j.je.2016.12.018

Safer, J. D., O'Connor, M. G., Colan, S. D., Srinivasan, S., Tollin, S. R., & Wondisford, F. E. (1999). The thyroid hormone receptor-beta gene mutation R383H is associated with isolated central resistance to thyroid hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *84*(9), 3099–3109. https://doi.org/10.1210/jcem.84.9.5985

Sakthivel, S., Finley, N. L., Rosevear, P. R., Lorenz, J. N., Gulick, J., Kim, S., VanBuren, P., Martin, L. A., & Robbins, J. (2005). In vivo and in vitro analysis of cardiac troponin I phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 703–714. https://doi.org/10.1074/jbc.M409513200

Salie, R., Alsalhin, A. K. H., Marais, E., & Lochner, A. (2019). Cardioprotective Effects of Beta3-Adrenergic Receptor (β3-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

Salvatore, D., Bartha, T., Harney, J. W., & Larsen, P. R. (1996). Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology*, *137*(8), 3308–3315. https://doi.org/10.1210/endo.137.8.8754756

Samuels, S. E., Thompson, J. R., & Christopherson, R. J. (1996). Skeletal and cardiac muscle protein turnover during short-term cold exposure and rewarming in young rats. *The American Journal of Physiology*, *270*(6 Pt 2), 1231-9. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.270.6.R1231

Saraiva, R. M., Minhas, K. M., Raju, S. V. Y., Barouch, L. A., Pitz, E., Schuleri, K. H., Vandegaer, K., Li, D., & Hare, J. M. (2005). Deficiency of neuronal nitric oxide synthase

increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium. *Circulation*, *112*(22), 3415–3422. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.557892

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5712), 1098–1101. https://doi.org/10.1126/science.1106148

Sato, M., Hutchinson, D. S., Bengtsson, T., Floren, A., Langel, U., Horinouchi, T., Evans, B. A., & Summers, R. J. (2005). Functional domains of the mouse beta3-adrenoceptor associated with differential G protein coupling. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *315*(3), 1354–1361. https://doi.org/10.1124/jpet.105.091736

Saurin, A. T., Martin, J. L., Heads, R. J., Foley, C., Mockridge, J. W., Wright, M. J., Wang, Y., & Marber, M. S. (2000). The role of differential activation of p38-mitogen- activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *The FASEB Journal*, *14*, 2237–2246. https://doi.org/10.1096/fj.99-0671com

Schena, G., & Caplan, M. J. (2019). Everything You Always Wanted to Know about β(3)-AR (But Were Afraid to Ask). *Cells*, *8*(4). https://doi.org/10.3390/cells8040357

Scherrer-Crosbie, M., Ullrich, R., Bloch, K. D., Nakajima, H., Nasseri, B., Aretz, H. T., Lindsey, M. L., Vançon, A.-C., Huang, P. L., Lee, R. T., Zapol, W. M., & Picard, M. H. (2001). Endothelial Nitric Oxide Synthase Limits Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation*, *104*(11), 1286–1291. https://doi.org/10.1161/hc3601.094298

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y. J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., Liceiri, K., Tomancak, P., & A., C. (2012). Fiji: An open source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji

Selimovic, D., Hassan, M., Haikel, Y., & Hengge, U. R. (2008). Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cellular Signalling*, *20*(2), 311–322. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.015

Sell, H., Deshaies, Y., & Richard, D. (2004). The brown adipocyte: update on its metabolic role. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(11), 2098–2104. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.003

SELLERS, E. A., & YOU, S. S. (1950). Role of the thyroid in metabolic responses to a cold environment. *The American Journal of Physiology*, *163*(1), 81–91. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1950.163.1.81

Sennitt, M. V, Kaumann, A. J., Molenaar, P., Beeley, L. J., Young, P. W., Kelly, J., Chapman, H., Henson, S. M., Berge, J. M., Dean, D. K., Kotecha, N. R., Morgan, H. K., Rami, H. K., Ward, R. W., Thompson, M., Wilson, S., Smith, S. A., Cawthorne, M. A., Stock, M. J., & Arch, J. R. (1998). The contribution of classical (beta1/2-) and atypical beta-adrenoceptors to the stimulation of human white adipocyte lipolysis and right atrial appendage contraction by novel beta3-adrenoceptor agonists of differing selectivities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *285*(3), 1084–1095.

