

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie

živočichů



Bc. Veronika Zvolská

Úloha batokinů v kardioprotekci vyvolané mírným chladem

The role of batokines in cardioprotection elicited by mild cold acclimation

Diplomová práce

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

Praha 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 10.08.2022

Bc. Veronika Zvolská

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala v první řadě své vedoucí diplomové práce, doc. RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za příkladné vedení, cenné rady a dobrá slova. RNDr. Barbaře Elsnicové, Ph.D. a RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D. děkuji za předávání zkušeností v oblasti metodiky této práce, trpělivé konzultace a pomoc se zpracováním grafů. Panu doc. RNDr. Jiřímu Novotnému a paní RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D. děkuji za možnost užívání vybavení jejich laboratoří potřebného pro protokol izolace kardiomyocytů. Mgr. Anetě Marvanové děkuji za předání zkušeností a dohled nad hodnocením výsledků ischemicko-reperfúzního poškození. Mgr. Marvanové a celému jejímu týmu také děkuji za poskytnutí výsledků ischemicko-reperfúzního poškození použitých pro porovnání se získanými výsledky. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Andree Žbírkové a Mgr. Františku Galatíkovi za uvedení do prostředí laboratoře a praktickou práci na metodě ischemicko-reperfúzního poškození. Bc. Martině Csomové děkuji za krásné chvíle, podporu, veselou mysl a skvělou spolupráci během izolování kardiomyocytů.

Zvláště děkuji svým rodičům a celé rodině za podporu, lásku a trpělivost během celého studia. Blízkým přátelům děkuji za podporu a humor za všech okolností. Děkuji i svému manželovi, Janu Zvolskému, za to, že je tu se mnou a pro mě.

Tato práce vznikla díky Grantové Agentuře Univerzity Karlovy pod číslem projektu 372321.

Abstrakt

Infarkt myokardu zůstává jedním z nejzávažnějších civilizačních onemocnění v celosvětovém měřítku. Cílem výzkumu je proto hledat nové strategie, jak ochránit srdce před ischemicko-reperfúzním (I/R) poškozením a jeho následky. Nové poznatky mohou být aplikovány v klinické praxi a sloužit k prevenci a léčbě srdečních onemocnění. Tato práce navazuje na studium naší laboratoře, která vyvinula model mírné chladové aklimace (5 týdnů, 8 °C) spojený s výrazným snížením velikosti infarktu po I/R myokardu potkana bez vedlejších účinků. Pro objasnění mechanismu kardioprotektivního účinku je však zapotřebí dalšího studia. Diplomová práce byla zaměřena na potenciální vliv známých batokinů, růstového faktoru fibroblastů (FGF21) a interleukinu 6 (IL-6). Dalším cílem bylo zavést na pracovišti metodu izolace dospělých kardiomyocytů potkana a postupy pro ověření viability a odolnosti buněk myokardu v zátěži hypoxií a oxidativním stresem. V práci byla potvrzena účinná kardioprotekce modelu mírného chladu. Akutní ablace BAT před ischemicko-reperfúzním protokolem neměla vliv na velikost infarktu. Metoda izolace kardiomyocytů byla úspěšně zavedena a byl potvrzen protektivní vliv akutního chladu (10 dní, 8 °C).

Klíčová slova: kardioprotekce, chladová aklimace, batokiny, izolované kardiomyocyty

Abstract

Myocardial infarction remains one of the most serious diseases of civilization worldwide. The aim of the research is therefore to search for new strategies to protect the heart from ischemia-reperfusion (I/R) damage and its consequences. New findings can be used in clinical practice and for the prevention and treatment of heart diseases. This work builds on a study from our laboratory that developed a model of mild cold acclimation (5 weeks, 8 °C) associated with a significant reduction in infarct size after rat myocardial I/R without side effects. However, further study is needed to elucidate the mechanism of the cardioprotective effect. The diploma thesis was focused on the potential influence of known batokines, fibroblast growth factor (FGF21) and interleukin 6 (IL-6). Furthermore, we aimed to introduce a method for isolating adult rat cardiomyocytes and a procedure for verifying the viability and resistance of myocardial cells under the load of hypoxia and oxidative stress at the workplace. Effective cardioprotection of the mild cold acclimation was confirmed in the work. Acute ablation of BAT before the ischemia-reperfusion protocol had no effect on infarct size. The cardiomyocyte isolation method was successfully introduced and the protective effect of acute cold (10 days, 8 °C) was confirmed.

Key words: cardioprotection, cold acclimation, batokines, isolated cardiomyocytes

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Literární přehled.....	12
2.1. Ischemicko-reperfúzní poškození srdce.....	12
2.2. Vliv chladové aklimace na I/R poškození srdce a viabilitu tkání.....	13
2.3. Hnědá tuková tkáň.....	15
2.4. Batokiny – adipokiny uvolněné z BAT.....	16
2.4.1. FGF21 v kardioprotekci.....	19
2.4.2. IL-6 v kardioprotekci.....	20
2.4.2.1. IL-6 a regenerace srdce.....	21
2.4.2.2. FGF21, IL-6 a adrenergní stimulace.....	22
3. Cíle diplomové práce.....	23
4. Materiál a metody.....	24
4.1. Ischemicko-reperfúzní poškození <i>in vivo</i>	24
4.1.1. Zvířata a chladová aklimace.....	24
4.1.2. Ischemicko-reperfúzní poškození.....	25
4.1.3. Barvení a fixace srdce.....	26
4.1.4. Analýza ischemicko-reperfúzního poškození.....	27
4.2. ELISA.....	27
4.2.1. Zvířata a chladová aklimace.....	27
4.2.2. Odběr tkání a homogenizace srdce.....	28
4.2.3. Statistická analýza.....	29
4.3. Zavedení metody izolace kardiomyocytů.....	29
4.3.1. Zvířata a chladová aklimace.....	29
4.3.2. Izolace kardiomyocytů.....	29
4.3.3. Viabilita kardiomyocytů po hypoxii a oxidativním stresu.....	31
4.3.4. Hodnocení výsledků viability kardiomyocytů.....	33
5. Výsledky.....	34
5.1. Vliv akutní ablace BAT a exogenního FGF21 na velikost infarktu po chronickém vystavení chladu.....	34
5.2. Hladiny batokinů v séru a markery zánětu v srdci.....	35
5.3. Zavedení metody izolace dospělých kardiomyocytů a měření viability.....	36
6. Diskuze.....	38
6.1. Vliv ablace BAT a administrace FGF21.....	38
6.2. FGF21 a IL-6 v séru a levé komoře.....	41

6.3. Izolované kardiomyocyty	42
7. Závěr.....	45
8. Literatura	46

Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
Akt	proteinkináza B
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
AR	oblast levé komory zasažená ischemií
ATF2	aktivační transkripční faktor 2
ATP	adenosintrifosfát
β -AR	beta-adrenergní receptory
BAT	hnědá tuková tkáň
BP	tert-Butylhydroperoxid
BP15	skupina vystavená působení BP po dobu 15 min
BP30	skupina vystavená působení BP po dobu 30 min
BP60	skupina vystavená působení BP po dobu 60 min
BP120	skupina vystavená působení BP na 15 min po 120 min normoxii
C	kontrolní skupina
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CLR	regresní skupina chladové aklimace
D	ředění suspenze
ERK	extracelulární signální regulační kináza
FGF21	fibroblastový růstový faktor 21
H	hloubka Bürkerovy komůrky
H60	skupina vystavená 60 min hypoxie
IL-6	interleukin 6
IL-10	interleukin 10
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
I/R	ischemicko-reperfúzní
IS	velikost infarktu
JAK	Janus kináza
LAD	levá přední sestupná arterie
L/D	světelný režim světlo tma (light/dark)
MCP	chemoatraktivní protein monocytů
mRNA	mitochondriální ribonukleová kyselina

MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid + vodík
N _L	počet živých buněk
N60	skupina 60 min normoxie
N120	skupina 120 min normoxie
P	počet buněk v 1 ml suspenze
PEPCK	fosfoenolpyruvát karboxykináza
PFA	paraformaldehyd
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
R30	skupina vystavená 60 min hypoxie a 30 min reoxygenace
R60	skupina vystavená 60 min hypoxie a 60 min reoxygenace
S	počet polí pro počítání N
SOCS	supresor cytokinové signalizace
STAT 3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3
TMES	MES pufr s obsahem Tween
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid
UCP 1	uncoupling protein 1
V	viabilita
V _i	iniciální viabilita
V _N	viabilita N60
1D/3D/10D	chládová aklimace pod dobu jednoho, tří nebo deseti dnů

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění, zahrnující také infarkt myokardu, stále představují nejčastější příčinu úmrtí nejen v České republice, ale i v celosvětovém měřítku. Proto je i nadále v této oblasti vynakládáno obrovské úsilí na poli medicíny a vědy. Tradičně známé blahodárné účinky chladové adaptace u lidí neboli otužování mají pozitivní vliv na vaskulární reaktivitu a imunitní systém. Avšak vystavení příliš nízkým teplotám vede u adaptovaných zvířat k hypertenzi a hypertrofii. Na druhou stranu výsledky naší laboratoře, ve které byl zaveden model aklimace na mírný chlad, ukazují na velmi pozitivní vliv chladu na kardiovaskulární systém.

Aklimace na mírný chlad je nazývána mírnou z důvodu použití vyšší teploty pro aklimaci, tj. 8 °C. V nedávno publikované práci naší laboratoře je pozorována zdatelně zmenšená velikost infarktu myokardu bez dalších vedlejších účinků, jako je systémová hypertenze a hypertrofie srdce, které jsou v souvislosti s chladem hojně popisovány.

Je známo, že hnědá tuková tkáň uvolňuje do svého okolí i do oběhu protektivní látky zvané batokiny. U některých z batokinů jako je např. růstový faktor fibroblastů (FGF21) nebo interleukin 6 (IL-6), byly již v minulosti prokázány kardioprotektivní účinky. Jedním z cílů této práce je studovat úlohu FGF21 uvolněného z hnědé tukové tkáně (BAT) po sympatické stimulaci během ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození na novém kardioprotektivním modelu aklimace na mírný chlad. Hlavním cílem práce bylo objasnit úlohu FGF21 a zhodnotit možný příspěvek IL-6 v kardioprotektivním fenotypu chladové aklimace.

Pro podporu uceleného studia této problematiky bylo dalším cílem práce rozšířit metodické portfolio naší laboratoře a zavést metodu izolace kardiomyocytů spolu s protokolem pro testování viability buněk po vystavení hypoxii a oxidativnímu stresu. Díky kombinaci poznatků získaných v experimentech *in vivo* a na izolovaných kardiomyocytech významně přispějeme k objasnění mechanismu kardioprotekce vyvolané mírným chladem, která má potenciál v klinickém využití.

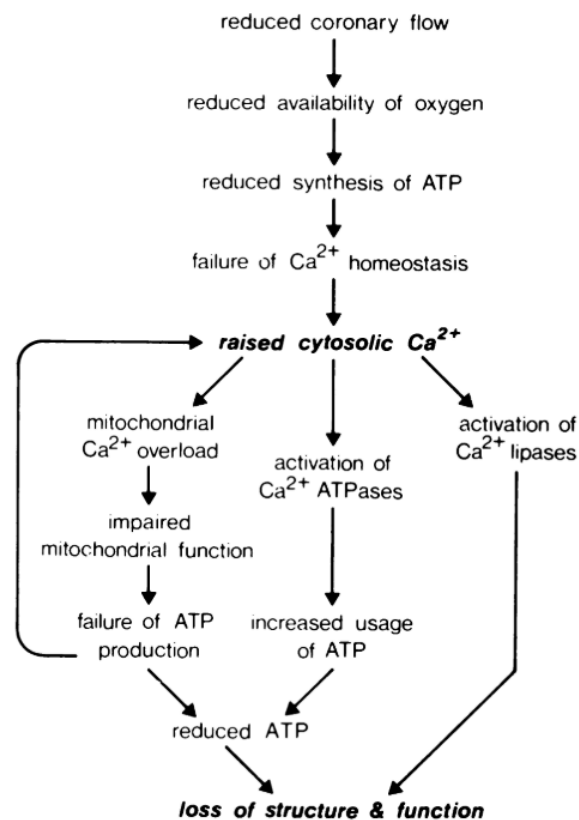
2. Literární přehled

2.1. Ischemicko-reperfúzní poškození srdce

Kardiovaskulární onemocnění zůstávají hlavní příčinou v čele příčin úmrtí celosvětově. V roce 2019 zemřelo na kardiovaskulární onemocnění 17,9 milionu lidí, z čehož 85 % úmrtí bylo způsobeno infarktem myokardu nebo mrtvicí (WHO, 2021). Díky lékařské péči úmrtnost na infarkt myokardu a jeho následky i v České republice stále klesá u mužů i žen, avšak onemocnění oběhové soustavy zůstávají nejčastější příčinou úmrtí (ČSÚ, 2021).

Poprvé byl průběh ischemicko – reperfučního (I/R) poškození popsán v roce 1960 Jenningsem et al. (Jennings et al., 1960). Za ischemii se považuje zastavení průtoku v krevním řečišti, potažmo jeho omezení o více než 50 %. Nejčastější příčinou srdeční ischemie je obstrukce nebo zúžení koronární tepny, vedoucí k infarktu myokardu (Reimer et al., 1983). Jennings et al. pro svá bádání použili psí srdce jako model koronární ligace. Autoři pozorovali urychlení rozvoje nekrózy vlivem reperfuze. Histologické změny pozorované po 30 – 60 minutách ischemie byly srovnatelné se stupněm nekrózy pozorovaným po 24 hodinách trvalé koronární okluze (Jennings et al., 1960). Později Harden et al. ukázali na detekovatelnost ischemie již jednu až dvě vteřiny po koronární okluzi. Ischemická komorová dysfunkce pak nastává za několik vteřin. Studie tak potvrdila, že kyslíková rezerva levé komory je téměř nulová. Díky akumulaci nikotinamidadeninukleotidu (NADH) je v myokardu patrná nerovnováha v zásobování a poptávce po kyslíku. Mezi nástupem buněčné anoxie a počátkem komorové kontraktilní dysfunkce existuje úzká časová korelace (Harden et al., 1979). Mitochondriální přetížení vápníkem je doprovázeno zhoršením mitochondriální funkce, ať už je způsobeno post-ischemickou reperfuží, nebo obnovením koncentrace Ca^{2+} po období perfúze bezvápníkovým médiem (Obr. 1). Zhoršení mitochondriální funkce lze kvantifikovat ve smyslu snížené

oxidativně-fosforylační aktivity a narušené kapacity produkce adenosintrifosfátu (ATP) (shrnuto v Nayler, 1981).



Obrázek 1: Schematické znázornění vlivu ischemie a reperfuze myokardu (převzato z Nayler et al., 1981). Snížený koronární průtok vede ke snížené dostupnosti kyslíku, a tedy snížené syntéze ATP následované selháním vápníkové homeostázy. Zvýšený cytosolický obsah vápenatých iontů vede k mitochondriálnímu přetížení, aktivaci Ca^{2+} ATPázy a Ca^{2+} lipázy. Všechny tyto vlivy ústí ve ztrátu struktury a funkce myokardu.

2.2. Vliv chladové aklimace na I/R poškození srdce a viabilitu tkání

Existuje mnoho studií, které dokládají detrimentální vliv chladu na organismus včetně kardiovaskulárního systému. V chladu dochází ke snížení objemu tekutin včetně plasmy, což pravděpodobně zvyšuje srážlivost krve (Atterhög et al., 1975). Na akutní vystavení chladu u netrénovaných jedinců je nahlíženo jako na kardiovaskulární rizikový faktor, jehož korelace byla opakovaně spojována s úmrtností na srdeční choroby v zimním období (The Eurowinter Group, 1997). Pád do ledové vody nebo náhlá změna teploty okolí může vyvolat nepřiměřenou vazokonstrikci a vzestup krevního tlaku (Edwards et al., 2006). Jsou však známy příznivé účinky přiměřené chladové aklimace, které snižují vaskulární reaktivitu a tím snižují pravděpodobnost náhlého výkyvu krevního tlaku, pozitivně ovlivňují imunitní odpověď,

termoregulaci a zvýšený aerobní metabolismus. Navíc byla chladová aklimace studována jako možná ochrana ve spojitosti s metabolickým syndromem (shrnutí v Laurberg et al., 2005; shrnutí v Schrauwen and Hesselink, 2002).

