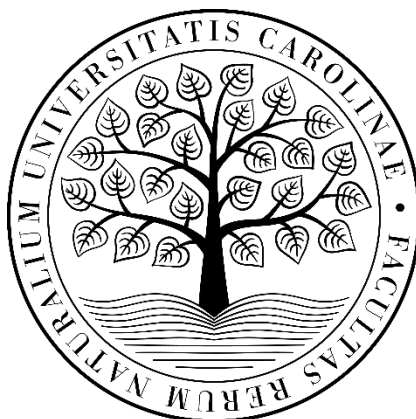


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Mgr. Aneta Marvanová

Vliv chladové adaptace na ischemicko-reperfuční poškození srdce

The role of cold acclimation in ischemia-reperfusion injury

Disertační práce

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

Praha, 2023

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

.....

Mgr. Aneta Marvanová

Poděkování

V první řadě bych ráda na tomto místě poděkovala mé školitelce doc. RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za možnost rozvíjet se v oblasti experimentální chirurgie, za veškerý čas, ochotu a cenné rady, které mi věnovala. Mé poděkování také patří paní doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za pomoc při sepisování všech mých publikací, panu doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. a panu doc. MUDr. Janu Polákovi, Ph.D., MDA za pomoc při metabolických experimentech.

Chtěla bych také poděkovat celému kolektivu naší laboratoře za přátelskou atmosféru, spolupráci a kolektivního ducha. Zejména pak Veronice Tibenské, se kterou jsme společně překonaly všechny nástrahy doktorandského studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Pavlovi Vebrovi, za veškerou pomoc při experimentech a také za podporu, kterou mi projevoval a nadále v životě projevuje.

Největší poděkování patří celé mé rodině, a především mým rodičům, kteří mi umožnili studovat a kteří mě ve všem podporovali.

Samozřejmě poděkování také náleží grantovým agenturám, s jejichž podporou byla tato práce vypracována: Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK), projekt číslo 188015 a Grantová agentura České republiky (GAČR), projekt číslo 17-07748S.

Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění, mezi které patří ischemická choroba srdeční, její akutní forma infarkt myokardu, a následné srdeční selhání, se stále řadí mezi nejčastější příčinu úmrtí na světě. Již desítky let si vědci kladou za cíl najít klinicky využitelné kardioprotektivní intervence, které by účinně předcházely tomuto onemocnění, a tak zmenšovaly následky tohoto onemocnění a zlepšily kvalitu života pacientů. Je známo, že k ochraně srdce významně přispívá zdravý životní styl, jehož součástí je i dlouhodobé otužování. Benefiční účinky otužování na posílení organismu jsou známy již dvě sta let, zatím však nikdo před námi nezkoumal vliv chladného prostředí na velikost ischemicko-reperfučního poškození (I/R). Před 10 lety jsme zavedli model mírné chladové expozice ($8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) (MCE), který byl protektivní na velikost infarktu myokardu a zároveň se neprokázaly negativní vedlejší účinky jako je hypertenze a hypertrofie myokardu. Naším cílem tedy bylo zkoumání mechanismu kardioprotekce vyvolané MCE. Položili jsme si následující otázky. Jaký je metabolický profil potkanů vystavených MCE? Jaký je vliv MCE na velikost I/R poškození v krátkodobém a dlouhodobém časovém horizontu? Kdy dozrává hnědá tuková tkáň v průběhu MCE? Které signální dráhy jsou zapojeny v kardioprotekci vyvolané MCE? Naše práce ukázala, že MCE přechodně ovlivňuje metabolismus glukózy. Také jsme jako první prokázali, že po 10 dnech MCE dochází k významné proliferaci a maturaci hnědé tukové tkáně. Stejně tak po 10 dnech došlo ke snížení velikosti I/R poškození. Tento benefiční účinek mírného chladu se ještě prohloubil po 5 týdnech kontinuální chladové expozice a přetrval dva týdny po návratu do termoneutrální teploty ($24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Za použití selektivních betablokátorů jsme potvrdili některé signální dráhy, které se mohou uplatňovat v dlouhodobém kardioprotektivním účinku MCE a po návratu do termoneutrálních podmínek.

Klíčová slova: potkan, myokard, hnědá tuková tkáň, mírná chladová expozice, ischemicko-reperfuční poškození, kardioprotekce

Abstract

Cardiovascular disease, including ischemic heart disease, its acute form of myocardial infarction and subsequent heart failure, is still the most common cause of death in the world. For decades, scientists have been aiming to find clinically usable cardioprotective interventions that effectively prevented this disease or reduced the consequences of this disease and improved the quality of life of patients. It is known that a healthy lifestyle, which includes long-term hardening, contributes to heart protection. The beneficial effects of hardening on personality have been known for two hundred years, but no one before us has investigated the effect of a cold environment on the magnitude of ischemia-reperfusion (I/R) damage 10 years ago, we introduced a model of mild cold exposure (8 ± 1 °C) (MCE) which was protective on the size of the myocardial infarction and at the same time no negative side effects such as hypertension and myocardial hypertrophy were demonstrated. Our aim was to investigate the mechanism of cardioprotection induced by MCE. We asked the following questions: What is the metabolic profile of rats exposed to MCE? What is the effect of MCE on the magnitude of I/R damage in the short and long term? When does brown adipose tissue mature during MCE? Which signalling pathways are involved in MCE-induced cardioprotection? Our work showed that MCE temporarily began to protect the metabolism. We were also the first to demonstrate that after 10 days of MCE there is proliferation and maturation of brown adipose tissue. Likewise, after 10 days there was a reduction in the magnitude of I/R damage, the beneficial effect of cold deepened after 5 weeks of continuous cold exposure and persisted even after two weeks returning to thermoneutral temperature (24 ± 1 °C). Using selective beta-blockers, we confirmed some signalling pathways which may apply in long-term cardioprotective effect of MCE and after return to thermoneutral conditions.

Key words: rat, myocardium, brown adipose tissue, mild cold exposure, ischemia-reperfusion injury, cardioprotection

Obsah

1	Úvod	11
2	Ischemicko-reperfúzní poškození	12
3	Kardioprotektivní intervence	15
3.1	Preconditioning.....	15
3.2	Farmakologický preconditioning.....	17
3.3	Postconditioning	18
3.4	Chronická intermitentní hypoxie	19
3.5	Fyzická zátěž	20
3.6	Kalorická restrikce.....	21
4	Chladová adaptace	23
4.1	Vystavení extrémnímu chladu	25
4.2	Vliv chladové expozice na glukózovou toleranci organismu	26
4.3	Vliv chladu na kardiovaskulární systém.....	27
4.4	Role β -adrenergního systému v ischemicko-reperfúzním poškození.....	29
4.4.1	Betablokátory	30
5	Úloha hnědého tuku v chladové adaptaci	31
6	Cíle disertační práce	34
7	Chladová expozice a použité metody	35
7.1	Režimy chladové expozice	35
7.2	Glukózový toleranční test.....	36
7.3	Metabolický test	36
7.4	Odběr krve na krevní obraz a biochemickou analýzu séra	37
7.5	Chirurgické navození ischemicko-reperfúzního poškození	38
7.6	Barvení.....	39
7.7	Podání inhibitoru	40

8	Statistické hodnocení.....	41
9	Výsledky	42
9.1	Metabolický profil chladové expozice	42
9.1.1	Hmotnostní parametry.....	43
9.1.2	Odpověď netřesové termogeneze na stimulaci noradrenalinem	44
9.1.3	Glukózový toleranční test.....	45
9.1.4	Hematologie a biochemická analýza séra	46
9.2	Ischemická tolerance srdce v počátečních chladové expozice (1 až 10 dní).....	48
9.3	Vliv dlouhodobé chladové expozice na ischemickou toleranci srdce a její přetrvání.....	51
9.4	Použití selektivních inhibitorů pro zjištění mechanismů kardioprotekce.....	55
9.4.1	Inhibitor Metoprolol tartrát	55
9.4.2	Inhibice β 2-ARs (ICI 118,551 hydrochlorid).....	58
10	Diskuze	60
11	Závěr.....	72
12	Literatura	73
13	Internetové zdroje	106
14	Seznam obrázků a tabulek	107
15	Přílohy	112
15.1	Záznam rektální teploty	112
15.2	Tabulka glukózového tolerančního testu	114
15.3	Seznam publikací.....	115

Seznam zkratek

Akt	Proteinkináza B
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
ATP	Adenosintrifosfát
BAT	Hnědá tuková tkáň
Bax	BCL2-associated x protein
Bcl2	B-cell CLL/Lymphoma 2
BW	Tělesná hmotnost
C	Kontrolní skupina
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát (cyklické AMP)
CAT	Kataláza
CL	5-týdenní chladová expozice
CLR	2-týdenní regrese
COX-2	Cyclooxygenáza 2
Cu/Zn SOD	Měď/Zinková superoxiddismutáza
eNOS	Endoteliální NO syntáza
ERK	Kináza regulována extracelulárním signálem
F	Fyziologický roztok
FGÚ	Fyziologický ústav AV ČR v.v.i.
G _i	Inhibiční G-protein
G _s	Stimulačním G-protein
GSK3β	Glykogensyntázakináza 3β
GTT	Glukózový toleranční test
HDL	Vysokodenzitní lipoprotein
Hoxc8	Homeobox C8
Hoxc9	Homeobox C9
HSP72	Protein teplotního šoku 72
HW	Hmotnost srdce
I	Inhibitor
I/R	Ischemicko-reperfúzní poškození
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Inducibilní NO syntáza

IP3	Inositoltrisfosfát
IP3 receptor	Receptor pro IP3
IPC	Ischemický preconditioning
K _{ATP} kanál	Mitochondriální draselný kanál citlivý k ATP
LAD	Levá přední sestupná koronární arterie
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein
LHX8	LIM homeobox 8
LV	Levá komora srdeční
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MEC	Mírná chladová expozice
Mn SOD	Manganová superoxiddismutáza
mPTP pór	Mitochondriální pór přechodné propustnosti
Myf5	Myogenní faktor 5
NA	Noradrenalin
Na ⁺ /Ca ²⁺ výměník	Sodnovápenatý výměník (NCX)
Na ⁺ /H ⁺ výměník	Výměník sodných a vodíkových protonů
Na ⁺ /K ⁺ ATPáza	Sodnodraselná ATPáza
NEFA	Neesterifikované mastné kyseliny
NFκB	Nuclear Faktor kappa B
p38MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza p38
PI3 kináza	Fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
PLC	Fosfolipáza C
PLD	Fosfolipáza D
PPAR γ	Koaktivátor peroxizomálního proliferací aktivovaného receptoru γ
PVC	Předčasné komorové údery
RIPC	Vzdálený ischemický preconditioning
RISK	Reperfúzi indukovaná záchranná kináza
ROS	Volné kyslíkové radikály
RT	Rektální teplota
RV	Pravá komora srdeční
SAFE	Dráha posílení aktivačního faktoru pro přežití

SERCA	Vápníková ATPáza sarkoplazmatického retikula
Slc27a1	Transportní protein mastných kyselin
SOD	Superoxiddismutáza
β -ARs	β -adrenergními receptory
STAT-3	Převodník signálu a aktivátor transkripce 3
T ₃	Trijodotyronin volný
T ₄	Tyroxin volný
TBX1	Transkripční faktor T-box
Tcf21	Transkripční faktor 21
TMEM 26	Transmembránový protein 26
TNF α	Tumor nekrotický faktor α
UCP	Odpřahující protein
1D	1-denní chladová expozice
3D	3-denní chladová expozice
10D	10-denní chladová expozice

1 Úvod

Jednou z hlavních příčin úmrtí ve světě je ischemická choroba srdeční a její akutní forma infarkt myokardu a následné srdeční selhání. V celosvětovém měřítku je každý rok více než 29 milionu lidí zasaženo infarktem myokardu a 17 milionů z nich na následky tohoto onemocnění umírá. Riziko vzniku infarktu se zvyšuje se špatným životním stylem a s věkem. Proto je jedním z hlavních cílů základního i klinického výzkumu najít molekulární mechanismus endogenní odolnosti srdce k ischemicko-reperfúznímu (I/R) poškození a tyto poznatky využít pro prevenci a léčbu srdce. Stejně tak je nutné nalézat nové kardioprotektivní intervence, které by tuto endogenní odolnost stimulovaly (Powers et al., 2007). Jako jedna z dobře použitelných možností se ukazuje chladová aklimace. U této protektivní intervence je však potřeba zvolit správnou teplotu, způsob expozice a dobu jejího trvání. Benefiční či detrimentalní účinek chladu je dán intenzitou chladu s ohledem na vystavený druh organismu, dobou trvání a režimem expozice. V literatuře je mnoho dokladů o škodlivém účinku působení náhlého i dlouhodobého intenzivního chladu na kardiovaskulární systém. Ze statistických analýz vyplývá, že zimní měsíce představují zvýšené riziko výskytu infarktu myokardu. Jsou známy i další škodlivé účinky nepřiměřené chladové expozice na organismus, které se projevují poškozením ledvin, zvýšením arteriálního krevního tlaku, zvýšeným výskytem arytmií. Z výše uvedených důvodů se dostáváme ke studiu benefičních účinků chladu až v posledních letech, kdy jsme zavedli experimentální model mírné chladové aklimace. Je třeba zmínit, že blahodárné účinky mírné hypotermie, která se dlouhodobě používá v klinické praxi a vykazuje terapeutické účinky snižující následky vyvolané I/R poškozením, jsou založeny na snížení metabolického obratu chlazených tkání. Tento mechanismus je zcela odlišný od mechanismu vyvolaného ne-hypotermickou chladovou aklimací, kterou se zabývá tato práce. Vlivem chladové aklimace na lidský organismus se dlouhodobě zabýval prof. Jánský, který s doc. Vybíralem a doc. Královou-Lesnou publikovali zajímavé práce na otužilcích. Předmětem intenzivního výzkumu je také hnědá či běžová tuková tkáň a její hnědnutí po chladovém stimulu v souvislosti s řadou závažných civilizačních chorob, jako je diabetes druhého typu a obezita.

Naše laboratoř se v posledních deseti letech intenzivně zabývá vlivem mírné chladové expozice na rozsah I/R poškození. Na základě většiny literárních údajů týkajících se vlivu drsného chladu (4–5 °C), jsme se rozhodli testovat vliv mírné chladové expozice na odolnost srdce k ischemii u potkana. Zavedli jsme model mírné chladové expozice 8 ± 1 °C (MCE), po dobu 5 týdnů a

přetrvávající efekt po 2 týdnech v normotermních podmínkách. Nejdříve jsme na perfundovaném srdci ex vivo pozorovali snížení velikosti infarktu a zjistili jsme, že tento model nevykazoval detrimetální účinky na organismus potkana na úrovni analýzy moči a krve. Také jsme nepozorovali srdeční hypertrofii a systémovou hypertenzi. Dále jsme se zaměřili na hledání co nejkratší doby působení mírného chladu, která bude postačující pro vyvolání kardioprotektivních účinků. V akutních expozičních (1, 3 a 10 dnů) teplotu zvýšili na 9 ± 1 °C. Posledním cílem bylo za použití specifických inhibitorů *in vivo* hledat protektivní signální dráhy stimulované mírným chladem, a tak přispět k vysvětlení mechanismu jím vyvolané kardioprotekce.

2 Ischemicko-reperfúzní poškození

Průběh I/R byl popsán v roce 1960 (Jennings et al., 1960). Ischemie myokardu je chápána jako nedostatečnost v krevním zásobení srdečního svalu, která může být zapříčena, zúžením koronární artérie, trombózou nebo akutní změnou uložení aterosklerotických plátů (Buja, 2005). I/R je spojováno, se ztrátou iontové rovnováhy v srdeční tkáni, rozvojem zánětu, s poškozením bioenergetických procesů a následnou buněčnou smrtí (Hausenloy and Yellon, 2013). Poškození myokardu se rozvíjí v obou fázích I/R ataku. V první, ischemické fázi, závisí míra poškození tkáně na délce trvání ischemie, zatímco v reperfúzní fázi, kdy detrimetálním agens je návrat kyslíku do hypoxické tkáně spojený s oxidativním stresem, je buněčné poškození závislé na míře ischemického poškození. V literatuře jsou popsány tři úrovně míry I/R poškození v závislosti na době trvání ischemie. V první úrovni ischemie, která trvá méně než 5 min, je reperfúzní fáze velice rychlá a je často doprovázena tachykardiemi a fibrilacemi komor, aniž by došlo ke snížení výkonu srdeční kontraktility nebo k buněčné smrti (Downey, 1990). Na druhé úrovni ischemie trvá od 5 do 20 min. Zde je reperfúze charakterizována tzv. omráčený myokard, kde dochází k ovlivnění kontraktility, jejíž deficit přetrvává 24 až 72 hodin od poškození. Na této úrovni ještě nedochází k významné smrti kardiomyocytů (Bolli and Marbán, 1999). Třetí úroveň I/R poškození je nejzávažnější. Ischemie trvá déle než 20 min a dochází k nevratnému poškození kardiomyocytů. V této fázi probíhá apoptotická i nekrotická buněčná smrt (Downey, 1990).

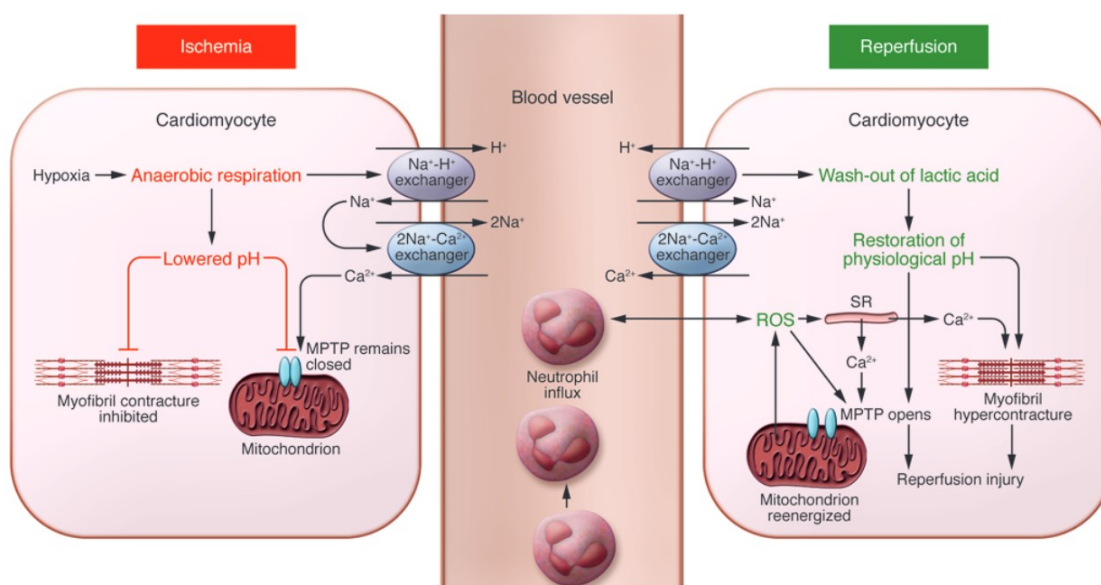
Během ischemické fáze dochází k nedostatečnému zásobování srdce kyslíkem. Je postupně snížena až zastavena oxidativní fosforylace v mitochondriích, což vede ke snížení produkce energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP). V časně fázi ischemie je ATP produkováno anaerobní glykolýzou, zvyšuje se akumulace H^+ iontů, zvyšuje se koncentrace laktátu a snižuje

se tedy pH. Po 30 min ischemie se může pH snížit na 6,0 až 5,5 (Solaini and Harris, 2005; Vuorinen et al., 1995). Během 10 min ischemie se sníží zásoby kreatinfosfátu o 90 %, po 30 min se sníží množství ATP o 50–60 % , zatímco se rychle zvyšuje množství adenosindifosfátu (Ambrosio et al., 1993). Hladina buněčného NADPH se také snižuje, a to má za následek významné snížení poměru NADPH/NADP. NADPH je spotřebováván glutation reduktázou, aby mohla obnovovat oxidovaný glutation během oxidačního stresu, pro přehled (Solaini and Harris, 2005).

Nedílnou součástí I/R je změna iontové rovnováhy K^+ , Na^+ a Ca^{2+} v cytoplasmě. Iontová dysbalance je způsobena neefektivním fungováním Na^+/K^+ ATPázy a vápníkovou ATPázou sarco/endoplazmatického retikula (SERCA), závislých na ATP (Schäfer et al., 2001; Zweier et al., 1987). V důsledku snížené schopnosti Na^+/K^+ ATPázy obnovovat klidový membránový potenciál se hromadí intracelulárně Na^+ ionty. To má za následek snižování sodíkového transmembránového gradientu, čímž je, mimo jiné, ovlivněná funkce Na^+/Ca^{2+} výměníku (NCX). Obrácený tok iontů přes NCX, způsobuje prohlubování vápníkového přetížení, pro přehled (Bers, 2002). Vtok Ca^{2+} do buňky během I/R poškození dále probíhá napětově závislým vápníkovým kanálem L-typu a následným uvolněním Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula přes ryanodinové receptory typu 2, tedy jako za fyziologických podmínek. Zároveň však snížená efektivita SERCA způsobuje nedostatečné přečerpávání intracelulárního Ca^{2+} zpět do sarkoplazmatického retikula, a tedy jeho hromadění v cytoplasmě. Dále dochází k akumulaci extracelulárních K^+ iontů na základě dvou mechanismů. Prvním je zvýšená propustnost membrány pro K^+ přes K_{ATP} kanály. Druhým je výsledek vyvažování membránového napětí kompenzující ztrátu záporně nabitého laktátu a fosfátového zbytku (Venkatesh et al., 1991). Snižování pH způsobené akumulací H^+ během ischemie je zapříčiněno změněným gradientem Na^+ iontů, které výměníkem Na^+/H^+ tečou z buňky, zatímco H^+ opačným směrem. Svůj význam to má v kardioprotekci zprostředkované mitochondriálním pórem přechodné propustnosti (mPTP). Jeho otevření v důsledku vtoku Ca^{2+} do mitochondrií a mírně se zvyšující produkci volných kyslíkových radikálů (ROS) (Steenbergen et al., 1987), je totiž během ischemie znemožněno právě sníženým pH (Griffiths and Halestrap, 1995) (Obr. 1).

Reperfúze je komplexní proces, ve kterém se uplatňuje pro-oxidační a pro-zánětlivá kaskáda projevující se funkčním poškozením, způsobujícím arytmiie a buněčnou smrt. V prvních minutách dochází k hyperkontrakci kardiomyocytů, jsou to první projevy nekrózy. V pozdější fázi (hodiny) se uplatňuje, jak apoptóza, tak i nekróza (Piper et al., 2004). Hlavními mediátory

reperfúzního poškození jsou ROS, vápníkové přetížení a hromadění neutrofilů (Buja, 2005; Kalogeris et al., 2016). ROS jsou mediátory oxidace ryanodinových receptorů na sarkoplazmatickém retikulu, která se projevuje uvolňováním Ca^{2+} do cytosolu (Andersson et al., 2011). Vápníkové přetížení je charakterizováno bobtnáním mitochondrií (swellingem), dezorganizací mitochondriálních krist a snížením mitochondriálního membránového potenciálu. Všechny tyto děje aktivují otevření mPTP na vnitřní mitochondriální membráně (Kalogeris et al., 2016). Otevření mPTP je také stimulováno návratem pH do normálních hodnot, k tomu dochází po 2 až 3 min reperfúze, pro přehled (Halestrap et al., 2004) (Obr. 1). Mezi další stimulanty otevření mPTP patří zvýšení koncentrace anorganického fosfátu, neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA), proapoptických proteinů z Bcl rodiny (Bax, Bak, Bad, Noxa, Puma a Bid), pro přehled (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). S myšlenkou, že mPTP má důležitou funkci v I/R poškození, přišel v roce 1987 Crompton (Crompton et al., 1987). V roce 1995 Griffiths a Halestrap experimentálně potvrdili, že mPTP se aktivuje během reperfúze myokardu (Griffiths and Halestrap, 1995). I když možná existence mPTP je známa dlouho, tak doposud není objasněná jeho struktura, pro přehled (Weiss et al., 2003).



Obrázek 1: Schéma ischemicko-reperfúzního poškození; volné kyslíkové radikály (ROS), sarkoplazmatické retikulum (SR), mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP). Převzato z (Hausenloy and Yellon, 2013b); doi: 10.1172/JCI62874.

3 Kardioprotektivní intervence

Vzhledem k četnosti výskytu I/R poškození v populaci, je velkou snahou primárního i klinického výzkumu předcházet poškození myokardu, či eliminovat jeho velikost. V následující kapitole budou popsány modely kardioprotektivních intervencí, u kterých byl prokázán benefiční efekt.

3.1 Preconditioning

Ischemický preconditioning je experimentální strategií, která využívá krátké epizody ischemie k protekci tkáně srdce před následujícím I/R atakem (Eltzschig and Eckle; Wu et al., 2019). Murry et al. Detekovali jako první intermitentní ischemické působení v roce 1986 a nazvali ho „preconditioning with ischemia“ (Murry et al., 1986). Na psím modelu použili čtyři cykly ischemie po 5 min, po kterých následovalo vždy 5 min reperfúze před samotnou 40-min ischemií. Následná velikost infarktu myokardu byla o 75 % menší než u kontrolního srdce (Murry et al., 1986). Dnes se pro tuto kardioprotektivní intervenci používá označení ischemický preconditioning (IPC) (Köhler et al., 2018). Bylo zjištěno, že IPC ochraňuje tkáň před ischemickým stresem a je doprovázeno uvolněním nebo aktivací mediátorů jako jsou adenosin, bradykinin, opioidy, noradrenalin (NA), volné radikály a podobně (Przyklenk and Kloner, 1998). Bylo zjištěno, že přes receptory spřažené s G-proteiny je aktivována protein kináza C (PKC), která fosforyluje mitochondriální ATP senzitivní draslíkový kanál (K_{ATP} kanál), přes který může být aktivována kardioprotekce během I/R poškození (Baines et al., 1997; Goto et al., 1995; Hu and Nattel, 1995; Schultz et al., 1997; Van Wylen et al., 1992). Tato intervence dále snižuje počet ischemických a reperfúzních komorových arytmií (Shiki and Hearse, 1987). IPC byl studován na psech, králicích, potkanech, prasatech a na lidských izolovaných kardiomyocytech (Yellon et al., 1998). Rozeznáváme dva druhy ischemického preconditioningu. První je přímý ischemický preconditioning a druhý je vzdálený ischemický preconditioning (RIPC) (Fukui et al., 2017). V roce 1993 bylo zjištěno, že IPC je složen ze dvou oken kardioprotekce. První okno se objeví ihned po stimulu preconditioningu a mizí po 2–3 hodinách. Po 12–24 hodinách se objeví druhé okno protekce a přetrvává 2–3 dny (Marber et al., 1993). Jiné zdroje uvádějí, že první okno mizí po 1–2 hodinách a druhé okno přetrvává 3–4 dny (Das and Das, 2008). Jednotlivá okna se liší v dějích, které v nich probíhají. Během prvního okna dochází k posttranslačním modifikacím již existujících proteinů, kdežto v druhém okně dochází k syntéze nových kardioprotektivních proteinů přes PKC a tyrosinkinázové dráhy. PKC je hlavním mediátorem IPC (Spechly-Dick et al., 1994). Důležitým krokem je

aktivace fosfolipázy D, tyrozinkinázy a MAP-kinázy (Brooks and Hearse, 1996). Kardioprotekce je založena na inhibici otevření mPTP. V průběhu reperfúze dochází k zvýšení faktorů, které podporují otevření mPTP (obnova elektrontransportního řetězce, ROS, zvýšení intracelulárních Ca^{2+} , acidóza a další), pro přehled (Weiss et al., 2003).

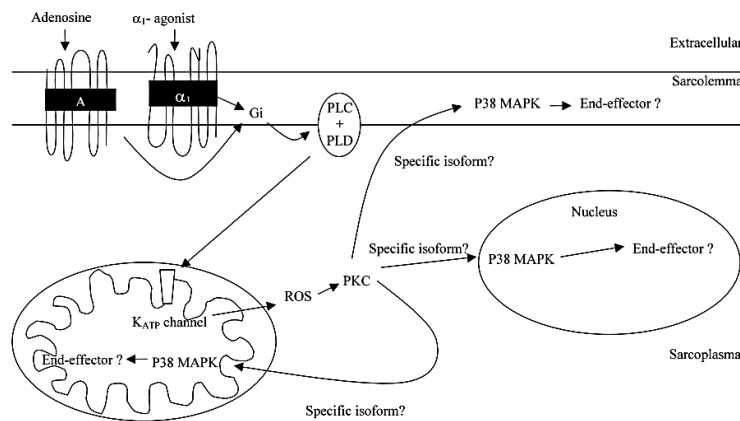
Během prvního okna IPC je aktivována tzv. „*Reperfusion-Induced Salvage Kinase (RISK)*“, signální dráha přes receptory spřažené s G-proteiny. Tato dráha zahrnuje fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3), proteinkinázu B (Akt), kinázu regulovanou extracelulárním signálem 1 a 2 (ERK $\frac{1}{2}$), glykogensyntázakináza 3 β (GSK-3 β), což vede k inhibici otevření mPTP. Přes receptory spřažené s G-proteiny je aktivována i druhá signální dráha tzv. „*Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE)*“, která zahrnuje tumor nekrotický faktor α (TNF α), převodník signálu a aktivátor transkripce 3 (STAT-3) a vede také k inhibici otevření mPTP. Během druhého okna jsou aktivovány jiné dráhy. Je aktivován nukleární faktor NF- κ B, což vede ke zvýšené expresi indukibilní NO syntázy (iNOS), cyklooxygenázy 2 (COX-2) a anti-apoptotických proteinů, pro přehled (Bousselmi et al., 2014) .