Shah, S. R., Fatima, K., & Ansari, M. (2014). Recovery of myofilament function through reactivation of glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β): mechanism for cardiac resynchronization therapy. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology : An International Journal of Arrhythmias and Pacing*, *41*(3), 193–194. https://doi.org/10.1007/s10840-014-9939-2

Shan, J., Betzenhauser, M. J., Kushnir, A., Reiken, S., Meli, A. C., Wronska, A., Dura, M., Chen, B.-X., & Marks, A. R. (2010). Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and β-adrenergic receptor blockade in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(12), 4375–4387. https://doi.org/10.1172/JCI37649

Sharma, A. K., Kumar, A., Sahu, M., Sharma, G., Datusalia, A. K., & Rajput, S. K. (2018). Exercise preconditioning and low dose copper nanoparticles exhibits cardioprotection through targeting GSK-3β phosphorylation in ischemia/reperfusion induced myocardial infarction. *Microvascular Research*, *120*, 59–66. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.06.003

Shechtman, O., Fregly, M. J., van Bergen, P., & Papanek, P. E. (1991). Prevention of cold-induced increase in blood pressure of rats by captopril. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *17*(6 Pt 1), 763–770. https://doi.org/10.1161/01.hyp.17.6.763

Shechtman, O., Sun, Z., Fregly, M. J., & Katovich, M. J. (1999). Increased tail artery vascular responsiveness to angiotensin II in cold-treated rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *77*(12), 974–979.

Sheth, T., Nair, C., Muller, J., & Yusuf, S. (1999). Increased winter mortality from acute myocardial infarction and stroke: the effect of age. *Journal of the American College of Cardiology*, *33*(7), 1916–1919. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00137-0

Sheth, T., Nair, C., Nargundkar, M., Anand, S., & Yusuf, S. (1999). Cardiovascular and cancer mortality among Canadians of European, south Asian and Chinese origin from 1979 to 1993. *CMAJ*, *161*(2), 132–138. https://www.cmaj.ca/content/161/2/132

Shi, Q., Li, M., Mika, D., Fu, Q., Kim, S., Phan, J., Shen, A., Vandecasteele, G., & Xiang, Y. K. (2017). Heterologous desensitization of cardiac β-adrenergic signal via hormone-induced βAR/arrestin/PDE4 complexes. *Cardiovascular Research*, *113*(6), 656–670. https://doi.org/10.1093/cvr/cvx036

Silva, J. E. (1995). Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid : Official Journal of the American Thyroid Association*, *5*(6), 481–492. https://doi.org/10.1089/thy.1995.5.481

Silva, J. E., & Larsen, P. R. (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*, *305*(5936), 712–713. https://doi.org/10.1038/305712a0

Singh, K., Xiao, L. E. I., Remondino, A., & Sawyer, D. B. (2001). *Adrenergic Regulation of Cardiac Myocyte Apoptosis*. *265*(July), 257–265.

Smolander, J., Mikkelsson, M., Oksa, J., Westerlund, T., Leppäluoto, J., & Huttunen, P. (2004). Thermal sensation and comfort in women exposed repeatedly to whole-body cryotherapy and winter swimming in ice-cold water. *Physiology & Behavior*, *82*(4), 691–695. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.06.007

Spruill, T. M. (2010). Chronic psychosocial stress and hypertension. *Current Hypertension Reports*, *12*(1), 10–16. https://doi.org/10.1007/s11906-009-0084-8

Stadel, J. M., Strulovici, B., Nambi, P., Lavin, T. N., Briggs, M. M., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1983). Desensitization of the beta-adrenergic receptor of frog erythrocytes. Recovery and characterization of the down-regulated receptors in sequestered vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, *258*(5), 3032–3038.