U otužilců bylo prokázáno, že chladová aklimace zvyšuje sérové hladiny antioxidačních enzymů a protizánětlivých cytokinů, což představuje značný potenciál v prevenci kardiovaskulárních onemocnění (Kralova Lesna et al., 2015). U potkanů zvyšuje chladová aklimace odolnost vůči (I/R) poškození (Tibenska et al., 2020, 2021). Ze studie Tsibulnikova et al. vyplývá, že vedlejším efektem aklimace na velmi nízké teploty (4°C, 4 týdny), která snížila velikost infarktu, bylo zvýšení krevního tlaku a hypertrofie levé komory (Tsibulnikov et al., 2019).

Na celotělové úrovni vede chladová aklimace k posunu od třesové termogeneze k netřesové termogenezi pod vlivem adrenergní stimulace (Van Der Lans et al., 2013). Naše výsledky ukázaly, že dlouhodobá chladová stimulace ovlivňuje i beta-adrenergní signalizaci v levé komoře potkana (Tibenska et al., 2020). V myokardu komor jsou přítomny tři podtypy beta-adrenergních receptorů (β -AR): β_1 -AR (~70 %), β_2 -AR (~27 %) a β_3 -AR (~3 %) (shrnutí v Brodde and Michel, 1999). Přestože jsou β_3 -AR zastoupeny v srdci nejnižší měrou, má jejich primární spojení s inhibičními G proteiny blahodárné účinky na srdce. Jejich zvýšená exprese v srdci brání fibróze myokardu (Hermida et al., 2018) a hypertrofickým změnám (Belge et al., 2014). Nedávná studie Tibenské et al. z naší laboratoře poprvé ukázala, že i postupná aklimace na mírný chlad redukuje velikost infarktu myokardu, aniž by vedla k přítomnosti hypertrofie myokardu či hypertenze. Kardioprotektivní účinek byl pozorován po vystavení potkanů mírnému chladu 8 °C, po dobu 5 týdnů. Pozorováno bylo snížení velikosti infarktu myokardu o 54 % ve srovnání s kontrolou. Dle výsledků naší skupiny by postupná chladová aklimace mohla představovat novou preventivní a terapeutickou strategii v případě I/R poškození srdce (Tibenska et al., 2020). Zvolenou teplotu v práci Tibenské et al. lze považovat za mírnou, protože se nachází pod prahem třesové termogeneze u potkana, která byla určena na 7 °C (Lømo et al., 2020). Mnohé studie na potkanech využívají individuálního ustájení experimentálních zvířat. Ustájení potkanů v párech a s dostatečnou podestýlkou se nejen v adaptivním procesu ukazuje jako nezbytné pro eliminaci stresu jako vedlejšího účinku. U potkanů bylo popsáno, že psychosociální stres vyvolaný individuálním ustájením přispívá k rozvoji hypertenze (shrnutí v Spruill, 2010). Mírný model aklimace v páru a pod prahem třesové termogeneze je

tedy bez vedlejších účinků, zatímco aklimace na nižší teploty (6 °C) vede k poškození nadledvin, hypertenzi a hypertrofii (Fregly et al., 1989).

2.3. Hnědá tuková tkáň

Hnědá tuková tkáň (BAT) zajišťuje tepelnou homeostázi při teplotách okolí pod termoneutrální zónou díky své termogenní funkci (shrnutí v Cannon and Nedergaard, 2004). Je známo, že významné množství BAT přítomné u člověka je u novorozenců, zatímco jeho přítomnost v dospělém věku byla dlouho předmětem diskusí. S rozvojem detekčních metod jako je pozitronová emisní tomografie byla u dospělých lidí detekována drobná ložiska béžové tukové tkáně v okolí velkých cév. Béžový tuk rychle reaguje na snížení okolní teploty aktivací chladových receptorů a stimulací sympatiku. Odhaduje se, že se prevalence aktivního BAT může v populaci pohybovat v řádu desítek procent (shrnutí v Nedergaard et al., 2007). BAT je jako vysoce metabolicky aktivní tkáň rozsáhle studována v souvislosti s obezitou a diabetem (shrnutí v Cypess and Kahn, 2010). Co se týká porovnání laboratorních modelů s člověkem, tak pro hlodavce i člověka jsou společná cervikální, supraklavikulární, axilární a spinální uložiska BAT. Zatímco pro dospělé hlodavce jsou jedinečné skapulární a gonadální depoty (shrnutí v Hankir and Klingenspor, 2018)

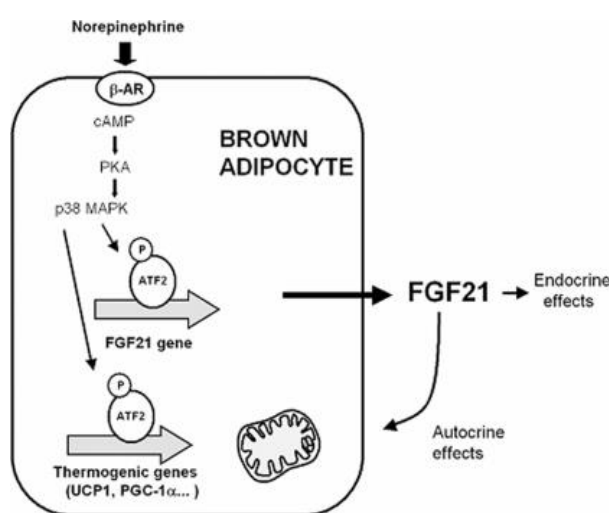
Chlad stimuluje chladové receptory, což vede k aktivaci neurohumorálních procesů. Pro aktivaci a růst BAT je klíčová adrenergní signalizace stimulovaná přes β_3 -AR, a následná stimulace tyroidního systému (shrnutí v Tsibulnikov et al., 2020). Na tyto signály reaguje bílá tuková tkáň „hnědnutím“, které bylo poprvé popsáno Youngem et al. v roce 1984. Ve své studii autoři pozorovali oblasti rozvoje BAT u myši po vystavení chladu. Jedná se o proces indukce termogenně aktivních adipocytů v bílých tukových zásobách následovaný hyperplastickým růstem, který zahrnuje akutní fázi růstu mitochondriálních buněk následovanou prodlouženou fází diferenciací (Young et al., 1984). Receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem (PPAR) jsou klíčovými regulátory metabolismu mastných kyselin a diferenciací adipocytů. Mohou tak zprostředkovat důležité metabolické změny během netřesové termogeneze. Guardiola-Diaz et al. zkoumali expresi messenger ribonukleové kyseliny (mRNA) transkriptu PPAR ve vztahu k proliferaci peroxisomů v BAT u potkanů během chladové aklimace (4 °C, 1 h po dobu 5–28 dní). Výsledkem bylo, že zapojení PPAR do chladem indukované diferenciací a aktivace BAT by mohlo být zprostředkované adrenergní stimulací tkáně (Guardiola-Diaz et al., 1999).

Podle experimentálních studií je přirozená funkce BAT, hlavního místa adaptivní termogeneze, ovlivněna u dospělých lidí obezitou a metabolickými onemocněními. Tradičně byla schopnost BAT chránit organismus před metabolickým onemocněním přičítána jeho možností využívat glukózu a lipidy pro termogenezi. Neopomenutelnou roli však hraje i sekreční role BAT, která může přispívat k systémovým účinkům BAT. BAT byl identifikován jako zdroj bioaktivních molekul, batokininů, které mohou působit parakrinně či endokrinně. Většina batokininů se zapojuje do aktivace samotného BAT a stimuluje jeho hypertrofii a hyperplazii, inervaci a vaskularizaci. Jedná se o procesy spojené s přibýváním BAT během zvýšené termogenní aktivity. Batokiny uvolněné z BAT mohou také ovlivňovat funkci dalších tkání a orgánů (shrnutí v Villarroya et al., 2016).

2.4. Batokiny – adipokiny uvolněné z BAT

Mezi první identifikované batokiny patří růstový faktor fibroblastů 21 (FGF21), interleukin 6 (IL-6) a neuregulin 4 (shrnutí v Villarroya et al., 2019). Shodou okolností mají všechny tři za určitých okolností kardioprotektivní účinky.

FGF21 jsem detailně popsala ve své bakalářské práci (Vrabcová, 2020, Bakalářská práce). Pro moji diplomovou práci je podstatné, že FGF21 je členem rodiny růstových faktorů fibroblastů a působí skrz FGF receptor a beta-klotho kofaktor, který je pro signalizaci FGF21 klíčový (Ogawa et al., 2007). Hlavním zdrojem FGF21 jsou ve velké míře játra (Markan et al., 2014), avšak vlivem termogenní aktivace BAT jsou v hnědých adipocytech exprimována a uvolňována také velká množství FGF21 (Chartoumpakis et al., 2011; Hondares et al., 2011). Byla prokázána souvislost adrenergní signalizace s produkcí FGF21 z BAT. U lidí byla po injekci noradrenalinu pozorována termogenní reakce již v rámci studie z roku 1999 (Lesná et al.,



Obrázek 2: Zobrazení hnědého tuku jako zdroje FGF21 po termogenní aktivaci. Dráha aktivovaná noradrenalinem (norepinephrine) zahrnuje beta-adrenergní receptory (β -AR), protein kinázu A (PKA), p38 MAP kinázovou dráhu (p38 MAPK), a aktivací transkripční faktor 2 (ATF2), který má vliv na expresi FGF21 z hnědých adipocytů (převzato z Hondares et al., 2011).

1999). K expresi FGF21 z BAT dochází vlivem noradrenalinu, který působí skrze beta-adrenergní receptory na zvýšení hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který aktivuje proteinkinázu A (PKA) a p38 MAP kinázovou dráhu (p38 MAPK) (Obr. 2) (Hondares et al., 2011).

FGF21 má v tukové tkáni vliv na několik metabolických procesů. FGF21, produkovaný v hnědé i bílé tukové tkáni, působí autokrinně i parakrinně. Podávání FGF21 mělo u obézních myši pozitivní vliv na metabolismus (Kharitonov et al., 2005). FGF21 snižuje hladiny triglyceridů a zjednodušuje ukládání mastných kyselin v tukových tkáních. U obézních myši směruje FGF21 likvidaci lipoproteinů do hnědé namísto bílé tukové tkáně (Schlein et al., 2016). Administrace FGF21 podpořila genovou expresi cyklických regulátorů triacylglycerolu a mastných kyselin, jako jsou fosfoenolpyruvát karboxykináza (PEPCK) a diacylglycerol acyltransferáza 1 v bílém tuku. V případě BAT šlo o expresi genu pro uncoupling protein 1 (UCP1) (Coskun et al., 2008).

Vystavení myši chladu (4 °C) po dobu 4 hodin vedlo k pětinásobnému navýšení hladiny mRNA FGF21 v BAT ve srovnání s kontrolní skupinou chovanou v teple (Chartoumpakis et al., 2011). U lidských subjektů vedlo i mírné snížení teploty k významnému navýšení hladin FGF21 v krvi. V tomto případě byla teplota v místnosti snížena ze 24 °C na 19 °C po dobu 12 hodin. Stejná studie ukázala, že hladiny FGF21 kolísají v závislosti na diurnálním rytmu (Lee et al., 2013).

Keipert et al. ve svém protokolu chladové aklimace vystavili myši 18 °C po dobu dvou týdnů a následně 5 °C po dobu tří týdnů. Jejich studie odhalila, že UCP1 ani FGF21 nejsou nezbytné faktory pro zachování tepelné homeostázy během chladové aklimace. Nedostatek FGF21 tak nemusí nutně vést ke změně metabolismu nebo regulaci exprese UCP genu (Keipert et al., 2017). Po krátké stimulaci nízkou teplotou (6 hodin, 4 °C) byla u myši pozorována snížená míra adrenergní signalizace. V této studii bylo množství katecholaminů sníženo, avšak toto snížení nebylo limitováno nedostatkem tyrozin hydroxylázy. Naopak došlo ke zvýšení hladiny FGF21 a lipolytické kapacity BAT (Vázquez et al., 2018).

Izumiya et al. ve své práci zkoumal vliv fosfatidylinositol 3-kináza – proteinkináza B (PI3K/Akt) signální dráhy na expresi FGF21. Ukázalo se, že aktivace PI3K/Akt dráhy stimuluje expresi FGF21 v myších myocytech (Izumiya et al., 2008). Model izolovaných dospělých potkaních kardiomyocytů odhalil spojení aktivity FGF21 také s dráhou extracelulární risk

kinázy (ERK1/2) a adenosinmonofosfát aktivované protein kinázy (AMPK). Během globální ischemie perfundovaného srdce podle Langendorffa vedla inhibice těchto drah k významnému snížení kardioprotektivního účinku FGF21 (Patel et al., 2014).

Vedle dráhy PI3K/Akt je i signální dráha p38 dalším možným klíčovým bodem regulace regenerace srdce po poškození, a modulace hypertrofie a proliferace srdeční tkáně (shrnutí v Arabacilar and Marber, 2015). Aktivita p38 negativně koreluje s fetálním vývojem kardiomyocytů. Přílišná produkce p38 v prenatalních kardiomyocytech brání jejich proliferaci, naproti tomu delece genu *p38α*, specifického pro srdeční tkáň, vyvolala navýšení mitózy neonatálních kardiomyocytů. Zatímco u dospělých kardiomyocytů vede inhibice p38 k obnově buněčné proliferace (Engel et al., 2005, 2006).

Z výše uvedeného lze usuzovat, že signální dráhy, aktivované působením FGF21, jsou spojeny s ochranou a přežíváním buněk. Náš model chronické aklimace ukazuje nárůst aktivace p38 v chladu a Akt po dvou týdnech zotavení po aklimaci, což přináší zajímavé otázky ve spojitosti s FGF21.

Vlivem beta-adrenergní stimulace je z BAT vylučován i IL-6 (Burýšek and Houštěk, 1997). Pro funkci IL-6 je vysoce důležitý fyziologický kontext signalizace, neboť zdroj cytokinové exprese může určovat zánětlivou signalizační odpověď (Han et al., 2020). Zajímavostí je, že transplantace BAT od myši s delecí IL-6 nevede k nárůstu sérové hladiny FGF21 v porovnání s kontrolami získávajícími wild-type BAT. To naznačuje, že FGF21 je regulován pomocí IL-6. To podporují i data ze stejné studie, tj. myši s delecí IL-6 měly sníženou hladinu FGF21 v játrech v pokojové teplotě a snížené koncentrace FGF21 v reakci na chlad (24 hod., 4 °C) (Stanford et al., 2013). Role IL-6 jako hlavního mediátoru prospěšných účinků zůstává nejasná. IL-6 je také nutný pro indukci hnědnutí bílé tukové tkáně v reakci na chladné prostředí, jak ukazuje snížená indukce termogeninu, klíčového proteinu netřesové termogeneze, u myši s delecí IL-6 v subkutánní bílé tukové tkáni po vystavení chladu (Knudsen et al., 2014).

V nedávné studii se ukázalo, že sekrece IL-6 v běžových adipocytech působí autokrinně na proces hnědnutí, alespoň co se týče pokusů *in vitro*. Tento jev byl pozorován na lidských běžových adipocytech, kde byly ve srovnání s bílými adipocyty sledovány zvýšené hladiny IL-6, interleukinu 8 (IL-8) a chemoatraktivního proteinu monocytů(MCP)-1. Naopak hladiny tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF α) a prozánětlivých cytokinů IL-1 β nebyly zvýšeny. Na lidských adipocytech odebraných z hloubkového ložiska v krční oblasti byly pozorovány

vyšší hladiny IL-6, IL-8 a MCP-1. V této studii byl po podání protilátky proti receptoru IL-6 a tím inhibicí jeho auto- i parakrinního účinku pozorován snížený výskyt běžového fenotypu lidských subkutánních adipocytů (Kristóf et al., 2019).

2.4.1. FGF21 v kardioprotekci

V oblasti kardiovaskulární medicíny je FGF21 známý jako možný biomarker akutního infarktu myokardu a selhávajícího srdce (Chou et al., 2016). O kardioprotektivním vlivu FGF21 vypovídá studie, ve které podání FGF21 vedlo u FGF21-KO myši k aktivaci ERK dráhy a ochraně srdce před hypertrofickými stimuly způsobenými infuzí isoproterenolu (Planavila et al., 2013). FGF21 chrání srdce před vlivy I/R poškození může pocházet z různých částí organismu. V reakci na infarkt myokardu ho uvolňují kosterní svaly (Joki et al., 2015), játra a BAT (Liu et al., 2013). FGF21 je také uvolňován během hladovění, při stresu endoplazmatického retikula (Brahma et al., 2014) nebo vlivem cvičení (Guo et al., 2016).