RIPC je charakterizován opakující se ischemií na tkáni vzdálené od srdce (Lau et al., 2017). Musí být však splněny následující tři podmínky: generování signálu, přenesení signálu na cílový orgán a odpověď transferovaného signálu musí vyústit v kardioprotekci (Totzeck et al., 2016). Prací, které se týkají RIPC existuje velké množství, ale není v nich použit jednotný režim tzn. Stejný počet a trvání I/R cyklů. Proto si v roce 2016 Johnsen a spol. dali za cíl zjistit vliv počtu cyklů a jejich trvání na účinnost RIPC. Z jejich výsledků vyplývá, že účinnost RIPC je závislá na počtu cyklů i na jejich délce. Protekce nebyla statisticky prokázána při použití méně než čtyř cyklů RIPC a okluzí zadní končetiny, která trvala 10 min (Johnsen et al., 2016). Mechanismus kardioprotekce je zde stejný jako u přímého ischemického preconditioningu, pro přehled (Hausenloy and Yellon, 2007). Doposud není objasněna signální dráha mezi ischemickým orgánem a srdcem, ale předpokládá se existence tří možných cest. První cesta je založena na humorálních faktorech, druhá cesta je neurální a třetí je systematická, pro přehled (Bousselmi et al., 2014).

3.2 Farmakologický preconditioning

Bylo zjištěno, že efektu ischemického preconditioningu lze docílit i farmakologickou cestou tzv. farmakologický preconditioning. Kardioprotektivní efekt ischemického preconditioningu je zprostředkován receptory, které jsou spřažené s inhibičním G-proteinem (G_i): adenosinovými receptory A_1/A_3 , bradykininovým B_2 a opioidními δ receptory (Ebrahim et al., 2001; Fryer et al., 1999; Takano et al., 2001), proto se využívá k vyvolání protekce agonistů těchto receptorů adenosin, bradykinin či opioidy (Miki et al., 1998; Schultz et al., 1996; Tsuchida et al., 1992), které dále aktivují PKC a následně stimulují otevření K_{ATP} kanálu, který je mediátorem nebo konečným efektem (Garlid et al., 1997; Sato et al., 1998). Úloha adenosinu byla zjištěna v aktivaci adenosinových receptorů A_1 jak před ischemií myokardu, tak i v časně fázi reperfúze. Bylo zjištěno, že v časně fázi reperfúze zvýšená aktivita adenosinových receptorů A_1 je spojená se zvýšenou fosforylací Akt, endoteliální NO syntázy (eNOS) a dochází tak ke zlepšení mitochondriální funkce (Liu et al., 1991; Paez et al., 2019). Baxter s kolektivem (1994) jako první prokázal efekt adenosinových receptorů na kardioprotekci po 24 hod od provedení ischemického preconditioningu. Kardioprotektivní účinek bradykininu byl prokázán na nejrůznějších animálních modelech jako jsou potkani, králíci a prasata (Jaberansari et al., 2001; Kositprapa et al., 2001; Starkopf et al., 1997). První experiment využívající agonistu opioidů, který potvrdil pozitivní efekt v pozdější fázi kardioprotekce, byl proveden v roce 1999 (Fryer et al., 1999). Loubani a Galinanes (2002) byli první, kteří ve své práci dokázali, že farmakologický preconditioning a ischemický preconditioning mají shodnou signální kaskádu u lidského myokardu probíhající přes mitochondriální K_{ATP} kanál, PKC a mitogenem aktivované proteinkinázy p38 (p38MAPK). Ve své práci popisují protektivní signální dráhu následovně: Aktivace adenosinového receptoru nebo α_1 -adrenergního receptoru způsobí otevření mitochondriálního K_{ATP} kanálu prostřednictvím signalizace G_i proteinů, včetně aktivace PKC. PKC může být translokována na mitochondriální membránu, sarkolemu, interkalární disky anebo jádro, kde aktivuje p38MAPK společně s konečnými efekty nebo, intermediáty mitogenu aktivované proteinové kinázy (MAPK) (Obr. 2). U člověka lze protekci inhibovat blokací jednotlivých komponent (K_{ATP} kanál, PKC, p38MAPK), zatímco například u prasat je potřeba inhibovat současně PKC a tyrozinkinázu (Vahlhaus et al., 1998). Proto je cíleno na tento mitochondriální K_{ATP} kanál pomocí farmak. Takovým příkladem je diazoxid, který selektivně otvírá K_{ATP} kanál a byl u něj potvrzen kardioprotektivní účinek (Garlid et al., 1997). Wang a spol. použili diazoxid u pacientů kteří měli podstoupit bypass koronární arterie. Srdeční index

byl mnohem lepší u pacientů, kterým byl aplikován diazoxid, stejně tak se jim rychleji uzdravovala srdeční tkáň po chirurgickém zákroku (Wang et al., 2003). González a spol. využili diazoxid na testování hypotézy, zda jsou během farmakologického preconditioningu regulovány vápníkové kanály L-typu. Z jejich výsledků vyplývá, že diazoxid snižuje influx Ca^{2+} a o 50 % snížil množství hlavní podjednotky vápníkového kanálu L-typu (α_{1c} podjednotky) v membráně. Pain a spol., 2000 za použití tyrozinkinázového antagonisty (genistein) demonstrovali inhibici protekce vyvolanou diazoxidem na králičím srdci (González et al., 2010).



Obrázek 2: Schéma signální dráhy farmakologického preconditioningu; inhibiční G-protein (Gi), fosfolipáza C (PLC), fosfolipáza D (PLD), mitogenem aktivovaná proteinkináza p38 (p38MAPK), mitochondriální draselný kanál citlivý na ATP (K_{ATP}), volné kyslíkové radikály (ROS), proteinkináza C (PKC). Převzato z (Loubani and Galiñanes, 2002); doi 10.1186/1472-6793-2-10.

3.3 Postconditioning

V roce 2003 vyšla první práce, která poprvé přinesla informace o kardioprotektivním účinku ischemického postconditioningu. Zhao jako první provedl na animálním modelu 3 cykly 30-s reperfuze následované 30-s reokluzí po 60 min po koronární okluzi. Snížení velikosti infarktu byla na stejné úrovni jako po IPC. Díky tomu byl definován ischemický postconditioning jako děj, při kterém se střídají krátké cykly reperfuze s reokluzí na počátku reperfuze (Zhao et al., 2003). Benefiční účinek byl také prokázán u pacientů, kterým byl navozen postconditioning během koronární angioplastiky. První klinická studie z roku 2005 dokládá signifikantní snížení množství kreatinkinázy v séru o 36 % během prvních 72 hod po reperfúzi u těchto pacientů ve srovnání se standardním angioplastickým zákrokem (Staat et al., 2005). Ukazuje se,

že se na protektivním účinku podílí snížení akumulace neutrofilů, snížení endoteliální disfunkce, snížení oxidačního stresu, redukce apoptotické smrti buněk, snížení akumulace Ca^{2+} v mitochondriích (Kin et al., 2004; Shao et al., 2019; Zhao et al., 2003; Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Guyton RA, 2003). Ischemický postconditioning je limitován brzkými reperfúzními minutami (Heusch, 2015).

3.4 Chronická intermitentní hypoxie

Hypoxie myokardu je charakterizována jako disproporce mezi dodávkou a požadavkem tkáně na kyslík. Příčin může být několik: snížení arteriálního pO_2 (hypoxická hypoxie), snížení průtoku krve koronárními arteriemi (ischemická hypoxie), snížení transportní kapacity krve pro kyslík (O_2) při zachování normálního pO_2 (anemická hypoxie) (Kolář, 1996). První experiment, který prokázal kardioprotektivní účinek chronické hypoxie, uskutečnili Kopecký a Daum v Praze v roce 1958. Sledovali odpověď izolovaného srdečního svalu, který vystavovali každý druhý den po dobu 6 týdnů podmínkám nadmořské výšky 7000 m (Kopecky and Daum, 1958). Počátky experimentů s hypoxií sahají do roku 1973, kdy byl použit intermitentní hypobarický model (Meerson et al., 1973). Potkani byli exponováni nadmořské výšce 6000 m 5 hodin denně v celkové délce 40 dnů. Úmrtnost zvířat s podvázanou koronární arterií byla snížena 5–6x a velikost nekrózy byla snížena o 35 %. Intermitentní hypobarické hypoxické podmínky (7000 m; 8 hod/den, 5 týdnů) chrání myokard před I/R poškozením, snižují jeho velikost a snižují počet komorových arytmií (Neckář et al., 2002, Asemu et al., 2000). Hypoxické podmínky nejsou testovány pouze na animálních modelech, ale také na lidech. Dobrovolníci podstupují normobarickou hypoxii, kdy jim je podáván plyn se sníženou koncentrací kyslíku. Ve studii, ve které byla navozena intermitentní normobarická hypoxie snížením koncentrace inhalovaného kyslíku z 18 % na 10 % a bylo zjištěno, že u hypertenzních pacientů došlo ke snížení arteriálního krevního tlaku na téměř stejnou hodnotu jako u normotenzních pacientů (Lyamina et al., 2011).

Kardioprotektivní mechanismus chronické intermitentní hypoxie je založen na zvýšené aktivitě K_{ATP} kanálu, což bylo potvrzeno experimentem na králičím modelu (Baker et al., 1997). K_{ATP} kanál se neotevřel za normálních podmínek. Za hypoxických podmínek dochází k hyperpolarizujícímu proudu, tím se zkracuje trvání srdečního akčního potenciálu, což vede k redukci vstupu Ca^{2+} vápníkovými kanály L-typu, snížením aktivity $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku a Na^+/H^+ výměníku. Tyto mechanismy představují prevenci proti vápníkovému přetížení během ischemie a během reperfúze. Vápníková rovnováha je během intermitentní hypoxie

udržována zvýšenou aktivitou ryanodinových receptorů, sarkoplazmatickým retikulem, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníkem (Chen et al., 2006; Yeung et al., 2007). Další důležitou roli v kardioprotektivním mechanismu intermitentní hypoxie hraje PKC (Ding et al., 2004). Její hlavní role je, že po své translokaci na membránu aktivuje signální kaskády popsané výše v kapitole Preconditioning (Liu et al., 1994).

Během I/R poškození vznikají ROS, které jsou velmi důležité signální molekuly pro indukcii kardioprotekce. ROS ovlivňují další signální dráhy přes: např. tyrozinovou kinázu, MAP kinázu, fosfolipázu C, NFκB, IP3 receptor, ryanodinový receptor, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník (Kamata and Hirata, 1999). Intermitentní hypoxie chrání kardiomyocyty před oxidativním stresem a otvíráním mPTP (Zhu et al., 2006b). Zvyšuje se exprese Cu/Zn superoxiddismutázy (Cu/Zn SOD), Mn superoxiddismutázy (Mn SOD), celková antioxidační kapacita a aktivita katalázy (CAT) v kardiomyocytech (Kolář et al. 2007, Chang et al., 2019). Antioxidační systém byl sledován také v podmínkách kontinuální hypoxie, kde byla zvýšená hladina Cu/Zn SOD, Mn SOD a snižuje se CAT na úrovni mRNA (Kasparova et al., 2015a).

3.5 Fyzická zátěž

V roce 1970 byla publikována odborná práce, která ukázala, že fyzická aktivita je spojená se snížením mortality vyvolané kardiovaskulárním onemocněním (Paffenbarger et al., 1970). Nejen, že fyzická aktivita snižuje výskyt infarktu myokardu, ale také zvyšuje míru přežití po něm (Hull et al., 1994). Existují práce, které se zabývají vlivem jak akutního (v rozsahu dnů), tak i chronického cvičení (týdny až měsíce) na I/R poškození (Hamilton et al., 2001; Powers et al., 1998; Taylor et al., 1999). Kardioprotekci vyvolanou cvičením můžeme rozdělit do dvou fází. První fáze kardioprotekce nastává asi po půl hodině akutního cvičení, ale její benefit je ztracen po 3 hodinách od cvičení. Mechanismus této brzké fáze není dobře znám, ale předpokládá se, že za ní může zvýšená aktivita antioxidačního enzymu MnSOD (Hoshida et al., 2002; Yamashita et al., 1999). Druhá fáze kardioprotekce vyvolané cvičením je dosaženo do 24 hod po 5-denním cvičení a přetrvává po dobu nejméně 9 dnů. Zcela vymizí po 18 dnech od cvičení (Lennon et al., 2004a). Vytrvalostní cvičení vede ke změnám v koronární cirkulaci, např. se zvyšuje průměr koronárních tepen a zvyšuje se hustota arteriolárního řečiště, pro přehled (Harold Laughlin et al., 2012). Dále dochází k řadě změn na úrovni kardiomyocytů. Na animálním modelu bylo prokázáno snížení rychlosti glykolýzy v srdci během ischemie (Burelle et al., 2004). Zvyšuje se fosforylace a aktivita eNOS (Hambrecht et al., 2003). Aktivita eNOS je spojená se zvyšující se produkcí oxidu dusnatého (NO). Během ischemie se dusitany

přeměňují na NO působením nitritredukázy (Lefer, 2006). Zvýšená hladina NO aktivuje S-nitrosylaci u srdečních proteinů během I/R poškození, což má za následek inhibici aktivity kaspázy 3 (Kim et al., 1997). Produkce NO z thionitrilů ovlivňuje komplex I elektron-transportního řetězce v mitochondriích, kde dochází ke snížení produkce ROS (Shiva et al., 2007). Po cvičení se také zvyšuje hladina proteinu teplotního šoku 72 (heat shock proteinu 72; HSP72) (Locke et al., 1995). HSP72 zvyšuje antioxidační kapacitu v myokardu a předchází apoptóze díky své ochranné funkci chaperonu (Steel et al., 2004; Suzuki et al., 2002). V neposlední řadě cvičení ovlivňuje aktivitu K_{ATP} kanálů, ovšem pouze sarkolemálních nikoliv mitochondriálních (Brown et al., 2005). Cvičení ovlivňuje klíčové antioxidační enzymy (SOD, glutathionperoxidáza a CAT), které jsou zapojeny do ochrany myokardu před nekrózou a apoptózou, tedy do kardioprotektivního mechanismu (Frasier et al., 2013; Hamilton et al., 2004; Homans et al., 1992; Lennon et al., 2004b; Powers et al., 1993; Yamashita et al., 1999). Kwak et al., 2006 byl jeden z prvních, který se zaměřil na vliv cvičení na stárnoucí srdce. Během stárnutí dochází ke ztrátě myocytů, remodelaci a poruše kontraktilní funkce srdce (Centurione et al., 2003; Stewart et al., 2003; Torella et al., 2004). Apoptóza v průběhu stárnutí přispívá ke ztrátě myocytů o více než 30 % (Olivetti et al., 1991). Na potkaním modelu bylo zjištěno, že 12-týdenní cvičení signifikantně zamezilo ztrátě myocytů, zvýšilo množství pojivové tkáně v levé komoře, byla snížena hladina kaspázy 9 a snížený poměr Bax/Bcl2, zapříčiněný zvýšením exprese Bcl2 proteinu (Kwak et al., 2006).

3.6 Kalorická restrikce

V celosvětovém měřítku se zvyšuje počet obézních jedinců. Z dat Českého statistického úřadu vyplývá, že obezitou v České republice trpí 20 % mužů a 18 % žen, mírnou nadváhou je postiženo 47 % mužů a 33 % žen (ČSÚ, 2018 <https://www.czso.cz/csu/czso/prumerny-cech-trpi-mirnou-nadvahou>). Existuje celá řada přístupů a dietních režimů, které se snaží snížit množství tukové tkáně v těle a zmírnit dopady obezity. Jedním z dietních režimů je kalorická restrikce, při které je snížen denní kalorický příjem, což vede k posílení zdraví a prodloužení života (Ahmet et al., 2011; pro přehled Chung et al., 2013). Obezita zvyšuje incidenci diabetu typu II a kardiovaskulárního poškození, pro přehled (Visscher and Seidell, 2001). Ke kardiovaskulárnímu poškození přispívá zvýšení arteriálního krevního tlaku a ostatních složek metabolického syndromu (Reusch, 2002; Wallis et al., 2002). Experimenty prokázaly již v roce 1978, že kalorická restrikce snižuje krevní tlak (Young et al., 1978) a jsou známy mnohé benefiční účinky jako je například prevence organismu před diabetem, snížení hladiny

cholesterolu, snížení zánětlivé odpovědi, snížení vaskulární fibrózy (Fontana et al., 2004; Guo et al., 2002; Michael Anson et al., 2003; Nicklas et al., 2004). Dalším kladem kalorické restrikce je vliv na hypertenzi a srdeční hypertrofii (Dolinsky et al., 2010). Nejen kontinuální kalorická restrikce prokazuje tyto účinky, ale také intermitentní kalorická restrikce, která se vyznačuje tím, že podávání potravy obden vykazuje pozitivní účinek na organismus (Goodrick et al., 1982; Wan et al., 2003).

Kardioprotektivní efekt byl prokázán u krátkodobé kalorické restrikce, u dlouhodobé mírné kalorické restrikce (20–40 %) a u intermitentního hladovění (Ahmet et al., 2005a; Han et al., 2012; De Lucia et al., 2018; Noyan et al., 2015; Peart et al., 2012). Kardioprotektivní efekt kalorické restrikce se studuje jak na *ex vivo* modelu, tak i na modelu *in vivo* s různým designem délky ischemie a reperfúze. Neexistuje jednotný model pro studium kalorické restrikce na I/R: Abete et al. použili 20 min globální ischemii následovanou 40 min reperfúzí (Abete et al., 2002a). Melo et al. zvolili 20 min globální ischemii následovanou 20 min reperfúzí (Melo et al., 2016). Zatímco Shinmura a spol. provedli experiment na modelu 25 min globální ischemie a 60 min reperfúze (Shinmura et al., 2007). *In vivo* model s 15 min ischemií s různě dlouhou reperfúzí (0,25, 0,5, 1, 2, 3 a 6 hodin) využili Chandrasekar a spol. (Chandrasekar et al., 2001). Bylo prokázáno, že dlouhodobá kalorická restrikce pozitivně ovlivňuje hemodynamické parametry během I/R poškození (Abete et al., 2002b), zvyšuje srdeční sympatickou inervaci s normalizovanou hladinou β -adrenergických receptorů (De Lucia et al., 2018). Snížení tepové frekvence a systolického krevního tlaku bylo také prokázáno u 25% restrikce, která trvala 4 týdny (Rodríguez et al., 2012). Noyan a spol. publikovali práci, která prokázala na myším modelu signifikantní snížení velikosti infarktu myokardu po 30% kalorické restrikci, která trvala 7 dní. Šnorek a spol. ukázal, že kalorická restrikce signifikantně snižuje předčasné komorové údery (PVC) (Šnorek et al., 2012), avšak také snižuje volný T_3 a T_4 v séru (Yamagishi et al., 2010). Intermitentní hladovění redukuje hypertrofii myocytů a dilataci levé komory (Okoshi et al., 2019), snižuje velikost I/R poškození, počet neutrofilů a makrofágů (Ahmet et al., 2005a). Je známo, že během I/R poškození se zvyšuje produkce ROS, která se také dále zvyšuje s věkem, proto vědci cílí na tuto oblast. V roce 1930 byl poprvé popsán benefiční účinek kalorické restrikce. McCay demonstroval prodloužení středního a maximálního věku u potkanů (McCay et al., 1989). Hypotéza proti stárnutí se opírá o to, že díky redukcí energetického příjmu mitochondrie neprodukují velké množství volných radikálů, a tím je sníženo oxidační poškození buňky, pro přehled (Sohal and Weindruch, 1996). Na potkaním modelu byla potvrzeno snížení hypertrofie levé komory srdeční, snížila se též aktivita

proapoptických izoform Bcl-rodiny a byla snížena aktivita kaspázy 9 (Niemann et al., 2010). Práce týkající se kardioprotekce ukázaly aktivaci „survival“ signální kaskády. Zvýšila se exprese Akt, Bcl2 (Ahmet et al., 2005a), byla zvýšena aktivita SOD a CAT (Cicekdal et al., 2019). Zvyšuje se také koncentrace beta-hydroxybutirátu a poměr mezi beta-hydroxybutirátem a acetoacetátem (Šnorek et al., 2012), což opět může vést k ovlivnění redoxního stavu mitochondrií.

4 Chladová adaptace

Na chladovou expozici můžeme nahlížet z mnoha pohledů. Prvním z nich je délka trvání chladové expozice. Takto lze chladovou expozici rozdělit na akutní a chronickou. Akutní expozice trvá od několika minut až po několik hodin (Garofalo et al., 1996; Ricci et al., 2000). Odpověď na chlad souvisí s vazokonstrikcí, třesovou termogenezí, snižujícími se tepelnými ztrátami, zvyšující se produkcí tepla (Castellani et Young 2016). Vystavení akutnímu chladu (10 °C, 2 hod) zvýšilo produkci tepla 2,6x. Zvýšila se oxidace glukózy v plazmě o 13 %, oxidace svalového glykogenu o 109 % a oxidace lipidu o 376 %. Tyto výsledky poukazují na to, že zvýšenou produkci tepla zajišťují především lipidy (50 %) a svalový glykogen (30 %), zatímco glukóza v plazmě (10 %) a proteiny (10 %) v menší míře (Haman et al., 2002). Během akutní chladové expozice je aktivována dráha: katecholaminy, β -adrenergní receptory, adenylátcykláza, cyklické AMP (cAMP), proteinkináza A, hormon senzitivní lipáza, NEFA a zvýšená exprese odpráhujícího proteinu (uncoupling-proteinu, UCP) (Maslov et Vychuzhanina, 2015). Stres vyvolaný chladem zvyšuje antioxidační kapacitu, zvyšuje rychlost metabolismu u chladově senzitivních orgánů, jako jsou játra, kosterní svaly, hnědá tuková tkáň (BAT) a srdce (Wang et al., 2015b). Dochází k ovlivňování krevních parametrů. Akutní chladová expozice vyvolána studenou lázní (18 °C, po několik min) signifikantně zvýšila koncentraci NEFA v plazmě, zatímco ostatní parametry, jako je hladina glukózy, triglyceridy, triiodotyronin, tyroxin, tyreotropní hormon, kortizol a adrenokortikotropní hormon byly beze změn (Ouellet et al., 2012). Avšak postupné vystavování lidí studenému vzduchu 14-15 °C v celkovém rozsahu 10 dní ukázalo v plazmě postupné snížení glukózy a zvýšení NA. Hladiny NEFA, triglyceridů a insulínu měly pouze zvyšující se tendenci. Překvapivě, hladina tyreotropního hormonu, volného T4 a adrenalinu měla tendenci ke snížení (Hanssen et al., 2016).

Doba trvání chronické expozice je chápána v délce několika týdnů (Girrotti et al., 2011). Xing a kol. ve své práci shrnuli obecnou charakteristiku chladové adaptace, kterou lze rozdělit na dvě

fáze. První fáze chladové stimulace trvá tři týdny. Teplo je produkováno játry a kosterními svaly. Zvyšuje se koncentrace katecholaminů, posiluje se aktivita adenylátcyklázy, fosfodiesterázy, zvyšuje se lipolýza. Druhá fáze chladové adaptace trvá další tři týdny. Snižuje se produkce tepla játry, kosterním svalstvem a zvyšuje se aktivita enzymů v hnědé tukové tkáni BAT (UCP, tyroxine-5-iodin, lipoproteinová lipáza). Urychluje se rozpad triglyceridů v plazmatických lipoproteinech, což vede k produkci tepla a ke snížení tělesného tuku. Existují termoregulační mechanismy, které lze rozdělit do dvou kategorií obligatorní a fakultativní. Obligatorní termogeneze je ovlivňována tyroidními hormony a postihuje kontinuálně všechny orgány a tkáni. Fakultativní termogeneze je regulována katecholaminy a je aktivována podle aktuální potřeby organismu. Je produkována hlavně BAT a kosterními svaly, pro přehled (Hampel et al., 2006). Fyziologická odpověď organismu na chronickou chladovou expozici probíhá ve třech oblastech: zvykání, metabolické přizpůsobení a izolační přizpůsobení (zvýšení termogeneze, respektive posílení mechanismů, které šetří tělesné teplo) (Castellani and Young, 2016). Dlouhodobá chladová expozice působí na adrenergní systém, jenž zvyšuje expresi UCPs v tkáních. Při chronické chladové expozici je aktivována dráha: katecholaminy, β -adrenergní receptory, adenylátcykláza, cAMP, proteinkináza A, p38 kináza, transkripční faktory a zvýšení exprese UCP (Maslov and Vychuzhanina, 2015).

Druhým způsobem rozlišování typů chladové expozice rozumíme způsob vystavení chladu. Jedinci jsou exponováni chladnému vzduchu (Blondin et al., 2014; Hiroshima et al., 2018), anebo mohou být ponořováni zcela či částečně do studené lázně (Gordon et al., 2019; Janský et al., 2006; Xing et al., 2014). Chladovou expozici lze studovat na otužilcích (Janský et al., 1996). U jednotlivých modelů byl dosud sledován vliv chladové expozice na rychlost metabolismu (Lesna et al., 1999; Šrámek et al., 2000), tělesnou hmotnost, tepovou frekvenci, systolický a diastolický arteriální krevní tlak, střední arteriální krevní tlak, hemodynamické parametry (Acosta et al., 2018; Deveci and Egginton, 2007; Janský et al., 2008; Kim et al., 2014; Lesna et al., 1999; De Lorenzo et al., 1999). Dále byla sledována koncentrace glukózy v plazmě, hladina katecholaminů, celková koncentrace cholesterolu, triglyceridů, antioxidačních enzymů (Kralova Lesna et al., 2015a; Manfredi et al., 2013).

Lidé se mezi sebou liší různými individuálními faktory – např. dietou, fyzickou kondicí a obsahem tělesného tuku atp., což podmiňuje jejich odlišnou reakci na chladovou expozici. Na základě změn v teplotě jádra, v průměrné teplotě kůže a na úrovni metabolismu pak můžeme rozdělit lidi do čtyř skupin podle adaptační odpovědi - metabolická, izolační, hypotermická

a izolační hypotermická (Bittel, 1992). Metabolická adaptace je charakterizována zvýšenou produkcí tepla během chladové expozice, zvýšením průměrné teploty kůže, při neměnné teplotě tělního jádra. Během izolační adaptace je zachována teplota jádra, nemění se ani produkce tepla a je snižená průměrná teplota kůže. Hypotermická adaptace snižuje teplotu jádra, střední teplota kůže se nemění. Metabolická kompenzace vede ke snížení střední tělesné teploty. Izolační hypotermická adaptace je kombinací jak izolační, tak i hypotermické adaptace: snížení teploty jádra a střední teploty kůže, úroveň metabolismu se téměř nemění, pro přehled (Launay and Savourey, 2009).

4.1 Vystavení extrémnímu chladu

Vědci také studují na animálním modelu a na dobrovolnících vliv extrémního chladu na organismus. Na potkaním modelu (-8 °C, 4 hod) byla zjištěna zvýšená spotřeba lipidů v buňkách nadledvinek, zvýšená spotřeba jaterního glykogenu. Byl také naměřen snížený objem kardiomyocytů o 76 % (Meneghini et al., 2008). Vystavení dobrovolníků chladnému vzduchu -11 °C (6-8 hod/den, 40 dní) ovlivnilo nejen hormonální hladinu, ale i variabilitu tepové frekvence. Došlo ke snížení hladiny kortizolu, testosteronu, prolaktinu, trijodtyroninu a tyroxinu. Byla zvýšená pouze hladina tyreotropního hormonu. V rámci variability tepové frekvence byla sledována jak nízká variabilita tepové frekvence (0,04–0,15 Hz), která je dána sympatickou a parasympatickou aktivitou, tak i vysoká variabilita tepové frekvence (0,15-0,40 Hz), kterou zapříčiňuje především parasympatikus. Byla zjištěna nerovnováha autonomního vegetativního nervstva, znamenající útlum sympatiku a/nebo převládající vliv parasympatiku (Farrace et al., 2003). Jedinci, kteří měli chlazené čelo 0 °C po dobu 60s, měli sníženou tepovou frekvenci, snížený průtok krve kůží a zvýšený střední arteriální tlak. Byl u nich sledován cerebrovaskulární index (podíl mezi středním arteriálním tlakem a průměrnou rychlostí toku) a také periferní resistance (podíl mezi středním arteriálním tlakem a srdečním výdejem). Bylo změřeno, že maximální zvýšení cerebrovaskulárního indexu bylo nižší než maximální zvýšení periferní resistance. Vazokonstrikce v mozku není tak masivní při sympatické inervaci, protože začnou působit autoregulační mechanismy na bázi humorální a neurální (Brown et al., 2003a).

V dnešní době se těší velké oblibě kryosauna. Jedinci jsou exponováni velmi nízkým teplotám po dobu několik minut. Po vystavení teplotě -70 °C (3 min) byla v krvi u dobrovolníků naměřena zvýšená aktivita glutamátdehydrogenázy, aspartátaminotransferázy, lipázy, laktátdehydrogenázy, cholinesterázy, leucinaminopeptidázy. Byla také zvýšená hladina NEFA

, HDL-cholesterolu, kreatininu, glukózy a β -hydroxybutyrátu, draselných a chloridových iontů (Juravlyova et al., 2018). Byla porovnána antioxidační kapacita v plazmě mezi ženami, které byly exponovány v kryosauně $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min, 3 měsíce) s otužilci, kteří byli vystaveni ledové vodě (2s, 3 měsíce). Bylo zjištěno, že u žen byla zvýšena antioxidační kapacita během prvních 4 týdnů ve 2. min po chladové expozice a k návratu na bazální hodnotu došlo po 35 min od vystavení chladu. Stejného výsledku bylo dosaženo i u otužilců (Dugué et al., 2005). Na stejném modelu (ženy vystaveny $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min; otužilci exponováni chladné vodě $0-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s) bylo naměřeno signifikantní snížení hladiny adrenokortikotropního hormonu a kortizolu v plazmě ve 35 min ve 4-12 týdnu ve srovnání s 1. týdnem. Úroveň interleukinů IL-1-beta, IL-6 a TNF α v plazmě byla beze změny (Leppäluoto et al., 2008).