Stafford, R. S., Furberg, C. D., Finkelstein, S. N., Cockburn, I. M., Alehegn, T., & Ma, J. (2004). Impact of clinical trial results on national trends in alpha-blocker prescribing, *JAMA*, *291*(1), 54–62. https://doi.org/10.1001/jama.291.1.54

Steinberg, S. F. (2012). Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *27*(3), 130–139. https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2012

Stenson, W. F., & Parker, C. W. (1979). Metabolism of arachidonic acid in ionophore-stimulated neutrophils. Esterification of a hydroxylated metabolite into phospholipids. *The Journal of Clinical Investigation*, *64*(5), 1457–1465. https://doi.org/10.1172/JCI109604

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), 1496-504. https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1496

Stephens, Dan P., Saad, A. R., Bennett, L. A. T., Kosiba, W. A., & Johnson, J. M. (2004). Neuropeptide Y antagonism reduces reflex cutaneous vasoconstriction in humans. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *287*(3 56-3), 1404–1409. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00061.2004

Strieleman, P. J., Schalinske, K. L., & Shrago, E. (1985). Fatty acid activation of the reconstituted brown adipose tissue mitochondria uncoupling protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *260*(25), 13402–13405.

Sturza, A., Leisegang, M. S., Babelova, A., Schröder, K., Benkhoff, S., Loot, A. E., Fleming, I., Schulz, R., Muntean, D. M., & Brandes, R. P. (2013). Monoamine oxidases are mediators of endothelial dysfunction in the mouse aorta. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *62*(1), 140–146. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01314

Sun, D., Huang, A., Mital, S., Kichuk, M. R., Marboe, C. C., Addonizio, L. J., Michler, R. E., Koller, A., Hintze, T. H., & Kaley, G. (2002). Norepinephrine elicits beta2-receptor-mediated dilation of isolated human coronary arterioles. *Circulation*, *106*(5), 550–555. https://doi.org/10.1161/01.cir.0000023896.70583.9f

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. *Physiol Behav, 62*(2), 379-84. doi: 10.1016/s0031-9384(97)00033-4.

Sun, Z., Zhang, Z., & Cade, R. (2003). Renal responses to chronic cold exposure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *81*(1), 22–27. https://doi.org/10.1139/y03-002

Susulic, V. S., Frederich, R. C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B. B., Harper, M. E., Himms-Hagen, J., Flier, J. S., & Lowell, B. B. (1995). Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(49), 29483–29492.

https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29483

Swedberg, K., Viquerat, C., Rouleau, J. L., Roizen, M., Atherton, B., Parmley, W. W., & Chatterjee, K. (1984). Comparison of myocardial catecholamine balance in chronic congestive heart failure and in angina pectoris without failure. *The American Journal of Cardiology*, *54*(7), 783–786. https://doi.org/10.1016/s0002-9149(84)80208-8

Sy, J. C., Seshadri, G., Yang, S. C., Brown, M., Oh, T., Dikalov, S., Murthy, N., & Davis, M. E. (2008). Sustained release of a p38 inhibitor from non-inflammatory microspheres inhibits cardiac dysfunction. *Nature Materials*, *7*(11), 863–868. https://doi.org/10.1038/nmat2299

Takeda, K., Sakurai, A., DeGroot, L. J., & Refetoff, S. (1992). Recessive inheritance of thyroid hormone resistance caused by complete deletion of the protein-coding region of the thyroid hormone receptor-beta gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *74*(1), 49–55. https://doi.org/10.1210/jcem.74.1.1727829

Takimoto, E. (2012). Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, *76*(8), 1819–1825. https://doi.org/10.1253/circj.cj-12-0664

Tanaka, K., Honda, M., & Takabatake, T. (2001). Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *Journal of the American College of Cardiology*, *37*(2), 676–685. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)01123-2

Tanoue, T., & Nishida, E. (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cellular Signalling*, *15*(5), 455–462. https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00112-2

Tansey, E. A., & Johnson, C. D. (2015). Recent advances in thermoregulation. *Advances in Physiology Education*, *39*(3), 139–148. https://doi.org/10.1152/advan.00126.2014