Kardioprotektivní vliv FGF21 potvrdila práce Patela et al., která navíc ukázala, že FGF21 je produkován samotnými kardiomyocyty (Patel et al., 2014). Planavila et al. později prokázali vliv FGF21 na aktivaci transkripce antioxidantů, čímž FGF21 snižuje pravděpodobnost vzniku oxidativního stresu v srdci (Planavila et al., 2015). Tyto poznatky byly potvrzeny ve stejném roce na modelu selhávajícího srdce (shrnuté v Di Lisa and Itoh, 2015).

Pomocí aktivace dráhy přes sirtuin 1 – jaterní kináza B1 – AMPK tlumí FGF21 zánět, oxidační stres a apoptózu, čímž zmírňuje srdeční dysfunkci vyvolanou experimentálním podáním dexorubicinu (Wang et al., 2017). Ukázalo se, že FGF21 stojí za zvyšováním plazmatických hladin adiponektinu, který je rovněž spojován s kardioprotekcí (Joki et al., 2015).

Na metodě mírné chladové aklimace naší laboratoře bylo zjištěno, že v případě regresní skupiny (CLR, 5 týdnů chladu 8 ± 1 °C + 2 týdny regrese při 24 ± 1 °C) dochází k výraznému nárůstu hladiny FGF21 v BAT. Chladová kontrola (C, 5 týdnů chladu 8 ± 1 °C) se od teplové kontroly příliš nelišila. Hladina FGF21 v srdci nebyla vlivem chladové adaptace ani regrese změněna ve srovnání s chladovou skupinou (Bajsova, 2021, Diplomová práce).

Můžeme předpokládat souvislost kardioprotektivního vlivu mírné chladové aklimace s produkcí FGF21 během vystavení chladu a při akutní ischemii srdce, během které je aktivován adrenergní systém v rámci poplachové odpovědi organismu.

2.4.2. IL-6 v kardioprotekci

IL-6 je prozánětlivý cytokin produkovaný mnoha typy buněk s pleiotrofními účinky. V raných fázích zánětu je IL-6 produkován monocyty a makrofágy, především stimulací Toll-like receptorů (shrnutí v Rossi et al., 2015). Produkce IL-6 indukuje syntézu C-reaktivního proteinu, sérového amyloidu A, fibrinogenu, haptoglobinu atd. Naopak snižuje hladiny fibronektinu, albuminu a transferinu (shrnutí v Tanaka et al., 2014).

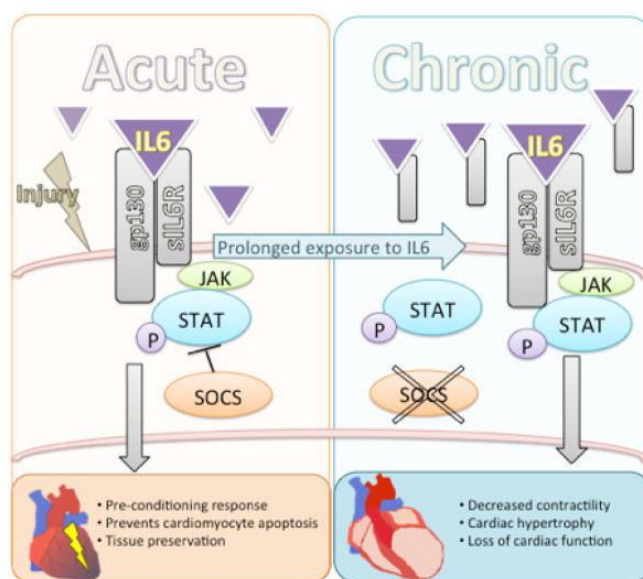
Kardioprotektivní funkce signalizace rodiny IL-6 byly charakterizovány u I/R poškození. V reakci na poškození produkují kardiomyocyty kromě FGF21 i IL-6. Zvýšení produkce IL-6 je spojeno se zvýšenou signalizací IL-6 a s útlumem srdeční funkce (Yang et al., 2004).

V pozdní fázi pre-conditioningu, která poskytuje kardioprotekci, figuruje zvýšená hladina IL-6. Pro pre-conditioning je nutná i downstream signální molekula IL-6, signální transduktor a aktivátor transkripce (STAT 3) (Dawn et al., 2004).

Yu et al. ve své studii prokázali, že chronické vystavení působení IL-6 aktivuje v dospělých kardiomyocytech potkana jak janus kináza (JAK2) – STAT3, tak ERK1/2 signální dráhu. Vlivem IL-6 je do dvou hodin také *de novo* syntetizován protein indukovatelné syntázy oxidu dusného (iNOS), což je doprovázeno produkcí NO v kultuře. Exprese iNOS, zvýšená produkce NO a pokles kontraktility je blokován inhibicí fosforylace STAT3 pomocí inhibitoru JAK2 a inhibitoru tyrosin kinázy. Nikoliv však vlivem inhibice aktivace ERK1/2 dráhy. Z těchto poznatků vyplývá, že signalizace IL-6 spojená s kontraktilitou srdce je spojena se signalizační drahou JAK/STAT a nikoliv alternativní signalizací ERK dráhy (Yu et al., 2003).

V případě akutního podání u poškození myokardu se IL-6 ukázal jako kardioprotektivní. V případě chronického zvýšení hladiny IL-6 a jeho signalizace může dojít k srdečnímu selhání. Přejít mezi akutní a chronickou fází je spojen se specifickou signalizací jedinečnou pro IL-6 (Obr. 3). Studie na myších i lidech ukázaly, že pokud zvýšení IL-6 překročí počáteční požadavek na zachování zasažené tkáně, stanou se stejné účinky škodlivé. Vyvoláním anti-apoptického programu a snížením kontraktility v dlouhodobém horizontu snižuje výkon srdce se všemi kompenzačními následky, do kterých patří indukce fetálního genetického programu

souvisejícího s hypertrofií. Ta může nakonec vést až k srdečnímu selhání. Chronická stimulace signalizace IL-6 je tedy patogenní (shrnuto ve Fontes et al., 2015).



Obrázek 3: Na obrázku je znázorněn přechod od akutní (ochranné) k chronické (patogenní) signalizaci IL-6 v kardiomyocytech. Během akutní fáze chrání IL-6 srdeční tkáň díky indukci antiapoptotického programu v myocyту a spuštění pre-conditioningu (Dawn et al., 2004; Smart et al., 2006). Během chronické signalizace IL-6 se tyto ochranné reakce stanou patogenními a vedou ke snížené funkci myocytů. Je tak snížena kontraktilita, hypertrofické geny jsou aktivovány a levá komora podléhá hypertrofii (shrnuto vFrangogiannis, 2006; Gwechenberger et al., 1999; Ono et al., 1998). Interleukin 6 (IL-6) se připojuje na svůj receptor (IL6R) a skrz aktivaci Janus kinázy a signálního transduktoru a aktivátoru transkripce (JAK/STAT) předává kardioprotektivní signály. JAK/STAT signalizace může být blokována supresory cytokinové signalizace (SOCS). Obrázek převzat z Fontes et al., 2015.

2.4.2.1. IL-6 a regenerace srdce

U novorozných myší se na regeneraci srdce po ischemickém poškození podílí zvýšená proliferace kardiomyocytů prostřednictvím akutní zánětlivé reakce. IL-6 hraje v tomto mechanismu pozitivní roli, zlepšuje kontraktilitu srdce a obnovuje jeho funkci (Tang et al., 2018). Z těchto výsledků lze usuzovat, že nadměrná exprese IL-6 může podpořit proliferaci kardiomyocytů, proteinovou expresi v myokardu i regeneraci srdce.

V souladu s tím bylo zjištěno, že za reaktivní proliferaci kardiomyocytů po poškození srdce novorozných myší stojí signalizace IL-6 – STAT3. Právě proto by signalizace IL-6 – STAT3 mohla mít významný potenciál pro léčbu lidských srdečních onemocnění v rámci regenerativní medicíny, avšak je třeba uvažovat limity studovaných modelů. Ve studii, která toto spojení

odhalila, byl u novorozeneých myší po apikální intra-myokardiální mikroinjekci imunogenních částic zymosanu A vyvolán akutní zánět, který indukoval proliferaci kardiomyocytů. Regenerace vyvolaná poškozením srdce byla v experimentu pozastavena po imunosupresi u neonatálních myší. Obdobně zrušila delece IL-6 schopnost proliferace kardiomyocytů po poškození srdce. Stejný výsledek byl pozorován i v případě specifické delece STAT3 v kardiomyocytech (Han et al., 2015).

Ve studii z roku 2012 byl použit k analýze mechanismu účinku IL-6 na hypertrofii srdce *in vitro* model srdečních fibroblastů, a *in vivo* model srdeční hypertrofie vyvolané tlakovým přetížením srdce u potkana kmene Wistar, po ligaci renální arterie. Specifická inhibice STAT3 výrazně omezila syntézu kolagenu indukovanou IL-6, dále redukovala srdeční hypertrofii vyvolanou tlakovým přetížením díky snížení fibrózních procesů (Mir et al., 2012).

2.4.2.2. FGF21, IL-6 a adrenergní stimulace

FGF21 a IL-6 jsou důležité batokiny, které souvisí s maturací BAT probíhající pod vlivem adrenergní signalizace (shrnutí v Cuevas-Ramos et al., 2019; Kristóf et al., 2019). Vedle toho je produkce FGF21 v játrech a jeho hladina v séru downregulována α_1 -AR. Blokáda tohoto receptoru může být využita ke stimulaci produkce FGF21 v játrech a zvýšení jeho sérové hladiny (Nonogaki and Kaji, 2017). Po selektivní stimulaci β_3 -AR nebo vystavení chladu došlo ke zvýšení exprese FGF21 v BAT (Chartoumpakis et al., 2011). Vliv β_3 -AR zkoumali také Abu-Odeh et al. a za využití syntetického agonisty β_3 -AR popsali roli FGF21 v hnědnutí bílé tukové tkáně. Studie odhaluje, že mnoho pozitivních efektů, které FGF21 přináší, je úzce spojeno s autokrinním či parakrinním faktorem v tuku, který pro úplnou expresi termogenního programu používá druhé posly (Abu-Odeh et al., 2021).

Naproti tomu, zvýšené uvolňování IL-6 v adipocytech je pod vlivem β_3 -adrenergní signalizace a je dále zprostředkováno signalizací p38 a proteinkinázy C (PKC) díky aktivaci transkripčních faktorů cAMP responzivní element vazebného proteinu a ATF2. Uvolnění IL-6 je nezávislé na inhibičních G proteinech a nezávisí na ERK1/2, PKA nebo jaderném faktoru kapa beta signálních drahách (Tchivileva et al., 2009). Chronické podávání isoproterenolu zvýšilo hladiny IL-6, které potlačily aktivaci MAP kináz v myokardu myší. To může být spojeno s udržováním exprese supresoru cytokinové signalizace 3 (SOCS3) pomocí IL-6 a ochranou srdce před fibrózou. β -adrenergní stimulace indukuje hypertrofii kardiomyocytů, která není závislá na IL-6 (Dziemidowicz et al., 2019).

Protektivní význam batokininů je nadějný v léčbě nejen obezity a metabolického syndromu, ale i v oblasti prevence a léčby kardiovaskulárních chorob. Proto je cílem této práce ověřit, zda batokiny mohou hrát roli v mechanismu kardioprotekce vyvolané adaptací na mírný chlad, který zvyšuje odolnost srdce k ischemickému infarktu.

3. Cíle diplomové práce

V práci jsme si stanovili tři cíle. První a druhý stanovený cíl vychází z předchozích publikovaných výsledků naší laboratoře, kde Tibenská et al. zjistili, že kardioprotekce vyvolaná chladem přetrvává ještě dva týdny po 5-týdenní chladové aklimaci a velikost BAT se zásadně nesnižuje a dochází k aktivaci Akt (Tibenska et al., 2020, 2021). Položili jsme si tedy otázku, jakou roli v kardioprotekci přetrvávající 2 týdny po ukončení aklimace hraje přítomnost samotného BAT a jakou roli hraje známý batokin FGF21. U tohoto modelu naměřila Barbora Bajsová ve své diplomové práci vysoké hladiny proteinu FGF21 v BAT (Bajsova, 2021, Diplomová práce).

Cíl 1: Zhodnotit úlohu BAT a FGF21 v kardioprotekci (zvýšené odolnosti levé komory k I/R poškození) vyvolané aklimací na mírný chlad u dospělého potkana.

Cíl 2: Stanovit hladiny FGF-21 a IL-6 v séru a homogenátu levé komory.

Stanovení třetího cíle vychází z potřeby rozšířit metodické portfolio laboratoře o experimenty na buněčném modelu, který umožní využívat specifické inhibitory, které není možné podávat na celotělové úrovni.

Cíl 3: Zavést metodu izolace dospělých kardiomyocytů a postupy pro ověření viability v průběhu hypoxie a reoxygenace a navozeném oxidativním stresu.

4. Materiál a metody

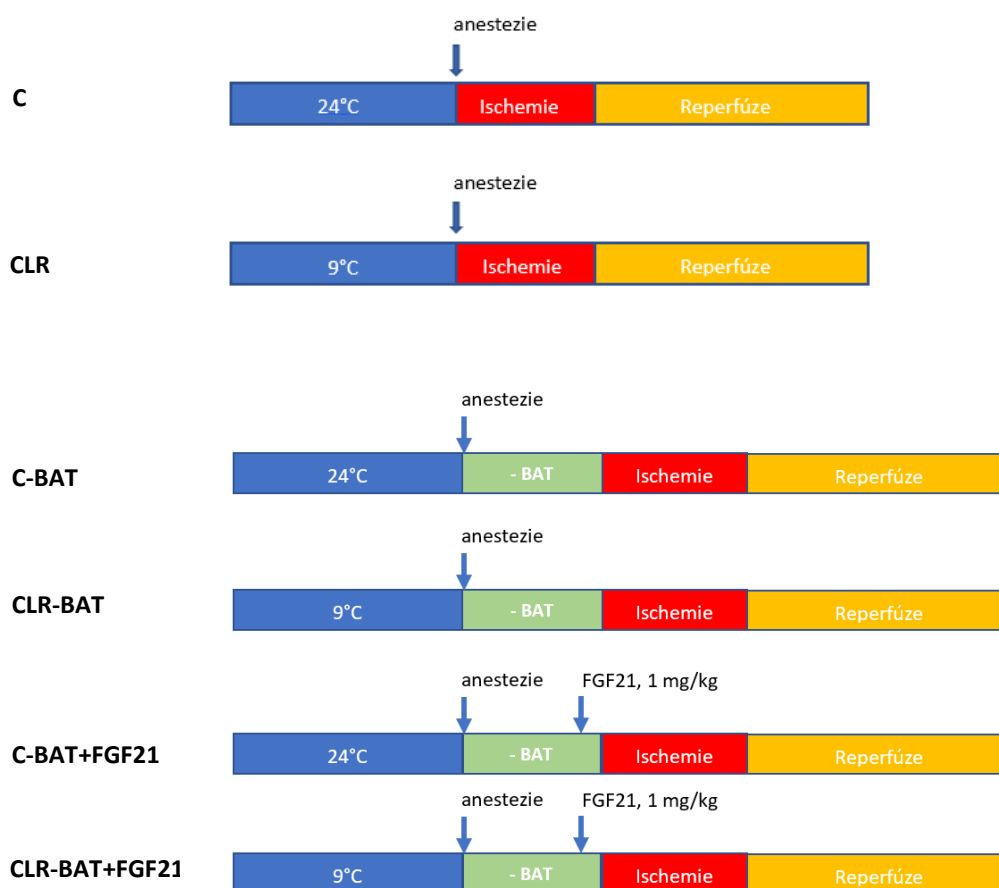
4.1. Ischemicko-reperfúzní poškození *in vivo*

4.1.1. Zvířata a chladová aklimace

V rámci cíle 1 jsme sledovali potenciální úlohu FGF21 po akutní ablaci BAT ve zvýšené odolnosti srdce k I/R poškození po chladové aklimaci. Byli použiti samci potkanů Wistar (Velaz s.r.o.) o hmotnosti 330 ± 12 g. Všechna zvířata měla po celou dobu volný přístup k vodě i standardní dietě ST1 a byla chována v párech ve světelném režimu L/D 12/12. Potkani byli adaptováni během prosince 2020. Potkani byli rozděleni do šesti experimentálních skupin. Porovnávali jsme vždy tři kontrolní teplové skupiny chované ve 24 °C (C) a tři skupiny regresní chované v 9 °C (CLR) po dobu čtyř týdnů a jednoho týdne opět ve 24 °C. U kontrolní i regresní skupiny byla jedna podskupina sham operovaná, druhá po ablaci BAT a třetí po ablaci BAT s podaným mimetikem FGF21 (PF-05231023 1 mg/kg, i.p.) (viz schéma, Obr. 4). Chirurgické odstranění interskapulárního BAT bylo provedeno v hluboké anestezii. Po 2 h byl proveden podvaz levé koronární arterie, tj. 20 min ischemie, a její následné uvolnění, tj. 3 h reperfúze.