4.2 Vliv chladové expozice na glukózovou toleranci organismu

Chladová expozice mění vnitřní prostředí organismu. Je velmi pravděpodobné, že glukózová tolerance se zvyšuje aktivací třesové a netřesové termogeneze (Vallerand et al., 1990). Změna glukózové homeostázy ve vztahu k chladové expozici začala být studována v 80. letech 20. století. První experimenty byly provedeny po akutním vystavení chladu a sledovaly převážně inzulínovou senzitivitu. 24hodinové vystavení $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zvýšilo příjem potravy, snížilo koncentraci glukózy v plazmě, snížilo jaterní glykogen. Došlo k mírnému nárůstu MK v plazmě a snížila se koncentrace inzulínu v séru o 50 % (Smith and Davidson, 1982). Experiment na samicích exponovaných chladu ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 hod), kterým byla injekčně podaná glukóza (1ml 50% glukózy/kg), prokázal snížení inzulínové odpovědi a zlepšení glukózové tolerance. Stejných výsledků bylo dosaženo i v případě, že samice byly vystaveny stejné teplotě ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 3 týdnů. Avšak, opačné změny byly pozorovány, když se samice vrátily do kontrolního prostředí na 15-18 hod (Vallerand et al., 1983). Sledování inzulínové senzitivity v kosterním svalu (soleus) u potkanů ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) v časovém rozmezí 0,5, 2, 7 a 14 dní prokázalo, že 2. a 7. den byla zvýšena citlivost glykolýzy na koncentraci inzulínu. Avšak u 2-denní chladové skupiny po přidání agonisty adenosinového receptoru tento efekt zmizel (Budohoski et al., 1984). V roce 2017 vyšla práce, která se zaměřila na vliv akutního chladu ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 7 dní) na oxidativní a glykolytické svalstvo. Bylo zjištěno, že akutní chlad zvýšil syntézu glykogenu, oxidaci glukózy a redukoval fosforylaci glykogensyntázy pouze v pomalém svalu, m. soleu. Ve všech svalech byla zvýšena fosforylace AKT, GSK3 a AMPK (Sepa-Kishi et al., 2017). Vallerand et al., 1987 provedl inzulínový test na potkanech exponovaných akutnímu chladu, kteří byli vystaveni $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 48 hod a byl jim podán inzulín ($0,5\text{ U/kg}$ intravenózně). Byla zjištěna

maximální spotřeba glukózy v BAT, v bílé tukové tkáni a v kosterním svalstvu jako odpověď na dávku inzulínu. Vystavení organismu akutnímu chladu (5 °C, 48 hod) signifikantně zvýšilo spotřebu glukózy následovně: srdce (73 %), kosterní svaly (126–326 %) a BAT 95krát (Shibata et al., 1989). Také experiment Vallerand a spol. prokázal zvýšenou spotřebu glukózy v červených a bílých kosterních svalech (2-5krát), v srdci (8krát), v bílé tukové tkáni (4-20krát) a v BAT (110krát) při teplotě 5 °C po dobu 48 hod. Chronická chladová expozice (5 °C, 3 týdny) zvýšila spotřebu glukózy v srdci 15krát a v bílé tukové tkáni 29krát. V BAT došlo naopak ke snížení spotřeby glukózy (Vallerand et al., 1990). Glukozový toleranční test byl sledován i u lidí, kteří byli exponováni 10 °C, 3 hod. Samotný chlad měl signifikantní vliv na zvýšení rychlosti metabolismu. Spotřeba O₂ se zvýšila více než 2,5krát a koncentrace noradrenalinu se zvýšila 6,5krát a adrenalinu 2,3krát. Orální provedení glukozového tolerančního testu (GTT) (40 g.m⁻² povrch těla) nemělo vliv na koncentrace glukózy v plazmě a inzulínovou odpověď, avšak intravenózní provedení GTT (20 g.m⁻² povrch těla) snížilo celkový glukozový profil, byla také snížena hladina inzulínu. Hladina glukózy v plazmě se navrátila na bazální úroveň během jedné hodiny v chladu, kdežto kontrolní skupina potřebovala pro návrat 2 hod v 29 °C (Vallerand et al., 1988). Na základě experimentů, které provedla pracovní skupina Valleranda, lze předpokládat, že chlad stimuluje spotřebu glukózy třemi mechanismy. Stimulací kontraktilní aktivity kosterního svalstva, zvýšenou inzulínovou citlivostí v kosterních svalech, v bílé tukové tkáni a v BAT. V neposlední řadě také prostřednictvím neinzulínové dráhy (Vallerand et al., 1990). Stejných výsledků bylo také dosaženo na myším modelu během intermitentní chladové adaptace. Myším byla podaná dávka buď čisté glukózy (2 g/kg, i.p.), nebo inzulínu (5 U/kg i.p.). Intermitentní model (4 °C, 2 hod denně) neprokázal významné změny po 7 dnech expozice, ale zvýšená glukozová tolerance a zlepšení inzulínové citlivosti bylo prokázáno po 14 dnech (Wang et al., 2015a). Vystavení organismu teplotě 20 °C po dobu 10 dní prokázalo snížení uvolnění inzulínu vyvolané glukózou a snížení glukozové odpovědi (Uchida et al., 2010).

4.3 Vliv chladu na kardiovaskulární systém

Bylo publikováno mnoho prací, které poukazují na negativní účinek chronického chladu ve smyslu vniku hypertenze a srdeční hypertrofie (Fregly et al., 1993; Kim et al., 2003; Matsubara et al., 2016; Sun et al., 1997, 2003). Předpokládá se, že hypertenze vyvolaná chladem je spojena se zvýšenou aktivitou renin-angiotensin-aldosteronového systému (Sun et al., 1995, 2001). Bylo také prokázáno, že inhibice mineralokortikoidních receptorů ochránila

organismus před vznikem hypertenze vyvolané chladem (Sun et al., 2008). Dále skupina Suna ukázala, že systémem renin-angiotensin-aldosteron nemá vliv na srdeční hypertrofii (Sun et al., 2003), avšak se ukazuje, že srdeční hypertrofii lze ovlivnit inhibicí protoonkogenu c-myc (Bello Roufai et al., 2007), který se podílí na buněčné proliferaci během tumorogeneze. Bylo publikováno, že po chladové adaptaci se jeho exprese v srdci zvyšuje (6 °C) (Bello Roufai et al., 2007; Ponzielli et al., 2005). Hypertrofie levé komory srdeční byla prokázána u chronické chladové adaptace (4 °C, 4 týdny) (Tsibulnikov et al., 2019). I práce na lidech, kdy dobrovolníci byli vystaveni chladné vodě 10 °C po dobu 120 min potvrdila zvýšení systolického a diastolického krevního tlaku ze 126 a 83 mmHg na 145 a 100 mmHg, ale došlo ke snížení tepové frekvence ze 72 úder/min na 59 úder/min. Zvýšení krevního tlaku má za následek vyšší pracovní zátěž na srdce (Korhonen, 2006). U našeho modelu mírné chladové adaptace (8 °C, 5 týdnů) jsme hypertenzi ani hypertrofii levé komory srdeční neprokázali (Tibenska et al., 2020).

Chladová adaptace zvyšuje srdeční přetížení i dotížení (preload, afterload) aniž by docházelo k významné změně komorové kontraktility, tepové frekvence a srdečního výdeje (Wilson and Crandall, 2011). V roce 2010 byla publikována práce, která porovnává odpověď srdce na chlad (voda 15 °C, 20 min) u mladých (20-34 let) a u starších lidí (58-64 let). U starších jedinců byl zjištěn vyšší index spotřeby kyslíku myokardem, stejně tak i vyšší systolický a střední arteriální tlak. Preload byl zvýšen, end-diastolický objem komory se zvýšil ze 106 ± 7 na 126 ± 9 ml, kdežto u mladých lidí se end-diastolický objem téměř nezměnil (107 ± 7 na 111 ± 7 ml). Měřené parametry komorové kontraktility jako ejekční frakce, srdeční akcelerace během izovolumické kontrakce byly u obou skupin neměnné (Wilson et al., 2010). Zvýšená spotřeba kyslíku byla také prokázána u jedinců (55-65 let), kteří byli vystaveni „krátkodobé“ chladové expozici (- 10 °C, 15 min) (Hintsala et al., 2014), což jsou velmi drsné podmínky. Vyšší spotřeba kyslíku vede k zvýšení průtoku koronárním systémem, pro přehled (Manou-Stathopoulou et al., 2015). Dvacetiminutová akutní chladová expozice zvyšuje u mladých (25 ± 1 rok) i u starších (65 ± 2 roky) jedinců stres stěny levé komory. I když je zvýšená poptávka myokardu po O₂ u obou experimentálních skupin, tak koronární vazodilatace je snižena pouze u mladých dobrovolníků (Gao et al., 2012). Koronární vazodilatace vyvolaná stresem, kam bezpochybně patří i chladová expozice, zahrnuje několik mechanismů: morfologické změny v koronárních cévách, změny vyvolané endotelem a reakce sympatického nervového systému, který je ovlivněn postupujícím věkem (Durand et al., 2004; Hess et al., 2009; Wilson et al., 2007). Je třeba zmínit, že vystavení neotuzilých lidí teplotě vody pod 17 °C je již velmi významný zásah do tepelné homeostázy, neboť voda rychle odjímá teplo z těla a ochlazuje organismus.

Chladné prostředí ovlivňuje také hemodynamické parametry v krvi (Mercer et al., 1999b; Ockene et al., 2004). Hladina červených krvinek a hemoglobinu odrážejí schopnost organismu přenášet O₂, a tím udržovat rovnováhu mezi nabídkou a poptávkou, proto se sledují hemodynamické parametry na chladových modelech. Vystavení chladnému vzduchu pouze v šortkách bez pohybu (11 °C, 1 hod) ovlivnilo u mladých lidí zánětlivou odpověď organismu a ze získaných výsledků vyplývá, že dochází i k zvýšení srážlivosti krve. Byl zvýšen počet červených krvinek a koncentrace hemu, dále bylo pozorováno zvýšení mobilizace granulocytů, zvýšení tromboxanu B2 a snížení počtu lymfocytů. Dále byl zjištěn binaurální rytmus u granulocytů, krevních destiček a v jejich středním objemu. Nedošlo však k signifikantním změnám u krevního koagulačního faktoru VII, cytokinů, interleukínu-6 a u TNF α (Mercer et al., 1999b). Dlouhodobé otužování v moři (říjen až duben) také zvýšilo počet červených krvinek, koncentraci hemoglobinu, střední množství hemoglobinu v erythrocytech (MCH), střední koncentraci hemoglobinu v erythrocytech (MCHC) a koncentraci erythropoetinu v séru. Byl snížen počet trombocytů, imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM) (Chęcinska-Maciejewska et al., 2019). Účastníci, kteří absolvovali plavání na 150 m v 6 °C vodě, měli signifikantně zvýšený počet červených krvinek, bílých krvinek a krevních destiček. Hladina hemoglobinu měla zvyšující se tendenci. Parametry MCH a MCHC byly beze změn. Celkový počet neutrofilů, lymfocytů a monocytů byl také zvýšen. Opět byl zjištěn pokles objemu plazmy o 2,54%, což může přispět k relativnímu nárůstu krevních buněk (Lombardi et al., 2011). I další experiment (6 °C, 2 hod), kde účastníci pouze seděli na židli v chladné místnosti, potvrdil výše zmíněné nálezy, tzn. tendence k zvýšení počtu erythrocytů, neutrofilů a zvýšená koncentrace tromboxanu B2 (Bøkenes et al., 2004a). Chladová expozice, při které účastníci bez pohybu byli obklopeni studenými matracemi (3 °C, 2 hod), také zvyšuje hladinu NEFA, cholesterolu, triacylglyceridů v séru (Hoeke et al., 2017). Avšak dlouhodobé otužování nepotvrdilo změny v hladině cholesterolu, HDL, LDL a triglyceridu (Kralova Lesna et al., 2015a).

4.4 Role β -adrenergního systému v ischemicko-reperfúzním poškození

Srdeční kontraktilita je modulována β -adrenergními receptory (β -ARs). β -ARs se vyskytují ve třech typech (β 1-, β 2-, β 3-ARs) a jsou spřažené s G-proteiny. β 1-, β 2-ARs byly v srdci objeveny dříve než β 3-ARs a oba tyto receptory mohou mít ionotropní a chronotropní efekt. Norepinefrinem se aktivuje dráha přes β 1-ARs, která je spřažena se stimulačním G-proteinem (G_s), následně stimuluje adenylátcyklázu, dochází k zvýšení hladiny cAMP, která poté aktivuje proteinkinázu A (PAK) fosforylující Ca²⁺ kanály L-typu a výsledným efektem je uvolnění CA²⁺

iontů a zvýšení srdeční kontraktility (Xiao and Lakatta, 1993). Disfunkce β_1 -ARs vede k rozvoji arytmií, srdeční hypertrofii, remodelaci komor a apoptóze (Lehnart et al., 2005; Zaugg et al., 2000). Bylo také prokázáno, že β_1 -ARs hrají důležitou roli během ischemického preconditioningu (Spear et al., 2007). β_2 -ARs jsou spřažený jak s G_s , tak s inhibičním G- proteinem (G_i) (T Asano, 1984). Stimulační dráha je aktivována zinterolem (Kaumann et al., 1996), kdežto na aktivaci inhibiční antiapoptotické dráhy ERK působí karchol (Xiao et al., 1999). Schopnost β_2 -ARs dráhy přepínat mezi stimulačním a inhibičním účinkem vede k antiapoptotickému účinku, a tím přispívá ke kardioprotekci (Chesley et al., 2000a). Již v 80. letech minulého století ischemické experimenty na psích a prasečích modelech prokázaly, že se během ischemie signifikantně zvyšuje počet adrenergních receptorů (Maisel et al., 1985; Mukherjee et al., 1979; Vatner et al., 1988). Práce z roku 1998 porovnávala expresi β -ARs na psím modelu mezi laterální oblastí a oblastí podvazu levé přední sestupné koronární arterie (LAD). Bylo zjištěno, že po 30 min ischemii a 1 hod reperfúzi není rozdíl v celkové hustotě β -ARs, avšak pouze po 30 min ischemické periodě se signifikantně zvýšila exprese β_2 -ARs (Bartels et al., 1998). Experiment porovnávající velikost I/R poškození mezi transgenními (zvýšena exprese β_2 -ARs v srdci) samicemi a samci prokázal, že po 20 min ischemie a 40 min reperfúze se velikost I/R poškození zvětšila u samců více než u samic. Samci měli také během ischemie nižší hladinu ATP a pH (Cross et al., 2002). β_3 -ARs byly objeveny v srdci na konci minulého století. Bylo zjištěno, že vykazují negativní ionotropní efekt na myokard, což představuje opačný vliv než β_1 - a β_2 -ARs. Jejich zvýšená exprese byla naměřena při srdečním selhání a hypertenzi (Rozec and Gauthier, 2006). V roce 2011 vyšla práce, která naopak poukazuje na benefiční účinek β_3 -ARs v I/R poškození, a to přes aktivaci eNOS (Aragón et al., 2011). Z výše uvedeného vyplývá, že β -adrenergní systém se stal důležitým terapeutickým cílem v předcházení či eliminování velikosti I/R poškození. K zjištění těchto cílů se využívají inhibitory β -AR receptorů např. metoprolol (inhibitor β_1 -ARs) a ICI 118,551 hydrochlorid (inhibitor β_2 -ARs).

4.4.1 Betablokátory

Metoprolol patří mezi β_1 adrenergní antagonisty, v oblasti kardiologie se používá od roku 1975. Byl používán v klinických studiích u pacientů s hypertenzí a s výskytem koronárního onemocnění. Po podání metoprololu došlo u těchto pacientů k snížení kardiovaskulárních příhod a úmrtí (Papadopoulos and Papademetriou, 2009). Na prasečím modelu byl proveden experiment, ve kterém bylo navozeno I/R poškození s 90 min ischemií, která byla následována

4 až 22 dny reperfúze. Prasatům byl po 15 min ischemie podán metoprolol (v celkovém množství 7,5 mg). Podání metoprololu mělo benefiční účinek, došlo ke snížení velikosti infarktu a došlo také ke zlepšení funkce levé srdeční komory a zlepšila se ejekční frakce levé komory (Ibanez et al., 2007). Snížení velikosti infarktu bylo také prokázáno u pacientů, kteří měli infarkt myokardu s ST elevacemi (Ibanez et al., 2013). Na prasečím modelu bylo prokázáno, že metoprolol (0,75 mg/kg) nemá vliv na velikost I/R poškození, pokud ischemie trvá krátkou dobu, tj. 20-25 min, a nebo příliš dlouho tj. 60 min. Účinnost metoprololu byla prokázána při délce trvání od 30 do 50 min (Lobo-Gonzalez et al., 2020). Bylo také potvrzeno, že myokard byl více chráněn před poškozením, pokud byl metoprolol podán před reperfúzní fází než po reperfúzi. Současně měla tato skupina sníženou infiltraci neutrofilů, byla snížena apoptóza a byla zvýšena aktivita proteinkinázy B (Akt) (Ibanez et al., 2011) .

Syntetická látka ICI 118,551 hydrochlorid (erytro-dl-1-(7-metyllindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol hydrochlorid) je jeden z β_2 adrenergických antagonistů. ICI 118,551 je také hojně využíván v oblasti sledování či ovlivňování kardioprotektivních projevů. Bylo prokázáno, že u lidí ICI 118,551 hydrochlorid projevuje svůj kompetitivní selektivní charakter u dávky nižší než 40 mg. Dávka nižší než 40 mg snížila tepovou frekvenci při cvičení o 10 úderů/min (Arnold et al., 1985). V roce 2003 byla publikována práce, která sledovala účinek ICI 118,551 hydrochloridu (2 μ M) na velikost I/R poškození (40 min globální ischemie následovaná 30 min reperfúzí). Ukázalo se, že podání ICI 118,551 hydrochloridu nemělo vliv na kardioprotektivní účinek isoprenalinu, který byl podán 5 min před ischemickou fází (Frances et al., 2003). Naopak práce roce 2011 ukázala opačný efekt (Salie et al., 2011a). Při podání tohoto inhibitoru (50 nM) byl zrušen kardioprotektivní efekt vyvolaný isoprenalinem (Salie et al., 2011a). Byl u něj také prokázán pozitivní účinek na plicní hypertenzi. Po podání ICI 118,551 hydrochloridu (0,2 mg/kg) byl snížen systolický plicní tlak z 32,3 mmHg na 23,9 mmHg, což představuje snížení o 25 %. Systémový systolický tlak byl po podání inhibitoru beze změny (Wenzel et al., 2009). Podání ICI 118,551 (50 mg) snížil krevní tlak u pacientů s mírnou hypertenzí (Vincent H., 1985). Na morčatech byl zase prokázán benefiční účinek ve snížení počtu komorových fibrilací (Cuparencu et al., 2000).

5 Úloha hnědého tuku v chladové adaptaci

U savců rozeznáváme tři typy tukové tkáně: bílou, běžovou a hnědou. Jednotlivé druhy se liší svojí morfologií, anatomickým uložením, vývojem a funkcí (Kiefer, 2016). Bílé adipocyty jsou tvořeny jednou velkou tukovou kapkou a obsahují relativně málo mitochondrií a malé množství

UCP1. Jsou součástí viscerálního tuku. Slouží jako zásobník pro skladování paliva (Wang and Seale, 2016). Za určitých podmínek jako je chronická chladová stimulace, cvičení, působení agonisty koaktivátor peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru gama (PPAR γ), nebo agonisty β_3 -adrenergických receptorů dochází k tzv. „browningu“, tedy hnědnutí bílé tukové tkáně (Richard et al., 2010; Sidossis et Kajimura, 2015). Těmto adipocytům říkáme béžové adipocyty. Hnědnutí je proces, při kterém dochází k aktivaci exprese UCP1 v béžových adipocytech uvnitř bílých tukových ložisek. Béžové adipocyty jsou kombinací jak bílých, tak i hnědých adipocytů. U hlodavců se vyskytují uvnitř bílých tukových oblastí, subkutánně v oblasti třísel nebo podpaží (Richard et al., 2010). Mají některé znaky stejné jako hnědé adipocyty. Obsahují větší množství mitochondrií, multilokulární lipidové vakuoly a probíhá v nich zvýšená exprese UCP1 (Sidossis and Kajimura, 2015). Na druhou stranu se liší ve svém původu a vývoji. Hnědé preadipocyty vznikají pod vlivem prekursoru myogenního faktoru 5 (*Myf5*), zatímco bílé a béžové preadipocyty vznikají přímo pod vlivem *Myf5* negativního progenitoru. Další rozdíl je v genové expresi. Hnědé adipocyty exprimují *Zic1* a LIM homeobox 8. Béžové adipocyty exprimují: *CD137*, transmembránový protein 26, transportní protein mastných kyselin (*Slc27a1*), transkripční faktor T-box, homeobox C9. Bílé adipocyty exprimují homeobox C8 a transkripční faktor 21 (Qian et al., 2015; Sidossis and Kajimura, 2015).

Hnědé adipocyty mají polygonální tvar. Obsahují velké množství mitochondrií, malých lipidových vakuol, které jsou obklopené cytoplazmou. Mitochondrie obsahují na vnitřní mitochondriální membráně UCP1 (Sidossis and Kajimura, 2015), díky kterému má BAT termogenetický potenciál. UCP1 odpřahuje oxidativní fosforylaci od syntézy ATP, a tím dochází ke generování tepla (Qian et al.). U hlodavců se BAT vyskytuje v malých interskapulárních, subskapulárních, axilárních, perirenálních a periaortálních ložiscích (Richard et al., 2010). U dospělého člověka se BAT vyskytuje spíše cervikálně, supracervikálně, parasterálně a někdy i perirenálně (Kiefer, 2016). Je to vysoce specializovaný orgán, který je zodpovědný za netřesovou termogenezi (Vucetic et al., 2011). Hanssen a spol. 2016 ukázali, že ve 3 dnech akutní chladové expozice je signifikantně zapojena třesová termogeneze, kdežto 10. den po chladové expozici se zvyšuje aktivita BAT a dochází k aktivaci netřesové termogeneze (Hanssen et al., 2016). U lidí, kteří se koupali ve vodní lázni (14 °C, 1 hod/den) v celkovém rozsahu 7 dnů, se po chladové expozici redukovala třesová termogeneze o 20 % a zvýšila se aktivita a kapacita BAT (Gordon et al., 2019). Stejně tak došlo k zvýšení o 45 % v metabolické aktivitě a 2,2násobně vyšší oxidativní kapacitě BAT

u lidí, kteří byli vystaveni 10 °C na vzduchu (2 hod/den/4 týdny), ale třesová intenzita nebyla rozdílná mezi skupinami (Blondin et al., 2014). BAT je tkáň, která je inervována sympatikem a je pod vlivem sympatického neurotransmiteru noradrenalinu, který je zodpovědný za aktivaci genové exprese v proliferaci a aktivaci netřesové termogeneze. Noradrenalin působí primárně přes β_3 -adrenergní receptory a určitý efekt mají i α_1 -adrenergní receptory (Cannon and Nedergaard, 2004). Bylo prokázáno, že netřesovou termogenezi lze zvýšit indukci noradrenalinu o více než 60 % u chladově adaptovaných potkanů. Bylo také zjištěno, že u potkanů, kteří byli vystaveni akutní chladové expozici (4°C, 4 hod denně) dochází k redukci endogenního noradrenalinu o 50 % v interscapulární oblasti a o 30 % v epididymální i retroperitoneální tukové tkáni (Garofalo et al., 1996).

UCP2 geny jsou exprimovány již v prenatálním vývoji, zatímco geny *UCP1* a *UCP3* jsou exprimovány až postnatálně. *Ucp2* mRNA transkript se zvyšuje po narození, ale pomaleji než mRNA *Ucp3* a *Ucp1*. Krátké vystavení chladu způsobilo u dospělých myši zvýšení mRNA *Ucp1* a *Ucp2*, ale nikoliv *Ucp3* (Carmona et al., 1998). Exprese *Ucp3* je závislá na hormonálních signálech (např. tyroidní hormony), které jsou zapojeny do energetické rovnováhy (Gong et al., 1997).

Z uvedeného vyplývá, že adaptivní odpověď na chlad vyvolává komplexní hormonální a metabolické změny v organismu a jeho účinky se liší dle intenzity a doby expozice. Vliv chladu na signální dráhy v srdci v době započetí této práce nebyl téměř vůbec studován a jeho potenciální kardioprotektivní efekt je úzce spojen s nastavením mírnější teploty a režimu s ohledem na exponovaný organismus.

6 Cíle disertační práce

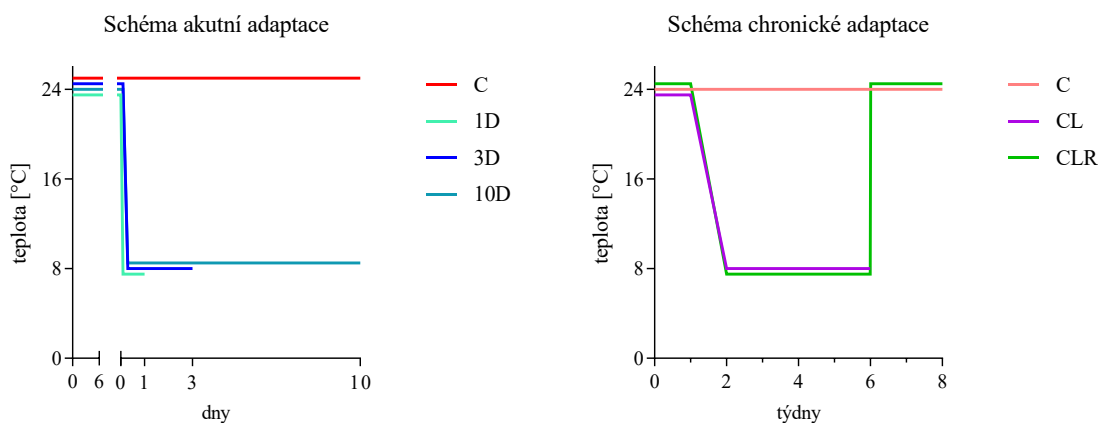
1. Zjistit nezbytně nutnou dobu expozice mírnému chladu ($8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), která již vyvolá odpověď netřesové termogeneze u podestlaných potkanů ustájených v páru
2. Stanovit vliv krátkodobé expozice mírnému chladu ($9 \pm 1^\circ\text{C}$) na velikost ischemicko-reperfúzního poškození s cílem najít nejkratší dobu, která vyvolává kardioprotekci
3. Stanovit vliv dlouhodobé expozice mírnému chladu ($8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) a následné 2-týdenní regrese ($24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) na velikost ischemicko-reperfúzního poškození
4. Určit zapojení adrenergických signálních drah $\beta 1\text{-AR}$ a $\beta 2\text{-AR}$ v mechanismu kardioprotekce s použitím selektivních inhibitorů

7 Chladová expozice a použité metody

7.1 Režimy chladové expozice

V této práci byla sledována odpověď organismu v průběhu chladové aklimace, která v tomto komplexním pohledu a mírném režimu není dosud popsána. Byly zvoleny dva režimy mírné chladové expozice, a to krátkodobá expozice (9 ± 1 °C) a dlouhodobá expozice (8 ± 1 °C). Na základě dostupné literatury byla vybrána 1-denní (1D), 3-denní (3D) chladová expozice, kdy je aktivována třesová termogeneze. 10-denní chladová expozice (10D), ve které byla již zaznamenána netřesová termogeneze u lidí při teplotě 15-16°C a byla již zvýšená aktivita BAT (van der Lans et al., 2013). Na základě dlouholetých zkušeností doc. Stanislava Vybírala byl zvolen chronický model 5-týdenní chladová expozice (CL). Pro zjištění přetrvávajícího účinku CL byla zvolena 2-týdenní regrese ve 24 ± 1 °C (CLR). Všechna zvířata byla pro minimalizaci vlivu stresu z transportu ponechána týden před chladovou expozicí v termoneutralní teplotě (24 ± 1 °C). Potkani určení na CL a CLR byli během prvního týdne chladové expozice postupně zvykáni na 8 ± 1 °C intermitentní expozicí (každý den 8 hodin v 8 ± 1 °C a 16 hodin ve 24 ± 1 °C). Na rozdíl od potkanů chladově exponovaných po dobu 1 dne, 3 dní a 10 dnů, kteří byli rovnou umístěni do teploty o stupně vyšší (9 ± 1 °C) na potřebnou dobu chladové expozice. V experimentech byly použity dvě kontrolní skupiny jedna pro 1D, 3D a 10D, a druhá pro CL a CLR. Hmotnost zvířat byla plánována tak, aby byla na konci všech experimentů přibližně stejná. Tedy, aby navozená ischemie myokardu byla prováděna na stejně starých zvířatech a mohla se porovnávat s úrovní metabolického profilu a netřesové termogeneze.

Průběh chladové aklimace je zobrazen na časové ose jednotlivých chladových expozic (Obr. 3). Zvířata byla chována po dvojicích s podestýlkou, abychom zamezili sociálnímu stresu. Během chladové expozice byla pravidelně sledována rektální teplota (Příloha 15.1). Všechna zvířata byla krmena standardní dietou ST1 a chována ve světelném režim 12/12. Pro stanovení I/R poškození byli použiti samci kmene Wistar, chovné jádro Charles River (Velaz s.r.o.). Na ostatní experimenty byli použiti samci kmene Wistar z Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i. (FGÚ). Všechna zvířata byla přivezena do vivária PřF UK v počáteční hmotnosti 180-220 g. Po týdnu byla část použita pro chronický experiment a zvířata pro akutní expozice byla vystavena chladu až po dosažení hmotnosti 300-350 g.



Obrázek 3: Časový průběh krátkodobé a dlouhodobé chladové expozice ve zvolených režimech: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontrol (C).

7.2 Glukózový toleranční test

Ve spolupráci s doc. Janem Polákem byl podle Weiszenstein a spol. zaveden na našich modelech glukózový toleranční test (Weiszenstein et al., 2016). Před glukózovým tolerančním testem potkani lačnili 17 hodin. V den experimentu byli zváženi a byla jim žiletkou odňata špička ocasu. Z ocasní cévy byla odebrána kapka krve a pomocí glukometru (ACCU-CHEK Performa) byla změřena počáteční hladina glukózy v krvi. Dle hmotnosti byla potkanům podána glukóza (i.p. 100 mg/100 g). V intervalu 5 min byla měřena hladina glukózy z ocasní cévy, v celkové délce 90 min. Poslední naměřená hodnota hladiny glukózy v krvi byla naměřena ve 120. min (Polak et al., 2018).