Tenhunen, O., Rysä, J., Ilves, M., Soini, Y., Ruskoaho, H., & Leskinen, H. (2006). Identification of cell cycle regulatory and inflammatory genes as predominant targets of p38 mitogen-activated protein kinase in the heart. *Circulation Research*, *99*(5), 485–493. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000238387.85144.92

Tenhunen, O., Soini, Y., Ilves, M., Rysä, J., Tuukkanen, J., Serpi, R., Pennanen, H., Ruskoaho, H., & Leskinen, H. (2006). p38 Kinase rescues failing myocardium after myocardial infarction: evidence for angiogenic and anti-apoptotic mechanisms. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *20*(11), 1907–1909. https://doi.org/10.1096/fj.05-5618fje

Thompson-Torgerson, C. S., Holowatz, L. A., Flavahan, N. A., & Kenney, W. L. (2007). Cold-induced cutaneous vasoconstriction is mediated by Rho kinase in vivo in human skin. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *292*(4), H1700-5. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01078.2006

Thompson-Torgerson, C. S., Holowatz, L. A., & Kenney, W. L. (2008). Altered mechanisms of thermoregulatory vasoconstriction in aged human skin. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *36*(3), 122–127. https://doi.org/10.1097/JES.0b013e31817bfd47

Tibenska, V., Benešová, A., Kolar, D., Pospíšilová, B., Hejnova, L., Elsnicová, B., Drahota, Z., Hornikova, D., Nedvědová, I., Novotný, J., Kolář, F., & Zurmanova, J. (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., Liptakova, A., Hejnova, L., Elsnicova, B., Drahota, Z., Hornikova, D., Galatik, F., Kolar, D., Vybiral, S., Alanova, P., Novotny, J., Kolar, F., Novakova, O., & Zurmanova, J. M. (2020a). Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting beta-adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling. *Journal of Applied Physiology*, *128*(4), 1023-1032. doi: 10.1152/japplphysiol.00511.2019.

Tibenská, V., Marvanova, A., Elsnicová, B., Hejnová, L., Vebr, P., Novotný, J., Kolar, F., Novakova, O., & Zurmanova, J. M. (2020b). The cardioprotective effect persisting during recovery from cold acclimation is mediated by the β2-adrenoceptor pathway and Akt activation. *Journal of Applied Physiology*. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00756.2020

Tong, H., Bernstein, D., Murphy, E., & Steenbergen, C. (2005). The role of beta-adrenergic receptor signaling in cardioprotection. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(8), 983–985. https://doi.org/10.1096/fj.04-3067fje

Trojan, S. (2003). Lékařská fyziologie. Grada Publishing. https://books.google.sk/books?id=Kwr8Mc2Wg4MC

Trost, S. U., Swanson, E., Gloss, B., Wang-Iverson, D. B., Zhang, H., Volodarsky, T., Grover, G. J., Baxter, J. D., Chiellini, G., Scanlan, T. S., & Dillmann, W. H. (2000). The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*, *141*(9), 3057–3064. https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7681

Tsibulnikov, S., Maslov, L., Voronkov, N., & Oeltgen, P. (2020). Thyroid hormones and the mechanisms of adaptation to cold. *Hormones (Athens) 19*(3), 329-339. doi: 10.1007/s42000-020-00200-2..

Tsibulnikov, S. Y., Maslov, L. N., Naryzhnaya, N. V, Ivanov, V. V, Bushov, Y. V, Voronkov, N. S., Jaggi, A. S., Zhang, Y., & Oeltgen, P. R. (2019). Impact of cold adaptation on cardiac tolerance to ischemia/reperfusion and glucocorticoid, thyroid hormone levels. *General Physiology and Biophysics*, *38*(3), 245–251. https://doi.org/10.4149/gpb_2019002

Turner, J. D., Gaspers, L. D., Wang, G., & Thomas, A. P. (2010). Uncoupling protein-2 modulates myocardial excitation-contraction coupling. *Circulation Research*, *106*(4), 730–738. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206631