V nabídce biotechnologických firem ani v dostupné literatuře, nejsou zmínky o specifickém inhibitoru FGF21, který by bylo možné podávat na celotělové úrovni. Proto bylo využito mimetikum FGF21, PF-05231023, po ablaci BAT.

Přehled experimentálních skupin je znázorněn níže (Obr. 4).



Obrázek 4: Přehled experimentálních skupin. C = kontrolní skupina, chovaná ve 24 °C; CLR = regresní skupina, chovaná v 9 °C (4 týdny) + návrat do 24 °C (1 týden); C-BAT = kontrolní skupina, chovaná ve 24 °C, odebrán BAT; CLR-BAT = regresní skupina, chovaná v 9 °C (4 týdny) + návrat do 24 °C (1 týden), odebrán BAT; C-BAT+FGF21 = kontrolní skupina, chovaná ve 24 °C, odebrán BAT, podán FGF21; CLR-BAT+FGF21 = regresní skupina, chovaná v 9 °C (4 týdny) + návrat do 24 °C (1 týden), odebrán BAT, podán FGF21

4.1.2. Ischemicko-reperfúzní poškození

Potkani byli zváženi a uvedeni do hluboké anestezie (i.p. Thiopental 60 mg/kg) a následně podrobeni I/R protokolu. Po celou dobu anestezie byla monitorována rektální teplota, která byla udržována v rozmezí 36 – 37,5°C. Krevní tlak byl monitorován invazivně po kanylaci *arterie carotis communis* a EKG bylo monitorováno pomocí 3 svodů s použitím systému Power Lab a LabChartPro softwaru (ADInstruments).

Následně byla provedena tracheotomie společně s intubací pro následné připojení na ventilátor (Rodent Ventilator, kód produktu: 7025, Ugo Basile). Po stabilizaci zvířete byla rozevřena žebra pomocí rozvěrače, protržen perikard a odhaleno levé srdce. Potkan byl připojen na ventilátor a mechanicky ventilován po celou dobu zákroku s frekvencí 60–70 nádechů/min, v objemu 1,2 ml/100 g hmotnosti zvířete.

Atraumatickou jehlou s hedvábnou nití 5/0 (Chirana T. Injecta s.r.o.) byla provedena okluze levé přední sestupné arterie (LAD) 1–2 mm od jejího odstupu z levé komory. Rozvěrač byl vyjmut a konce nitě byly protaženy polyethylenovou trubičkou. Rána byla kryta proti vysychání.

Po 10 min stabilizace byla vyvolána ischemie trvající 20 min zatažením podvazu. Po uplynutí této doby byla svorka povolena. Po pěti minutách byl hrudník uzavřen za současného odsávání přebytečného vzduchu. Potkan byl odpojen od ventilátoru a přemístěn na vyhřívanou podložku, kde strávil další tři hodiny pod anestézií v reperfúzi.

4.1.3. Barvení a fixace srdce

Po tříhodinové reperfúzi v hluboké anestezii byl otevřen hrudník prostřížením žeber a bylo vyjmuto srdce. Odebrané srdce bylo retrográdně perfundované s fyziologickým roztokem a promýváno až do průtoku čirého efluentu.

Následovalo opětovné zatažení podvazu kolem LAD a pokračovala perfúze 5% roztokem manganistanu draselného v destilované vodě. To vedlo k obarvení části myokardu nezasažené I/R poškozením.

Následně bylo srdce promyto fyziologickým roztokem pro vyplavení přebytečného barviva. Podvaz byl povolen, srdce sejmuto z kanyly, osušeno na filtračním papíře a mraženo v –20 °C po dobu 1 h. Po zmrznutí byla tkáň krájena žiletkou na řezy o tloušťce 1 mm, z každého srdce bylo tímto způsobem připraveno 6-9 řezů. Srdeční řezy byly barveny v 0,1% roztoku 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridu (TTC) a inkubovány ve vodní lázni (37 °C) po dobu 20 min. Následně byly řezy skladovány v 4% roztoku paraformaldehydu (PFA) po dobu 72 hodin.

4.1.4. Analýza ischemicko-reperfúzního poškození

Po třech dnech byly řezy vyjmuty z PFA, osušeny a z každého řezu byla odstřižena pravá komora. Řezy byly následně fotografovány s příslušným označením k další počítačové analýze pomocí fotoaparátu Nikon D5100 s objektivem Sigma 105 mm F2.8 Makro. Na snímcích byla v programu WinStereology hodnocena oblast levé komory zasažená ischemií (AR) a procentuální velikost infarktu (IS) vyjádřené jako IS/AR (Obr. 5).



Obrázek 5: Vzor fixovaného řezu levé komory srdeční. Tmavá oblast = nezasažená viabilní tkáň, obarvena roztokem anganistanu; červená oblast = oblast zasažení (AR), obarveno TTC; bílá oblast = infarkt myokardu (IS)

Výsledky hodnocení byly zpracované pomocí programu GraphPad Prism 7. Mezi dvěma skupinami byla statistická analýza provedena pomocí t-testu. Pro porovnání rozdílů více hodnot byla využita analýza ANOVA.

4.2. ELISA

4.2.1. Zvířata a chladová aklimace

Pro stanovení koncentrace IL-6 a IL-10 v homogenátu byly použity levé srdeční komory samců kmene Wistar (Velaz s.r.o.), pro stanovení koncentrace FGF21 a IL-6 v séru byly použity vzorky séra kontrolních a aklimovaných samců kmene Wistar (Velaz s.r.o.).

Samci byli chováni v páru v klecích s podestýlkou, s vodou a standardní dietou ST1 *ad libitum*. Počáteční hmotnost zvířat odebraných pro experiment v říjnu 2021 byla 323 ± 26 g. Po náhodném rozdělení potkanů do čtyř skupin byla kontrolní skupina chována ve $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Skupiny akutní chladové aklimace byly chovány při teplotě 8 ± 1 °C po dobu jednoho dne (1D), tří dnů (3D), nebo deseti dnů (10D).

4.2.2. Odběr tkání a homogenizace srdce

Potkanům v hluboké anestezii (i.p. Thiopental 60 mg/kg) byla odebrána arteriální krev do zkumavky, po sedimentaci byla krev stočena při 15 000x g po dobu 10 min a 4 °C (centrifuga Hettich Universal 32 R). Vzniklé vzorky séra byly mrazeny v tekutém dusíku a skladovány v -80 °C. Po odebrání vzorku krve bylo odebráno srdce do studeného fyziologického roztoku. Na ledu bylo rozděleno na tři části, tj. levá komora, septum, pravá komora. Všechny části byly okamžitě mrazeny v tekutém dusíku a po zvážení uchovávány v -80°C.

Vzorky séra byly rozmrazeny na ledu, promíchány a centrifugovány (10 000x g, 10 min, 4 °C). Sérové koncentrace IL-6 a FGF21 byly měřeny pomocí souprav ELISA: Rat IL-6 ELISA Kit (ThermoFisher Scientific, ERA31RB) a Rat FGF-21 ELISA Kit (Abcam, ab223589). Vzorky séra byly zředěny 1:1 pomocí ředícího pufru. Dle návodu byly připraveny kalibrační křivky v koncentracích odpovídajících předpokládaným výsledkům u jednotlivých cytokinů, a blank. Test byl zpracován dle pokynů výrobce. Koncentrace proteinů v homogenátu byly stanoveny dle Bradforda (Sigma) na základě kalibrační křivky dle firemního návodu spektrofotometricky pomocí Microplate reader Synergy HT, BioTek při absorbanci 450 nm.

Koncentrace IL-6 a IL-10 v homogenátu srdeční tkáně byly stanoveny za použití ELISA kitů: Rat IL-6 ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, BMS625) a IL-10 Rat ELISA Kit (Abcam, ab100764). Hluboce zmrazené levé srdeční komory byly rozetřeny v třecí misce v tekutém dusíku. Rozdrcená tkáň byla přenesena do předvážených mikrozkuvek s 800 µl MES pufru s obsahem Tween (TMES) a doplněna v poměru 1:1,5 [hmotnost tkáně (mg) ku objem TMES (µl)]. Vzorky homogenátu byly promíchány a následně zbaveny debris centrifugací (10 min při 1500 RPM, Hettich Universal 32 R). Supernatant byl odebrán do připravených mikrozkuvek a pipetován na připravené destičky podle návodu výrobce s ostatními reagensy („Assay Buffer“, Biotin konjugát) a následně inkubovány po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Po inkubaci byly jamky promyty pomocí „Wash Buffer“ a do každé z nich byl přidán Straptavidin-HRP. Po hodinové inkubaci v pokojové teplotě byly jamky opět vymyty pomocí „Wash Buffer“. Po přidání „TMP Development Solution“ bylo během 10 min inkubace rozvinuto modré zbarvení. Tato reakce byla následně zastavena přidáním „Stop Solution“, který

zastavil probíhající barevnou reakci. Koncentrace cytokinů je přímo úměrná intenzitě stanovené při 450 nm (Microplate reader Synergy HT, Biotek, USA).

4.2.3. *Statistická analýza*

Získaná data byla hodnocena jednocestným ANOVA testem. Pro vyhodnocení výsledků byl použit program GraphPad Prism 7.

4.3. Zavedení metody izolace kardiomyocytů

4.3.1. *Zvířata a chladová aklimace*

V rámci třetího cíle byla zavedena metoda pro izolaci kardiomyocytů dle Zahradníka a Paladea (Zahradník and Palade, 1993). Byli použiti samci potkanů Wistar, s chovným jádrem Charles River (dodavatel Velaz s.r.o.). Hmotnost použitých zvířat činila 422 ± 39 g. Potkani byli chováni v párech ve standardních klecích s podestýlkou, s volným přístupem k vodě i standardní potravě ST1 ve světelném režimu L/D 12/12.

Po náhodném rozdělení do dvou experimentálních skupin byla kontrolní skupina (C) chována při teplotě $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Skupina akutní chladové aklimace byla chována při teplotě $8 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 10 dnů (10D).

4.3.2. *Izolace kardiomyocytů*

Pro izolaci kardiomyocytů byl použit Tyrodeův roztok (Tabulka 1) připravený v Milli-Q vodě a probublávaný medicínálním kyslíkem po dobu 15 min. Na kalibrovaném pH-metru bylo dorovnáno pH roztoku na 7,35 a byl doplněn objem roztoku.

Tabulka 1: Tyrodeův základní roztok. Navážka chemikálií pro přípravu 0,5 litru Tyrodeova roztoku a výsledná molarita jednotlivých látek.

látká	molarita [mM]	navážka [g] na 0,5 l
NaCl	135	3,94
KCl	5,4	0,21
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1,2	0,15
HEPES	10	1,19
NaH ₂ PO ₄ * 1H ₂ O	1,2	0,08
Kreatin	10	0,66
Taurin	10	0,63
Glukóza	10	0,90

Dále byl připraven oddělený Tyrodeův roztok (0 Ca^{2+}), vápníkový Tyrodeův roztok (přídavkem 1 mM Ca^{2+}), roztok liberázy (Liberase TM Research Grade, Cat. No. 05401127001, Roche) v Tyrodeově roztoku a Tyrodeův roztok pro frakce s 10% hovězím sérovým albuminem.

Langendorffův perfúzní aparát byl pomocí pumpy (Minipuls 3 Peristaltic Pump, Gilson) naplněn liberázou. Do nádob aparatury byly nality roztoky 1 mM Ca^{2+} a 0 Ca^{2+} . Z aparatury byly důkladně odstraněny bubliny a roztoky byly vytemperovány na 37°C pomocí vodní lázně (Thermo Haake DC 10 P5, Thermo Haake).

Kardiomyocyty byly izolovány ze srdce odebraného z potkana v hluboké anestezii (i.p. Thiopental 60 mg/kg). Srdce bylo retrográdně promýváno na Langendorffově aparátu Tyrodeovým roztokem s vápníkem (viz výše) až do průtoku čirého efluentu a následně relaxováno bezvápníkovým médiem. Poté byla svalovina srdce natrávena promýváním liberázou ($0,05 - 0,2 \text{ mg/ml}$, (Cagalinec et al., 2019)) po dobu maximálně 12 minut. Roztoky byly v aparatuře probublávány kyslíkem a temperovány na 37°C . Srdce bylo během perfúze umístěno ve vyhřívané komůrce, kde byla udržována stálá teplota 37°C . Změklé srdce bylo sejmuto z kanyly a levá komora byla nastříhána na menší kousky.

Nastříhaná tkáň byla přecezena do zkumavky 0 a centrifugována po dobu 2 min na 300 RPM (Centrifuga Labnet Spectrafuge 6C, Verkon), zbylá tkáň byla přenesena do lahvičky s frakčním roztokem o teplotě 37°C . Lahvička byla vložena do termobloku (Grant QBA1 Heater, Grant) (37°C) na 5 min. Po odsátí supernatantu byl do zkumavky přidán 1 ml výstupního roztoku. Tento proces byl opakován až do získání minimálně pěti frakcí (Obr. 6).



Obrázek 6: Očíslované zkumavky se sítkem a trychtýřem připravené pro přípravu frakcí.

Frakce byly prohlédnuty pod světelným mikroskopem (Olympus CX31, zvětšení 10x) pro ověření hustoty a viability kardiomyocytů. K počítání kardiomyocytů byla použita Bürkerova počítací komůrka, ve které byla počítána viabilita kardiomyocytů díky barvení trypanovou modří v poměru 1:1. Trypanová modř proniká porézní membránou poškozených kardiomyocytů, barví buňku a indikuje tak ireverzibilní poškození buňky. Živé buňky zůstávají neobarvené (Altschuld et al., 1980).

Výpočet viability

Na Bürkerově komůrce bylo přepočítáno množství kardiomyocytů. Viabilita byla vypočítána dle vzorce:

$$V = \frac{N_L}{N} \times 100$$

$$[V] = \%$$

V – viabilita (uváděná v procentech), N_L – počet živých buněk, N – celkový počet buněk.

Výpočet hustoty buněk na mřížce

Pro dostatečnou hustotu buněk na mřížce pro další analýzy byl vypočítán počet buněk v jednom mililitru suspenze (Vejražka, 2004):

$$P = \frac{N \times D \times 1000}{H \times S}$$

$$P = \frac{N \times 2 \times 1000}{0,1 \times 3}$$

$$[P] = 1$$

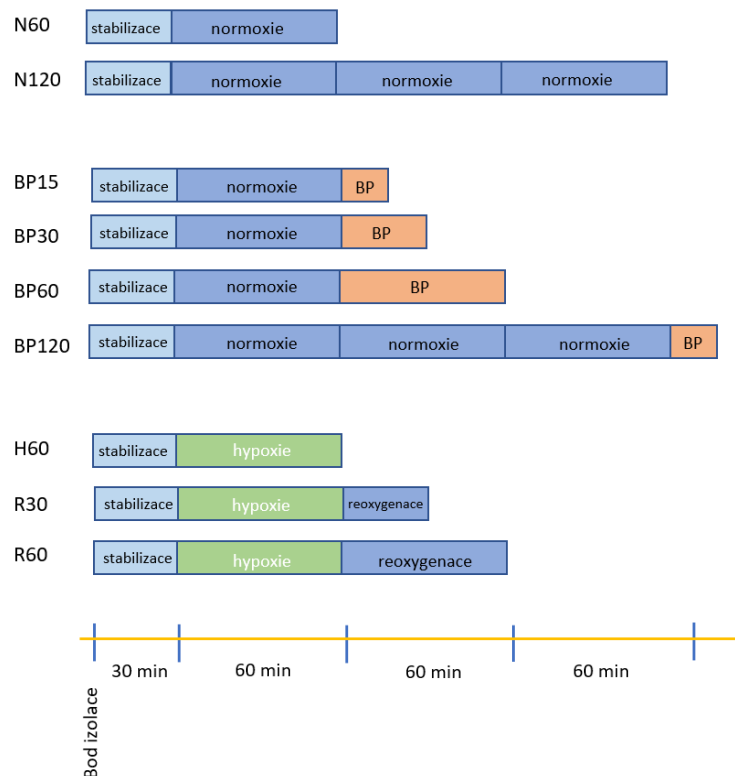
P – počet buněk v 1 ml suspenze, N – celkový počet buněk, D – ředění (1:1 s trypanovou modří), H – hloubka komůrky (0,1 mm), S – počet polí, kde bylo počítáno N

4.3.3. Viabilita kardiomyocytů po hypoxii a oxidativním stresu

Suspenze kardiomyocytů byla naředěna na vhodnou koncentraci buněk, tj. $3-8 \times 10^5$ buněk v 1 ml suspenze, a zpracována následovně: Byly připraveny dvě 96-jamkové destičky, první pro kontrolní normoxický protokol s působením tert-Butylhydroperoxidu (BP) a druhá

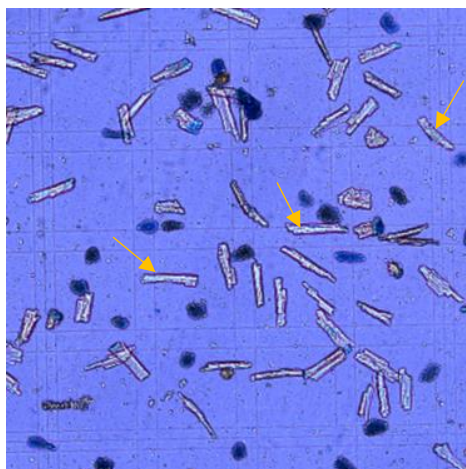
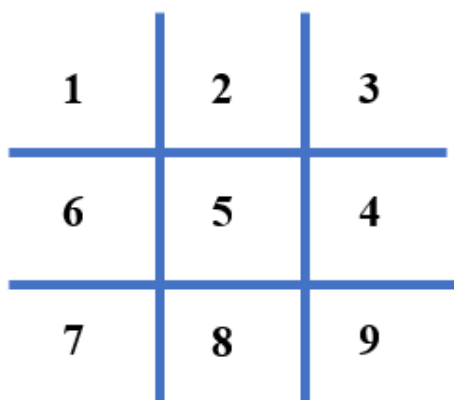
pro hypoxická měření dle schématu uvedeného v Obr.7. Do obou destiček byla rozpipetována suspenze po 100 μ l do každé jamky a destičky byly ponechány 30 min stabilizaci při 37 °C. Po fázi stabilizace byla kontrolní destička ponechána v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂) (Multi-gas Incubator MCO-19M, Sanyo), zatímco hypoxická destička byla vložena do hypoxické komory (37 °C, 5 % CO₂, 0,5 % O₂) (ProOx C21 Hypoxia Chamber, BioSpherix). Po ustálení hladiny kyslíku na 0,5 % byla počítána 60-min hypoxie.