7.3 Metabolický test

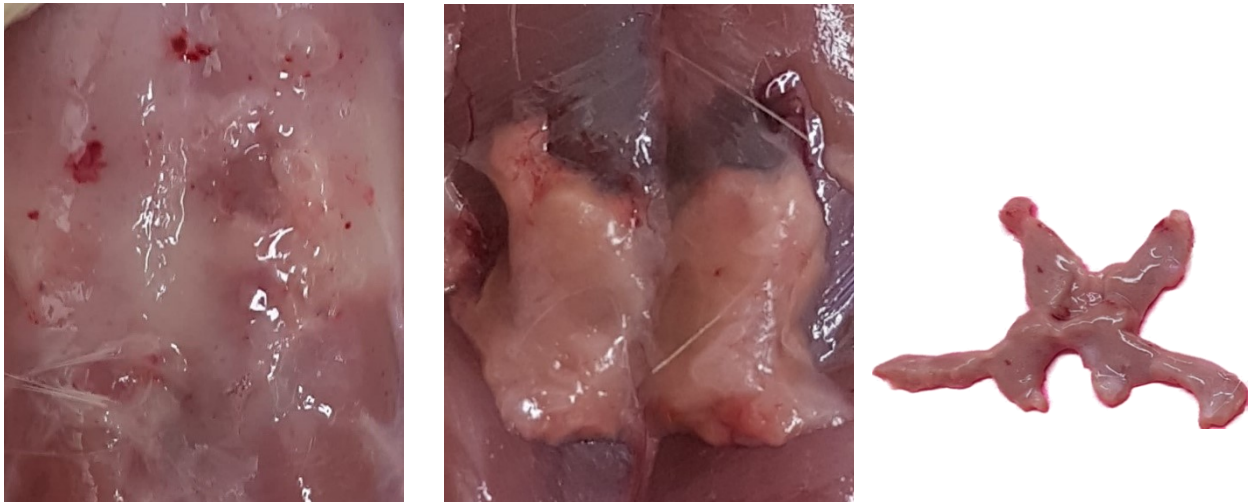
Potkani určeni pro stanovení odpovědi netřesové termogeneze po stimulaci noradrenalinem byli rozděleni do následujících skupin: 3D, 10D, CL, CLR a kontrolní skupiny. Den před samotným experimentem byli zváženi a v den experimentu jim bylo podáno anestetikum Thiopental (i.p. 0,1 ml/100 g), v hluboké anestezii byla zvířata fixována v poloze na zádech a byl jim zaveden teploměr do rekta. Tělesná teplota byla monitorována po celou dobu experimentu a byla udržována pomocí vyhřívací dečky v rozmezí 36–37 °C. Následovala kanylace levé jugulární žíly. Prostřednictvím kanyly byli potkani napojeni na infuzní pumpou pro kontinuální infúzi noradrenalinu. Před spuštěním infúze byla potkanům nasazena metabolická maska, a tím došlo

k propojení s analyzátozem dýchacích plynů (Spirolyt II; VEB JUNKALOR DESSAU DDR 18/2961). Dle příslušné hmotnosti potkana byl připraven infúzní roztok následujícího složení: noradrenalin byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku s 5% glukózou s výslednou koncentrací noradrenalinu 20 µg/ml na 100 g.

Potkanům byla měřena celková spotřeba kyslíku prvních 10 min pomocí spirometru (Spirolyt, NDR), byl stanoven bazální metabolismus (BM). Následovala 15 min infúze noradrenalinu v infúzní rychlosti 20 µl/min. Po vypnutí infúze byla 5 min měřena spotřeba kyslíku v tzv. post aplikační fázi (PAP). Po ukončení měření byl odebrán kompaktní BAT z interskapulární oblasti (Obr. 4) a zvážen.

A

B



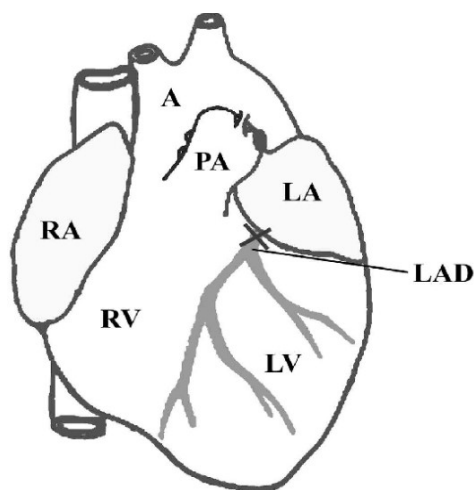
Obrázek 4: Ukázka hnědé tukové tkáně (BAT) v interskapulární oblasti u kontrolní skupiny (A) a po chronické chladové expozici (B) a po izolaci (vpravo); (autor: Mgr. Pavel Vebr).

7.4 Odběr krve na krevní obraz a biochemickou analýzu séra

Krev byla odebrána z ocasní žíly. Potkanům byla odňata špička ocasu a volně tekoucí krev byla sbírána do předem připravených odběrových zkumavek. Zkumavky byly předem určené pro analýzu krevního obrazu (cca 1 ml krve) a pro biochemickou analýzu krevního séra (cca 0,5 ml). Odebraná krev byla analyzována veterinární laboratoří Freston s.r.o.

7.5 Chirurgické navození ischemicko-reperfúzního poškození

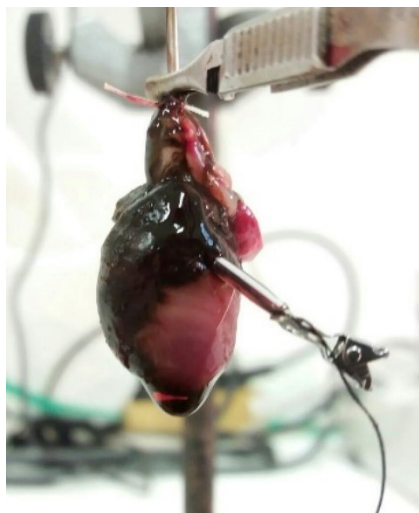
Všechny experimenty byly provedeny v souladu se zákonem České národní rady na ochranu zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.). Potkani byli anestetizováni v místnosti chladové adaptace podáním Thiopentalu (i.p. 60 mg/100 g). Hloubka anestezie a rektální teplota byly kontrolovány v průběhu celého experimentu. Byla kanylována pravá karotida, kterou byl invazivně snímán arteriální krevní tlak a tepová frekvence potkanů. Byla provedena tracheostomie, následována thorakotomií v oblasti pátého mezižebří. Potkani byli ventilováni plicním ventilátorem (UGO Basile, Italy). Dechový objem byl nastaven na 1,2 ml/100 g, 68–70 cyklů/min. Byl odstraněn perikard, poté byl proveden podvaz přední sestupné větve levé koronární artérie (LAD) 1–2 mm pod síňovým ouškem (šicí materiál od Chirmax) (Obr. 5). Byla započata 10 minut stabilizace. Potkan byl napojen na EKG (PowerLab a LabChart 8 software; ADInstrument). Po 10-min stabilizaci byla provedená okluze LAD chirurgickou svorkou (Medin) na 20 min, tj. ischemická fáze. Po 20 min byl podvaz povolen a byla zahájena reperfúze (3 hodiny). Během prvních 5 min reperfúze byl potkan ještě monitorován a bylo snímáno EKG. Následně byl odsát vzduch a tekutina v hrudní dutině a hrudník byl chirurgicky uzavřen. Potkan byl odpojen od plicního ventilátoru a byla vyjmuta kanyla z karotidy. Potkan byl přenesen na vyhřívanou podložku, kde sám přežíval 3-hodinovou reperfúzi (Neckář et al., 2017; Tibenska et al., 2020, 2021; Marvanová et al. submitted).



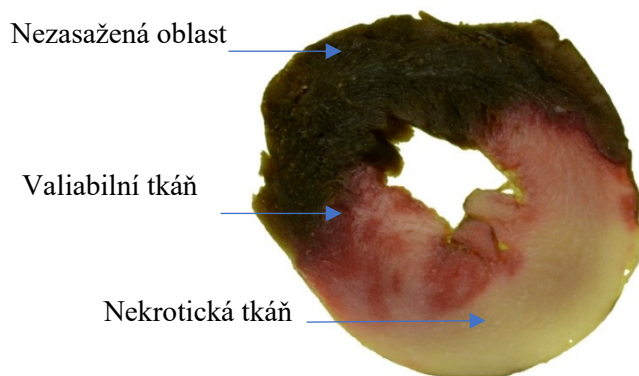
Obrázek 5: Grafické zobrazení oblasti podvazu; přední levá sestupná koronární artérie (LAD), pravá komora srdeční (RV), levá komora srdeční (LV), aorta (A), plicnice (PA), pravé ouško (RA), levé ouško (LA). Převzato z (Aljinović et al., 2010); DOI: 10.14670/HH-25.1507.

7.6 Barvení

Velikost I/R poškození byla stanovena barvením tetrazoliovou solí jak je uvedeno (Neckář et al., 2003; Tibenska et al., 2020). Po 3-hodinové reperfúzi byl potkanovi otevřen hrudník. Srdce bylo vyjmuto, aortou zavěšeno na kanylu na 20 ml injekční stříkačce, promyto fyziologickým roztokem o pokojové teplotě a podvaz byl znovu utážen chirurgickou svorkou (Medin s.r.o.). Koronární arterie byly naplněny fyziologickým roztokem a po výměně injekční stříkačky bylo srdce následně nabarveno 3% vodným roztokem manganistanu draselného, což obarvilo oblast nezasaženou ischemií. Po následném promytí fyziologickým roztokem byl odstraněn podvaz a srdce bylo uloženo alespoň na 1 hodinu do mrazáku (-20 °C). Po jedné hodině bylo rozkrájeno na jednotlivé řezy o tloušťce 1 mm. Řezy byly přeneseny do předem zahřátého 1% roztoku 2,3,5 - triphenyltetrazolium chloridu (Sigma) v PBS (pH 7,4, 37 °C) (TTC). Ve vodní lázni (37 °C) byly řezy v roztoku barveny 25 min. Poté byl roztok TTC vyměněn za 4% roztok formaldehydu (PFA) v PBS. V PFA byly řezy fixovány po dobu 3 dnů. Následně byla z jednotlivých řezů odstříhnutá pravá komora (RV) a levá komora (LV) s mezikomorovým septem (S) byla nafocena (Nikon D5100, 105 mm F2.8 EX DG MACRO OS) (Obr. 6, 7). Velikost I/R poškození a rozsah oblasti zasažené ischemií byla stanovena pomocí softwaru Graphic Cell Analyzer (Parulek et al., 2009).



Obrázek 6: Srdce obarvené 3% manganistanem draselným (autor obrázku: Mgr. Pavel Vebr).



Obrázek 7: Ukázka příčného řezu levé komory po obarvení 1% roztokem 2,3,5 - triphenyltetrazolium chloridu v PBS (autor: Mgr. Pavel Vebr).

7.7 Podání inhibitoru

Pro zjištění kardioprotektivních mechanismů v mírném chladu byl u 12 potkanů z CL a CLR skupin stanoven rozsah I/R poškození po podání vybraných selektivních inhibitorů: metoprolol tartrát (inhibitor β_1 -AR; Apotex Europe B. V., Leiden, Nerland), ICI 118,551 hydrochlorid (inhibitor β_2 -AR; Sigma). Všechny experimenty byly provedeny v daném roce v zimním období (listopad až únor).

Prvním použitým selektivním inhibitorem byl metoprolol tartrát. Inhibitor byl podáván rozpuštěný ve fyziologickém roztoku a aplikován 20 min před ischemickou fází I/R, ve výsledné koncentraci 50 mg/kg i.p.. Kontrolním skupinám byl podán odpovídající objem fyziologického roztoku (Sharma et al., 2008).

Druhým použitým inhibitorem byl ICI 118,551 hydrochlorid, který byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku a aplikován 20 min před ischemickou fází I/R ve výsledné koncentraci 1 mg/kg i.p.. Kontrolním skupinám byl podán odpovídající objem fyziologického roztoku (Mantsch et al., 2010).

8 Statistické hodnocení

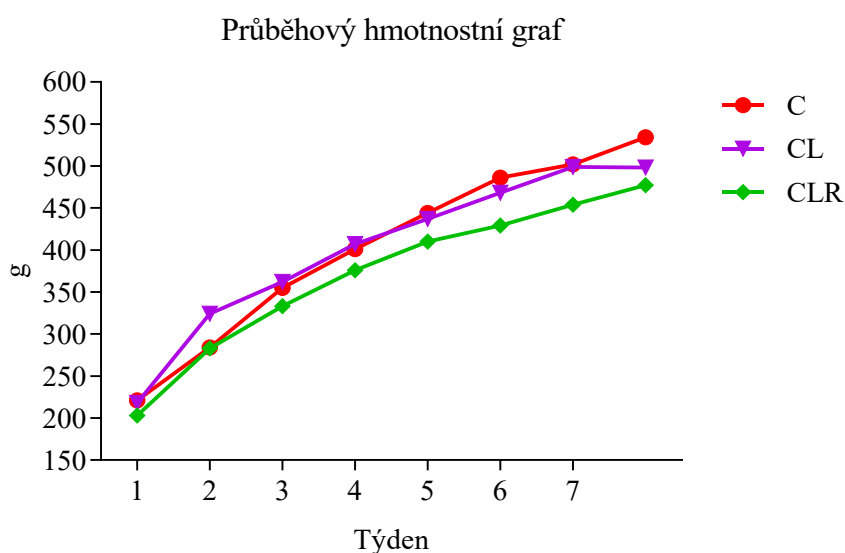
Získaná data byla statisticky hodnocena pomocí GraphPad Prism 8 software (GraphPad, San Diego, CA). Pro porovnání 2 skupin byl použit neparametrický T-test (Mann-Whitney test). V případě 3 a více skupin byla použita One-way ANOVA korigována Tukey post hoc testem. Posledním použitým testem byla Two-way ANOVA s Dunnett's post hoc testem (zjištění vlivu chladové expozice) a se Sidak's post hoc testem (zjištění vlivu inhibitoru). Za statisticky průkazná data se považovala při $p < 0,05$.

9 Výsledky

Disertační práci lze rozdělit do dvou částí. První část práce si klade za cíl stanovit metabolický profil akutní (9 ± 1 °C) i chronické fáze chladové expozice (8 ± 1 °C). V rámci metabolického profilu byly u samců Wistar sledovány následující parametry: tělesná hmotnost (BW), hmotnost BAT, odpověď organismu na stimulaci noradrenalinem, glukózová tolerance, hematologické a biochemické parametry krve. Nedílnou součástí bylo také sledování rektální teploty a stanovení srdečních indexů. Druhá část disertační práce se zaměřuje na stanovení velikosti ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození v průběhu chladové expozice a využití selektivních inhibitorů pro zjištění mechanismů kardioprotekce.

9.1 Metabolický profil chladové expozice

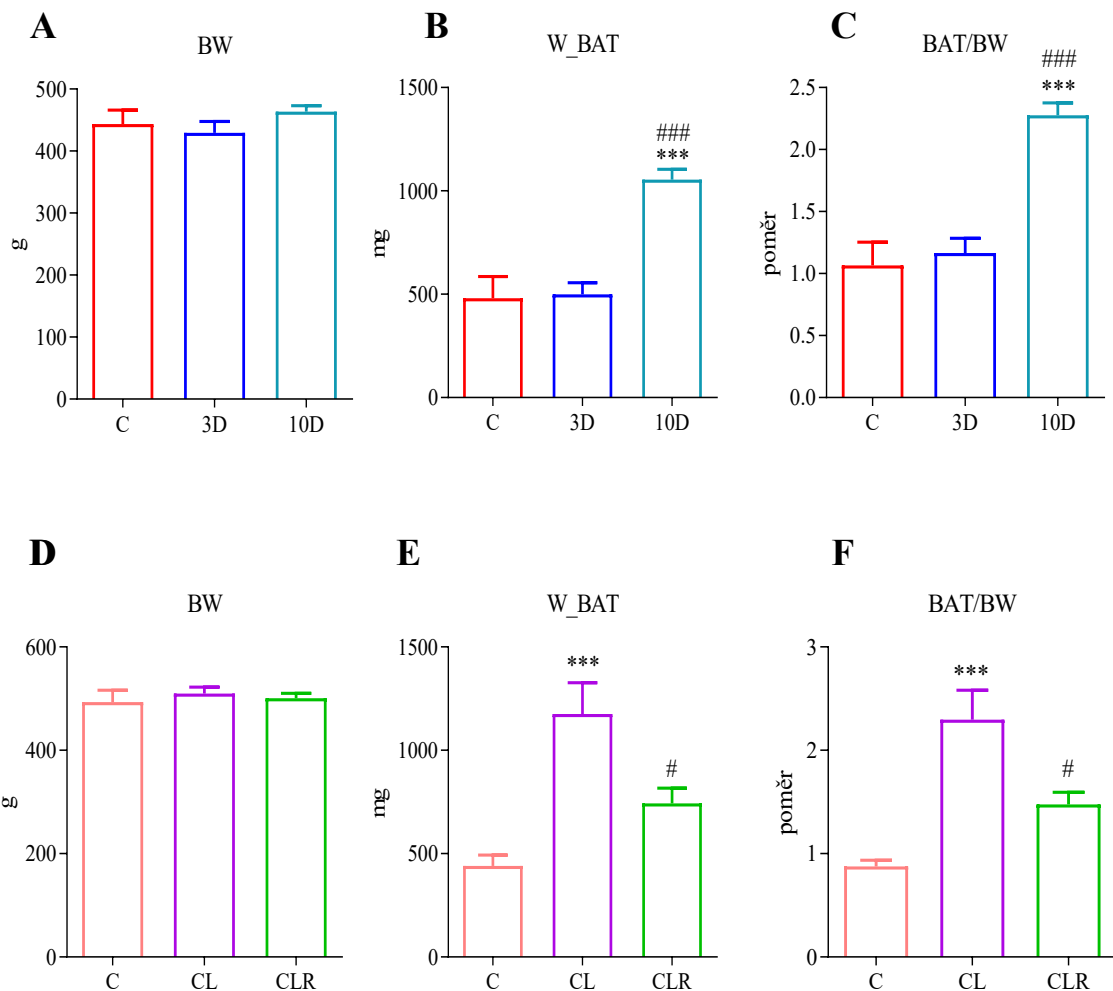
V první studii bylo cílem stanovit metabolický profil chladové expozice. V rámci profilování chladové expozice byli použiti samci kmene Wistar z chovného jádra FGÚ. Byla u nich stanovena odpověď organismu na stimulaci noradrenalinem, glukózová tolerance, byly stanoveny hematologické a biochemické parametry krve. V neposlední řadě byla u všech experimentálních zvířat sledována hmotnost kompaktní hnědé tukové tkáně (W_BAT) v interskapulární oblasti a tělesná hmotnost. Průběhový hmotnostní graf je zobrazen na Obr. 8 a nebyl zjištěn žádný hmotnostní rozdíl mezi skupinami.



Obrázek 8: Průběhový hmotnostní graf u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), u 5 týdnů chladu a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C) z chovného jádra FGÚ AV ČR; n= 8.

9.1.1 Hmotnostní parametry

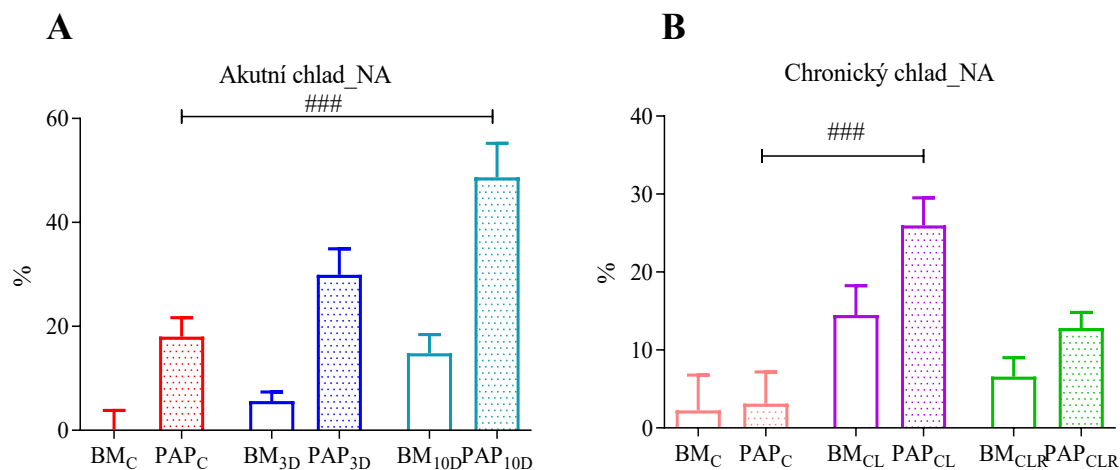
Během chladové expozice nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v tělesné hmotnosti napříč skupinami. Průměrná tělesná hmotnost kontrolních zvířat ke metabolickým testům v průběhu krátkodobého chladu (chovné jádro Fyziologický ústav AV ČR) byla 443 ± 51 g, skupiny 3D byla 429 ± 41 g a 10D 464 ± 23 g, hmotnosti se nelišily. Průměrná hmotnost kontrol dlouhodobé chladové expozice byla 464 ± 23 g, u CL byla 510 ± 32 g a u CLR byla 501 ± 23 g (Obr. 9A a 9D). Na těchto zvířatech při teplotě 9°C modelech dosáhl BAT průměrné maximální hmotnosti u CL 1176 ± 368 mg, nárůst o 135 % proti kontrole (Obr. 9E). Ale již u 10D byl zjištěn signifikantní nárůst BAT 1054 ± 122 mg, což představuje nárůst o 110 % oproti kontrolní skupině (Obr. 9B).



Obrázek 9: Tělesná hmotnost (BW) (A; D); hmotnost hnědé tukové tkáně (W_BAT) (B; E); poměr BAT/BW (C; F); ve zvolených chladových expozicích: 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chladu a 2-týdenní regrese (CLR) a u příslušných kontrol (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p < 0,05); ***p < 0,001 vs C; ###p < 0,001 vs 3D; **p < 0,01 vs CL; #p < 0,05 vs CL; n = 6.

9.1.2 Odpověď netřesové termogeneze na stimulaci noradrenalinem

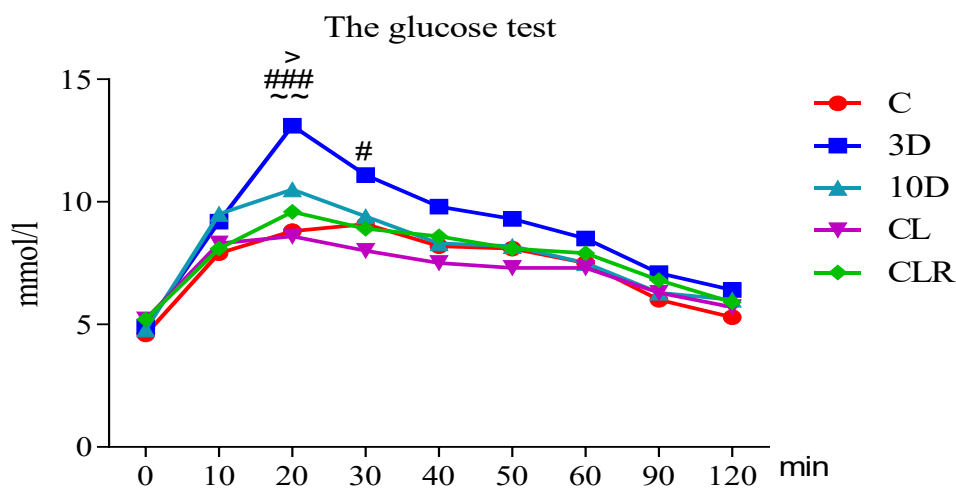
Historicky se traduje, že dospělá zvířata již nelze plnohodnotně adaptovat na chlad (ústní sdělení doc. Vybíral). Avšak využití chladu v terapii má smysl většinou u dospělých, často obézních jedinců, proto jsme zvolili dospělá zvířata, která vykazovala poměrně strmou růstovou křivku (viz Obr. 9). Hmotnost zvířat v době experimentu byla mezi 400-500 gramy. Pomocí nepřímé kalorimetrie (Spirolyt II) jsme měřili rychlost metabolismu u kontrolních a adaptovaných zvířat a zjistili jsme signifikantní zvýšení u 10D o 48 % vůči kontrole. U CL stále přetrvává signifikantní nárůst oproti kontrole, ale je zde patrný pokles od skupiny 10D (o 53 %). V regresi skupině CLR byl zjištěn klesající trend v metabolickém obratu a rozdíl již nebyl signifikantní (Obr. 10).



Obrázek 10: Rychlost metabolismus po infúzi noradrenalinu ve zvolených chladových expozicích (A; B): 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u příslušných kontrol (C); bazální metabolismus (BM), postaplikační fáze noradrenalinu (1,8 ug/ml na 100 g, 5 min; PAP). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05); *p <0,05 vs BM_{3D}; ***p <0,001 vs BM_{10D}; ###p <0,001 vs PAP_C; n= 6.

9.1.3 Glukózový toleranční test

Glukózový toleranční test byl stanoven v průběhu chladové aklimace v expozicích 3D, 10D, CL a následného zotavení ve skupině CLR. Hladina glukózy byla signifikantně zvýšená třetí den expozice chladu (3D) ve 20 min, kdy byla naměřená hodnota 13 mmol/l. Tento rozdíl byl statisticky průkazný proti ostatním skupinám exponovaným chladu a proti kontrole. Signifikantní zvýšení bylo vůči všem ostatním skupinám následovně: o 17 % ve srovnání s kontrolou, o 11 % oproti 10D, o 19 % oproti CL a o 13 % oproti CLR. U téže skupiny 3D byla významně vyšší hladina i ve 30 min ve srovnání s CL o 28 % (Obr. 11, Příloha. 15.2).



Obrázek 11: Průběh glukózového tolerančního testu ve zvolených chladových expozicích: 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontrolní skupiny (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$). *** $p < 0,001$ 3D vs C; ~ $p < 0,01$ 3D vs 10D; ### $p < 0,001$ 3D vs CL; > $p < 0,05$ 3D vs CLR; $n=9$.

9.1.4 Hematologie a biochemická analýza séra

Vzhledem k tomu, že chladová expozice je v literatuře spojována s poškozením ledvin (Fregly, 1982) a změnou krevních parametrů (Kralova Lesna et al., 2015b), byl stanoven v našich modelech krevní obraz a provedena biochemická analýza séra tomto ohledu. Hladina kyseliny močové byla signifikantně zvýšená o 45 % u CLR oproti kontrole a mezi CL a CLR byl rozdíl 52 %. Hladiny cholesterolu a triacylglycerolů byly beze změn (Tab. 1). Výsledky krevního obrazu a biochemická analýza séra ukázaly následující: signifikantní snížení počtu lymfocytů u 3D o 20 %, u 10D o 12 % a u CLR o 15 %. Signifikantní nárůst granulocytů o 41 % u 3D. U CLR bylo zjištěno signifikantní navýšení granulocytů o 31 % a monocytů o 35 % od kontrolní skupiny. Počet červených krvinek byl signifikantně snížen o 12 % a hladina hemoglobinu byla snížena o 7 % v 10D. Na rozdíl od průměrného objemu erytrocytů, který byl naopak zvýšen v 10D o 7 %. U CLR došlo k snížení o 5 %. A mezi CL a CLR byl signifikantní rozdíl 7 %. Stejný nález byl u průměrné koncentrace hemoglobinu v erytrocytech: signifikantní nárůst v 10D o 6 % a snížení o 6 % u CLR. Jak mezi 3D a 10D, tak i mezi CL a CLR byl signifikantní rozdíl 7 %. U 3D došlo k signifikantnímu snížení o 3 % a také v hladině MCHC vztaženého na hematokrit bylo snížení o 5 %. Distribuční šíře erytrocytů byla také zvýšená o 4 % v 10D. Počet krevních destiček byl signifikantně snížen u všech experimentálních skupin: 3D o 27 %, 10D o 29,5 %, CL o 27 % a CLR o 25 %.

Experimentální skupiny	C	3D	10D	CL	CLR
n	6	6	6	6	6
<i>Krevní obraz</i>					
Počet bílých krvinek ($10^9/l$)	18,2 ± 6	19,0 ± 1	17,1 ± 2	16,3 ± 2	15,6 ± 4
Počet lymfocytů ($10^9/l$)	12,3 ± 4	10,5 ± 1	10,2 ± 1	10,4 ± 1	9,2 ± 3
Počet monocytů ($10^9/l$)	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2
Počet granulocytů ($10^9/l$)	5,3 ± 2	7,8 ± 1	6,3 ± 1	5,3 ± 1	5,8 ± 1
Lymfocyty (%)	68,0 ± 3	55,2 ± 4**	59,8 ± 2*	64,1 ± 4	58,0 ± 6**
Monocyty (%)	3,1 ± 0,5	3,8 ± 0,5	3,5 ± 0,4	3,8 ± 0,3	4,2 ± 0,5**
Granulocyty (%)	28,9 ± 3	40,8 ± 4**	36,7 ± 2	32,2 ± 4	37,8 ± 6*
Počet červených krvinek ($10^{12}/l$)	9,0 ± 0,5	8,6 ± 0,4	7,9 ± 0,2**	8,5 ± 0,4	9,5 ± 0,3##
Hemoglobin (g/l)	175,0 ± 13	165,3 ± 4*	162,2 ± 3*	164,0 ± 5	174,7 ± 3
Hematokrit (%)	53,3 ± 4	52,1 ± 2	50,2 ± 2	51,1 ± 2	53,4 ± 1
Průměrný objemu erytrocytů (fl)	59,2 ± 2	60,6 ± 1	63,6 ± 1***	60,3 ± 1	56,1 ± 2***
MCHC prům. obsah hemoglobinu (pg)	19,4 ± 0,4	19,2 ± 0,6	20,5 ± 0,2***##	19,3 ± 0,4	18,3 ± 0,5***
MCHC je hodnota vztažená na hematokrit (g/l)	328,0 ± 4	317,0 ± 6*	322,8 ± 5	321,0 ± 6	327,0 ± 4
Hodnoty distribuční křivky pro erytrocyty (%)	15,0 ± 0,4	15,1 ± 0,1	15,6 ± 0,3*	15,3 ± 0,3	14,9 ± 0,5
Počet krevních destiček ($10^9/l$)	2094,7 ± 323	1528,5 ± 222*	1476,5 ± 307**	1530,0 ± 99**	1572,3 ± 88*
Průměrný objem destičky (fl)	6,4 ± 0,1	6,6 ± 0,7	6,3 ± 0,2	6,4 ± 0,1	6,0 ± 0,3
Trombokrit (%)	16,9 ± 0,3	17,0 ± 0,3	17,1 ± 0,2	16,9 ± 0,1	16,6 ± 0,1
<i>Biochemická analýza séra</i>					
Cholesterol (umol/l)	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,4	2,3 ± 0,3
Triacylglycerol (umol/l)	2,0 ± 0,6	1,4 ± 0,4	2,0 ± 0,4	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,6
Kyselina močová (umol/l)	119,3 ± 42	86,0 ± 18	118,2 ± 16	102,2 ± 10	53,5 ± 9***

Tabulka 1: Krevní obraz a biochemická analýza séra ve zvolených chladových expozicích: 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontrol (C). Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; *** $p < 0,001$ vs C; ~ ~ $p < 0,01$ vs 3D; ## $p < 0,01$ vs CL; # $p < 0,05$ vs CL; $n = 6$.