Utiger, R. D. (1984). Beta-adrenergic-antagonist therapy for hyperthyroid Graves' disease. In *The New England journal of medicine*, *310*(24), 1597–1598). https://doi.org/10.1056/NEJM198406143102410

Vallerand, A. L., Pérusse, F., & Bukowiecki, L. J. (1990). Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues. *The American Journal of Physiology*, *259* (5 Pt 2), R1043-9. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.259.5.R1043

van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. A. F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., & Teule, G. J. J. (2009). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1500–1508. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808718

van Mullem, A., van Heerebeek, R., Chrysis, D., Visser, E., Medici, M., Andrikoula, M., Tsatsoulis, A., Peeters, R., & Visser, T. J. (2012). Clinical phenotype and mutant TRα1. In *The New England journal of medicine*, *366*(15), 1451–1453). https://doi.org/10.1056/NEJMc1113940

Varma, D. R., Shen, H., Deng, X. F., Peri, K. G., Chemtob, S., & Mulay, S. (1999). Inverse agonist activities of beta-adrenoceptor antagonists in rat myocardium. *British Journal of Pharmacology*, *127*(4), 895–902. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702616

Vebr, P. (2016). Ischemicko-reperfuzní poškození srdce u chladově adaptovaných potkanů. Charles University.

Végh, A. M. D., Duim, S. N., Smits, A. M., Poelmann, R. E., Ten Harkel, A. D. J., DeRuiter, M. C., Goumans, M. J., & Jongbloed, M. R. M. (2016). Part and Parcel of the Cardiac Autonomic Nerve System: Unravelling Its Cellular Building Blocks during Development. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, *3*(3). https://doi.org/10.3390/jcdd3030028

Veicsteinas, A., Ferretti, G., & Rennie, D. W. (1982). Superficial shell insulation in resting and exercising men in cold water. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, *52*(6), 1557–1564. https://doi.org/10.1152/jappl.1982.52.6.1557

Vidal, M., Wieland, T., Lohse, M. J., & Lorenz, K. (2012). β-Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a Gβγ/Erk-dependent pathway. *Cardiovascular Research*, *96*(2), 255–264. https://doi.org/10.1093/cvr/cvs249

Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., & Giralt, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews. Endocrinology*, *13*(1), 26–35. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.136

Villeneuve, C., Guilbeau-Frugier, C., Sicard, P., Lairez, O., Ordener, C., Duparc, T., De Paulis, D., Couderc, B., Spreux-Varoquaux, O., Tortosa, F., Garnier, A., Knauf, C., Valet, P., Borchi, E., Nediani, C., Gharib, A., Ovize, M., Delisle, M.-B., Parini, A., & Mialet-Perez, J. (2013). p53-PGC-1α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(1), 5–18. https://doi.org/10.1089/ars.2011.4373

Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., & Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1518–1525. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949

Vítková Ivana. (2018). Vliv akutního chladu a stálého světla na levou komoru srdce potkana. Charles University.

von Hafe, M., Neves, J. S., Vale, C., Borges-Canha, M., & Leite-Moreira, A. (2019). The impact of thyroid hormone dysfunction on ischemic heart disease. *Endocrine Connections*,

8(5), R76–R90. https://doi.org/10.1530/EC-19-0096

Vucetic, M., Otasevic, V., Korac, A., Stancic, A., Jankovic, A., Markelic, M., Golic, I., Velickovic, K., Buzadzic, B., & Korac, B. (2011). Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF-1α and AMPKα. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1810*(12), 1252–1261. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.007

Vybíral, S., Lesná, I., Janský, L., & Zeman, V. (2000). Thermoregulation in winter swimmers and physiological significance of human catecholamine thermogenesis. *Experimental Physiology*, *85*(3), 321–326. https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2000.01909.x

Wachsman, D. E., Kavaler, J. P., Sugár, I. P., Schachter, E. N., Gonsiorek, W., & Maayani, S. (1997). Kinetic studies of desensitization and resensitization of the relaxation response to beta-2 adrenoceptor agonists in isolated guinea pig trachea. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *280*(1), 332–345.