Po hodinové hypoxii byly destičky s kardiomyocyty vyjmuty z inkubátoru a snímány fluorescenčním mikroskopem Leica DM6_P42. Buňky byly pod pětinasobným zvětšením pomocí programu LAS X (Leica Application Suite X, Leica Microsystems) nasnímány ve skupinách pro následné hodnocení viability.



Obrázek 7: Schéma skupin izolovaných kardiomyocytů pro snímání. Na konci svého protokolu byla každá skupina nasnímána. Všechny skupiny na začátku protokolu podstoupily 30 min stabilizaci. N60 = 60 min inkubace v normoxickém prostředí; N120 = 60 min inkubace plus 120 min normoxie; BP15 = přidáván tert-Butylhydroperoxid (BP; 4 μ l/ 0,2 mM) na 15 min v normoxii; BP30 = BP na 30 min v normoxii; BP60 = BP na 60 min v normoxii; BP120 = 60 plus 120 min normoxie, BP na 15 min; H60 = vystavena 60 min hypoxii; R30 = 60 min hypoxie a 30 min reoxygenace; R60 = 60 min hypoxie a 60 min reoxygenace

Každé pole na Bürkerově komůrce bylo snímáno jednotlivě. Pořadí hodnocených polí bylo zachovááno v pořadí uvedeném na schématu (Obr. 8).

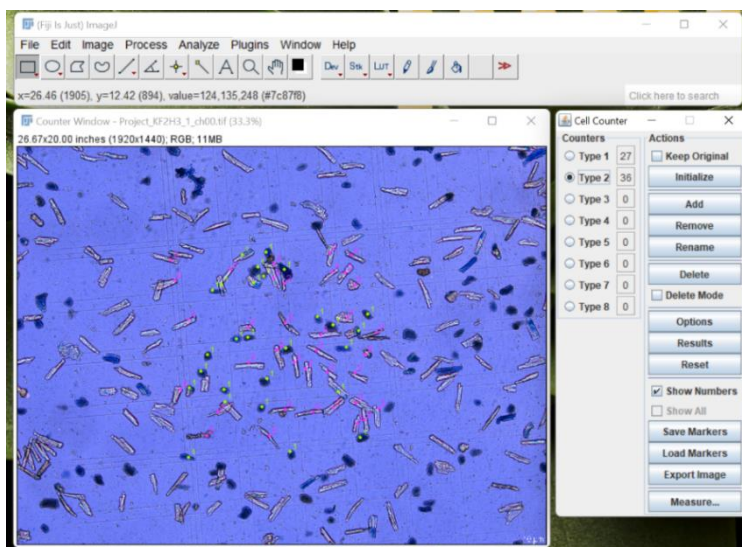


Obrázek 8: Schéma určující pořadí hodnocených polí Bürkerovy komůrky

Obrázek 9: snímek hodnoceného pole Bürkerovy komůrky, barveno trypanovou modří (1:1), zvětšení 5x, šipkami jsou označeny živé neobarvené buňky

4.3.4. Hodnocení výsledků viability kardiomyocytů

V rámci hodnocení viability kardiomyocytů byl počítán poměr živých a mrtvých buněk (Obr. 9) (založeno na barvení trypanovou modří) za pomoci programu Fiji – ImageJ (Obr. 10). Pro každé zvíře byl počítán průměr ze tří čtvercových polí v diagonální rovině Bürkerovy komůrky.



Obrázek 10: počítání buněk v programu Fiji-ImageJ, zelenou barvou jsou značeny mrtvé buňky, růžovou barvou živé

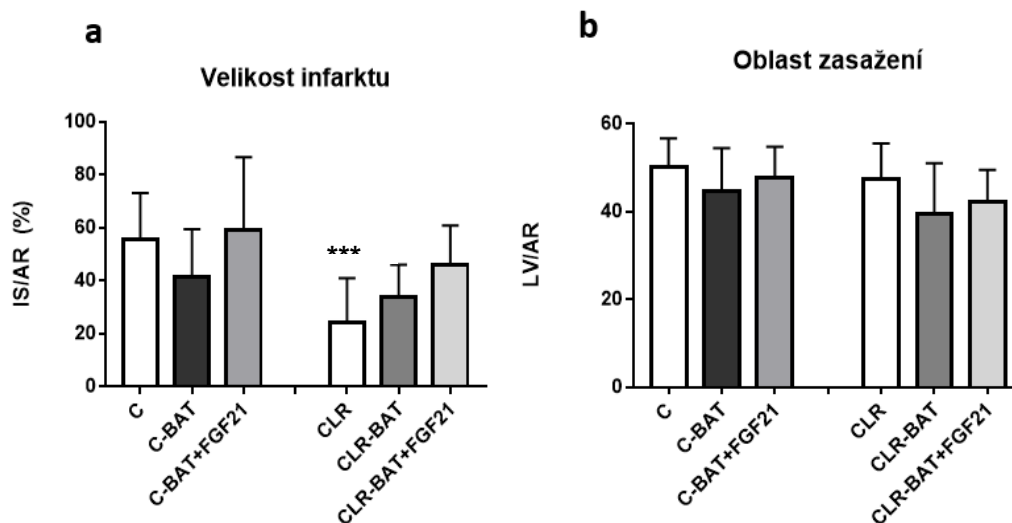
Získaná data byla statisticky zpracována v programu GraphPad Prism 7 pomocí dvoucestné analýzy ANOVA.

5. Výsledky

5.1. Vliv akutní ablace BAT a exogenního FGF21 na velikost infarktu po chronickém vystavení chladu

Velikost infarktu po 20 min ischemie a 3 h reperfúze je vyjádřena jako poměr ischemické ku zasažené oblasti myokardu (IS/AR) (Graf 1a). Velikost infarktu po 4 týdnech aklimace na mírný chlad (9 °C) a následné regresi (CLR) se signifikantně snížila z kontrolních (C) 56 ± 14 % (n = 12) na 24 ± 14 % (n=12), při zachování velikosti oblasti zasažení (AR) (Graf 1b). Chirurgická ablace BAT 2 hodiny před ischemií neměla signifikantní vliv na velikosti infarktu ani u kontrolní (C-BAT) (IS, 41 ± 14 %, n = 12), ani u regresní skupiny (CLR-BAT) (IS, 34 ± 10 %, n = 11). Mezi kontrolními a regresními skupinami po ablaci BAT není rozdíl. Externí podání FGF21 mimetika (C-BAT+FGF21) nevyvolalo signifikantní změny (IS, 59 ± 21 %, n = 3) u kontrol, ani u regresní skupiny s ablací BAT (CLR-BAT+FGF21) (IS, 46 ± 13 %, n = 12) (Graf 1a).

Velikost oblasti zasažení ischemií (AR) se napříč skupinami nelišila, pro kontrolní skupinu (C) byla 50 ± 6 %, pro kontrolní skupinu s ablací BAT (C-BAT) činila 45 ± 7 %, pro kontrolní skupinu s ablací BAT a podáním FGF21 (C-BAT+FGF21) 48 ± 5 %, pro regresní skupinu (CLR) 47 ± 7 %, pro regresní skupinu s ablací BAT (CLR-BAT) 39 ± 9 %, pro regresní skupinu s ablací BAT a podáním FGF21 (CLR-BAT+FGF21) 42 ± 6 % (Graf 1b).



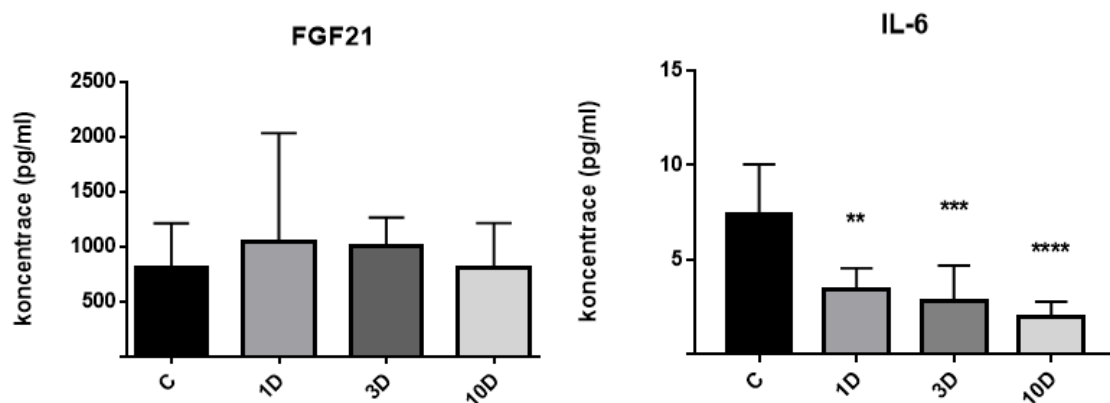
Graf 1: Vliv ablace BAT na velikost infarktu a následné podání FGF21 u kontrolní (C) a aklimované skupiny po dvou týdnech navrácené do kontrolní teploty (CLR). C = kontrolní skupina, chovaná ve 24 °C (n=12); C-BAT = kontrolní skupina, chovaná ve 24 °C, ablace

BAT(n=12); C-BAT+FGF21 = kontrolní skupina, chovaná ve 24 °C, ablace BAT, podán FGF21(n=3); CLR = regresní skupina, chovaná v 9 °C (4 týdny) + návrat do 24 °C (1 týden) (n=12); CLR-BAT = regresní skupina, chovaná v 9 °C (4 týdny) + návrat do 24 °C (1 týden), ablace BAT(n=11); CLR-BAT+FGF21 = regresní skupina, chovaná v 9 °C (4 týdny) + návrat do 24 °C (1 týden), odebrán BAT, podán FGF21(n=12). Data byla analyzována jednocestnou metodou ANOVA s Tukeyovým vícenásobným srovnávacím testem. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD. *** $p < 0,0003$.

Z výsledků vyplývá, že ablace BAT ani administrace FGF21 neměly signifikantní vliv na velikost infarktu (Graf 1a).

5.2. Hladiny batokinů v séru a markery zánětu v srdci

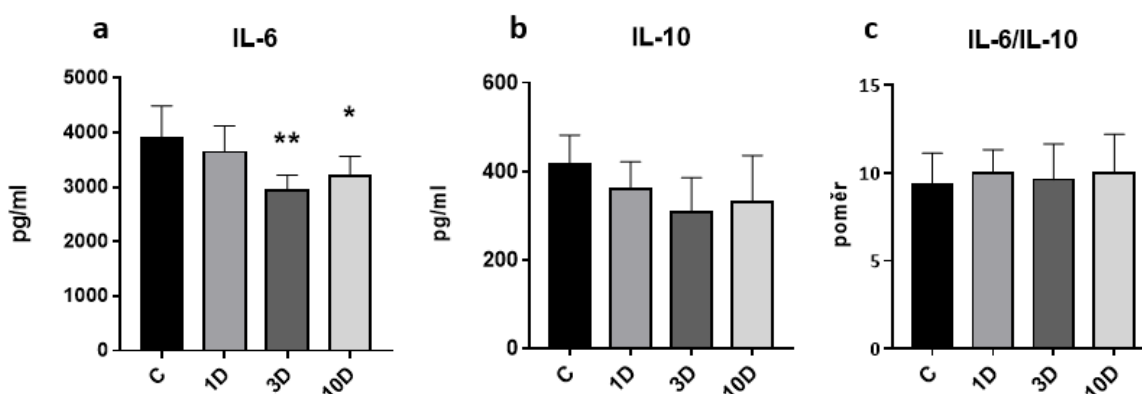
Graf 2 zobrazuje výsledky koncentrací FGF21 a IL-6 v séru. V případě FGF21 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl napříč adaptacemi. U IL-6 lze pozorovat postupný pokles koncentrace proteinu u séra s prodlužující se akutní aklimací na mírný chlad. V případě IL-6 došlo k výraznému poklesu: 1D pokles o 54 %, 3D pokles o 62 %, 10D pokles o 74 % ve srovnání s kontrolou.



Graf 2: Koncentrace FGF21, IL-6 a IL-10 ve vzorcích séra z arteriální krve kontrolních potkanů (C) a po akutní expozici chladu 1 den (1D), 3 dny (3D) a 10 dní (10D). Porovnávány byly kontrolní skupina (chována ve 24 °C, n = 6) a skupiny akutního chladu (9 ± 1 °C) chované ve snížené teplotě 1/3/10 dnů (1D/3D/10D; n = 6). Data byla analyzována jednocestnou metodou ANOVA s Dunettovým vícenásobným srovnávacím testem. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD. ** $p < 0,0024$; *** $p < 0,0006$; **** $p < 0,0001$.

Graf 3 zobrazuje výsledky koncentrací IL-6 a IL-10 v homogenátu levé komory. Hladina IL-6 se signifikantně snižuje s postupující aklimací na akutní chlad ve srovnání s kontrolou: 1D vedlo ke snížení IL-6 o 6,5 %, 3D pokles o 24,9 %, 10D pokles o 17,6 % (Graf 3a).

V případě IL-10 nedochází k signifikantním změnám (Graf 3b). Na Grafu 3c je znázorněn poměr pro- a protizánětlivých cytokinů v homogenátu srdce.



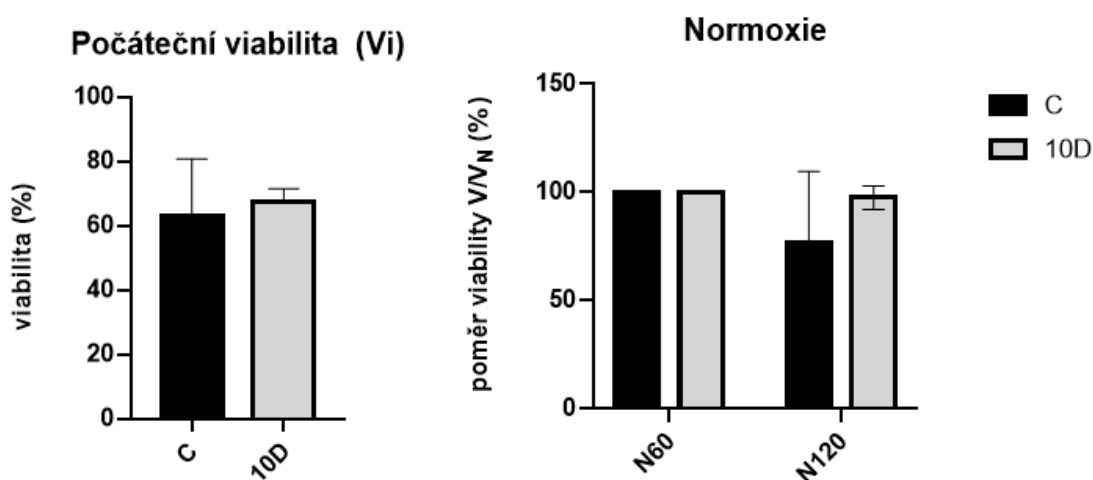
Graf 3: Analýza koncentrace IL-6 a IL-10 ve vzorcích homogenátu srdeční tkáně (a,b). V grafu c je znázorněn poměr IL-6/IL-10. Porovnávány byly kontrolní skupina (chována ve 24 °C, n = 6) a skupiny akutního chladu (9±1 °C) chované ve snížené teplotě 1/3/10 dnů (1D/3D/10D; n = 6). Data byla analyzována jednocestnou metodou ANOVA s Dunettovým vícenásobným srovnávacím testem. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD. *p <0,039; **p <0,003.