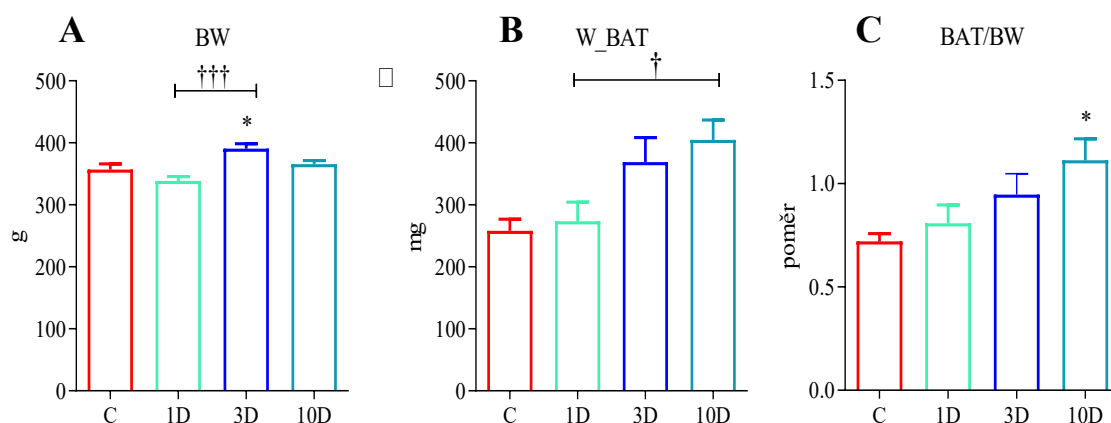
9.2 Ischemická tolerance srdce v počátcích chladové expozice (1 až 10 dní)

V rámci druhého cíle byla provedena na potkanech kmene Wistar z chovu Velaz s.r.o. Zaměřili jsme se na stanovení ischemické tolerance levé komory v počátcích chladové expozice po 1, 3 a 10 dnech. V počátcích chladové expozice byly stanoveny základní parametry: tělesná hmotnost (BW), hmotnost BAT, poměr BAT/BW, rektální teplota (RT), celková hmotnost srdce (HW), poměr hmotnosti levé komory srdeční ku hmotnosti těla (LV/BW), poměr hmotnosti pravé komory srdeční ku hmotnosti zvířete (RV/BW) a poměr hmotnosti celého srdce ku hmotnosti těla (HW/BW). Ve 3 dnech chladové expozice (3D) bylo zjištěno signifikantní zvýšení HW o 15 % ve srovnání s kontrolní skupinou. U skupiny 10D byl zjištěn signifikantní nárůst následujících parametrů oproti kontrolní skupině: hmotnosti BAT o 45 %, poměr BAT/BW o 44 %, HW o 22 %, RV/BW o 35 % a HW/BW o 18 %. Ostatní parametry byly beze změny (Tab. 2).

Experimentální skupiny	Kontrola	1D	3D	10D
n	8	8	8	8
BW (g)	385 ± 16	363 ± 13	356 ± 21	370 ± 30
BAT (mg)	257 ± 47	270 ± 57	266 ± 86	396 ± 71**
BAT/BW	0,67 ± 0,12	0,74 ± 0,16	0,74 ± 0,23	1,07 ± 0,11***
RT (°C)	37,0 ± 0,23	36,9 ± 0,54	36,7 ± 0,27	36,9 ± 0,31
HW (mg)	1016 ± 83	1059 ± 79	1018 ± 58	1030 ± 86
LV/BW	2,07 ± 0,23	2,21 ± 0,26	2,24 ± 0,08	2,16 ± 0,13
RV/BW	0,57 ± 0,05	0,57 ± 0,06	0,61 ± 0,07	0,62 ± 0,07
HW/BW	2,64 ± 0,22	2,78 ± 0,26	2,86 ± 0,11	2,79 ± 0,12

Tabulka 2: Základní parametry: tělesná hmotnost (BW); hmotnost hnědé tukové tkáně (BAT); poměr BAT/BW; rektální teplota (RT); hmotnost celého srdce (HW); poměr hmotnosti levé komory srdeční ku hmotnosti těla (LV/BW), poměr hmotnosti pravé komory srdeční ku hmotnosti těla (RV/BW) a poměr hmotnosti celého srdce ku hmotnosti těla (HW/BW) u krátkodobé chladové expozice: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); ** $p < 0,05$ vs C; *** $p < 0,01$ vs C; $n = 8$).

Hmotnost potkanů v den experimentu byla v rozmezí: kontrola 356 ± 17 g, 1D 344 ± 5 g, 3D 387 ± 7 g, 10D 371 ± 5 g a skupiny se vzájemně signifikantně nelišily (Obr. 10A). Hmotnost BAT u kontrolní skupiny byla 278 ± 20 mg, po 1 a 3 dnu se signifikantně nezměnila (1D 244 ± 29 mg; 3D 351 ± 27 mg), avšak po 10 dnech vzrostla na 414 ± 43 mg, což představuje signifikantní zvýšení o 149 % oproti kontrolní skupině (Obr. 12B). V průběhu I/R poškození byly sledovány hemodynamické parametry, tepová frekvence a střední arteriální tlak (Tab. 3) a nebyly zjištěny žádné rozdíly v naměřených hodnotách.

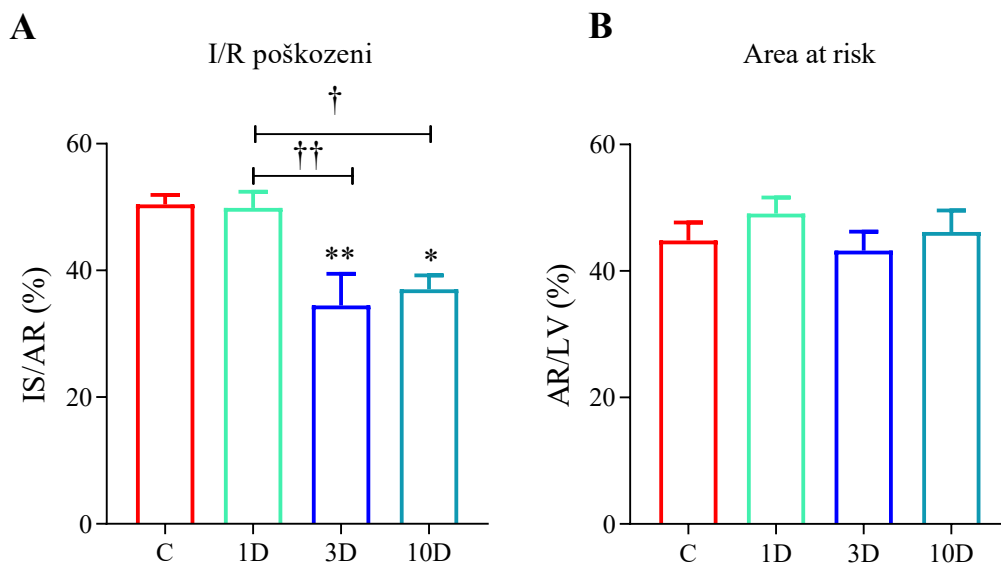


Obrázek 12: Maturace hnědé tukové tkáně (BAT): Tělesná hmotnost (BW, A); hmotnost hnědé tukové tkáně (W_BAT, B); poměr BAT/BW (C); u krátkodobé chladové expozice: 1den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); * $p < 0,05$ vs C; † $p < 0,05$ vs 1D; †† $p < 0,001$ vs 1D; $n = 6$.

Experimentální skupiny	C	1D	3D	10D
<i>Tepová frekvence (úderů/min)</i>				
Stabilizace	390 ± 17	403 ± 20	398 ± 22	382 ± 30
Ischemie	384 ± 33	395 ± 23	382 ± 31	380 ± 33
Reperfúze	375 ± 29	395 ± 30	385 ± 36	382 ± 35
<i>Střední arteriální tlak (mmHg)</i>				
Stabilizace	91 ± 24	83 ± 18	92 ± 16	$70 \pm 18^*$
Ischemie	77 ± 19	73 ± 11	88 ± 18	74 ± 23
Reperfúze	76 ± 16	70 ± 12	84 ± 17	70 ± 17

Tabulka 3: Hemodynamické parametry: tepová frekvence a střední arteriální tlak v krátkodobé chladové expozici: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); * $p < 0,05$ vs C; $n = 9$.

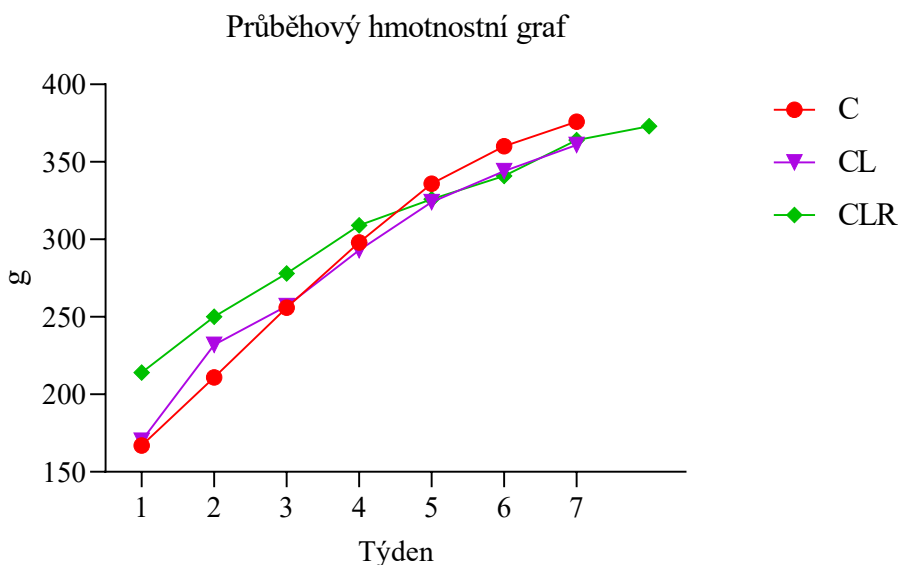
U kontrolní skupiny byla naměřena velikost I/R poškození 52 %. Velikost I/R poškození po 1 dni chladové expozice (1D) 49 % se nelišila od kontrolní skupiny, u které velikost infarktu byla 52 %. Překvapivě již po 3 dnech chladové expozice (3D) byla velikost infarktu snížena na 34 % a došlo k signifikantnímu snížení velikosti I/R poškození o 35 % proti kontrole. 10 dni chladové expozice (10D) snížilo velikost I/R poškození na 38 %, což představuje signifikantní snížení o 27 % proti kontrole (Obr. 13A). Velikost oblasti zasažené ischemií se mezi jednotlivými skupinami nelišila, pohybovala se v rozmezí 45-48 % (Obr. 13B).



Obrázek 13: Velikost ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození (A) vyjádřeno jako poměr velikosti infarktu (IS) a velikosti zasažené oblasti ischemií (AR); velikost zasažené oblasti levé komory srdeční ischemií (B), vyjádřeno jako poměr AR a velikosti levé komory (LV) u krátkodobé chladové expozice: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,05$ vs C; † $p < 0,01$ vs 1D; †† $p < 0,001$ vs 1D; $n = 9$).

9.3 Vliv dlouhodobé chladové expozice na ischemickou toleranci srdce a její přetrvání

Třetí studie byla také provedena na potkanech kmene Wistar z chovu Velaz s.r.o.. Byla zaměřená na stanovení velikosti I/R poškození po dlouhodobé chladové expozici a na její přetrvávající efekt. Během adaptace byli potkani váženi jednou týdně a nebyl zjištěn rozdíl v tělesné hmotnosti, průběhový hmotnostní graf ukazuje Obr. 14. U dlouhodobé chladové expozice byly také stanoveny základní parametry: tělesná hmotnost, hmotnost BAT, poměr BAT/BW, rektální teplota (RT), celková hmotnost srdce (HW), poměr hmotnosti levé komory srdeční ku hmotnosti těla (LV/BW), poměr hmotnosti pravé komory srdeční ku hmotnosti těla (RV/BW) a poměr hmotnosti celého srdce ku hmotnosti těla (HW/BW). Po 5 týdnech chladové expozice (CL) byl zjištěn signifikantní nárůst hmotnosti BAT o 158 % a poměr BAT/BW o 160 % oproti kontrole. Toto signifikantní zvýšení přetrvalo i během 2- týdenní regrese (CLR) 136 % (BAT) a 131 % (BAT/BW). Ostatní parametry byly beze změny (Tab. 4).

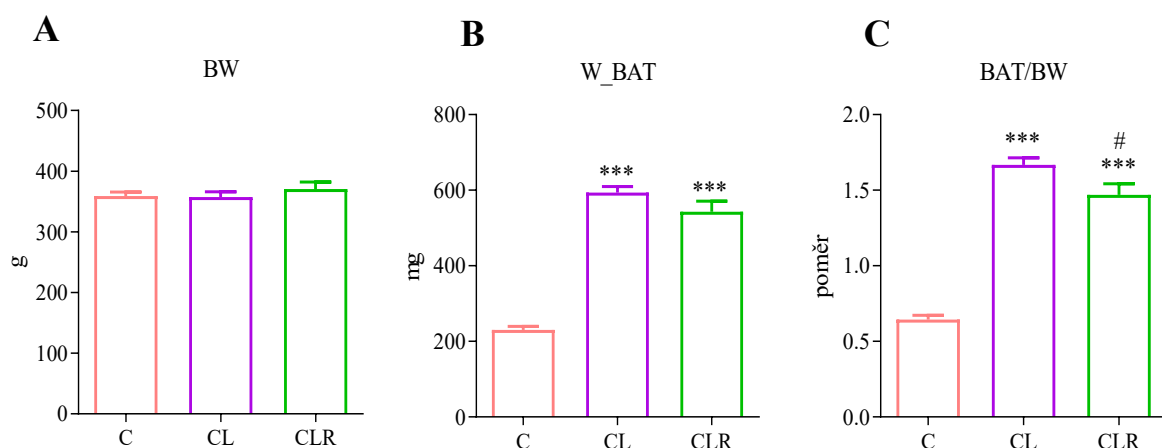


Obrázek 14: Průběhový hmotnostní graf u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), u 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C) z chovného jádra Velaz s.r.o.; n = 24.

Experimentální skupiny	Kontrola	CL	CLR
n	12	12	12
BW (g)	359 ± 22	357 ± 30	371 ± 39
BAT (mg)	230 ± 33	594 ± 54***	543 ± 98***
BAT/BW	0,64 ± 0,10	1,67 ± 0,16***	1,47 ± 0,25***
RT _{1.týden} (°C)	37,4 ± 0,1	37,1 ± 0,1	-
RT (°C)	37,0 ± 0,3	37,1 ± 0,4	36,9 ± 0,3
HW (mg)	975 ± 29,1	1007 ± 22,0	961 ± 24,5
LV/BW	1,65 ± 0,52	1,77 ± 0,04	1,62 ± 0,1
RV/BW	0,53 ± 0,24	0,55 ± 0,02	0,48 ± 0,02
HW/BW	2,72 ± 0,81	2,82 ± 0,06	2,58 ± 0,05

Tabulka 4: Základní parametry: tělesná hmotnost (BW); hmotnost hnědé tukové tkáně (BAT); poměr BAT/BW; rektální teplota během prvního týdne (RT_{1.týden}); rektální teplota v průběhu adaptace (RT); hmotnost celého srdce (HW); poměr hmotnosti levé komory srdeční ku hmotnosti těla (LV/BW), poměr hmotnosti pravé komory srdeční ku hmotnosti těla (RV/BW) a poměr hmotnosti celého srdce ku hmotnosti těla (HW/BW) u dlouhodobé chladové expozice: u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); *** $p < 0,001$ vs C; $n = 12$).

V den experimentu byla průměrná hmotnost zvířat 360 ± 22 g (Obr. 15A). Hmotnost BAT byla po 5-týdenní chladové expozici 594 ± 54 mg, signifikantní zvýšení o 158 % oproti kontrolní skupině. U CLR přetrvávala zvýšená hmotnost BAT 543 ± 98 mg, signifikantní zvýšení o 136 % oproti kontrolní skupině (Obr. 15B). Během navozování I/R poškození byly sledovány hemodynamické parametry tepová frekvence a střední arteriální tlak (Tab. 5). Bylo zjištěno nepatrné signifikantní zvýšení tepové frekvence ve stabilizaci u CL skupiny z 363 ± 24 úderů/min na 399 ± 29 úderů/min, ostatní hemodynamické parametry byly beze změny.

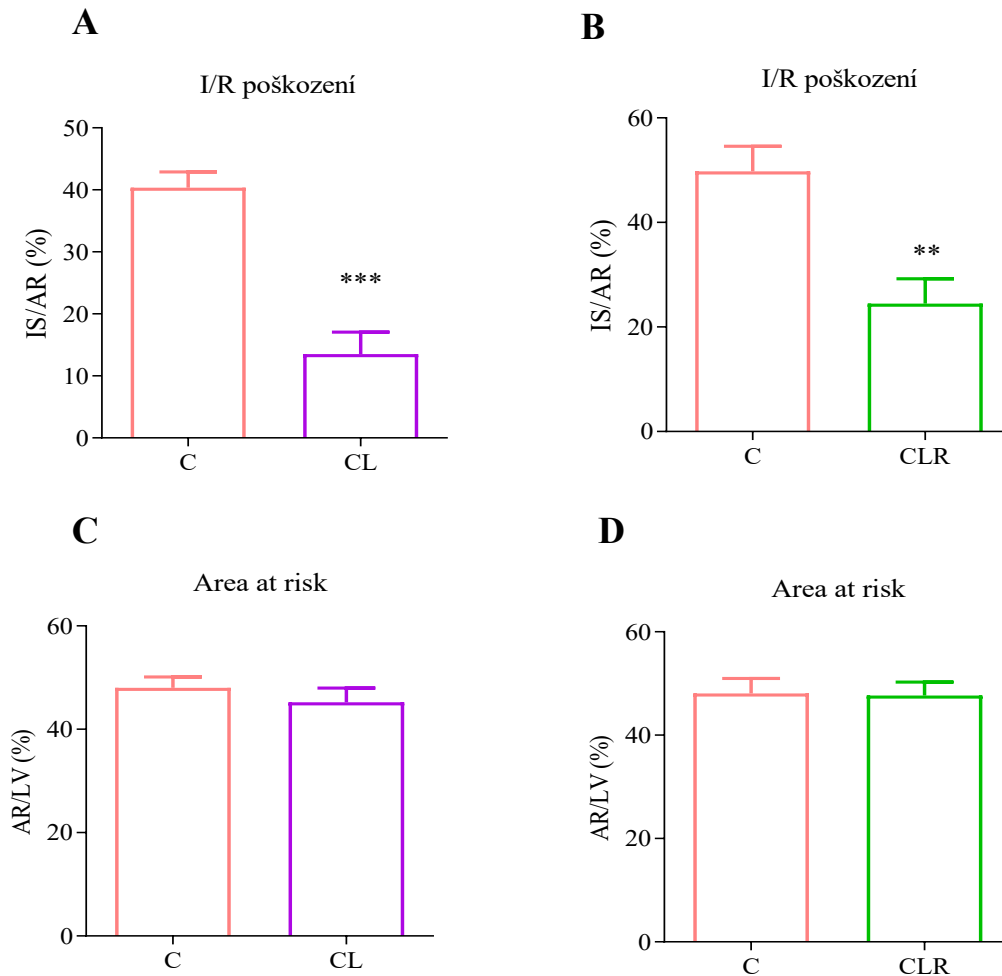


Obrázek 15: Tělesná hmotnost (BW, A); hmotnost hnědé tukové tkáně (W_BAT, B); poměr BAT/BW (C); u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); *** $p < 0,001$ vs C; # $p < 0,05$ CL vs CLR; $n = 12$).

Experimentální skupiny	C	CL	CLR
<i>Tepová frekvence (úderů/min)</i>			
Stabilizace	363 ± 24	399 ± 29*	379 ± 29
Ischemie	370 ± 23	379 ± 35	381 ± 42
Reperfúze	360 ± 28	379 ± 29	379 ± 39
<i>Střední arteriální tlak (mmHg)</i>			
Stabilizace	91 ± 18	97 ± 22	96 ± 20
Ischemie	91 ± 17	84 ± 21	99 ± 17
Reperfúze	88 ± 14	89 ± 19	97 ± 10

Tabulka 5: Hemodynamické parametry: tepová frekvence a střední arteriální tlak u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); * $p < 0,05$ vs C; $n = 12$).

U kontrolní skupiny byla naměřena velikost I/R poškození 41 %. Velikost I/R poškození po 5týdnech chladové expozice (CL) byla 14 %, což představuje signifikantní snížení o 66 % oproti kontrole. Po 2-týdenní regresi (CLR) efekt chladové expozice přetrvával a rozsah I/R poškození byl 24 % a přetrvávalo tedy signifikantní snížení o 51 % oproti kontrole (Obr. 16A, B). Velikost oblasti zasažené ischemií se mezi jednotlivými skupinami nelišila, 48 % (Obr. 16C, D).



Obrázek 16: Velikost I/R poškození, vyjádřeno jako poměr velikosti infarktu (IS) a velikosti zasažené oblasti ischemií (AR) (A, B); velikost zasažené oblasti levé komory srdeční ischemií (C, D), vyjádřeno jako poměr AR a velikosti levé komory (LV) u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u příslušných kontrol (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); *** $p < 0,001$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; $n=10$).

9.4 Použití selektivních inhibitorů pro zjištění mechanismů kardioprotekce

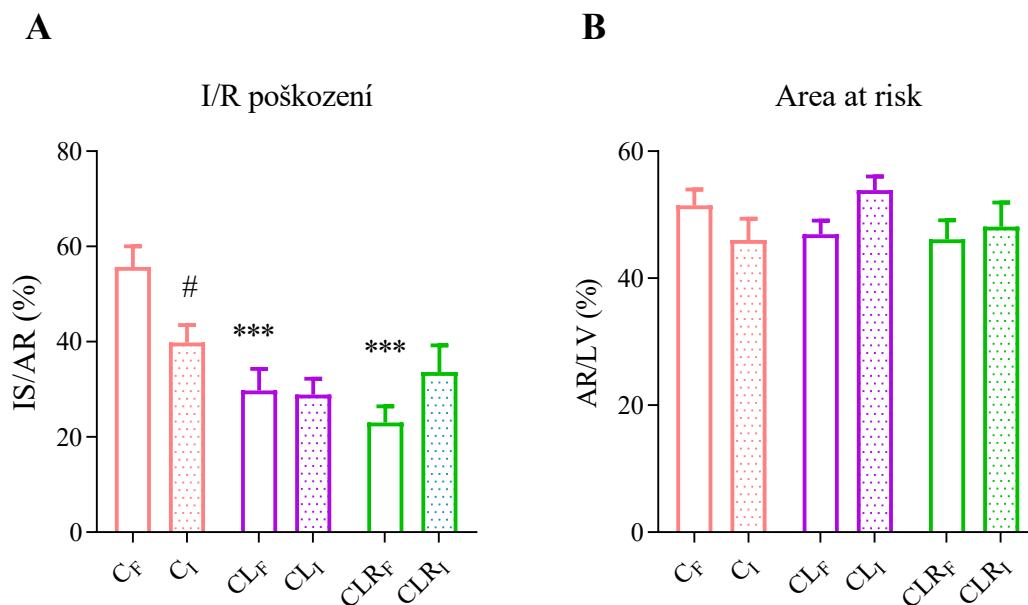
9.4.1 Inhibitor Metoprolol tartrát

Ve čtvrté studii jsme se zaměřili na objasnění mechanismu zodpovídajícího za kardioprotekci vyvolanou dlouhodobou chladovou expozicí. Prvním použitým selektivním inhibitorem byl metoprolol tartrát, inhibitor β_1 -ARs. Během chladové adaptace byla také sledována tělesná hmotnost a po navození I/R poškození byla sledována hmotnost BAT. Průměrná hmotnost u kontrolních potkanů v den experimentu byla 423 ± 8 g, u CL 399 ± 5 g, u CLR 416 ± 9 g a u potkanů s inhibitorem: kontrola 425 ± 7 g, CL 398 ± 6 g a CLR 426 ± 5 g. Během navozování I/R poškození byly sledovány hemodynamické parametry tepová frekvence a střední arteriální tlak (Tab. 6). V naměřených hodnotách byly zjištěny následující signifikantní rozdíly. Tepová frekvence byla ve všech fázích I/R poškození po podání inhibitoru snížena vyjma reperfúzní fáze u CLR, kde došlo k zvýšení tepové frekvence z 283 ± 10 úderů/min na 295 ± 7 úderů/min. Střední arteriální tlak byl také snížen po aplikaci inhibitoru ve stabilizaci, a to u CL z 80 ± 8 mmHg na 60 ± 5 mmHg a u CLR z 93 ± 7 mmHg na 61 ± 3 mmHg. Stejně tak byl snížen i v ischemické fázi, u kontrolní skupiny ze 77 ± 3 mmHg na 60 ± 3 mmHg a u CLR z 95 ± 7 mmHg na 65 ± 2 mmHg. Regresní skupina bez inhibitoru měla zvýšený střední arteriální tlak v ischemické fázi 95 ± 7 mmHg v porovnání s kontrolní skupinou 77 ± 3 mmHg. V reperfúzní fázi I/R poškození byl střední arteriální tlak snížen po podání metoprololu pouze u CLR z 89 ± 6 mmHg na 61 ± 3 mmHg. Naměřené hodnoty středního arteriálního tlaku ukázaly rozdíl u skupiny CL bez inhibitoru mezi stabilizační (81 ± 8 mmHg) a reperfúzní fází (62 ± 4 mmHg) (tab. 6).

Experimentální skupiny	C ^F	C ^I	CL ^F	CL ^I	CLR ^F	CLR ^I
<i>Tepová frekvence (úderů/min)</i>						
Stabilizace	386 ± 11	338 ± 8 [#]	375 ± 15	327 ± 10 [#]	387 ± 9	305 ± 6 [#]
Ischemie	379 ± 10	321 ± 8 [#]	365 ± 14	307 ± 10 [#]	389 ± 12	296 ± 7 [#]
Reperfúze	380 ± 9	320 ± 8 [#]	360 ± 15	311 ± 11 [#]	283 ± 10	295 ± 7 [#]
<i>Střední arteriální tlak (mmHg)</i>						
Stabilizace	82 ± 6	69 ± 4	81 ± 8	60 ± 5 [#]	93 ± 7	61 ± 3 [#]
Ischemie	77 ± 3	60 ± 3 [#]	70 ± 4	55 ± 2	95 ± 7 [*]	65 ± 2 [#]
Reperfúze	73 ± 4	64 ± 4	62 ± 4 ^l	58 ± 3	89 ± 6 [*]	61 ± 3 [#]

Tabulka 6: Hemodynamické parametry: tepová frekvence a střední arteriální tlak po podání 50 mg/kg za den inhibitoru metoprolol tartrát (I) a po podání fyziologického roztoku (F) u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (**p* < 0,05); **p* < 0,05 vs odpovídající kontrolní skupina, #*p* < 0,05 vs odpovídající skupina bez inhibitoru, ^l*p* < 0,05 vs odpovídající skupina ve stabilizaci; *n* = 12.

Velikost I/R poškození po 5 týdnech chladové expozice (CL) byla 30 %. Po 2-týdenní regresi (CLR) efekt chladové expozice přetrvával a rozsah I/R poškození byl 23 % v obou chladových režimech došlo tedy k signifikantnímu snížení, jelikož velikost I/R poškození u kontrolní skupiny byla 56 %. Po podání inhibitoru metoprololu byla velikosti I/R poškození u kontrolní skupiny 40 %, ostatní skupiny byly beze změny 29 % u skupiny CL a 34 % u skupiny CLR (Obr. 17A). Velikost oblasti zasažené ischemií se mezi jednotlivými skupinami nelišila. Pohybovala se v rozmezí 46-55 % (Obr. 17B).



Obrázek 17: Velikost ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození po podání inhibitoru inhibitor β 1 AR, metoprolol tartrát (I) a po podání fyziologického roztoku (F; A); velikost zasažené oblasti levé komory srdeční ischemií (B) u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL); 5 týdnů a 2-týdenní regrese (CLR) a u příslušných kontrol. Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); *** $p < 0,001$ vs C; # $p < 0,05$ C s inhibitorem vs C s fyziologickým roztokem; $n=12$.