Wachter, S. B., & Gilbert, E. M. (2012). Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology*, *122*(2), 104–112. https://doi.org/10.1159/000339271

Wagner, K. D., Geil, D., Schimke, I., Stauss, H. M., Lammerich, A., Theres, H., Pfitzer, G., Vetter, R., & Günther, J. (1998). Decreased susceptibility of contractile function to hypoxia/reoxygenation in chronic infarcted rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *30*(11), 2341–2353. https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0794

Wang, J., Schilling, J. M., Niesman, I. R., Headrick, J. P., Finley, J. C., Kwan, E., Patel, P. M., Head, B. P., Roth, D. M., Yue, Y., & Patel, H. H. (2014). Cardioprotective trafficking of caveolin to mitochondria is Gi-protein dependent. *Anesthesiology*, *121*(3), 538–548. https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000295

Wang, X., Che, H., Zhang, W., Wang, J., Ke, T., Cao, R., Meng, S., Li, D., Weiming, O., Chen, J., & 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

Wang, Y., De Arcangelis, V., Gao, X., Ramani, B., Jung, Y., & Xiang, Y. (2008). Norepinephrine- and epinephrine-induced distinct beta2-adrenoceptor signaling is dictated by GRK2 phosphorylation in cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(4), 1799–1807. https://doi.org/10.1074/jbc.M705747200

Warner, A., Rahman, A., Solsjö, P., Gottschling, K., Davis, B., Vennström, B., Arner, A., & Mittag, J. (2013). Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor α1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(40), 16241–16246. https://doi.org/10.1073/pnas.1310300110

Wassen, F. W. J. S., Schiel, A. E., Kuiper, G. G. J. M., Kaptein, E., Bakker, O., Visser, T. J., & Simonides, W. S. (2002). Induction of thyroid hormone-degrading deiodinase in cardiac hypertrophy and failure. *Endocrinology*, *143*(7), 2812–2815. https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8985

Weinbrenner, C., Liu, G. S., Cohen, M. V, & Downey, J. M. (1997). Phosphorylation of

tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *29*(9), 2383–2391. https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0473

Weiner, J., Kranz, M., Klöting, N., Kunath, A., Steinhoff, K., Rijntjes, E., Köhrle, J., Zeisig, V., Hankir, M., Gebhardt, C., Deuther-Conrad, W., Heiker, J. T., Kralisch, S., Stumvoll, M., Blüher, M., Sabri, O., Hesse, S., Brust, P., Tönjes, A., & Krause, K. (2016). Thyroid hormone status defines brown adipose tissue activity and browning of white adipose tissues in mice. *Scientific Reports*, *6*, 38124. https://doi.org/10.1038/srep38124

Weissinger, J. (1984). Propranolol can inhibit the development of hypertension in SHR. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice*, *6*(6), 1169–1177. https://doi.org/10.3109/10641968409039589

Wiersinga, W. M. (2010). The role of thyroid hormone nuclear receptors in the heart: evidence from pharmacological approaches. *Heart Failure Reviews*, *15*(2), 121–124. https://doi.org/10.1007/s10741-008-9131-9

Williams, G. R. (2000). Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor β Isoforms. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(22), 8329–8342. https://doi.org/10.1128/MCB.20.22.8329-8342.2000

Wilson, T. E., & Crandall, C. G. (2011). Effect of thermal stress on cardiac function. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *39*(1), 12–17. https://doi.org/10.1097/JES.0b013e318201eed6

Woo, A. Y.-H., Jozwiak, K., Toll, L., Tanga, M. J., Kozocas, J. A., Jimenez, L., Huang, Y., Song, Y., Plazinska, A., Pajak, K., Paul, R. K., Bernier, M., Wainer, I. W., & Xiao, R.-P. (2014). Tyrosine 308 is necessary for ligand-directed Gs protein-biased signaling of β2-adrenoceptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(28), 19351–19363. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.558882