5.3. Zavedení metody izolace dospělých kardiomyocytů a měření viability

Stanovení viability izolovaných kardiomyocytů je významný experimentální přístup, který umožňuje ověřit kardioprotektivní mechanismus jednotlivých signálních drah s využitím specifických inhibitorů, které nelze aplikovat na úrovni organismu. Metoda izolace kardiomyocytů byla zavedena pod vedením RNDr. Barbary Elsnicové, Ph.D., a ve spolupráci s Bc. Martinou Csomovou podle Zahradníka a Paladea (Zahradník and Palade, 1993). Zavedení této metody je klíčové pro použití hybridního multidetekčního readeru, Cytation 5 (Cytation 5, BioTek), který umožní použití více inhibitorů na buňkách pocházejících od jednoho zvířete. Díky tomu bude možné ušetřit laboratorní zvířata i finanční prostředky.

V této práci bylo srovnáváno přežívání buněk izolovaných z kontrolních (C; n = 10) a chladově aklimovaných zvířat (10D; n = 6). Na výsledcích je patrná tendence kardioprotektivního vlivu 10D chladové aklimace při ±8 °C, avšak vzhledem k vysokému rozptylu dat nebylo dosaženo signifikance. Metoda vyžaduje rutinní provedení.

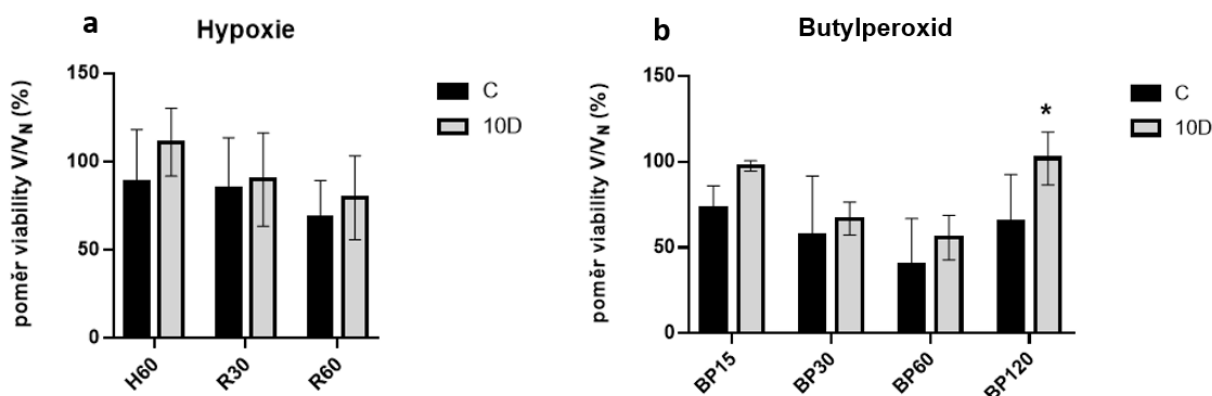
V grafu níže je srovnávána počáteční viabilita izolovaných kardiomyocytů u kontrolních a chladově aklimovaných zvířat. Jedná se o reálná procenta počátečního výtěžku viabilních kardiomyocytů (V_i , initial). Tato počáteční viabilita se signifikantně nelišila. Dále bylo srovnáváno přežívání kardiomyocytů z kontrolních a aklimovaných zvířat v čase po 60 min normoxii (N60) a 120 min normoxii (N120). Hodnota N60 byla používána jako kontrolní hodnota pro další experimenty, a byla vzata jako 100 %. Další hodnoty jsou tak uváděny jako poměr viability buněk (V) a hodnotu N60 (V_N). Buňky izolované z aklimovaných zvířat měly mírně zvýšené přežívání v čase.



Graf 4: Počáteční viabilita kardiomyocytů (a) a přežívání izolovaných buněk v čase (b). Počáteční viabilita se nelišila u kontrolních (C, $n = 10$) a adaptovaných zvířat (10D, $n = 6$). Přežívání buněk po 60 min normoxii (N60) a 120 min normoxii (N120) ukázalo tendenci k vyšší odolnosti buněk izolovaných z chladově adaptovaných zvířat. Data počáteční viability byla zpracována pomocí nepárového t testu. Data přežívání buněk v normoxii byla analyzována pomocí dvoucestné ANOVA s Sidakovým vícenásobným srovnávacím testem a jsou uvedena jako průměr \pm SD.

Dále byl pozorován vliv hypoxie a následné reoxygenace na viabilitu kardiomyocytů. Srovnávány byly kardiomyocyty z kontrolních a adaptovaných zvířat v podmínkách 60 min hypoxie (H60), následné 30 min reoxygenace (R30) a 60 min reoxygenace (R60) (Obr. 7). Lze zde pozorovat tendenci ke zvýšení viability po 10D aklimaci (Graf 5a), která nedosáhla signifikance vzhledem k relativně vysoké variabilitě hodnot. Vystavení kardiomyocytů oxidativnímu stresu v podobě aplikace tert-Butylperoxidu (BP; 0,2 mM) po dobu 15, 30, nebo 60 min (BP15, BP30, BP60) neukázalo signifikantní rozdíl viability u C a 10D, avšak

po 15 min působení BP po 120 min normoxie byla viabilita kardiomyocytů z adaptovaných zvířat signifikantně vyšší (Graf 5b).



Graf 5: Vliv hypoxie a oxidativního stresu na viabilitu kardiomyocytů. Hodnoty viability pro jednotlivé skupiny jsou uváděny jako poměr viability v daném bodě intervence (V) a viability před intervencí (V_N). Statistické rozdíly jsou porovnávány pouze mezi kontrolními (C; $n = 10$) a chladově aklimovanými zvířaty (10D; $n = 6$).; H60 = vystavena 60 min hypoxii; R30 = 60 min hypoxie a 30 min reoxygenace; R60 = 60 min hypoxie a 60 min reoxygenace; BP15 = přidáván tert-Butyl hydroperoxid (BP; 0,2 mM) na 15 min v normoxii; BP30 = BP na 30 min v normoxii; BP60 = BP na 60 min v normoxii; BP120 = 180 min normoxie, BP na 15 min (Obr. 7). Data přežívání buněk v normoxii byla analyzována pomocí dvoucestné ANOVA s Sidakovým vícenásobným srovnávacím testem a jsou uvedena jako průměr \pm SD. * $p < 0,026$

6. Diskuze

6.1. Vliv ablace BAT a administrace FGF21

Na základě literárních údajů a našich předchozích výsledku vznikl předpoklad, že mechanismus kardioprotektivního efektu vyvolaného aklimací na mírný chlad může souviset s produkcí FGF21 z BAT v průběhu či po vystavení chladu a při akutní ischemii srdce, kdy dochází k aktivaci adrenergního systému v poplachové odpovědi organismu. V této práci jsme zjistili, že akutní ablace interskapulárního BAT zrušila kardioprotektivní efekt chladu, avšak kontrola po ablaci BAT měla sníženou velikost infarktu s velkým rozptylem, a tudíž tento efekt není prokazatelný. Podobně následné podání externího FGF21 mimetika nemělo vliv ve smyslu snížení velikosti I/R poškození srdce, spíše naopak.

Z literatury je známo, že chirurgická ablace interskapulárního, cervikálního a axilárního BAT vede u potkanů k redukci celkového množství BAT na 60 %. Po ablaci BAT z těchto depotů

navíc dochází k rapidní kompenzační expanzi ostatních depotů BAT, až po dobu několika dní (Horwitz et al., 1985; Rothwell and Stock, 1989). Ablace v našem experimentu byla akutní, a doba před okluzí odpovídala krátkému poločasu rozpadu FGF21 (30 min až 2 hodiny) *in vivo* (Kharitonov et al., 2007; Xu et al., 2009). BAT byl proto odebírán 2 hodiny před I/R poškozením. Proto můžeme vyloučit kompenzační odpověď po ablaci BAT. Oproti tomu u myši nebyla po ablaci interskapulárního BAT pozorována natolik intenzivní odpověď jako u potkana (Grunewald et al., 2018). Je tedy možné, že na úrovni druhu se mohou následky ablace BAT lišit. U laboratorních hlodavců má chirurgické odstranění BAT rozličné dopady na energetický metabolismus organismu, od tendence k navyšování tělesné váhy až po malé změny v glykemické homeostáze nebo lipidemii (Moore et al., 1985; Stern et al., 1984). U myši bylo dokonce po ablaci interskapulárního BAT zaznamenáno zvýšení tuhosti aorty, což bylo pravděpodobně způsobeno sníženou sekreční aktivitou BAT (Grunewald et al., 2018). V posledních letech byla metoda chirurgického odstranění BAT využita, jako experimentální nástroj k ověření funkce BAT, jako zdroje myostatinu (Kong et al., 2018) a 12,13-dihydroxy-9Z-oktadekanové kyseliny (Stanford et al., 2018). Ablace BAT vedla ke zvýšené kapacitě cvičení (Kong et al., 2018) a oxidaci mastných kyselin v kosterním svalstvu (Stanford et al., 2018). Dle studie Zhao et al. chirurgické odstranění BAT před I/R výrazně oslabuje kardioprotektivní účinky cvičení, což BAT uvádí do role klíčové extrakardiální tkáně zajišťující kardioprotekci při zátěži. Jejich studie je první, která v kontextu cvičení a I/R poškození odhaluje komunikační dráhu BAT–kardiomyocyty zajištěnou malými extracelulárními vezikuly. Myši v tomto experimentu podstoupily chirurgickou ablaci BAT 48 hodin před I/R poškozením (Zhao et al., 2022). V našem případě odstranění BAT před chladovou aklimací nepřichází v úvahu, neboť je nezbytný pro samotný adaptivní proces.

Co se týká FGF21, Hu et al., kteří ve své práci využili I/R protokol, tj. 30-min okluze následovaná 2-h reperfúzí, na potkanech kmene Wistar a použili následující skupiny: sham (bez okluze), I/R (standardní protokol), I/R+FGF21 (navíc podání FGF21). Skupině I/R+FGF21 byl FGF21 podáván intraperitoneálně (0,1 mg/kg/den) po dobu 4 týdnů. Studie ukázala, že chronicky podávaný FGF21 výrazně omezil rozsah infarktu myokardu po I/R poškození, snížil apoptózu způsobenou I/R a snížil i sérové hladiny LDH, TNF- α a IL-6 po I/R poškození. Dále FGF21 inhiboval procesy vyvolané I/R protokolem, jako jsou pokles hladiny miR-145 a nárůst exprese angiopoetinu 2, biomarkeru kardiovaskulárních onemocnění, a pokles autofagie (Hu et al., 2018). V naší práci byla zvolena dávka 1 mg/kg, i.p., jednalo se o dávku zvolenou na základě následujících studií. Na základě těchto studií jsme se také rozhodli pro podávání FGF21

mimetika PF-05231023, které literatura označuje jako vhodné pro substituční použití (Bernardo et al., 2015) a jeho cenová dostupnost z něj činí vhodnou alternativu samotného FGF21. Potkanům Zucker byl denně subkutánně podáván FGF21 (s.c., 1,32 mg/kg) nebo dvakrát týdně po dobu dvou týdnů PF-05231023 (s.c., 3 mg/kg nebo 10 mg/kg), za účelem stanovení příspěvku jater a BAT ke zlepšení metabolismu u potkanů Zucker a myši s obezitou indukovanou dietou. Mezi podávanými látkami nebyl shledán rozdílný vliv. Podání PF-05231023 neovlivnilo tělesnou hmotnost ani příjem potravy, zlepšilo však glykemickou kontrolu u potkanů Zucker (Bernardo et al., 2015). Turner et al. zkoumali vliv FGF21 na homeostázi tekutin u potkanů pomocí mimetika PF-05231023. Akutní podání PF-05231023 (i.v. 1 mg/kg) výrazně zvýšilo příjem vody, kterému předcházelo zvýšené vylučování moči. Dále mimetikum rychle a výrazně zvýšilo tepovou frekvenci a tlak krve u potkanů s implantovaným telemetrem, ještě předtím, než byly patrné změny v příjmu a vylučování. Zvýšený příjem vody vlivem FGF21 tak může být sekundární k diuréze, která může být kompenzačním mechanismem akutní hypertenze způsobené FGF21. Látka byla podána jednu hodinu před začátkem temnotní fáze a zvířata byla umístěna v metabolických klecích s přístupem k vodě a potravě *ad libitum* (Turner et al., 2018).

Naše výsledky ablace BAT a administrace FGF21 mimetika podané 2 hodiny před I/R poškozením nepotvrdily nálezy v literatuře, což může být dáno akutním odebráním BAT před navozením ischemie. I přesto, že tento zákrok probíhal v anestezii, tendence ke snížení velikosti infarktu po ablaci u kontrol naznačuje stresovou reakci organismu a s tím související efekt preconditioningu. Navíc získané hodnoty velikosti infarktů byly zatíženy nezvykle velkým rozptylem dat. Samotná ablace BAT tendenčně snižovala velikost infarktu u teplových zvířat a u chladových byla tendence ke zvýšení rozsahu infarktu. Následně mezi teplovou skupinou a chladovou nebyl rozdíl. Co se týká FGF21 mimetika, z důvodu omezeného počtu zvířat jsme byli nuceni snížit n ve skupině C-BAT+FGF21, ale u chladové skupiny v plném počtu zvířat došlo k jasné tendenci zhoršení infarktu proti intaktní CLR. Velikost infarktu u experimentálních skupin vykazovala u adaptovaných zvířat jasné trendy ke zhoršení po intervencích, ale nelišila se signifikantně.

6.2. FGF21 a IL-6 v séru a levé komoře

V naší práci jsme nepozorovali změny v koncentraci FGF21 hladin v séru u chladově aklimovaných skupin ve srovnání s kontrolou. Z tohoto pohledu můžeme autokrinní kardioprotektivní působení FGF21 při akutním mírném chladu vyloučit, což je v souladu s negativními výsledky u externího podání po ablaci BAT. Oproti tomu došlo v případě myši vystavených teplotě 4 °C po dobu 15 dní ke zvýšení hladin FGF21 a prozánětlivých cytokinů, ve srovnání s termoneutralními kontrolami (Bal et al., 2017). Ve studii prováděné na lidských subjektech bylo také pozorováno zvýšení sérových hladin FGF21 paralelně se zvýšenou aktivitou BAT, a to po vystavení subjektů 10-dennímu chladu (15 – 16°C po dobu 2 – 6 h/den) (Hanssen et al., 2015). Stejně tomu bylo i u zdravých lidských subjektů vystavených 19°C po dobu 12 hodin (Lee et al., 2013). Náš náleží tudíž není v souladu s literaturou. Měření koncentrace FGF21 v séru by bylo vhodné zopakovat, za přísného dodržení předepsaných postupů.