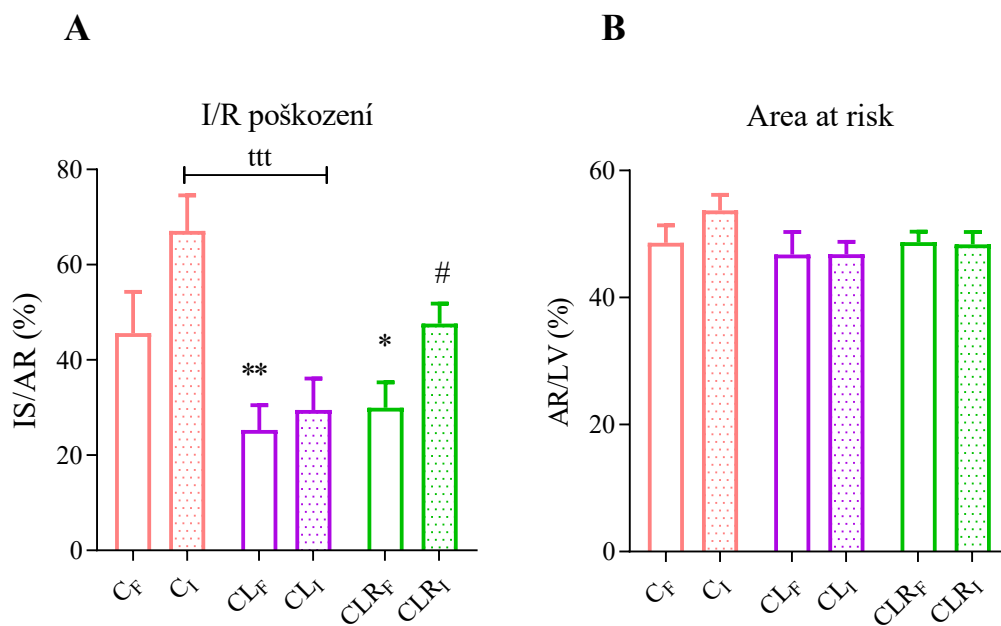
9.4.2 Inhibice β 2-ARs (ICI 118,551 hydrochlorid)

Na základě nálezů ve změnách aktivace protein kinázy B/Akt dráhy kolegyně (Tibenska et al., 2020) jsme stanovili rozsah infarktu po i.p. podání inhibitoru β 2-ARs (ICI 118,551 hydrochlorid). Průměrná hmotnost u kontrolních potkanů v den experimentu byla 371 ± 6 g, u CL 355 ± 10 g, u CLR 460 ± 8 g a u potkanů s inhibitorem: kontrola 377 ± 6 g, CL 352 ± 9 g a CLR 433 ± 7 g. Během navozování I/R poškození byly sledovány hemodynamické parametry tepová frekvence a střední arteriální tlak (tab. 7) a nebyly zjištěny žádné rozdíly v naměřených hodnotách mezi experimentálními skupinami.

Experimentální skupiny	C ^f	C ⁱ	CL ^f	CL ⁱ	CLR ^f	CLR ⁱ
<i>Tepová frekvence (úderů/min)</i>						
Stabilizace	374 ± 6	380 ± 9	369 ± 15	368 ± 6	374 ± 9	359 ± 9
Ischemie	363 ± 6	369 ± 8	350 ± 15	354 ± 10	369 ± 12	344 ± 8
Reperfúze	359 ± 7	366 ± 6	346 ± 15	357 ± 11	361 ± 10	343 ± 8
<i>Střední arteriální tlak (mmHg)</i>						
Stabilizace	82 ± 8	75 ± 8	78 ± 7	71 ± 7	80 ± 6	72 ± 7
Ischemie	77 ± 7	65 ± 5	66 ± 4	65 ± 4	71 ± 6	65 ± 5
Reperfúze	71 ± 5	58 ± 4	59 ± 4	65 ± 5	67 ± 4	60 ± 4

Tabulka 7: Hemodynamické parametry: tepová frekvence a střední arteriální tlak po podání 1 mg/kg inhibitoru ICI 118,551 (I) a po podání fyziologického roztoku (F) u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují středovou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); $n = 12$.

Podání inhibitoru β 2-ARs ICI 118,551 ukázalo zajímavé výsledky (Obr. 18). Potvrdili jsme, jak snížení velikost infarktu z 50 % na 25 % u skupiny CL, tak přetrvávající efekt chladové expozice u skupiny CLR, kde velikost infarktu byla 30 %. Podání 1 mg/kg ICI118,551 u kontrolních potkanů a u CL skupiny nevyvolalo žádné signifikantní změny. K signifikantnímu rozdílu ve velikosti I/R poškození došlo u skupiny CLR, kdy po podání inhibitoru se velikost infarktu zvýšila ze 30 % na 48 %, což představuje nárůst o 60 % (Obr. 18A). Velikost oblasti zasažené ischemií se mezi jednotlivými skupinami nelišila. Pohybovala se v rozmezí 47-52 % (Obr. 18B).



Obrázek 18: Velikost ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození, vyjádřeno jako poměr velikosti infarktu (IS) a velikosti zasažené oblasti ischemií (AR), po podání inhibitoru ICI 118,551 hydrochlorid (1mg/kg, I), po podání fyziologického roztoku (F, A) a velikost zasažené oblasti levé komory srdeční ischemií (B), vyjádřeno jako poměr AR a velikosti levé komory (LV), u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); ** $p < 0,001$ vs C; * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ CLR s inhibitorem vs CLR s fyziologickým roztokem; ††† $p < 0,001$ C s inhibitorem vs CL s inhibitorem; $n = 12$).

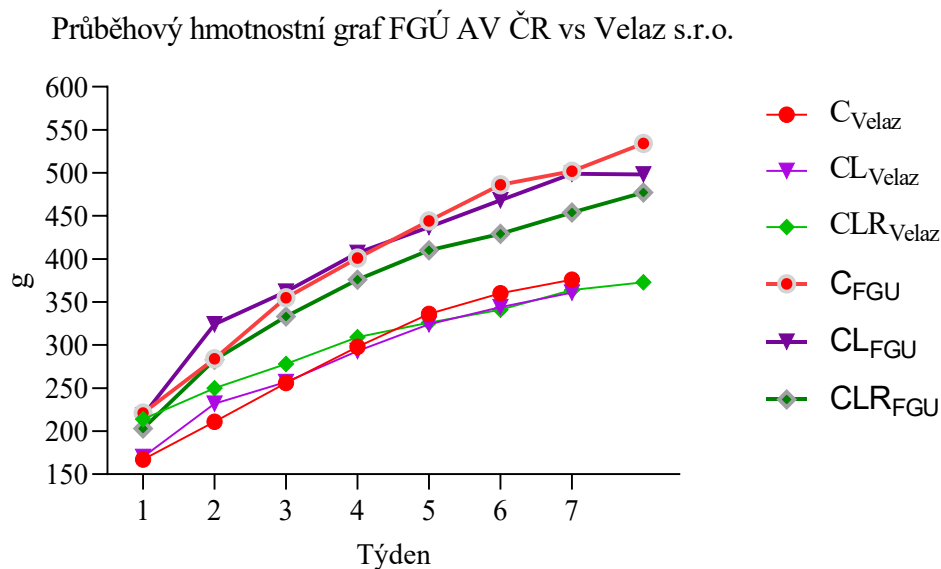
10 Diskuze

Tato disertační práce je dokončena 5 let poté, co byly poprvé publikovány první klíčové výsledky této práce dokládající, že chronická aklimace na mírný chlad (8 ± 1 °C) snižuje velikost infarktu bez vedlejších negativních účinků (publikovaný abstrakt konference Amsterdam ISHR; JMCC, 2018) a publikace druhého souboru klíčových výsledků týkající se akutní expozice byla publikována v roce podání této práce (Marvanová et al. 2023). Tento prvotní nález stimuloval velké úsilí k pochopení mechanismu kardioprotektivního účinku MCA, které je součástí disertační práce Veroniky Tibenské a dvou společných publikovaných článků (Tibenska et al., 2020, 2021), jejichž fyziologická část je součástí předkládané disertační práce. Tato disertační práce dále přináší důležité originální nálezy, které odpovídají na otázky, jaká je nejkratší doba expozice mírnému chladu, která vyvolává kardioprotektivní účinek a jak probíhá raná fáze aklimace u tohoto modelu. Ukázali jsme, že mírný chlad stimuluje kardioprotektivní signální dráhy (snižuje velikost infarktu) již po 3 dnech aklimace, aniž by byl maturovaný hnědý tuk a dále, že hnědý tuk za těchto podmínek dozrává a významně proliferuje až v 10 dnech aklimace (Marvanova et al., 2023). Maturace hnědé tukové tkáně v 10 dnech, byla prokázána i pomocí klasického měření intenzity metabolismu stimulované infúzí noradrenalinu pomocí nepřímé kalorimetrie. Analýza signálních drah ukazuje, že mechanismus kardioprotekce po 3 a 10 dnech chladové expozice se liší (Marvanová et al. 2023).

Setkáváme se s častým dotazem, proč nazýváme naši aklimaci na chlad mírnou, když teplota 8 °C, je poměrně velmi nízká. K tomu je potřeba dodat, že zvířata jsou aklimována ve dvojicích, mohou se zahřívat a mají též dostatek podestýlky, což dříve nebylo zvykem u obdobných experimentů a zvířata byla chována individuálně a bez podestýlky z důvodu reprodukovatelnosti výsledků (Dronjak et al., 2004; Tibenska et al., 2020). Individuální chov a absence podestýlky je zdrojem negativního aditivního sociálního a environmentálního stresu (Dronjak et al., 2004; Frisbee et al., 2015; Westenbroek et al., 2004). Dalším důvodem, proč nazýváme náš režim mírný je, že teplota je nastaven pod prahem třesové termogeneze u potkana, kterou ustanovil Lømo et al. na hodnotě 7 °C (Lømo et al., 2020). Práh byl stanoven u potkana (samce) s nižší tělesnou váhou, než jsou v této studii, tak je pravděpodobné, že práh zde bude ještě o něco výše.

Vystavení chladnému prostředí představuje jistou stresovou zátěž organismu, která má specifický charakter. Abychom zhodnotili a následně vyloučili nepřiměřený energetický výdej a stres zvířat, měřili jsme hmotnost těla zvířat po celou dobu experimentů. Hmotnost

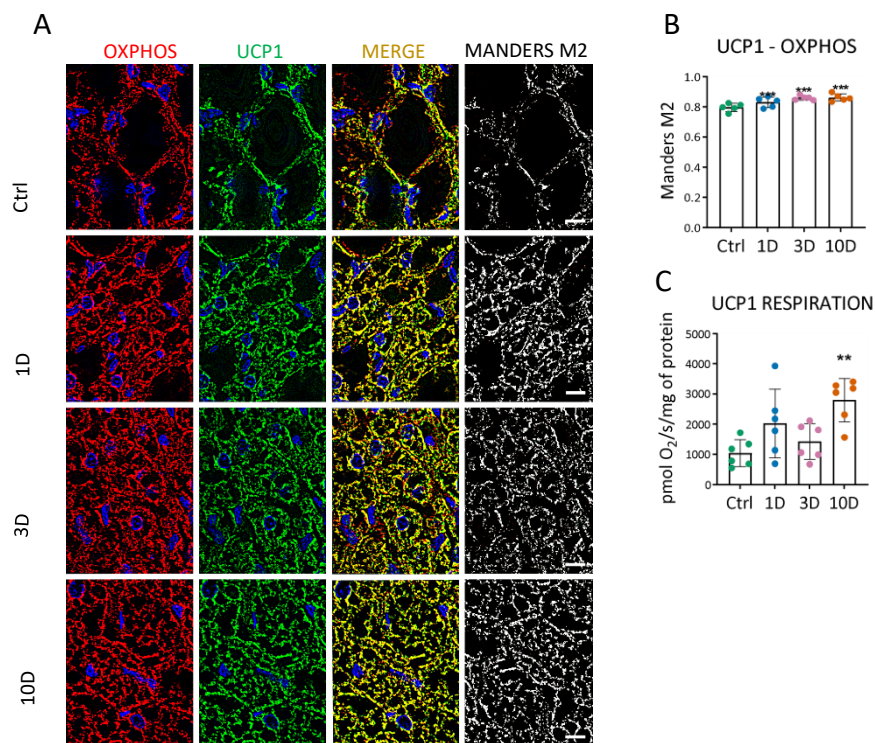
aklimovaných zvířat rostla stejně jako u kontrolní skupiny, což potvrzuje, že model je přiměřený a fyziologický. Další otázkou, kterou jsme si kladli bylo, zda námi zvolený model, respektive námi zvolené teploty, jsou dostatečné k dosažení adaptovaného fenotypu zvířat vyvolávající kardioprotekci. Proto jsme sledovali hmotnost BAT a změny morfologie v průběhu aklimace, byla pozorována mitochondriální biogeneze od 1. dne expozice, avšak signifikantní nárůst hmotnosti byl zjištěn až po 10 dnech expozice mírnému chladu. Hmotnost BAT odráží průběh a kvalitu adaptivní odpovědi těla u potkanů. V tomto ohledu je potřeba zmínit, že jsme v této práci použili potkany ze dvou chovných jader. První skupinu tvoří samci kmene Wistar z chovného jádra FGÚ AV ČR. Tito jedinci byli použiti v první studii této práce, která je zaměřena na stanovení metabolického profilu chladově exponovaných potkanů. Byla to zvířata, která rychle nabývala hmotnosti (Obr. 19), významně rychleji než potkani z chovného jádra Velaz s.r.o.; a byli proto využiti pro zodpovězení otázky, zda lze zvířata s vysokou hmotností adaptovat a jaký vliv má chlad na jejich metabolismus.



Obrázek 19: Srovnávací průběhový hmotnostní graf u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), u 5 týdnů chladu a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C) z chovného jádra FGÚ AV ČR; n= 8; vs z chovné jádro Velaz s.r.o.; n= 24.

Na postupném nárůstu BAT v podmínkách mírného chladového modelu bylo zjištěno, že mezi 0. a 10. dnem chladové expozice (10D) bylo dosaženo nejvýraznějšího nárůstu velikosti BAT 1054 ± 122 mg (FGÚ) a 396 ± 71 mg (Velaz s.r.o.). Kolokalizace UCP s mitochondriemi byla signifikantně zvýšena již po 1 dni expozice chladu, avšak funkční aktivita na úrovni UCP-

závislé respirace se objevila až v 10 dnech, což svědčí o maturaci (Obr. 20) (Marvanova et al., 2023).



Obrázek 20: Reprezentativní obrázek mitochondrií v BAT (červená barva, anti-OXPPOS Abs) a odprahujícího proteinu UCP1 (zelená barva), modrá barva označuje barvení jader pomocí DAPI v průběhu expozice chladu 1 až 10 dní (1D, 3D, 10D). Třetí sloupec ukazuje kolokalizaci UCP1 s OXPPOS (žlutooranžová barva), černobílé obrázky ukazují odpovídající kolokalizaci pixelů (Mander's M2 korelační koeficient) kvantifikované v grafu A, B; (n=5). UCP-závislá respirace izolovaných mitochondrií, C; (n=5-6). (Marvanová et al. 2023); doi: 10.1038/s41598-023-44205-4.

Z našich výsledků lze tedy usuzovat, že 10. den chladové expozice je důležitým bodem mezi krátkodobou expozicí a chronickou/dlouhodobou expozicí. Dále ze získaných hodnot vyplývá, že mezi 10. dnem a 5. týdnem chronické chladové expozice (CL) již nedochází k tak rychlému nárůstu velikosti BAT a jeho hmotnost stoupla pouze o 10 % (FGÚ AV potkani) a o 33 % (potkani z Velaz s.r.o). Toto zjištění bylo potvrzeno u obou dodavatelských skupin. Hmotnostní nálezy BAT byly podpořeny experimentem zaměřeným na odpověď stimulací noradrenalinem netřesovou termogenezi, kdy maximální odpovědi bylo dosaženo po 10 dnech chladové expozice a po 5 týdnech tento efekt přetrvával, avšak odpověď netřesové termogeneze nebyla již tak vysoká jako u skupiny 10D (Obr. 10). U lidí, kteří byli vystaveni chladnému vzduchu 15-16 °C po dobu 10 dní, byla zjištěna zvýšená aktivita BAT a také zvýšená aktivita netřesové termogeneze (van der Lans et al., 2013). Stejného zjištění bylo dosaženo u obézních

jedinců za stejných podmínek chladové expozice (Hanssen et al., 2016). Lidé, kteří byli vystaveni chladné vodě (14°C) 1 hodinu denně, měli zvýšenou aktivitu netřesové termogeneze již sedmý den otužování (Gordon et al., 2019). Po 4-týdenním otužování (10 °C, 2 h denně) došlo ke zvýšení objemu BAT o 45 % a oxidativní metabolismus byl zvýšen o 182 % (Blondin et al., 2017). Z dostupné literatury lze usuzovat, že zvýšená aktivita netřesové termogeneze je závislá na zvoleném modelu chladové expozice, zda jsou jedinci vystaveni chladnému vzduchu či chladné vodě a také na množství podkožního tuku, což dokládá Smith (Smith and Hanna, 1975). U otužilců byla také sledována rychlost metabolismu po podání infuze adrenalinu (0,1 $\mu\text{g min}^{-1} \text{kg}^{-1}$), izoprenalinu a noradrenalinu (0,45 $\mu\text{g min}^{-1} \text{kg}^{-1}$). Bylo prokázáno, že rychlost metabolismu otužilců se zvýšila po podání adrenalinu o 45 % v porovnání s hladinou bazálního metabolismu, zatímco u kontrol vzrostla pouze o 24 %. Podání izoprenalinu a noradrenalinu mělo na otužilce stejný vliv jako na kontrolní skupinu. Tento náález vedl ke zjištění, že po exogenním podání adrenalinu dochází k termogenezi na svalové úrovni a v bílém tuku, což zajišťuje krátkodobé přežití i v prostředí o teplotě okolo 5 °C (Lesna et al., 1999; Simonsen et al., 1992). Je třeba poznamenat, že v době, kdy byly experimenty provedeny, nebylo známo, že u člověka se aktivuje hnědá (běžová) tuková tkáň, což bylo zjištěno až v roce 2013 (van der Lans et al., 2013).

Co se týká metabolismu glukózy a chladu, je známo, že na počátku chladové expozice se spotřeba glukózy zvyšuje v důsledku třesové termogeneze a je to možná jeden z důvodů, proč neexistují práce, které by se zaměřily na glukózový toleranční test v dlouhodobém časovém horizontu. V rámci sledování metabolického profilu jsme se tedy zaměřili na stanovení hladiny glukózy v krvi prostřednictvím glukózového tolerančního testu. Námi provedený glukózový toleranční test prokázal maximální zvýšenou hladinu glukózy v krvi u skupiny, která byla exponována chladu 3 dny (3D) a to ve 20 min od podání glukózy. Ostatní skupiny exponované chladu se od kontroly nelišily. V počátcích testu tedy byl pozorován zhoršený metabolismus glukózy, jelikož ve 3D by mohlo tělo preferovat jako zdroj energie mastné kyseliny oproti glukóze, ale srovnání hladiny glukózy ve 120. min napříč skupinami je stejný a zároveň ve 3D bylo zjištěno snížené množství triacylglycerolu v séru. Publikované zdroje se zaměřují převážně na krátkodobou chladovou expozici v rozmezí několika dní, či na intermitentní chladový model. Na intermitentním myším modelu (4 °C, 7 a 14 týdnů) sledovali Wang a spol. také hladinu glukózy v krvi po i.p. podání dextrózy (2 g/kg) v časovém úseku 0, 30, 60, 90 a 120 min. Po 14 týdnech došlo ke zlepšení glukózové tolerance u intermitentní skupiny, zatímco po 7 týdnech nebyl rozdíl mezi intermitentní skupinou

a kontrolou pozorován. U obou skupin hladina glukózy v krvi dosáhla svého maxima v 30 min Wang a spol., (2015b). Literatura se především zaobírá vlivem chladu na glukózovou toleranci u obézních jedinců. U obézních dobrovolníků, kteří byli vystaveni chladné vodě (10 °C, 1 h) a byl jim proveden 3 hod orální glukózový toleranční test (75 g glukózy/200 ml vody), nebylo prokázáno zlepšení (Sellers et al., 2021). Avšak práce na zvířecích modelech ukazují na zvýšenou hladinu glukózy v krvi v rozmezí mezi 20 a 30 min od i.p. podání glukózy. Myšim vystaveným studené vodě (7 týdnů, 1 hod/den) byl podán 10% roztok glukózy. Maximální hladina glukózy v krvi ve 30 min byla zjištěna jak u myší, které byly vystaveny pouze studené vodě, tak i u myší, které měly kombinaci chladné vody s dietou s vysokým obsahem tuku (Zhu et al., 2018). Další práce kombinovala cvičení a akutní vystavení chladu (4 °C, 48 hod) ukázala maximální tendenci ke zvýšení hladiny glukózy v krvi během prvních 20 min po podání D-glukózy (2 g/kg) (Knuth et al., 2018).

Nedílnou součástí metabolického profilu v této práci byl screening krevního obrazu a biochemická analýza séra ve spolupráci s veterinární laboratoří Freston s.r.o. tlustých potkanů z FGÚ. Stanovení krevního obrazu u krátkodobé adaptace opět ukázala významné změny ve skupině 10D. V této experimentální skupině byl zjištěn pokles v počtu lymfocytů, v počtu červených krvinek a v hladině hemoglobinu, avšak MCHC prům. obsah hemoglobinu vzrostl. Naopak bylo prokázáno zvýšení objemu erytrocytů, v průměrném obsahu hemoglobinu v erytrocytech a v distribuční šíři erytrocytů. U skupiny 3D byl zjištěn také pokles počtu lymfocytů a mírný pokles v počtu erytrocytů, avšak jako jediná skupina vykázala nárůst v počtu granulocytů. V dlouhodobé chladové expozici byly zaznamenány významné změny pouze u skupiny CLR. Návrat do termoneutrální teploty (24 ± 1 °C) způsobil snížení průměrného objemu erytrocytů a průměrného obsahu hemoglobinu v erytrocytech. Významný nález je, že napříč všemi experimentálními skupinami se počet krevních destiček oproti kontrole snížil. Biochemická analýza krevního séra prokázala změny pouze u skupiny CLR, a to v hladině kyseliny močové, která byla zvýšená. Hladina kyseliny močové v krvi byla sledována pouze v jediné publikaci, kdy krev byla otužilcům odebrána hodinu před ponořením do ledové vody (2 °C, 5 min) a hodinu po otužování. Bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny močové v plazmě klesá po chladovém stimulu. Siems a spol. vyslovili hypotézu, že tento pokles je způsoben spotřebou kyseliny močové pro eliminaci ROS (Siems et al., 1994).

Hladina cholesterolu a triacylglycerolů byla u všech skupin beze změn. Hematologické a biochemické parametry byly sledovány také u otužilců. Otužilci byli vystaveni

intermitentnímu chladu, zatímco náš režim je kontinuální. V roce 2019 bylo po sezonním otužování žen i mužů (říjen až duben) prokázáno, že se zvyšuje počet červených krvinek, hladina hemoglobinu, MCHC, MCH a dochází ke snížení počtu krevních destiček (Chęcinska-Maciejewska et al., 2019), což jsou opačné výsledky než u nás a je potřeba zdůraznit, že tyto výsledky byly získány na potkanech z chovů FGU AV s rychle přibývajícím hmotností, kde byla později zjištěna infekce mykoplasma a proto data nebyla publikována. NA potkanech z Velazu po mírném chronickém chladu nebyly zjištěny rozdíly v krevním obrazu (výsledky Iveta Nedvědová). Nicméně, nálezy snížené imunitní odpovědi u infikovaných potkanů adaptovaných na chlad posloužily jako inspirace pro analýzu cytokinů a chemokinů v průběhu aklimace, která odhalila antiinflamační-imunosupresivní vliv mírného chladu (Marvanová et al. 2023) a tyto výsledky byly podkladem pro další šetření imunitní odpovědi v chladu v kombinaci s podáním lipopolysacharidu (Daniel Vašek et al. Submitted).

Snížení objemu plazmy po vystavení chladu je častým jevem vzhledem ke zvýšení diurézy v chladném prostředí (Vogelaere et al., 1992). Lombardi et al. ukázal zvýšený počet všech krevních elementů (červené, bílé krvinky a krevní destičky), zvýšení relativního čísla granulocytů, lymfocytů a neutrofilů bylo zjištěno při otužování v 6 °C (10 min), aniž by došlo ke změně v objemu plazmy (Lombardi et al., 2011). Pokud se mladí muži vystavovali studené vodě (0 °C, 120 min) měli zvýšený počet červených krvinek, hladinu hemoglobinu i hematokrit, ale objem plazmy byl snížen (Vogelaere et al., 1990). Po šesti měsících sezonního otužování bylo zjištěno, že přetrvává zvýšení MCH a MCHC, zatímco počet erytrocytů a hladina hematokritu klesá pod bazální úroveň (Teległów et al., 2015). Na otužilcích bylo také prokázáno, že dochází během vystavení chladné vodě (8 °C) ke snížení vodivosti krve, která pak přetrvává 30 min po otužování (Gregson et al., 2011; Mawhinney et al., 2013).

Důležitým faktorem ve změnách krevních parametrů jsou sezónní vlivy. V roce 2013 byla publikována práce, která se zaměřila na sběr dat týkajících se faktorů negativně ovlivňujících kardiovaskulární systém. Bylo zjištěno, že hladina celkového cholesterolu byla v průběhu let 1979–2008 nejvyšší v říjnu, HDL cholesterol v lednu a hladina triacylglycerolů měla své maximum v září a říjnu (Hopstock et al., 2013). V práci zaměřené na rozdíl v hemodynamických parametrech mezi ženami a muži bylo zjištěno, že v říjnu mají ženy sníženou koncentraci triacylglycerolů, poměr ApoB/ApoA a zvýšený HDL cholesterol více než muži. Stejný trend byl zjištěn v lednu u poměru ApoB/ApoA a HDL cholesterolu, zatímco v dubnu byl tento trend opět i u triacylglycerolů (Chęcinska-Maciejewska et al., 2017).

Dalším cílem práce bylo posoudit vliv mírného chladu na odolnost srdce k ischemii a na odpověď kardiovaskulárního systému. V první řadě jsme monitorovali rektální teplotu v průběhu celé chladové expozice. Sledování rektální teploty bylo velice důležité, aby bylo možné vyloučit podchlazení potkanů jako příčinu kardioprotektivního efektu. Současně jsme se zaměřili na sledování srdečních a hemodynamických parametrů (tepovou frekvenci a střední arteriální tlak). Z literatury vyplývá, že expozice $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ negativně ovlivňuje hemodynamické parametry (Li et al., 2009; Šrámek et al., 2000), dále je spojováno s rozvojem hypertenze (Kim et al., 2003; Sun et al., 1997, 2003) a u dlouhodobé chladové expozice za drsnějších teplotních podmínek ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 týdny) byla prokázána srdeční hypertrofie (Lu and Xu, 2013). Naměřené hodnoty prokázaly, že námi zvolený model mírného chladu neovlivňuje rektální teplotu. Rektální teplota zvířat exponovaných chladu se od kontrolní skupiny nelišila, pohybovala se v rozmezí $36,7 \pm 0,27\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $37,1 \pm 0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na lidském modelu byl také sledován vliv chladové expozice, ale jedinci byli vystaveni akutně chladné vodě ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min), která jak jsme již zmínili, má vysokou tepelnou vodivost a kapacitu, čímž tělo ztrácí rychle teplo. To vysvětluje, proč u těchto experimentů dochází ke snížení rektální teploty. Muži vystaveni po dobu 10 min chladné vodě ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$) měli sníženou rektální teplotu na stejnou hodnotu jako muži vystaveni vodě $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mawhinney et al., 2013). I další práce na dvanácti aktivních mužích prokázala, že dochází ke snižování rektální teploty po akutním vystavení 4 min $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Costello et al., 2012). Šrámek a spol. se zaměřili na otužování v různých teplotách ($32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $14\text{ }^{\circ}\text{C}$) a jejich vlivu na organismus. Bylo zjištěno, že teplota $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ nemá vliv na rektální teplotu ani na rychlost metabolismu, ale dochází ke snížení tepové frekvence o 15 % a ke snížení systolického a diastolického krevního tlaku o 12 %. Vystavení $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ snížilo rektální teplotu, zvýšilo rychlost metabolismu o 93 %, ale tepová frekvence a arteriální krevní tlak byly na úrovni skupiny v termoneutralní oblasti (Šrámek et al., 2000). Poslední sledovanou skupinou byli jedinci vystavení vodě ($14\text{ }^{\circ}\text{C}$), u kterých došlo ke snížení rektální teploty, avšak došlo ke zvýšení rychlosti metabolismu o 350 %, tepová frekvence byla zvýšena o 5 %, systolický krevní tlak byl zvýšen o 7 % a diastolický krevní tlak byl zvýšen o 8 %. Práce porovnávající časy 5, 10 a 20 min po ponoření v chladné vodě ($14\text{ }^{\circ}\text{C}$) prokázala, že v 5. min došlo k nejvýraznějšímu snížení rektální teploty (Peiffer et al., 2009). Na intermitentním modelu ($14\text{ }^{\circ}\text{C}$) bylo prokázáno, že jedinci, kteří byli vystaveni rychle chladu, měli dříve snížený set point na teplotu $35,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ než jedinci, kteří byli vystaveni chladu pomaleji (Brazaitis et al., 2014). Jedinci, kteří byli vystaveni ledové tříšti, měli stabilní tepovou frekvenci (72 úderů/min) a střední arteriální tlak (106 mmHg) během prvních 30 min otužování. Během zbývajících 58 min tepová frekvence i střední arteriální tlak dosáhly svého maxima (101 úderů/min; 115 mmHg) (Bongers et al.,

2019). Intermittentní vystavování mužů chladnému vzduchu (2 h, 10 °C) po dobu 11 dní prokázalo snížení rektální teploty o 0,5 °C po 120 min chladové expozice. Dále bylo zjištěno snížení tepové frekvence z 78 ± 6 úderů/min na 64 ± 4 úderů/min ve 120. min. Systolický krevní tlak se začal signifikantně zvyšovat v nultém dni chladové expozice, konkrétně již po 5 min setrvání v chladu. V 60. min systolický tlak dosáhl svého maxima 137 ± 4 mmHg. Bylo zaznamenáno i snížení zvýšeného systolického krevního tlaku, a to 4. a 6. den chladové expozice, zatímco diastolický krevní tlak se signifikantně zvýšil až na konci chladové intermittní expozice (Leppäluoto et al., 2001). Práce sledující odpověď mladého organismu (věk 19–31 let) na akutní vystavení chladnému vzduchu (2 h, 6 °C) prokázala, že u těchto dobrovolníků docházelo k postupnému zvyšování středního arteriálního tlaku, ale svého významného rozdílu dosáhla až na samém konci experimentu (Bøkenes et al., 2004b). Akutní vystavení samců Wistar chladnému vzduchu (11 °C) nemělo vliv na tepovou frekvenci, ale došlo ke zvýšení hodnoty systolického krevního tlaku (Luo et al., 2012). Některé pracovní skupiny poukázaly na změny hmotností srdečních komor vyvolané chladovou expozicí potkanů. Jedná se o dlouhodobou chladovou expozici v rozmezí týdnů, zvolená teplota byla v těchto experimentech 4–5 °C. Byla u nich prokázána hypertrofie levé srdeční komory (Freegly et al., 1991; Tsibulnikov et al., 2019). Na modelu potkana bylo prokázáno, že vystavení chladnému prostředí po dobu 40 dnů (9 °C) nevyvolalo hypertenzi, avšak po snížení teploty na 5 °C došlo k hypertenzi, rozvoji zvyšujícího se systolického, diastolického i středního krevního tlaku a také hypertrofii levé komory srdeční (Shechtman et al., 1990). Je tedy zřejmé, že bude existovat prahová hodnota pro vznik hypertenze. Vliv chladu v rozpětí několika dní na hmotnost srdečních komor nebyl doposud publikován. Námi zvolený model mírného chladu neovlivnil tepovou frekvenci ani střední arteriální tlak v počátcích chladové expozice. Po pěti týdnech chladové expozice byla mírně zvýšena tepová frekvence u skupiny CL o 10 % od kontrolní skupiny. Po návratu do termoneutrálního prostředí se hodnota tepové frekvence vrátila na úroveň kontroly. Střední arteriální tlak nebyl v dlouhodobém horizontu chladové expozice ovlivněn. Stejně tak mírný chlad nevyvolal změny ve sledovaných hmotnostních parametrech srdce. Z dosažených výsledků lze tedy usuzovat, že námi zvolený model mírného chladu nevyvolal hypertenzi a srdeční hypertrofii v počátcích chladové expozice ani v dlouhodobém časovém horizontu. Dochází k eliminaci vzniku hlavních rizikových faktorů, které podporují vznik kardiovaskulárních onemocnění (Jackson et al., 2005).