Woo, A. Y.-H., Wang, T.-B., Zeng, X., Zhu, W., Abernethy, D. R., Wainer, I. W., & Xiao, R.-P. (2009). Stereochemistry of an agonist determines coupling preference of beta2-adrenoceptor to different G proteins in cardiomyocytes. *Molecular Pharmacology*, *75*(1), 158–165. https://doi.org/10.1124/mol.108.051078

Woo, A. Y. H., Song, Y., Xiao, R. P., & Zhu, W. (2015). Biased β2-adrenoceptor signalling in heart failure: Pathophysiology and drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, *172*(23), 5444–5456. https://doi.org/10.1111/bph.12965

Woodman, O. L., & Vatner, S. F. (1987). Coronary vasoconstriction mediated by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in conscious dogs. *The American Journal of Physiology*, *253*(2 Pt 2), 388-93. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.253.2.H388

Wortzel, I., & Seger, R. (2011). The ERK cascade: Distinct functions within various subcellular organelles. *Genes and Cancer*, *2*(3), 195–209. https://doi.org/10.1177/1947601911407328

Wright, C. D., Chen, Q., Baye, N. L., Huang, Y., Healy, C. L., Kasinathan, S., & O'Connell, T. D. (2008). Nuclear alpha1-adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes. *Circulation Research*, *103*(9), 992–1000. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176024

Xiao, L., Pimental, D. R., Amin, J. K., Singh, K., Sawyer, D. B., & Colucci, W. S. (2001). MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *33*(4), 779–787. https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1348

Xiao, R. (2001). β -Adrenergic Signaling in the Heart : Dual Coupling of the β 2 -Adrenergic Receptor to G s and G i Proteins. *Sci STKE* (104) re15. doi: 10.1126/stke.2001.104.re15.1–11.

Xing, J.-Q., Zhou, Y., Chen, J.-F., Li, S.-B., 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.

Xue, R., Wan, Y., Zhang, S., Zhang, Q., Ye, H., & Li, Y. (2014). Role of bone morphogenetic protein 4 in the differentiation of brown fat-like adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *306*(4), 363–372. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00119.2013

Yamashita, H., Kizaki, T., Ookawara, T., Sato, Y., Yamamoto, M., Ohira, Y., & Ohno, H. (1994). Is insulin-like growth factor I involved in brown adipose tissue enlargement? *Life Sciences*, *55*(2), 141–148. https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)90105-8

Yang-Feng, T. L., Xue, F. Y., Zhong, W. W., Cotecchia, S., Frielle, T., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Francke, U. (1990). Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(4), 1516–1520. https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1516

Yang, X.-P., Liu, Y.-H., Shesely, E. G., Bulagannawar, M., Liu, F., & Carretero, O. A. (1999). Endothelial Nitric Oxide Gene Knockout Mice. *Hypertension*, *34*(1), 24–30. https://doi.org/10.1161/01.HYP.34.1.24

Yao, H., Han, X., & Han, X. (2014). The cardioprotection of the insulin-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *American Journal of Cardiovascular Drugs : Drugs, Devices, and Other Interventions*, *14*(6), 433–442. https://doi.org/10.1007/s40256-014-0089-9

Yeh, C.-C., Fan, Y., Xu, Y., Yang, Y.-L., Simpson, P. C., & Mann, M. J. (2017). Shift toward greater pathologic post-myocardial infarction remodeling with loss of the adaptive hypertrophic signaling of alpha1 adrenergic receptors in mice. *PloS One*, *12*(12), e0188471. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188471

Yokota, T., & Wang, Y. (2016). p38 MAP kinases in the heart. *Gene*, *575*(2 Pt 2), 369–376. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.030

Zhang, K.-R., Liu, H.-T., Zhang, H.-F., Zhang, Q.-J., Li, Q.-X., Yu, Q.-J., Guo, W.-Y., Wang, H.-C., & Gao, F. (2007). Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, *12*(9), 1579–1588. https://doi.org/10.1007/s10495-007-0090-8

Zhao, J. I. N., Cannon, B., Nedergaard, J. A. N., Cannon, B., & Nedergaard, J. (1998). Thermogenesis is beta3- but not beta1-adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. *Am J Physiol 275*(6), 2002-11. doi:

10.1152/ajpregu.1998.275.6.R2002.