Zajímavý náleží v naší práci se týkal prozánětlivého cytokinu IL-6, jehož hladina v séru s postupující akutní mírnou chladovou aklimací významně klesá (Graf 2b). Obdobně se v průběhu chladu snižovala i koncentrace IL-6 v homogenátu srdeční tkáně (Graf 3a), zatímco koncentrace IL-10 zůstala nezměněna (Graf 3b). Na protizánětlivý cytokin IL-10 jsme se zaměřili mimo jiné kvůli nedávným poznatkům o jeho kardioprotektivní roli po infarktu myokardu. Ve studii Junga et al. se ukázalo, že infuze IL-10 po infarktu myokardu snižuje zánět a usnadňuje hojení (Jung et al., 2017). Můžeme tedy říci, že se srdce v akutním chladovém modelu nachází v mírně protizánětlivém stavu. Kardioprotektivní role batokinu IL-6, známého regulátoru růstu BAT (Kristóf et al., 2019), je z našeho pohledu nepravděpodobná. Studie Dawna et al. a Smarta et al. však sdílí jiný úhel pohledu. V naivním myokardu IL-6 kardioprotekci nevyvolává, avšak ve fázi preconditioningu je nezbytný pro aktivaci JAK/STAT dráhy, která vede k rozvoji kardioprotektivního fenotypu (Dawn et al., 2004). Akutní podání IL-6 *in vitro* (izolované kardiomyocyty) vedlo ve studii Smarta et al. k zvýšení exprese iNOS a NO-dependetní suprese kalciových kanálů, která souvisí s kontrakcemi kardiomyocytů. Tyto účinky vedly v reakci na IL-6 ke zvýšení polarizace vnitřní mitochondriální membrány a obsahu mitochondriálního vápníku. Podání IL-6 rozvinulo u izolovaných kardiomyocytů podrobených simulovanému I/R poškození kardioprotektivní fenotyp. IL-6 indukoval PI3-kinázu a cytoprotekci závislou na NO. Cytokiny tak mohou být důležitým cílem pro léčbu post-infarktové remodelace a srdečního selhání stejně jako pro další studium kardioprotektivních signálních drah (Smart et al., 2006).

Úloha IL-6 byla dokumentována také ve studii na IL-6-deficientních myších (IL-6^{-/-}), kde se ukázalo, že nedostatek endogenního IL-6 souvisí se zvýšením energetického výdeje během vystavení stresu v novém prostředí a při vystavení chladu. IL-6^{-/-} myši měly nižší tělesnou teplotu než WT myši, zejména během vystavení chladu. Celkově byl u myši bez IL-6 snížen výdej energie a termogeneze. V souladu s tím je, že se nedostatek IL-6 v reakci na mírný stres a vystavení chladu projevil nižší spotřebou kyslíku. Myši použité v této studii byly chovány v teplotách 30 °C (8 h), 20 °C (8 h), 4 °C (6 h) (Wernstedt et al., 2006).

IL-6 je studován stále podrobněji, především proto, že přetrvávající produkce IL-6 je pozorována u různých zánětlivých a/nebo autoimunitních onemocnění, a může být navozena i u zvířecích modelů. K potlačení negativních dopadů těchto onemocnění existují dva klinicky registrované inhibitory IL-6, tj. siltuximab (anti-IL-6 mAb) a tocilizumab (anti-IL-6R mAb) (shrnuto v Rossi et al., 2015). Tocilizumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti receptoru IL-6, která blokuje přenos signálu zprostředkovaný inhibicí vazby IL-6 na transmembránový receptor. Od jeho vzniku potvrdily různé studie jeho výjimečnou účinnost a vedly ke schválení tocilizumabu jako léku na revmatoidní artritidu a juvenilní idiopatickou artritidu. Podle dalších studií by mohl být používán k léčbě různých imunitně zprostředkovaných onemocnění, mezi která patří autoimunitní, chronická zánětlivá onemocnění, např. systémová skleróza, zánětlivé myopatie, získaná hemofilie A, Crohnova choroba, onemocnění štepů proti hostiteli, plicní arteriální hypertenze, ateroskleróza, diabetes druhého typu a další (shrnuto v Tanaka et al., 2014).

Inhibice receptoru IL-6 tocilizumabem by mohla být jednou z cest pro další experimenty s izolovanými kardiomyocyty, jejichž izolaci jsme v této práci zavedli.

6.3. Izolované kardiomyocyty

Model izolovaných kardiomyocytů nabízí řadu výhod, umožňují výběr specifické oblasti srdečního svalu, ze které budou buňky izolovány, tj. síně, levá a pravá komora, převodní systém nebo specifické oblasti zasažené infarktem myokardu, a získané výsledky reflektují odpovědi specifické pro tento typ buněk. Studium na izolovaných srdečních myocytech tedy přináší cenný pohled na buněčnou a subcelulární fyziologii, avšak je zde zcela eliminován humorální vliv přítomný na úrovni celého organismu, který v chladové aklimaci pravděpodobně hraje významnou roli. Kombinací poznatků z dat získaných na modelu izolovaných kardiomyocytů

a experimentů provedených *in vivo* získáváme ucelený a systematický přehled o srdeční funkci (shrnutí v Louch et al., 2011).

V návaznosti na potvrzené kardioprotektivní účinky mírné chladové aklimace trvající 5 týdnů při 8 °C (Tibenska et al., 2020) byla naše pozornost zaměřena směrem k buněčným a molekulárním pochodům probíhajícím během raného stádia kardioprotektivního fenotypu vyvolaným chladem. Nepublikovaná data naší laboratoře (Marvanová et al., v recenzním řízení) dokazují, že dobu mírné chladové aklimace lze zkrátit s přetrvávajícím kardioprotektivním účinkem. Již dříve byl popsán vývoj adaptivního protektivního fenotypu na chlad, a to u pacientů trpících obezitou a diabetem, kteří byli vystaveni přerušovanému chladu po dobu deseti dnů (Hanssen et al., 2015). Během mé práce se mi podařilo zavést metodu a otestovat viabilitu izolovaných kardiomyocytů v podmínkách hypoxie (0,5 % O₂) a oxidativního stresu (tert-Butylhydroperoxid, 0,2 mM). Všechny protokoly jsou zavedeny a dávají naději na dobré výsledky. U chladově aklimovaných zvířat jsme zaznamenali na úrovni izolovaných kardiomyocytů kardioprotektivní tendenci. V další práci je však zapotřebí snížit variabilitu výsledků přesným a opakovaným měřením. Dále také snížit variabilitu mezi zvířaty ve skupině, tj. jejich váhu a věk. Roli hrají i další faktory, nezbytné pro úspěšný průběh experimentů. Především jde o precizní izolaci srdečních buněk. I přes dlouhou historii této metody není dán univerzální postup, který by zajistil vysoký výtěžek a kvalitu izolace. Protokoly se různí napříč laboratořemi a závisí nejen na živočišném druhu, ale také na typu experimentu. V literatuře se uvádí, že i laboratořím, které metodu úspěšně zavedly hrozí nepředvídatelné potíže. Ty mohou být způsobeny špatnou kvalitou vody, nesprávně vyčištěným nebo znečištěným laboratorním sklem a nástroji, nesprávným pH nebo teplotou roztoků, obměnou většího množství chemikálií, vzduchovými bublinami v promývacím médiu a neopatrnou prací se srdcem (shrnutí v Louch et al., 2011).

Ve většině protokolů je srdce primárně perfundováno roztokem s nulovým nebo nízkým obsahem Ca²⁺, což podporuje porušení mezibuněčných spojů na interkalárních discích (Muir, 1967). V našem použitém protokolu (Cagalinec et al., 2019; Zahradník and Palade, 1993) je na počátku experimentu použita fyziologická koncentrace kalcia a až později je snižována. Napříč studiemi se může lišit také využití různých typů kolagenáz, a to samostatně nebo za přidání dalších enzymů, jako jsou proteázy, pankreatin atd. (Bers et al., 1990; Bridge et al., 1999; Lines et al., 2006; Louch et al., 2006; Wolska and John Solaro, 1996; Zhou et al., 2000).

Předchozí data naší laboratoře naznačují aktivaci signální dráhy ERK 1/2 – p38 – cPLA2a (Tibenská, 2021, Disertační práce), popřípadě dráhy PI3K/Akt (Tibenska et al., 2021), což je v souladu s dalšími publikacemi (Liu et al., 2013; Micova et al., 2016; Míčová et al., 2017). Zavedení metodiky izolovaných kardiomyocytů umožňuje tyto protektivní dráhy ověřit pomocí specifických inhibitorů. Dalším plánovaným krokem je specifická inhibice receptoru pro FGF21 a vybraných kardioprotektivních signálních drah souvisejících s tímto receptorem, které by měly objasnit roli FGF21 v kardioprotekci vyvolané mírným chladem.

7. Závěr

V této práci byla potvrzena kardioprotekce na dvou modelech chladové aklimace pocházejících z naší laboratoře. Jednalo se o mírnou chladovou aklimaci v 8 °C po dobu 5 týdnů a akutní chladovou aklimaci 1D, 3D nebo 10D v 9 °C. V práci byla hodnocena úloha BAT a FGF21 v kardioprotekci vyvolané mírným chladem. Akutní ablace BAT, ani administrace FGF21 neměly signifikantní vliv na velikost infarktu. Překvapivý byl signifikantní vzestup velikosti infarktu vyvolaný kumulativním efektem intervencí ablace BAT a podání FGF21 mimetika po chladové aklimaci, který byl v rozporu s naší hypotézou.

Dále byly stanoveny hodnoty FGF21 a IL-6 v séru a homogenátu levé komory u chladově aklimovaných zvířat (9 °C, 1D/3D/10D). Ukázalo se, že v případě IL-6 dochází s postupnou aklimací k úměrnému poklesu hladiny IL-6, a to jak v levé komoře, tak v séru, zatímco hladiny IL-10 se v séru nemění. Tyto výsledky ukázaly na mírně protizánětlivý stav během akutní aklimace na mírný chlad.

V neposlední řadě byla na našem pracovišti úspěšně zavedena metoda izolace dospělých kardiomyocytů a postupů pro ověření viability v průběhu hypoxie a reoxygenace a v navozeném oxidativním stresu. Tyto experimenty probíhaly na modelu akutního chladu, jehož protektivní tendenci se podařilo na izolovaných srdečních buňkách prokázat, a to jak v podmínkách hypoxie, tak při oxidativním stresu. Zavedený model izolace kardiomyocytů bude v budoucnu možné využít pro práci s přístrojem Cytation 5, který umožní použití několika inhibitorů na vzorku buněk z jednoho zvířete, čímž se sníží množství použitých laboratorních zvířat.

8. Literatura

Sekundární zdroje jsou označeny hvězdičkou.

Internetové zdroje:

[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

https://www.czso.cz/documents/10180/163378569/csu_tk_priciny_smrti_prezentace.pdf/b87f04e6-ca7a-4c3e-9a1b-8eef3fe1c32d?version=1.0

Použitá literatura:

Abu-Odeh, M., Zhang, Y., Reilly, S.M., Ebadat, N., Keinan, O., Valentine, J.M., Hafezi-Bakhtiari, M., Ashayer, H., Mamoun, L., Zhou, X., et al. (2021). FGF21 promotes thermogenic gene expression as an autocrine factor in adipocytes. *Cell Rep.* 35, 109331.

Altschuld, R., Gibb, L., Ansel, A., Hohl, C., Kruger, F.A., and Brierley, G.P. (1980). Calcium tolerance of isolated rat heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12, 1383–1395.

*Arabacilar, P., and Marber, M. (2015). The case for inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase in heart failure. *Front. Pharmacol.* 6, 102.

Atterhög JH, Carlens P, Granberg PO, and Wallenberg LR (1975). Cardiovascular and renal responses to acute cold exposure in water-loaded man - PubMed. *Scand J Clin Lab Invest.*

Bajsova, Barbora. Úloha PGC-1 α v priebehu rozvoja kardioprotektivneho fenotypu u potkana adaptovaného na mierny chlad. Praha, 2021. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie. Vedoucí práce Žurmanová, Jitka.

Bal, N.C., Maurya, S.K., Pani, S., Sethy, C., Banerjee, A., Das, S., Patnaik, S., and Kundu, C.N. (2017). Mild cold induced thermogenesis: are BAT and skeletal muscle synergistic partners? *Biosci. Rep.* 37.

Belge, C., Hammond, J., Dubois-Deruy, E., Manoury, B., Hamelet, J., Beauloye, C., Markl, A., Pouleur, A.C., Bertrand, L., Esfahani, H., et al. (2014). Enhanced expression of β 3-adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase. *Circulation* 129, 451–462.

Bernardo, B., Lu, M., Bandyopadhyay, G., Li, P., Zhou, Y., Huang, J., Levin, N., Tomas, E.M., Calle, R.A., Erion, D.M., et al. (2015). FGF21 does not require interscapular brown adipose tissue and improves liver metabolic profile in animal models of obesity and insulin-resistance. *Sci. Rep.* 5, 1–13.

Bers, D.M., Lederer, W.J., and Berlin, J.R. (1990). Intracellular Ca transients in rat cardiac myocytes: role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *Am. J. Physiol.* 258.

Brahma, M.K., Adam, R.C., Pollak, N.M., Jaeger, D., Zierler, K.A., Pöcher, N., Schreiber, R., Romauch, M., Moustafa, T., Eder, S., et al. (2014). Fibroblast growth factor 21 is induced upon cardiac stress and alters cardiac lipid homeostasis. *J. Lipid Res.* 55, 2229–2241.

Bridge, J.H.B., Ershler, P.B., and Cannell, M.B. (1999). Properties of Ca²⁺ sparks evoked by action potentials in mouse ventricular myocytes. *J. Physiol.* 518, 469.

*Brodde, O.-E., and Michel, M.C. (1999). Adrenergic and Muscarinic Receptors in the Human Heart. *Pharmacol. Rev.* 51, 651 LP – 690.

Burýšek, L., and Houštěk, J. (1997). β -Adrenergic stimulation of interleukin-1 α and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett.* 411, 83–86.

Cagalinec, M., Zahradníková, A., Zahradníková, A., Kováčová, D., Paulis, L., Kureková, S., Hot'ka, M., Pavelková, J., Plaas, M., Novotová, M., et al. (2019). Calcium Signaling and Contractility in Cardiac Myocyte of Wolframin Deficient Rats. *Front. Physiol.* 10, 172.

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

Chartoumpekis, D. V., Habeos, I.G., Ziros, P.G., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., and Papavassiliou, A.G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol. Med.* 17, 736–740.

Chou, R.H., Huang, P.H., Hsu, C.Y., Chang, C.C., Leu, H.B., Huang, C.C., Chen, J.W., and Lin, S.J. (2016). Circulating fibroblast growth factor 21 is associated with diastolic dysfunction in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Sci. Rep.* 6.

Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitononkov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149, 6018–6027.

*Cuevas-Ramos, D., Mehta, R., and Aguilar-Salinas, C.A. (2019). Fibroblast growth factor 21 and browning of white adipose tissue. *Front. Physiol.* *10*, 37.

*Cypess, A.M., and Kahn, C.R. (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* *17*, 143.

Dawn, B., Xuan, Y.T., Guo, Y., Rezazadeh, A., Stein, A.B., Hunt, G., Wu, W.J., Tan, W., and Bolli, R. (2004). IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc. Res.* *64*, 61–71.

Dziemidowicz, M., Bonda, T.A., Litvinovich, S., Taranta, A., Winnicka, M.M., and Kamiński, K.A. (2019). The role of interleukin-6 in intracellular signal transduction after chronic β -adrenergic stimulation in mouse myocardium. *Arch. Med. Sci.* *15*, 1565–1575.

Edwards, D.G., Gauthier, A.L., Hayman, M.A., Lang, J.T., and Kenefick, R.W. (2006). Acute effects of cold exposure on central aortic wave reflection. *J. Appl. Physiol.* *100*, 1210–1214.

Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y., and Keating, M.T. (2005). p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* *19*, 1175–1187.

Engel, F.B., Hsieh, P.C.H., Lee, R.T., and Keating, M.T. (2006). FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 15546–15551.

*Fontes, J.A., Rose, N.R., and Čiháková, D. (2015). The varying faces of IL-6: from cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* *74*, 62.

*Frangogiannis, N. (2006). Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr. Med. Chem.* *13*, 1877–1893.

Fregly, M.J., Kikta, D.C., Threatte, R.M., Torres, J.L., and Barney, C.C. (1989). Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *J. Appl. Physiol.* *66*, 741–749.

Grunewald, Z.I., Winn, N.C., Gastecki, M.L., Woodford, M.L., Ball, J.R., Hansen, S.A., Sacks, H.S., Vieira-Potter, V.J., and Padilla, J. (2018). Removal of interscapular brown adipose tissue increases aortic stiffness despite normal systemic glucose metabolism in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *314*, R584–R597.

Guardiola-Diaz, H.M., Rehnmark, S., Usuda, N., Albrektsen, T., Feltkamp, D., Gustafsson, J.Å., and Alexson, S.E.H. (1999). Rat peroxisome proliferator-activated receptors and brown adipose tissue function during cold acclimatization. *J. Biol. Chem.* *274*, 23368–23377.

Guo, Y., Liu, Q., Gui, Y., Liao, C., and Xu, D. (2016). Exercise promotes cardiac-specific fibroblast growth factor 21 expression. *Int. J. Cardiol.* *203*, 532–533.