V této práci přinášíme první informace o vlivu mírného chladu na velikost I/R poškození myokardu v časně fázi aklimace (1D, 3D a 10D), a po dlouhodobě (CL) kde byl také sledován přetrvávající efekt chladové expozice (po 2 týdnech, CLR). Ukázali jsme, že již po třech dnech došlo k významnému snížení ve velikosti I/R poškození o 35 % proti kontrole. U 10D se snížila velikost infarktu oproti kontrole o 27 %. Chronický chlad tento kardioprotektivní efekt prohloubil a po pěti týdnech chladové expozice došlo k razantnějším snížení ve velikosti I/R poškození oproti kontrole, a o to o 66 %. Po návratu do termoneutrálního prostředí (24 °C) kardioprotektivní efekt přetrvával a skupina CLR měla velikosti I/R poškození také signifikantně sníženou oproti kontrole, a to o 51 %. U všech experimentálních skupin velikost oblasti zasažené ischemií se nelišila a pohybovala se v rozmezí 45-48 %. Současná literatura se doposud nezmiňuje o krátkodobém kontinuálním vystavení chladnému prostředí. Akutní chlad je pouze prezentován ve smyslu vystavení organismu tepelnému šoku ve spojitosti s vyšším rizikem či výskytem infarktu myokardu (Bhaskaran et al., 2009), zatímco chronický chlad byl studován na kontinuálních nebo na intermitentních modelech (Tsibulnikov et al., 2019). Práce, která se zaměřila na vliv kontinuálního chladu (4 °C, 4 týdny) na velikost I/R poškození byla publikována v roce 2016 skupinou Tsibulnikova (Tsibulnikov et al., 2016). Námi zjištěné výsledky byly prezentovány v souboru abstraktů konference Amsterdam ISHR; JMCC, 2018. Ruští kolegové posléze publikovali práci, která se zaměřila jak na kontinuální chlad (4 °C, 4 týdny), tak i na intermitentní modely 8 hod/denně nebo 1,5 hod/denně (4 °C, 4 týdny). Na animálním modelu bylo provedeno I/R poškození s ischemií 45 min následovanou 2 hod reperfúzí. Bylo zjištěno, že kontinuální chladová expozice snížila velikost I/R poškození, zatímco ani jeden intermitentní model neměl na velikost I/R poškození vliv (Tsibulnikov et al., 2019). Z dostupné literatury můžeme říci, že doposud neexistují jiné pracovní skupiny, které by experimentální chirurgií studovali vliv chladové expozice a její přetrvávající efekt na velikost I/R poškození. Stejně tak výzkum týkající se kardioprotektivních mechanismů vyvolaných chladem je teprve na svém počátku. Lze však usuzovat, že díky již zjištěným benefičním účinkům chladové expozice na kardiovaskulární systém, se vystavení chladu zařadí mezi další kardioprotektivní intervence, jako je např. hypoxie, kalorická restrikce či fyzická zátěž (viz níže). Velmi překvapující je zjištění, že doposud studované kardioprotektivní intervence zaměřené na velikost I/R poškození nedosahují takových výsledků jako je námi zvolený chronický model mírné chladové expozice. Námi zvolené podmínky mírné chronické chladové expozice v porovnání s dalšími kardioprotektivními modely prokázaly významně větší snížení velikosti I/R poškození ve srovnání s výše zmíněnými protektivními režimy. Bylo prokázáno, že intermitentní hypoxie (7000 m, 8 h/den, 24-30

expozi) snižuje velikost I/R poškození o 16 % (Neckář et al., 2002) proti našim nálezům, kdy I/R poškození bylo sníženo o 66 % u skupiny CL a o 51 % u skupiny CLR (Tibenska et al., 2020). Stejně tak byl prokázán benefiční účinek na velikost I/R poškození na modelu chronické hypoxie (12% O₂) (Alánová et al., 2017). Vystavení kontinuální chronické normobarické hypoxii prokázalo snížení velikosti I/R poškození o 21 %. Stejných výsledků bylo dosaženo při intermitentní normobarické hypoxii (8 h/den), velikost I/R poškození byla snížena o 27 % (Kasparova et al., 2015b). Ani dostupná literatura týkající se kalorické restrikce či cvičení neprokazuje takové výsledky jako byly dosaženy na námi zvoleném modelu. Kalorická restrikce na myším modelu prokázala snížení velikosti I/R poškození o 8 % (Noyan et al., 2015). Také intermitentní hladovění prokázalo signifikantní snížení velikosti I/R poškození o 30 % na potkaním modelu (Ahmet et al., 2005a). V neposlední řadě jsou známy blahodárné účinky cvičení na srdce. Potkani, kteří plavali hodinu denně ve 35 - 37 °C po dobu 5 týdnů, měli sníženou velikost I/R poškození o 30 % ve srovnání s kontrolní skupinou (McElroy et al., 1978). V roce 2003 byla publikována práce, která prokázala, že 20-týdenní cvičení snižuje velikost I/R poškození, a to o 8 % (Brown et al., 2003b).

Na základě výsledků proteinové analýzy levých srdečních komor po chronické chladové expozi kolegyně Veroniky Tibenské (Tibenska et al., 2020), jsme se zaměřili na ověření jejich nálezů u dlouhodobé chladové expozi. Veronika Tibenská zjistila, že chronická chladová expozi zvyšuje množství β 2-ARs a β 3-ARs v hrubé membránové frakci, zatímco mírná chladová expozi měla desenzitizující vliv na β 1-AR signální dráhu. Bylo zjištěno, že se množství β 2-AR v membránové frakci zvyšuje o 46 % u CL skupiny a zvýšení o 30 % přetrvává u CLR skupiny. Množství β 3-ARs se signifikantně zvýšilo o 30 % u CL skupiny a o 52 % u CLR skupiny. Z dostupné literatury je známo, že během infarktu myokardu jsou β 1-AR spojovány se srdeční hypertrofií, remodelací komor a apoptózou (Bernstein et al., 2005; Communal et al., 1999; Zhu et al., 2001). Bylo prokázáno, že β 2-ARs v ischemickém srdci tlumí srdeční remodelaci a zvyšuje kontraktální funkci (Ahmet et al., 2005b; Patterson et al., 2004; Tsuneyoshi et al., 2005), jsou spojovány s antiapoptickým vlivem v kardiomyocytech (Chesley et al., 2000b; Zaugg et al., 2000; Zhu et al., 2001), a modulují cévní reaktivitu a regulují krevní tlak (Masuo, 2010). Za použití selektivních β 1-AR a β 2-AR betablokátorů (Metoprolol tartrát a ICI 118, 551 hydrochlorid) jsme zacílili na potvrzení či vyvrácení úlohy těchto receptorů v mechanismu kardioprotektivního efektu dlouhodobého mírného chladu.

Aplikace betablokátoru Metoprolol tartrát (50 mg/kg i.p.) ovlivnila tepovou frekvenci i střední arteriální tlak. Tepová frekvence byla ve všech fázích I/R poškození po podání inhibitoru signifikantně snížena kromě reperfúzní fáze u skupiny CLR, kde došlo k zvýšení tepové frekvence o 12 úderů/min. U skupiny CLR bez inhibitoru došlo k zvýšení středního arteriálního tlaku v ischemické i v reperfúzní fázi. Po podání Metoprololu došlo ke snížení středního arteriálního tlaku u CL skupiny o 20 mmHg a u skupiny CLR o 32 mmHg. Dále střední arteriální tlak byl snížen i v ischemické fázi u kontrolní skupiny o 17 mmHg a u skupiny CLR o 30 mmHg. Skupina CLR s podaným inhibitorem měla snížený střední arteriální tlak i v reperfúzní fázi o 28 mmHg. Byl také zjištěn rozdíl u skupiny CL bez inhibitoru mezi stabilizací a reperfúzní fází o 22 mmHg. Výsledky na mírném chladovém modelu bez inhibitoru potvrdily kardioprotektivní efekt. U skupiny CL byla velikost I/R poškození 30 % a u skupiny CLR 23 %. Podání betablokátoru Metoprololu mělo vliv pouze na kontrolní skupinu. Po podání inhibitoru došlo u kontrolní skupiny k signifikantnímu snížení velikosti I/R poškození na 40 % oproti kontrole, které byl podán pouze fyziologický roztok. Ostatní experimentální skupiny nebyly podáním inhibitoru ovlivněny. Obecně je známo, že čím větší plocha myokardu je ischemií zasažena, tím je větší nekrotické poškození tkáně (ústní předání při konzultaci metody). Velikost oblasti zasažené ischemií se mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišila. Pohybovala se v rozmezí 46-55 %. Lze tedy vyloučit variabilitu chirurgického zásahu. Znamená to, že velikosti infarktů je možné napříč skupinami porovnávat. V literatuře se setkáváme pouze s informacemi týkající se účinku podání samotného metoprololu v průběhu I/R poškození na různých animálních modelech. Bylo prokázáno na prasečím modelu, že podání metoprololu (7,5 mg) v časně ischemické fázi, tj. po 15 min koronární okluze snižuje velikost infarktu a zlepšuje obnovu funkce levé komory srdeční během reperfúzní fáze (Ibanez et al., 2007). Další práce na prasečím modelu toto tvrzení nepotvrdila, intravenózní podání metoprololu (0,75 mg/kg) ve 20. minutě ischemie nemělo vliv na velikost infarktu v brzké fázi I/R poškození, tj. ve 20 až 25 min, ale jeho benefiční efekt byl potvrzen během 30 až 50 min ischemie. Podání metoprololu zlepšilo ejekční frakci levé komory srdeční 45. den reperfúze (Lobo-Gonzalez et al., 2020). Na potkaním modelu byl prokázán benefiční účinek metoprololu (1mg/kg), kdy byl potkanům podán na začátku dvouhodinové reperfúzní fáze. Opět došlo ke snížení velikosti infarktu a zlepšení disfunkce levé komory (Zhu et al., 2006a). Také podání vyšší dávky metoprololu (1 mg/kg + 0.5 mg/kg o 90 min později) 5 min před začátkem reperfúzní fáze snížilo velikost infarktu na králičím modelu (Feuerstein et al., 1998).

Inhibitor ICI 118, 551 hydrochlorid byl úspěšně používán ve studiích, které využívaly pro sledování velikosti I/R poškození izolovaná potkaní srdce. Jednotlivé experimenty se liší jak navozením ischemie (globální nebo regionální), ale také použitou koncentrací inhibitoru (Frances et al., 2003; Salie et al., 2011b). Z dostupné literatury vyplývá, že jsme jako první použili inhibitor ICI 118, 551 hydrochlorid na modelu *in vivo*. Jelikož neexistuje podpůrná literatura, která by odkazovala jednoznačně na standardně používanou dávku, tak jsme se v první řadě zaměřili na její testování. Zvolili jsme si dvě dávky 0,5mg/kg a 1mg/kg, které jsme testovali na 5-týdenním chladu. Nízká dávka neměla významný vliv na velikost I/R poškození, zatímco 1mg/kg tento efekt měl (viz výsledky).

Podání ICI 118, 551 hydrochloridu (1 mg/kg i.p.) nemělo vliv na tepovou frekvenci ani na hodnoty středního arteriálního tlaku. Byl potvrzen kardioprotektivní efekt vyvolaný mírnou chladovou expozicí. Došlo ke snížení velikosti I/R poškození: u skupiny CL byla velikost I/R poškození snížena o 25 % a u skupiny CLR byl potvrzen přetrvávající efekt, velikost I/R poškození byla 30 %. Podání selektivního inhibitoru ICI 118,551 hydrochloridu nemělo vliv na kontrolní skupinu ani na skupinu CL, zatímco u skupiny CLR došlo ke statisticky významnému zvýšení velikosti I/R poškození o 18 %. Velikost oblasti zasažené ischemií se mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišila; pohybovala se v rozmezí 47- 52 %. Tato hodnota je důležitá pro posouzení relevance velikosti infarktu, neboť menší oblast zasažení procentuálně snižuje velikost infarktu. Ve spolupráci s kolegyní Veronikou Tibenskou byly zjištěny výsledky proteinovou a imunofluorescenční analýzou, které poukazují na to, že pravděpodobně budou existovat dva kardioprotektivní mechanismy uplatňující se během chronické chladové expozice. Z dosažených výsledků vyplývá, že kardioprotektivní mechanismus po návratu do normální teploty po 2 týdnech se liší od mechanismu vyvolaného v průběhu aklimace, který je na β_2 adrenergní dráze nezávislý. Ve dvou týdenní regresi jsou spojeny s β_2 adrenergní signalizací a protein kinázou B/Akt, zatímco chronický chlad neovlivňuje β_1 , ani β_2 adrenergní signální dráhu (Tibenska et al., 2021). To je zajímavý nálezný a stále zbývá najít a objasnit mechanismus kardioprotekce v chronickém chladu.

11 Závěr

Tato práce navazuje na moji diplomovou práci z roku 2015, kde byly představeny pilotní výsledky metabolického profilu mírné chladové aklimace (10 ± 2 °C) v dlouhodobém časovém horizontu. Zjištěné pozitivní výsledky nás zavázaly zjistit odpověď organismu na krátkodobé vystavení chladnému prostředí a pokusit se najít přelomový bod mezi akutním a chronickým vystavením chladu. Pro experimenty jsme byli nuceni použít potkaní samce kmene Wistar ze dvou chovných jader, jelikož bylo zjištěno, že potkani z chovného jádra FGÚ jsou k ischemii rezistentní a nelze je využít pro navození I/R poškození. Tato zvířata byla proto využita pouze pro stanovení metabolického profilu chladové aklimace. Překvapující byl také nárůst hmotnosti u těchto potkanů. Z naměřených výsledků vyplývá, že zjištěný nárůst hmotnosti neměl vliv na míru jejich adaptace na chlad. Námi zvolený model mírného chladu u obou chovných jader prokázal, že k dostatečné adaptaci organismu na chlad dochází 10. den chladové expozice, kdy hmotnost hnědé tukové tkáně dosahuje svého maxima a dále se již významně nezvyšuje.

Po stanovení metabolického profilu se práce zaměřila na vliv chladové aklimace na velikost I/R poškození. Již 3. den chladové aklimace byl pozorován trend ke snížení velikosti I/R poškození, i když hnědá tuková tkáň není ještě plně maturována. Chladová aklimace měla největší benefiční vliv na velikost infarktu u skupiny CL. Skupina dvoutýdenní regrese vykazovala ve srovnání s CL trend mírného růstu I/R poškození, při zachování signifikantního benefičního efektu oproti kontrole. Dle zjištěných benefičních účinků mírné chladové aklimace, by se náš model mohl zařadit mezi kardioprotektivní modely jako jsou hypoxie, kalorická restrikce nebo fyzická zátěž.

Disertační práce přispívá k objasnění mechanismu kardioprotekce za použití selektivních inhibitorů beta-adrenergických receptorů. Ze zjištěných hodnot usuzujeme, že se liší kardioprotektivní mechanismus u dlouhodobě aklimatizovaných potkanů a potkanů po dvoutýdenní regresi. Skupina pětitydenní aklimace vykazovala kardioprotektivní efekt bez zapojení β_1 i β_2 adrenergické signalizace, zatímco u samců, kteří se po pětitydenní aklimaci vrátili do normální teploty na dva týdny, je mechanismus kardioprotekce spojený s β_2 adrenergickou signalizací.

12 Literatura

Abete, P., Testa, G., Ferrara, N., De Santis, D., Capaccio, P., Viati, L., Calabrese, C., Cacciatore, F., Longobardi, G., Condorelli, M., et al. (2002a). Cardioprotective effect of ischemic preconditioning is preserved in food-restricted senescent rats. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 282, H1978–H1987.

Abete, P., Testa, G., Ferrara, N., De Santis, D., Capaccio, P., Viati, L., Calabrese, C., Cacciatore, F., Longobardi, G., Condorelli, M., et al. (2002b). Cardioprotective effect of ischemic preconditioning is preserved in food-restricted senescent rats. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 282, H1978–H1987.

Acosta, F.M., Martinez-Tellez, B., Sanchez-Delgado, G., Alcantara, J.M., Acosta-Manzano, P., Morales-Artacho, A.J., and Ruiz, J.R. (2018). Physiological responses to acute cold exposure in young lean men. *PLoS One* 13, e0196543.

Ahmet, I., Wan, R., Mattson, M.P., Lakatta, E.G., and Talan, M. (2005a). Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* 112, 3115–3121.

Ahmet, I., Lakatta, E.G., and Talan, M.I. (2005b). Pharmacological stimulation of β 2-adrenergic receptors (β 2AR) enhances therapeutic effectiveness of β 1AR blockade in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. *Heart Fail. Rev.* 10, 289–296.

Ahmet, I., Tae, H.J., de Cabo, R., Lakatta, E.G., and Talan, M.I. (2011). Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 263–271.

Alánová, P., Chytilová, A., Neckář, J., Hrdlička, J., Míčová, P., Holzerová, K., Hlaváčková, M., Macháčková, K., Papoušek, F., Vašinová, J., et al. (2017). Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 122, 1452–1461.

Aljinović, J., Vukojevic, K., ... V.K.-H. and, and 2010, U. (2010). Histological differences in healing following experimental transmural infarction in rats.

Ambrosio et al. (1993). Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow - PubMed.

- Andersson, D.C., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Umanskaya, A., Xie, W., Shiomi, T., Zalk, R., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2011). Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* *14*, 196–207.
- Aragón, J.P., Condit, M.E., Bhushan, S., Predmore, B.L., Patel, S.S., Grinsfelder, D.B., Gundewar, S., Jha, S., Calvert, J.W., Barouch, L.A., et al. (2011). Beta 3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. *J. Am. Coll. Cardiol.* *58*, 2683–2691.
- Arnold, J., O'Connor, P., Riddell, J., Harron, D., Shanks, R., and McDevitt, D. (1985). Effects of the beta 2-adrenoceptor antagonist ICI 118,551 on exercise tachycardia and isoprenaline-induced beta-adrenoceptor responses in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *19*, 619–630.
- Asemu, G., Neckář, J., Szárszoi, O., Papoušek, F., Ošťádal, B., and Kolář, F. (2000). Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. In *Physiological Research*, p.
- Baines, C.P., Goto, M., and Downey, J.M. (1997). Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *29*, 207–216.
- Baker, J.E., Contney, S.J., Gross, G.J., and Bosnjak, Z.J. (1997). KATPChannel Activation in a Rabbit Model of Chronic Myocardial Hypoxia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *29*, 845–848.
- Bartels, L.A., Clifton, G.D., and Szabo, T.S. (1998). Influence of myocardial ischemia and reperfusion on β -adrenoceptor subtype expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *31*, 484–487.
- Baxter, G.F., Marber, M.S., Patel, V.C., and Yellon, D.M. (1994). Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation* *90*, 2993–3000.
- Bello Roufai, M., Li, H., and Sun, Z. (2007). Heart-specific inhibition of protooncogene c-myc attenuates cold-induced cardiac hypertrophy. *Gene Ther.* *14*, 1406–1416.
- Bernstein, D., Fajardo, G., Zhao, M., Urashima, T., Powers, J., Berry, G., and Kobilka, B.K. (2005). Differential cardioprotective/cardiotoxic effects mediated by β -adrenergic receptor subtypes. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* *289*, H2441–H2449.

- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198–205.
- Bhaskaran, K., Hajat, S., Haines, A., Herrett, E., Wilkinson, P., and Smeeth, L. (2009). Effects of ambient temperature on the incidence of myocardial infarction. *Heart* 95, 1760–1769.
- Bittel, J. (1992). The Different Types of General Cold Adaptation in Man. *Int. J. Sports Med.* 13, S172–S176.
- Blondin, D.P., Labbé, S.M., Tingelstad, H.C., Noll, C., Kunach, M., Phoenix, S., Guérin, B., Turcotte, E.E., Carpentier, A.C., Richard, D., et al. (2014). Increased brown adipose tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E438-46.
- Blondin, D.P., Daoud, A., Taylor, T., Tingelstad, H.C., Bézaire, V., Richard, D., Carpentier, A.C., Taylor, A.W., Harper, M.-E., Aguer, C., et al. (2017). Four-week cold acclimation in adult humans shifts uncoupling thermogenesis from skeletal muscles to brown adipose tissue. *J. Physiol. C* 2016 Authors. *J. Physiol. C* 595, 2099–2113.
- Bøkenes, L., Alexandersen, T.E., Tveita, T., Osterud, B., and Mercer, J.B. (2004a). Physiological and hematological responses to cold exposure in young subjects. *Int. J. Circumpolar Health* 63, 115–128.
- Bøkenes, L., Alexandersen, T.E., Tveita, T., Osterud, B., and Mercer, J.B. (2004b). Physiological and hematological responses to cold exposure in young subjects. *Int. J. Circumpolar Health* 63, 115–128.
- Bolli, R., and Marbán, E. (1999). Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* 79, 609–634.
- Bongers, C.C.W.G., Eijsvogels, T.M.H., Thijssen, D.H.J., and Hopman, M.T.E. (2019). Thermoregulatory, metabolic, and cardiovascular responses during 88 min of full-body ice immersion – A case study. *Physiol. Rep.* 7.
- Bousselmi, R., Lebbi, M.A., and Ferjani, M. (2014). Myocardial ischemic conditioning: Physiological aspects and clinical applications in cardiac surgery. *J. Saudi Hear. Assoc.* 26, 93–100.

- Brazaitis, M., Eimantas, N., Daniuseviciute, L., Mickeviciene, D., Steponaviciute, R., and Skurvydas, A. (2014). Two strategies for response to 14 °C cold-water immersion: is there a difference in the response of motor, cognitive, immune and stress markers? *PLoS One* 9, e109020.
- Brooks, G., and Hearse, D.J. (1996). Role of Protein Kinase C in Ischemic Preconditioning: Player or Spectator? *Circ. Res.* 79, 628–631.
- Brown, C.M., Sanya, E.O., and Hilz, M.J. (2003a). Effect of cold face stimulation on cerebral blood flow in humans. *Brain Res. Bull.* 61, 81–86.
- Brown, D.A., Jew, K.N., Sparagna, G.C., Musch, T.I., and Moore, R.L. (2003b). Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J. Appl. Physiol.* 95, 2510–2518.
- Brown, D.A., Chicco, A.J., Jew, K.N., Johnson, M.S., Lynch, J.M., Watson, P.A., and Moore, R.L. (2005). Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J. Physiol.* 569, 913–924.
- Budohoski, L., Challiss, R.A.J., Lozeman, F.J., McManus, B., and Newsholme, E.A. (1984). Increased insulin sensitivity in soleus muscle from cold-exposed rats: reversal by an adenosine-receptor agonist. *FEBS Lett.* 175, 402–406.
- Buja, L.M. (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury B. *Cardiovasc. Pathol.* 14, 170–175.
- Burelle, Y., Wambolt, R.B., Grist, M., Parsons, H.L., Chow, J.C.F., Antler, C., Bonen, A., Keller, A., Dunaway, G.A., Popov, K.M., et al. (2004). Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 287.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance.
- Carmona, M.C., Valmaseda, A., Brun, S., Viñ, O., Mampel, T., Giralt, M., and Villarroya, F. (1998). Differential Regulation of Uncoupling Protein-2 and Uncoupling Protein-3 Gene Expression in Brown Adipose Tissue during Development and Cold Exposure.

Castellani, J.W., and Young, A.J. (2016). Human physiological responses to cold exposure: Acute responses and acclimatization to prolonged exposure. *Auton. Neurosci.* *196*, 63–74.

Centurione, L., Di Giulio, C., Cacchio, M., Rapino, M., Bosco, D., Grifone, G., Sabatini, N., Bianchi, G., Castorina, S., Antonucci, A., et al. (2003). Correlations between protein kinase C ζ signaling and morphological modifications during rat heart development and aging. *Mech. Ageing Dev.* *124*, 957–966.

Chandrasekar, B., Nelson, J.F., Colston, J.T., and Freeman, G.L. (2001). Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *280*, H2094-102.

Chang, J.-C., Lien, C.-F., Lee, W.-S., Chang, H.-R., Hsu, Y.-C., Luo, Y.-P., Jeng, J.-R., Hsieh, J.-C., and Yang, K.-T. (2019). Intermittent Hypoxia Prevents Myocardial Mitochondrial Ca^{2+} Overload and Cell Death during Ischemia/Reperfusion: The Role of Reactive Oxygen Species. *Cells* *8*, 564.

Checinska-Maciejewska (2017). Gender-related effect of cold water swimming on the seasonal changes in lipid profile, ApoB/ApoA-I ratio, and homocysteine concentration in cold water swimmers - PubMed.

Checinska-Maciejewska, Z., Niepolski, L., Checinska, A., Korek, E., Kolodziejczak, B., Kopczynski, Z., Krauss, H., Pruszyńska-Oszmalek, E., Kolodziejcki, P., and Gibas-Dorna, M. (2019). Regular cold water swimming during winter time affects resting hematological parameters and serum erythropoietin. *J. Physiol. Pharmacol.* *70*, 747–756.

Chen, L., Lu, X.-Y., Li, J., Fu, J.-D., Zhou, Z.-N., and Yang, H.-T. (2006). Intermittent hypoxia protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury-induced alterations in Ca^{2+} homeostasis and contraction via the sarcoplasmic reticulum and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange mechanisms. *Am. J. Physiol. Physiol.* *290*, C1221–C1229.

Chesley, A., Lundberg, M.S., Asai, T., Xiao, R.-P., Ohtani, S., Lakatta, E.G., and Crow, M.T. (2000a). The β_2 -Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal to Cardiac Myocytes Through G_i -Dependent Coupling to Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Circ. Res.* *87*, 1172–1179.

- Chesley, A., Lundberg, M.S., Asai, T., Xiao, R., Ohtani, S., Lakatta, E.G., and Crow, M.T. (2000b). The beta 2 -Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic. *Circulation* 87, 1172–1179.
- Chung, K.W., Kim, D.H., Park, M.H., Choi, Y.J., Kim, N.D., Lee, J., Yu, B.P., and Chung, H.Y. (2013). Recent advances in calorie restriction research on aging. *Exp. Gerontol.* 48, 1049–1053.
- Cicekdal, M.B., Tuna, B.G., Charehsaz, M., Cleary, M.P., Aydin, A., and Dogan, S. (2019). Effects of long-term intermittent versus chronic calorie restriction on oxidative stress in a mouse cancer model. *IUBMB Life* 71, 1973–1985.
- Communal, C., Singh, K., Sawyer, D.B., and Colucci, W.S. (1999). Opposing effects of β 1- and β 2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: Role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100, 2210–2212.
- Costello, J.T., Culligan, K., Selfe, J., and Donnelly, A.E. (2012). Muscle, skin and core temperature after -110°C cold air and 8°C water treatment. *PLoS One* 7.
- Crompton, M., Costi, A., and Hayat, L. (1987). Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* 245, 915–918.
- Cross, H.R., Murphy, E., Koch, W.J., and Steenbergen, C. (2002). Male and female mice overexpressing the β 2-adrenergic receptor exhibit differences in ischemia/reperfusion injury: Role of nitric oxide. *Cardiovasc. Res.* 53, 662–671.
- Cuparencu, B., Tomus, C., Gozariu, M., and Cuprian, A. (2000). Effects of ICI 118.551 a selective beta-2 adrenergic blocking agent on the guinea pig cardiac excitability and ventricular fibrillation threshold. *Acta Physiol. Hung.* 87, 113–126.
- Das, M., and Das, D.K. (2008). Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life* 60, 199–203.
- Deveci, D., and Egginton, S. (2007). Effects of Acute and Chronic Cooling on Cardiorespiratory Depression in Rodents. *J. Physiol. Sci.* 57, 73–79.