Zhou, H., Li, X. M., Meinkoth, J., & Pittman, R. N. (2000). Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *Journal of Cell Biology*, *151*(3), 483–494. https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.483

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 beta(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

Zidar, N., Odar, K., Glavac, D., Jerse, M., Zupanc, T., & Stajer, D. (2009). Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(9B), 3753–3763. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00430.x

Ziskoven, C., Grafweg, S., Bölck, B., Wiesner, R. J., Jimenez, M., Giacobino, J.-P., Bloch, W., Schwinger, R. H. G., & Brixius, K. (2007). Increased Ca2+ sensitivity and protein expression of SERCA 2a in situations of chronic beta3-adrenoceptor deficiency. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, *453*(4), 443–453. https://doi.org/10.1007/s00424-006-0137-7

Zurborg, S., Yurgionas, B., Jira, J. A., Caspani, O., & Heppenstall, P. A. (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca2+. *Nature Neuroscience*, *10*(3), 277–279. https://doi.org/10.1038/nn1843

Prílohy

Príloha 1 – ELFO gely

Dělící	8%	10%	12%	15%
H2O	8,47	7,13	5,8	3,8
AA sol. (ml)	5,33	6,67	8	10
Tris 8,9 sol. C (ml)	5	5	5	5
SDS sol. B (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2
APS sol. E (ml)	1	1	1	1

Zaostřovací	5%	3%
H2O	5,2	6,9
AA sol. (ml)	1,7	1
Tris 8,9 sol. D (ml)	2,5	1,3
SDS sol. B (ml)	0,1	0,1
APS sol. E (ml)	0,5	0,7

Tris pH 8,9 sol C: Trizma base: 18,2 g
TEMED: 345ul upravit pH na 8,9 a doplnit do objemu 100 ml

Tris pH 6,9 sol. D: Trizma base: 3,025 g
TEMED: 345ul upravit pH na 6,9 a doplnit do objemu 50 ml

SDS sol. B: SDS: 1 g do 10 ml vody

APS sol. E: APS: 90 mg do 5 ml vody

AA: akrylamide/bisacrylamide (Sigma, A3699)

Trizma base (Sigma, T1503), TEMED (Serva, 100732), SDS (Sigma, 120 777), APS (Roth, 9592.3)

Príloha 2 - Vnitřní elektrodový pufr pro ELFO

Koncentrovaný (celkový objem 1l):

Trizma base: 30,3 g, Glycine: 144,0 g, SDS: 10,0 g

Ředěný (celkový objem 1l): 100 ml koncentrovaného elektrodového pufru do 900 ml destilované vody

Trizma base (Sigma, T1503), Glycine (Sigma, G8898), SDS (Sigma, 120 777)

Príloha 3 – Towbin roztok

Towbin roztok (celkový objem 1l):

Trizma base: 3,03 g, Glycine: 14,4 g, Methanol: 200 ml

Trizma base (Sigma, T1503), Glycine (Sigma, G8898)

Príloha 4 – TTBS roztok

TBS roztok (celkový objem 5l):

Trizma base: 12,1 g, NaCl: 146,2 g , Upravit pH na 7,5

TTBS roztok (celkový objem 1l):

Odebrat 1l TBS co čisté lahve a přidat 0,5 ml Tween 20

Príloha 5 – Tyrode roztok

Tyrode roztok (celkový objem 1l):

NaCl: 7,89 g , KCl: 1,401 g, $NaH_2PO_4x2H_2O$: 51 mg, $MgCl_2x6H_2O$: 1,016 g, HEPES: 2,38 g, vše rozpustit ve vodě a upravit pH na 7,3

Príloha 6 – PBS roztok (celkový objem 1l):

NaCl: 8g, KCl: 0,2g, $Na_2HPO_4.2H2O$: 1,72g, 1 KH_2PO4: 0,24g

vše rozpustit ve vodě a upravit pH pomocí NaOH na 7,4