Gwechenberger, M., Mendoza, L.H., Youker, K.A., Frangogiannis, N.G., Wayne Smith, C., Michael, L.H., and Entman, M.L. (1999). Cardiac Myocytes Produce Interleukin-6 in Culture and in Viable Border Zone of Reperfused Infarctions. *Circulation* *99*, 546–551.

Han, C., Nie, Y., Lian, H., Liu, R., He, F., Huang, H., and Hu, S. (2015). Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart. *Cell Res.* *25*, 1137–1151.

Han, M.S., White, A., Perry, R.J., Camporez, J.P., Hidalgo, J., Shulman, G.I., and Davis, R.J. (2020). Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *117*, 2751–2760.

*Hankir, M.K., and Klingenspor, M. (2018). Brown adipocyte glucose metabolism: a heated subject. *EMBO Rep.* *19*.

Hanssen, M.J.W., Broeders, E., Samms, R.J., Vosselman, M.J., Van Der Lans, A.A.J.J., Cheng, C.C., Adams, A.C., Van Marken Lichtenbelt, W.D., and Schrauwen, P. (2015). Serum FGF21 levels are associated with brown adipose tissue activity in humans. *Sci. Rep.* *5*.

Harden, W.R., Barlow, C.H., Simson, M.B., and Harken, A.H. (1979). Temporal relation between onset of cell anoxia and ischemic contractile failure. Myocardial ischemia and left ventricular failure in the isolated, perfused rabbit heart. *Am. J. Cardiol.* *44*, 741–746.

Hermida, N., Michel, L., Esfahani, H., Dubois-Deruy, E., Hammond, J., Bouzin, C., Markl, A., Colin, H., Van Steenbergen, A., De Meester, C., et al. (2018). Cardiac myocyte β 3-adrenergic receptors prevent myocardial fibrosis by modulating oxidant stress-dependent paracrine signaling. *Eur. Heart J.* *39*, 888–898.

Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011a). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* *286*, 12983–12990.

Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011b). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* *286*, 12983–12990.

Horwitz, B.A., Inokuchi, T., Moore, B.J., Stern, J.S. (1985). The effect of brown fat removal on the development of obesity in Zucker and Osborne-Mendel rats - PubMed. *Int. J. Obes.*

Hu, S., Cao, S., Tong, Z., and Liu, J. (2018). FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy. *Am. J. Transl. Res.* *10*, 3677–3688.

Izumiya, Y., Bina, H.A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitononkov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* *582*, 3805–3810.

Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A. (1960) Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog - PubMed.

Joki, Y., Ohashi, K., Yuasa, D., Shibata, R., Ito, M., Matsuo, K., Kambara, T., Uemura, Y., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., et al. (2015). FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *459*, 124–130.

Jung, M., Ma, Y., Iyer, R.P., DeLeon-Pennell, K.Y., Yabluchanskiy, A., Garrett, M.R., and Lindsey, M.L. (2017). IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res. Cardiol.* *112*, 33.

Keipert, S., Kutschke, M., Ost, M., Schwarzmayer, T., van Schothorst, E.M., Lamp, D., Brachthäuser, L., Hamp, I., Mazibuko, S.E., Hartwig, S., et al. (2017). Long-Term Cold Adaptation Does Not Require FGF21 or UCP1. *Cell Metab.* *26*, 437-446.e5.

Kharitononkov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* *115*, 1627–1635.

Kharitononkov, A., Wroblewski, V.J., Koester, A., Chen, Y.-F., Clutinger, C.K., Tigno, X.T., Hansen, B.C., Shanafelt, A.B., and Etgen, G.J. (2007). The Metabolic State of Diabetic Monkeys Is Regulated by Fibroblast Growth Factor-21. *Endocrinology* *148*, 774–781.

Knudsen, J.G., Murholm, M., Carey, A.L., Biensø, R.S., Basse, A.L., Allen, T.L., Hidalgo, J., Kingwell, B.A., Febbraio, M.A., Hansen, J.B., et al. (2014). Role of IL-6 in Exercise Training- and Cold-Induced UCP1 Expression in Subcutaneous White Adipose Tissue. *PLoS One* 9, e84910.

Kong, X., Yao, T., Zhou, P., Kazak, L., Tenen, D., Lyubetskaya, A., Dawes, B.A., Tsai, L., Kahn, B.B., Spiegelman, B.M., et al. (2018). Brown Adipose Tissue Controls Skeletal Muscle Function via the Secretion of Myostatin. *Cell Metab.* 28, 631-643.e3.

Kralova Lesna, I., Rychlikova, J., Vavrova, L., and Vybiral, S. (2015). Could human cold adaptation decrease the risk of cardiovascular disease? *J. Therm. Biol.* 52, 192–198.

Kristóf, E., Klusóczki, Á., Veress, R., Shaw, A., Combi, Z.S., Varga, K., Gyóry, F., Balajthy, Z., Bai, P., Bacso, Z., et al. (2019). Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Exp. Cell Res.* 377, 47–55.

Van Der Lans, A.A.J.J., Hoeks, J., Brans, B., Vijgen, G.H.E.J., Visser, M.G.W., Vosselman, M.J., Hansen, J., Jörgensen, J.A., Wu, J., Mottaghy, F.M., et al. (2013). Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J. Clin. Invest.* 123, 3395–3403.

*Laurberg, P., Andersen, S., and Karmisholt, J. (2005). Cold adaptation and thyroid hormone metabolism. *Horm. Metab. Res.* 37, 545–549.

Lee, P., Brychta, R.J., Linderman, J., Smith, S., Chen, K.Y., and Celi, F.S. (2013). Mild cold exposure modulates fibroblast growth factor 21 (FGF21) diurnal rhythm in humans: Relationship between FGF21 levels, lipolysis, and cold-induced thermogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E98.

Lesná, I., Vybíral, S., Janský, L., and Zeman, V. (1999). Human nonshivering thermogenesis. *J. Therm. Biol.* 24, 63–69.

Lines, G.T., Sande, J.B., Louch, W.E., Mørk, H.K., Grøttum, P., and Sejersted, O.M. (2006). Contribution of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger to Rapid Ca²⁺ Release in Cardiomyocytes. *Biophys. J.* 91, 779.

*Di Lisa, F., and Itoh, N. (2015). Cardiac Fgf21 synthesis and release: An autocrine loop for boosting up antioxidant defenses in failing hearts. *Cardiovasc. Res.* 106, 1–3.

Liu, S.Q., Roberts, D., Kharitononkov, A., Zhang, B., Hanson, S.M., Li, Y.C., Zhang, L.-Q., and Wu, Y.H. (2013a). Endocrine Protection of Ischemic Myocardium by FGF21 from the Liver and Adipose Tissue. *Sci. Reports* 2013 31 3, 1–11.

Liu, S.Q., Roberts, D., Kharitononkov, A., Zhang, B., Hanson, S.M., Li, Y.C., Zhang, L.Q., and Wu, Y.H. (2013b). Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Sci. Rep.* 3.

Lømo, T., Eken, T., Bekkestad Rein, E., and Njå, A. (2020). Body temperature control in rats by muscle tone during rest or sleep. *Acta Physiol.* 228.

Louch, W.E., Mørk, H.K., Sexton, J., Strømme, T.A., Laake, P., Sjaastad, I., and Sejersted, O.M. (2006). T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca²⁺ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *J. Physiol.* 574, 519.

*Louch, W.E., Sheehan, K.A., and Wolska, B.M. (2011). Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 288.

Markan, K.R., Naber, M.C., Ameka, M.K., Anderegg, M.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Mohammadi, M., and Potthoff, M.J. (2014). Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* 63, 4057–4063.

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

Míčová, P., Klevstig, M., Holzerová, K., Vecka, M., Žurmanová, J., Neckář, J., Kolář, F., Nováková, O., Novotný, J., and Hlaváčková, M. (2017). Antioxidant tempol suppresses heart cytosolic phospholipase A2 α stimulated by chronic intermittent hypoxia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 95, 920–927.

Mir, S.A., Chatterjee, A., Mitra, A., Pathak, K., Mahata, S.K., and Sarkar, S. (2012). Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) attenuates interleukin-6 (IL-6)-induced collagen synthesis and resultant hypertrophy in rat heart. *J. Biol. Chem.* 287, 2666–2677.

- Moore, B.J., Inokuchi, T., Stern, J.S., and Horwitz, B.A. (1985). Brown adipose tissue lipectomy leads to increased fat deposition in Osborne-Mendel rats. *Am. J. Physiol.* 248.
- Muir, A.R. (1967). The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J. Anat.* 101, 239.
- *Nayler, W.G. (1981). The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am. J. Pathol.* 102, 262.
- *Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293, 444–452.
- Nonogaki, K., and Kaji, T. (2017). α 1-Adrenergic receptor downregulates hepatic FGF21 production and circulating FGF21 levels in mice. *Neurosci. Lett.* 638, 35–38.
- Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K.P., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., and Kuro-O, M. (2007). β Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7432–7437.
- Ono, K., Matsumori, A., Shioi, T., Furukawa, Y., and Sasayama, S. (1998). Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 98, 149–156.
- Patel, V., Adya, R., Chen, J., Ramanjaneya, M., Bari, M.F., Bhudia, S.K., Hillhouse, E.W., Tan, B.K., and Randeve, H.S. (2014). Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. *PLoS One* 9.
- Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L.A., Sitges, M., Giralt, M., Van Bilsen, M., et al. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat. Commun.* 4, 1–12.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralt, M., and Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* 106, 19–31.
- Reimer, K.A., Jennings, R.B., and Tatum, A.H. (1983). Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am. J. Cardiol.* 52, 72–81.
- *Rossi, J.-F., Lu, Z.-Y., Jourdan, M., and Klein, B. (2015). Interleukin-6 as a Therapeutic Target. *Clin Cancer Res* 21.

Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1989). Surgical removal of brown fat results in rapid and complete compensation by other depots. *Am. J. Physiol.* 257.

Schlein, C., Talukdar, S., Heine, M., Fischer, A.W., Krott, L.M., Nilsson, S.K., Brenner, M.B., Heeren, J., and Scheja, L. (2016). FGF21 lowers plasma triglycerides by accelerating lipoprotein catabolism in white and brown adipose tissues. *Cell Metab.* 23, 441–453.

*Schrauwen, P., and Hesselink, M. (2002). UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J. Exp. Biol.* 205, 2275–2285.

Smart, N., Mojte, M.H., Latchman, D.S., Marber, M.S., Duchon, M.R., and Heads, R.J. (2006). IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 69, 164–177.

*Spruill, T.M. (2010) Chronic Psychosocial Stress and Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 12:10-16

Stanford, K.I., Tseng, Y.-H., Goodyear, L.J., Middelbeek, R.J.W., Townsend, K.L., An, D., Nygaard, E.B., Hitchcox, K.M., Markan, K.R., Nakano, K., et al. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 123, 215–223.

Stanford, K.I., Lynes, M.D., Takahashi, H., Baer, L.A., Arts, P.J., May, F.J., Lehnig, A.C., Middelbeek, R.J.W., Richard, J.J., So, K., et al. (2018). 12,13-diHOME: An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake. *Cell Metab.* 27, 1111-1120.e3.

Stern, J.S., Inokuchi, T., Castonguay, T.W., Wickler, S.J., and Horwitz, B.A. (1984). Scapular brown fat removal enhances development of adiposity in cold-exposed obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 247.

*Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, 16295–16296.

Tang, P., Ma, S., Dong, M., Wang, J., Chai, S., Liu, T., and Li, J. (2018). Effect of interleukin-6 on myocardial regeneration in mice after cardiac injury. *Biomed. Pharmacother.* 106, 303–308.

Tchivileva, I.E., Tan, K.S., Gambarian, M., Nackley, A.G., Medvedev, A. V., Romanov, S., Flood, P.M., Maixner, W., Makarov, S.S., and Diatchenko, L. (2009). Signaling Pathways Mediating Beta 3 Adrenergic Receptor-induced Production of Interleukin-6 in Adipocytes. *Mol. Immunol.* 46, 2256.

The Eurowinter Group (1997). Cold exposure and winter mortality from ischaemic heart disease, cerebrovascular disease, respiratory disease, and all causes in warm and cold regions of Europe. *Lancet* 349, 1341–1346.

Tibenska, V., Benesova, A., Vebr, P., Liptakova, A., Hejnová, L., Elsnicová, B., Drahota, Z., Hornikova, D., Galatík, F., Kolar, D., et al. (2020). Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting β -adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling. *J. Appl. Physiol.* 128, 1023–1032.

Tibenska, Veronika. Vliv chladové adaptace na aktivaci adrenergických a tyroidních signálních drah v myokardu potkana. Praha, 2021. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie. Vedoucí práce Žurmanová, Jitka.

Tibenska, V., Marvanova, A., Elsnicova, B., Hejnova, L., Vebr, P., Novotný, J., Kolar, F., Novakova, O., and Zurmanova, J.M. (2021). The cardioprotective effect persisting during recovery from cold acclimation is mediated by the β_2 -adrenoceptor pathway and Akt activation. *J. Appl. Physiol.* 130, 746–755.

*Tsubulnikov, S., Maslov, L., Voronkov, N., and Oeltgen, P. (2020). Thyroid hormones and the mechanisms of adaptation to cold. *Hormones* 19, 329–339.

Tsubulnikov, S.Y., Maslov, L.N., Naryzhnaya, N. V., Ivanov, V. V., Bushov, Y. V., Voronkov, N.S., Jaggi, A.S., Zhang, Y., and Oeltgen, P.R. (2019). Impact of cold adaptation on cardiac tolerance to ischemia/reperfusion and glucocorticoid, thyroid hormone levels. *Gen. Physiol. Biophys.* 38, 245–251.

Turner, T., Chen, X., Zahner, M., Opsahl, A., DeMarco, G., Boucher, M., Goodwin, B., and Perreault, M. (2018). FGF21 increases water intake, urine output and blood pressure in rats. *PLoS One* 13.

Vázquez, P., Hernández-Sánchez, C., Escalona-Garrido, C., Pereira, L., Contreras, C., López, M., Balsinde, J., de Pablo, F., and Valverde, Á.M. (2018). Increased FGF21 in brown adipose tissue of tyrosine hydroxylase heterozygous mice: Implications for cold adaptation. *J. Lipid Res.* 59, 2308–2320.

*Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., and Giralt, M. (2016). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016 131 13, 26–35.

*Villarroya, J., Cereijo, R. n., Gavald -Navarro, A., Peyrou, M., Giralt, M., and Villarroya, F. (2019). New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *J. Endocrinol.* 243, R19–R27.

Vrabcova, Veronika. Fibroblastový růstový faktor 21 a jeho funkce. Praha, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie. Vedoucí práce Žurmanová, Jitka.

Wang, S., Wang, Y., Zhang, Z., Liu, Q., and Gu, J. (2017). Cardioprotective effects of fibroblast growth factor 21 against doxorubicin-induced toxicity via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway. *Cell Death Dis.* 8, e3018.

Wernstedt, I., Edgley, A., Berndtsson, A., Fäldt, J., Bergström, G., Wallenius, V., and Jansson, J.O. (2006). Reduced stress- and cold-induced increase in energy expenditure in interleukin-6-deficient mice. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, 551–557.

Wolska, B.M., and John Solaro, R. (1996). Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. *Am. J. Physiol.* 271.

Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y.Y., Hager, T., Patel, J., Ge, H., Weiszmann, J., Lu, S.C., Graham, M., et al. (2009). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models - Association with liver and adipose tissue effects. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297, 1105–1114.

Yang, S., Zheng, R., Hu, S., Ma, Y., Choudhry, M.A., Messina, J.L., Rue, L.W., Bland, K.I., and Chaudry, I.H. (2004). Mechanism of cardiac depression after trauma-hemorrhage: increased cardiomyocyte IL-6 and effect of sex steroids on IL-6 regulation and cardiac function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287.

Young, P., Arch, J.R.S., and Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* 167, 10–14.

Yu, X.W., Kennedy, R.H., and Liu, S.J. (2003). JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 16304–16309.

Zahradník, I., and Palade, P. (1993). Multiple effects of caffeine on calcium current in rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 1993 4242 424, 129–136.

Zhao, H., Chen, X., Hu, G., Li, C., Guo, L., Zhang, L., Sun, F., Xia, Y., Yan, W., Cui, Z., et al. (2022). Small Extracellular Vesicles From Brown Adipose Tissue Mediate Exercise Cardioprotection. *Circ. Res.* *130*, 1490–1506.

Zhou, Y.Y., Wang, S.Q., Zhu, W.Z., Chruscinski, A., Kobilka, B.K., Ziman, B., Wang, S., Lakatta, E.G., Cheng, H., and Xiao, R.P. (2000). Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *279*.