- Ding, H.-L., Zhu, H.-F., Dong, J.-W., Zhu, W.-Z., and Zhou, Z.-N. (2004). Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. *Life Sci.* 75, 2587–2603.
- Dolinsky, V.W., Morton, J.S., Oka, T., Robillard-Frayne, I., Bagdan, M., Lopaschuk, G.D., Des Rosiers, C., Walsh, K., Davidge, S.T., and Dyck, J.R.B. (2010). Calorie restriction prevents hypertension and cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 56, 412–421.
- Downey, J.M. (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 487–504.
- Dronjak, S., Gavrilović, L., Filipović, D., and Radojčić, M.B. (2004). Immobilization and cold stress affect sympatho–adrenomedullary system and pituitary–adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiol. Behav.* 81, 409–415.
- Dugué, B., Smolander, J., Westerlund, T., Oksa, J., Nieminen, R., Moilanen, E., and Mikkelsen, M. (2005). Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidative capacity in healthy women. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 65, 395–402.
- Durand, S., Cui, J., Williams, K.D., and Crandall, C.G. (2004). Skin surface cooling improves orthostatic tolerance in normothermic individuals. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286.
- Ebrahim, Z., Yellon, D.M., and Baxter, G.F. (2001). Bradykinin elicits “second window” myocardial protection in rat heart through an NO-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 281.
- Eltzschig, H.K., and Eckle, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation.
- F. Kolář, B.O. (2004). Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol.Res.*
- Farrace, S., Ferrara, M., De Angelis, C., Trezza, R., Cenni, P., Peri, A., Casagrande, M., and De Gennaro, L. (2003). Reduced sympathetic outflow and adrenal secretory activity during a 40-day stay in the Antarctic. *Int. J. Psychophysiol.* 49, 17–27.

- Feuerstein, G., Liu, G.L., Yue, T.L., Cheng, H.Y., Hieble, J.P., Arch, J.R.S., Ruffolo, R.R., and Ma, X.L. (1998). Comparison of metoprolol and carvedilol pharmacology and cardioprotection in rabbit ischemia and reperfusion model. *Eur. J. Pharmacol.* *351*, 341–350.
- Fontana, L., Meyer, T.E., Klein, S., and Holloszy, J.O. (2004). Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6659–6663.
- Frances, C., Nazeyrollas, P., Prevost, A., Moreau, F., Pisani, J., Davani, S., Kantelip, J.P., and Millart, H. (2003). Role of β 1- and β 2-adrenoceptor subtypes in preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *41*, 396–405.
- Frasier, C.R., Moukdar, F., Patel, H.D., Sloan, R.C., Stewart, L.M., Alleman, R.J., La Favor, J.D., and Brown, D.A. (2013). Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. *Cardiovasc. Res.* *98*, 47–55.
- Freegly, M.J., Shechtman, O., Bergen, P. van, Reeber, C., and Papanek, P.E. (1991). Changes in blood pressure and dipsogenic responsiveness to angiotensin II during chronic exposure of rats to cold. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *38*, 837–842.
- Fregly, M.J. (1982). Thermogenic drinking: mediation by osmoreceptor and angiotensin II pathways. *Fed. Proc.* *41*, 2515–2519.
- Fregly, M.J., Rossi, F., Bergen, P., Brummermann, M., and Cade, J.R. (1993). Effect of chronic treatment with losartan potassium (DuP 753) on the elevation of blood pressure during chronic exposure of rats to cold. *Pharmacology* *46*, 198–205.
- Frisbee, J.C., Brooks, S.D., Stanley, S.C., and D'Audiffret, A.C. (2015). An Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol for Instigating Depressive Symptoms, Behavioral Changes and Negative Health Outcomes in Rodents. *J. Vis. Exp.* *2015*, 53109.
- Fryer, R.M., Hsu, A.K., Eells, J.T., Nagase, H., and Gross, G.J. (1999). Opioid-Induced Second Window of Cardioprotection. *Circ. Res.* *84*, 846–851.

- Fukui, T., Ishida, K., Mizukami, Y., Shiramoto, K., Harada, H., Yamashita, A., Yamashita, S., and Matsumoto, M. (2017). Comparison of the protective effects of direct ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning in a rabbit model of transient spinal cord ischemia. *J Anesth* *1*, 3–14.
- Gao, Z., Wilson, T.E., Drew, R.C., Ettinger, J., and Monahan, K.D. (2012). Altered coronary vascular control during cold stress in healthy older adults. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *302*, H312-8.
- Garlid, K.D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H.N., Darbenzio, R.B., D'Alonzo, A.J., Lodge, N.J., Smith, M.A., and Grover, G.J. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels: Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* *81*, 1072–1082.
- Garofalo, M.A.R., Kettelhut, I.C., Roselino, J.S., and Migliorini, R.H. (1996). Effect of acute cold exposure on norpinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J. Auton. Nerv. Syst.* *60*, 206–208.
- Girotti, M., Donegan, J.J., and Morilak, D.A. (2011). Chronic intermittent cold stress sensitizes neuro-immune reactivity in the rat brain. *Psychoneuroendocrinology* *36*, 1164–1174.
- Gong, D.W., He, Y., Karas, M., and Reitman, M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J. Biol. Chem.* *272*, 24129–24132.
- González, G., Zaldívar, D., Carrillo, E.D., Hernández, A., García, M.C., and Sánchez, J.A. (2010). Pharmacological preconditioning by diazoxide downregulates cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* *161*, 1172–1185.
- Goodrick, C.L., Ingram, D.K., Reynolds, M.A., Freeman, J.R., and Cider, N.L. (1982). Effects on intermittent feeding upon growth and life span in rats. *Gerontology* *28*, 233–241.
- Gordon, K., Blondin, D.P., Friesen, B.J., Tingelstad, H.C., Kenny, G.P., and Haman, F. (2019). Seven days of cold acclimation substantially reduces shivering intensity and increases nonshivering thermogenesis in adult humans. *J. Appl. Physiol.* *126*, 1598–1606.

- Goto, M., Liu, Y., Yang, X.-M., Ardell, J.L., Cohen, M. V., and Downey, J.M. (1995). Role of Bradykinin in Protection of Ischemic Preconditioning in Rabbit Hearts. *Circ. Res.* 77, 611–621.
- Gregson, W., Black, M.A., Jones, H., Milson, J., Morton, J., Dawson, B., Atkinson, G., and Green, D.J. (2011). Influence of cold water immersion on limb and cutaneous blood flow at rest. *Am. J. Sports Med.* 39, 1316–1323.
- Griffiths, E.J., and Halestrap, A.P. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 307, 93–98.
- Guo, Z.M., Mitchell-Raymundo, F., Yang, H., Ikeno, Y., Nelson, J., Diaz, V., Richardson, A., and Reddick, R. (2002). Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1121–1131.
- Halestrap, A.P., Clarke, S.J., and Javadov, S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - A target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61, 372–385.
- Haman, F., Péronnet, F., Kenny, G.P., Massicotte, D., Lavoie, C., Scott, C., and Weber, J.M. (2002). Effect of cold exposure on fuel utilization in humans: Plasma glucose, muscle glycogen, and lipids. *J. Appl. Physiol.* 93, 77–84.
- Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Kränkel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J.F., et al. (2003). Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 107, 3152–3158.
- Hamilton, K.L., Powers, S.K., Sugiura, T., Kim, S., Lennon, S., Tumer, N., and Mehta, J.L. (2001). Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 281.
- Hamilton, K.L., Quindry, J.C., French, J.P., Staib, J., Hughes, J., Mehta, J.L., and Powers, S.K. (2004). MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1360–1368.
- HAMPL, R., Stárka, L., and Janský, L. (2006). Steroids and Thermogenesis. *Physiol. Res* 55, 123–131.

- Han, X., Turdi, S., Hu, N., Guo, R., Zhang, Y., and Ren, J. (2012). Influence of long-term caloric restriction on myocardial and cardiomyocyte contractile function and autophagy in mice. *J. Nutr. Biochem.* *23*, 1592–1599.
- Hanssen, W., Van Der Lans, A.A.J.J., Brans, B., Hoeks, J., Jardon, K.M.C., Schaart, G., Mottaghy, F.M., Schrauwen, P., Van, W.D., and Lichtenbelt, M. (2016). Mark J Short-term Cold Acclimation Recruits Brown Adipose Tissue in Obese Humans.
- Harold Laughlin, M., Bowles, D.K., and Duncker, D.J. (2012). The coronary circulation in exercise training. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *302*.
- Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2007). Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion. *Pharmacol. Ther.* *116*, 173–191.
- Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2013). Review series Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* *123*.
- Hess, K.L., Wilson, T.E., Sauder, C.L., Gao, Z., Ray, C.A., and Monahan, K.D. (2009). Aging affects the cardiovascular responses to cold stress in humans. *J. Appl. Physiol.* *107*, 1076–1082.
- Heusch, G. (2015). Molecular basis of cardioprotection signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* *116*, 674–699.
- Hintsala, H., Kandelberg, A., Herzig, K.H., Rintamäki, H., Mäntysaari, M., Rantala, A., Antikainen, R., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Jaakkola, J.J.K., and Ikäheimo, T.M. (2014). Central aortic blood pressure of hypertensive men during short-term cold exposure. *Am. J. Hypertens.* *27*, 656–664.
- Hiroshima, Y., Yamamoto, T., Watanabe, M., Baba, Y., and Shinohara, Y. (2018). Effects of cold exposure on metabolites in brown adipose tissue of rats. *Mol. Genet. Metab. Reports* *15*, 36–42.
- Hoeke, G., Nahon, K.J., Bakker, L.E.H., Norkauer, S.S.C., Dinnes, D.L.M., Kockx, M., Lichtenstein, L., Drettwan, D., Reifel-Miller, A., Coskun, T., et al. (2017). Short-term cooling increases serum triglycerides and small high-density lipoprotein levels in humans. *J. Clin. Lipidol.* *11*, 920-928.e2.

Homans, D.C., Asinger, R., Pavek, T., Crampton, M., Lindstrom, P., Peterson, D., and Bache, R.J. (1992). Effect of superoxide dismutase and catalase on regional dysfunction after exercise-induced ischemia. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 263.

Hopstock, L.A., Barnett, A.G., Bønaa, K.H., Mannsverk, J., Njølstad, I., and Wilsgaard, T. (2013). Seasonal variation in cardiovascular disease risk factors in a subarctic population: The Tromsø Study 1979-2008. *J. Epidemiol. Community Health* 67, 113–118.

Hoshida, S., Yamashita, N., Otsu, K., and Hori, M. (2002). Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 826–831.

Hu, K., and Nattel, S. (1995). Mechanisms of Ischemic Preconditioning in Rat Hearts. *Circulation* 92, 2259–2265.

Hull, S.S., Vanoli, E., Adamson, P.B., Verrier, R.L., Foreman, R.D., and Schwartz, P.J. (1994). Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. *Circulation* 89, 548–552.

Ibanez, B., Prat-González, S., Speidl, W.S., Vilahur, G., Pinero, A., Cimmino, G., García, M.J., Fuster, V., Sanz, J., and Badimon, J.J. (2007). Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: Analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* 115, 2909–2916.

Ibanez, B., Cimmino, G., Prat-González, S., Vilahur, G., Hutter, R., García, M.J., Fuster, V., Sanz, J., Badimon, L., and Badimon, J.J. (2011). The cardioprotection granted by metoprolol is restricted to its administration prior to coronary reperfusion. *Int. J. Cardiol.* 147, 428–432.

Ibanez, B., MacAya, C., Sánchez-Brunete, V., Pizarro, G., Fernández-Friera, L., Mateos, A., Fernández-Ortiz, A., García-Ruiz, J.M., García-Álvarez, A., Iñiguez, A., et al. (2013). Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: The effect of Metoprolol in Cardioprotection during an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) Trial. *Circulation* 128, 1495–1503.

- Jaberansari, M.T., Baxter, G.F., Muller, C.A., Latouf, S.E., Röth, E., Opie, L.H., and Yellon, D.M. (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibition enhances a subthreshold stimulus to elicit delayed preconditioning in pig myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* *37*, 1996–2001.
- Janský, L., Pospíšilová, D., Honzová, S., Ulicný, B., Srámek, P., Zeman, V., and Kamínková, J. (1996). Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* *72*, 445–450.
- Janský, L., Matoušková, E., Vávra, V., Vybíral, S., Janský, P., Jandová, D., Knížková, I., and Kunc, P. (2006). Thermal, Cardiac and Adrenergic Responses to Repeated Local Cooling. *Physiol. Res* *55*, 543–549.
- Janský, L., Vybíral, S., Trubačová, M., and Okrouhlík, J. (2008). Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. In *European Journal of Applied Physiology*, (Springer-Verlag), pp. 131–135.
- Jennings, R.B., Sommers, H.M., Smyth, G.A., Flack, H.A., and Linn, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* *70*, 68–78.
- Johnsen, J., Pryds, K., Salman, R., Løfgren, B., Kristiansen, S.B., and Bøtker, H.E. (2016). The remote ischemic preconditioning algorithm: effect of number of cycles, cycle duration and effector organ mass on efficacy of protection. *Basic Res. Cardiol.* *111*, 10.
- Juravlyova, O.A., Markin, A.A., Kuzichkin, D.S., Saltuikova, M.M., Loginov, V.I., Zabolotskaya, I. V., and Vostrikova, L. V. (2018). Features of Human Metabolic Reactions under Extreme Cold Exposure. *Hum. Physiol.* *44*, 330–335.
- Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M., and Korthuis, R.J. (2016). Ischemia/Reperfusion. In *Comprehensive Physiology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 113–170.
- Kamata, H., and Hirata, H. (1999). Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cell. Signal.* *11*, 1–14.
- Kasparova, D., Neckar, J., Dabrowska, L., Novotny, J., Mraz, J., Kolar, F., and Zurmanova, J. (2015a). Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol. Genomics* *47*, 612–620.

- Kasparova, D., Neckar, J., Dabrowska, L., Novotny, J., Mraz, J., Kolar, F., and Zurmanova, J. (2015b). Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol. Genomics* 47, physiolgenomics.00058.2015.
- Kaumann, A.J., Sanders, L., Lynham, J.A., Bartel, S., Kuschel, M., Karczewski, P., and Krause, E.G. (1996). β 2-Adrenoceptor activation by zinterol causes protein phosphorylation, contractile effects and relaxant effects through a cAMP pathway in human atrium. *Mol. Cell. Biochem.* 163–164, 113–123.
- Kiefer, F.W. (2016). Browning and thermogenic programming of adipose tissue. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 479–485.
- Kim, J.Y., Jung, K.Y., Hong, Y.S., Kim, J. Il, Jang, T.W., and Kim, J.M. (2003). The Relationship between Cold Exposure and Hypertension. *J. Occup. Health* 45, 300–306.
- Kim, K., Suzuki, K., Peake, J., Ahn, N., Ogawa, K., Hong, C., Kim, S., Lee, I., and Park, J. (2014). Physiological and leukocyte subset responses to exercise and cold exposure in cold-acclimatized skaters. *Biol. Sport* 31, 39–48.
- Kim, Y.M., Talanian, R. V., and Billiar, T.R. (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3- like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272, 31138–31148.
- Kin, H., Zhao, Z.Q., Sun, H.Y., Wang, N.P., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Guyton, R.A., and Vinten-Johansen, J. (2004). Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 62, 74–85.
- Knuth, C.M., Pepler, W.T., Townsend, L.K., Miotto, P.M., Gudiksen, A., and Wright, D.C. (2018). Prior exercise training improves cold tolerance independent of indices associated with non-shivering thermogenesis. *J. Physiol.* 596, 4375–4391.
- Köhler, D., Bibli, S.-I., Klammer, L.P., Roth, J.M., Lehmann, R., Fleming, I., Granja, T.F., Straub, A., Benz, P.M., and Rosenberger, P. (2018). Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein contributes to myocardial ischemic preconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 113, 11.

Kolář, F. (1996). *Cardioprotective Effects of Chronic Hypoxia: Relation to Preconditioning*. (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 261–275.

Korhonen, I. (2006). Blood pressure and heart rate responses in men exposed to arm and leg cold pressor tests and whole-body cold exposure. *Int. J. Circumpolar Health* 65, 178–184.

Kositprapa, C., Ockaili, R.A., and Kukreja, R.C. (2001). Bradykinin b2 receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1355–1362.

Kopecký M, Daum S: Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium (in Czech). *Čs Fyziol* 7:518-521, 1958.

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

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

Frantisek Kolar, Jana Jezkova, Patricie Balkova, Jiri Breh, Jan Neckar, Frantisek Novak, Olga Novakova, Helena Tomasova, Martina Srbova, Bohuslav Ostadal, Jiri Wilhelm, Jan Herget. Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia (2007). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(1):H224-30.

Kwak, H., Song, W., and Lawler, J.M. (2006). Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB J.* 20, 791–793.

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.

Lau, J.K., Pennings, G.J., Yong, A., and Kritharides, L. (2017). Cardiac Remote Ischaemic Preconditioning: Mechanistic and Clinical Considerations.

Launay, J.-C., and Savourey, G. (2009). Cold adaptations. *Ind. Health* 47, 221–227.

- Lefer, D.J. (2006). Nitrite therapy for protection against ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 290.
- Lehnart, S.E., Wehrens, X.H.T., Reiken, S., Warriar, S., Belevych, A.E., Harvey, R.D., Richter, W., Jin, S.L.C., Conti, M., and Marks, A.R. (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123, 25–35.
- Lennon, S.L., Quindry, J., Hamilton, K.L., French, J., Staib, J., Mehta, J.L., and Powers, S.K. (2004a). Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J. Appl. Physiol.* 96, 1299–1305.
- Lennon, S.L., Quindry, J.C., Hamilton, K.L., French, J.P., Hughes, J., Mehta, J.L., and Powers, S.K. (2004b). Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 287.
- Leppäluoto, J., Korhonen, I., and Hassi, J. (2001). Habituation of thermal sensations, skin temperatures, and norepinephrine in men exposed to cold air. *J. Appl. Physiol.* 90, 1211–1218.
- Leppäluoto, J., Westerlund, T., Huttunen, P., Oksa, J., Smolander, J., Dugué, B., and Mikkelsen, M. (2008). Effects of long-term whole-body cold exposures on plasma concentrations of ACTH, beta-endorphin, cortisol, catecholamines and cytokines in healthy females. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 68, 145–153.
- Lesna, I., Vybíral, S., Jansky, L., and Zeman, V. (1999). Human nonshivering thermogenesis. *J. Therm. Biol.* 24, 63–69.
- Li, Y., Alshaer, H., and Fernie, G. (2009). Blood pressure and thermal responses to repeated whole body cold exposure: Effect of winter clothing. *Eur. J. Appl. Physiol.* 107, 673–685.
- Liu, G.S., Thornton, J., Van Winkle, D.M., Stanley, A.W., Olsson, R.A., and Downey, J.M. (1991). Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84, 350–356.
- Liu, Y., Ytrehus, K., and Downey, J.M. (1994). Evidence that Translocation of Protein Kinase C is a Key Event During Ischemic Preconditioning of Rabbit Myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26, 661–668.

- Lobo-Gonzalez, M., Galán-Arriola, C., Rossello, X., González-Del-Hoyo, M., Vilchez, J.P., Higuero-Verdejo, M.I., García-Ruiz, J.M., López-Martín, G.J., Sánchez-González, J., Oliver, E., et al. (2020). Metoprolol blunts the time-dependent progression of infarct size. *Basic Res. Cardiol.* 115.
- Locke, M., Tanguay, R.M., Klabunde, R.E., and Ianuzzo, C.D. (1995). Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 269.
- Lombardi, G., Ricci, C., and Banf, G. (2011). Effect of winter swimming on haematological parameters. *Biochem. Medica* 21, 71–78.
- 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, e13348.
- De Lorenzo, F., Kadziola, Z., Mukherjee, M., Saba, N., and Kakkar, V. V (1999). Haemodynamic responses and changes of haemostatic risk factors in cold-adapted humans. *QJM* 92, 509–513.
- Loubani, M., and Galiñanes, M. (2002). Pharmacological and ischemic preconditioning of the human myocardium: mitoK(ATP) channels are upstream and p38MAPK is downstream of PKC. *BMC Physiol.* 2, 10.
- Lu, S., and Xu, D. (2013). Cold stress accentuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction: Role of TRPV1/AMPK-mediated autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 442, 8–15.
- De Lucia, C., Gambino, G., Petraglia, L., Elia, A., Komici, K., Femminella, G.D., D'Amico, M.L., Formisano, R., Borghetti, G., Liccardo, D., et al. (2018). Long-term caloric restriction improves cardiac function, remodeling, adrenergic responsiveness, and sympathetic innervation in a model of postischemic heart failure. *Circ. Hear. Fail.* 11.
- Luo, B., Zhang, S., Ma, S., Zhou, J., and Wang, B. (2012). Effects of cold air on cardiovascular disease risk factors in rat. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 2312–2325.

- Lyamina, N.P., Lyamina, S. V., Senchiknin, V.N., Mallet, R.T., Downey, H.F., and Manukhina, E.B. (2011). Normobaric hypoxia conditioning reduces blood pressure and normalizes nitric oxide synthesis in patients with arterial hypertension. *J. Hypertens.* 29, 2265–2272.
- Maisel, A.S., Motulsky, H.J., and Insel, P.A. (1985). Externalization of β -Adrenergic receptors promoted by myocardial ischemia. *Science* (80-). 230, 183–186.
- Manfredi, L.H., Zanon, N.M., Garófalo, M.A., Navegantes, L.C.C., and Kettelhut, I.C. (2013). Effect of short-term cold exposure on skeletal muscle protein breakdown in rats. *J Appl Physiol* 115, 1496–1505.
- Manou-Stathopoulou, V., Goodwin, C.D., Patterson, T., Redwood, S.R., Marber, M.S., and Williams, R.P. (2015). The effects of cold and exercise on the cardiovascular system. *Heart* 101, 808–820.
- Mantsch, J.R., Weyer, A., Vranjkovic, O., Beyer, C.E., Baker, D.A., and Caretta, H. (2010). Involvement of noradrenergic neurotransmission in the stress- but not cocaine-induced reinstatement of extinguished cocaine-induced conditioned place preference in mice: Role for β -2 adrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology* 35, 2165–2178.
- Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M., and Yellon, D.M. (1993). Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88, 1264–1272.
- Marvanova, A., Kasik, P., Elsnicova, B., Tibenska, V., Galatik, F., Hornikova, D., Zvolska, V., Vebr, P., Vodicka, P., Hejnova, L., et al. (2023). Continuous short-term acclimation to moderate cold elicits cardioprotection in rats, and alters β -adrenergic signaling and immune status. *Sci. Rep.* 13.
- Maslov, L.N., and Vychuzhanina, E.A. (2015). [Role of sympatho-adrenomedullar system in adaptation to cold]. *Ross. Fiziol. Zhurnal Im. I.M. Sechenova* 101, 145–162.
- Masuo, K. (2010). Roles of beta2- and beta3-adrenoceptor polymorphisms in hypertension and metabolic syndrome. *Int. J. Hypertens.* 2010.

- Matsubara, T., Shimamoto, S., Ijiri, D., Ohtsuka, A., Kanai, Y., and Hirabayashi, M. (2016). The effects of acute cold exposure on morphology and gene expression in the heart of neonatal chicks. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 186, 363–372.
- Mattson, M.P., and Wan, R. (2005). Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J. Nutr. Biochem.* 16, 129–137.
- Mawhinney, C., Jones, H., Joo, C.H., Low, D.A., Green, D.J., and Gregson, W. (2013). Influence of cold-water immersion on limb and cutaneous blood flow after exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 45, 2277–2285.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., and Maynard, L.A. (1989). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* 5, 155–171; discussion 172.
- McElroy, C.L., Gissen, S.A., and Fishbein, M.C. (1978). Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation* 57, 958–962.
- Meerson, F.Z., Gomzakov, O.A., and Shimkovich, M. V. (1973). Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am. J. Cardiol.* 31, 30–34.
- Melo, D.S., Costa-Pereira, L. V, Santos, C.S., Mendes, B.F., Costa, K.B., Santos, C.F.F., Rocha-Vieira, E., Magalhães, F.C., Esteves, E.A., Ferreira, A.J., et al. (2016). Severe Calorie Restriction Reduces Cardiometabolic Risk Factors and Protects Rat Hearts from Ischemia/Reperfusion Injury. *Front. Physiol.* 7, 106.
- Meneghini, A., Ferreira, C., De Abreu, L.C., Ferreira, M., Filho, C.F., Valenti, V.E., and Murad, N. (2008). Cold stress effects on cardiomyocytes nuclear size in rats: Light microscopic evaluation. *Brazilian J. Cardiovasc. Surg.* 23, 530–533.
- Mercer, J.B., Østerud, B., and Tveita, T. (1999a). The Effect of Short-Term Cold Exposure on Risk Factors for Cardiovascular Disease.
- Mercer, J.B., Østerud, B., and Tveita, T. (1999b). The Effect of Short-Term Cold Exposure on Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Thromb. Res.* 95, 93–104.

- Michael Anson, R., Guo, Z., de Cabo, R., Iyun, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D.K., Lane, M.A., and Mattson, M.P. (2003). Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6216–6220.
- Miki, T., Cohen, M. V., and Downey, J.M. (1998). Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol. Cell. Biochem.* *186*, 3–12.
- Mukherjee, A., Wong, T.M., Buja, L.M., Lefkowitz, R.J., and Willerson, J.T. (1979). Beta adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in canine myocardium. Effects of ischemia. *J. Clin. Invest.* *64*, 1423–1428.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* *74*, 1124–1136.
- Neckář, J., Szárszoi, O., Koten, L., Papoušek, F., Ošťádal, B., Grover, G.J., and Kolář, F. (2002). Effects of mitochondrial KATP modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc. Res.* *55*, 567–575.
- Neckář, J., Papoušek, F., Nováková, O., Ošťádal, B., and Kolář, F. (2002). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res. Cardiol.* *97*, 161–167.
- Neckář, J., Szárszoi, O., Herget, J., Ošťádal, B., and Kolář, F. (2003). Cardioprotective Effect of Chronic Hypoxia is Blunted by Concomitant Hypercapnia. *Physiol. Res* *52*, 171–175.
- Neckář, J., Svatoňová, A., Weissová, R., Drahota, Z., Zajíčková, P., Brabcová, I., Kolář, D., Alánová, P., Vašinová, J., Šilhavý, J., et al. (2017). Selective replacement of mitochondrial DNA increases the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* *131*, 865–881.
- Newmeyer, D.D., and Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* *112*, 481–490.

- Nicklas, B.J., Ambrosius, W., Messier, S.P., Miller, G.D., Penninx, B.W.J.H., Loeser, R.F., Palla, S., Bleecker, E., and Pahor, M. (2004). Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: A randomized controlled clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* *79*, 544–551.
- Niemann, B., Chen, Y., Issa, H., Silber, R.E., and Rohrbach, S. (2010). Caloric restriction delays cardiac ageing in rats: Role of mitochondria. *Cardiovasc. Res.* *88*, 267–276.
- Noyan, H., El-Mounayri, O., Isserlin, R., Arab, S., Momen, A., Cheng, H.S., Wu, J., Afroze, T., Li, R.-K., Fish, J.E., et al. (2015). Cardioprotective Signature of Short-Term Caloric Restriction.
- Ockene, I.S., Chiriboga, D.E., Stanek, E.J., Harmatz, M.G., Nicolosi, R., Saperia, G., Well, A.D., Freedson, P., Merriam, P.A., Reed, G., et al. (2004). Seasonal Variation in Serum Cholesterol Levels: Treatment Implications and Possible Mechanisms. *Arch. Intern. Med.* *164*, 863–870.
- Okoshi, K., Cezar, M.D.M., Polin, M.A.M., Paladino, J.R., Martinez, P.F., Oliveira, S.A., Lima, A.R.R., Damatto, R.L., Paiva, S.A.R., Zornoff, L.A.M., et al. (2019). Influence of intermittent fasting on myocardial infarction-induced cardiac remodeling. *BMC Cardiovasc. Disord.* *19*.
- Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J.M., and Anversa, P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ. Res.* *68*, 1560–1568.
- Ouellet, V., Labbé, S.M., Blondin, D.P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., Turcotte, E.E., Richard, D., and Carpentier, A.C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* *122*, 545–552.
- Paez, D.T., Garces, M., Calabró, V., Bin, E.P., D’Annunzio, V., del Mauro, J., Marchini, T., Höcht, C., Evelson, P., Gelpi, R.J., et al. (2019). Adenosine A₁ receptors and mitochondria: targets of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* *316*, H743–H750.
- Paffenbarger, R.S., Laughlin, M.E., Gima, A.S., and Black, R.A. (1970). Work Activity of Longshoremen as Related to Death from Coronary Heart Disease and Stroke. *N. Engl. J. Med.* *282*, 1109–1114.

- Pain, T., Yang, X.M., Critz, S.D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G.S., Heusch, G., Cohen, M. V., and Downey, J.M. (2000). Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* 87, 460–466.
- Papadopoulos, D.P., and Papademetriou, V. (2009). Metoprolol succinate combination in the treatment of hypertension. *Angiology* 60, 608–613.
- Parulek, J., Šrámek, M., Červěanský, M., Novotová, M., and Zahradník*, I. (2009). A Cell Architecture Modeling System Based on Quantitative Ultrastructural Characteristics. (Humana Press), pp. 289–312.
- Patterson, A.J., Zhu, W., Chow, A., Agrawal, R., Kosek, J., Xiao, R.P., and Kobilka, B. (2004). Protecting the myocardium: A role for the β 2 adrenergic receptor in the heart. *Crit. Care Med.* 32, 1041–1048.
- Peart, J.N., See Hoe, L., Pepe, S., Johnson, P., and Headrick, J.P. (2012). Opposing effects of age and calorie restriction on molecular determinants of myocardial ischemic tolerance. *Rejuvenation Res.* 15, 59–70.
- Peiffer, J.J., Abbiss, C.R., Watson, G., Nosaka, K., and Laursen, P.B. (2009). Effect of cold-water immersion duration on body temperature and muscle function. *J. Sports Sci.* 27, 987–993.
- Piper, H.M., Abdallah, Y., and Schäfer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: A window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61, 365–371.
- Polak, J., Punjabi, N.M., and Shimoda, L.A. (2018). Blockade of endothelin-1 receptor type B ameliorates glucose intolerance and insulin resistance in a mouse model of obstructive sleep apnea. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9.
- Ponzielli, R., Katz, S., Barsyte-Lovejoy, D., and Penn, L.Z. (2005). Cancer therapeutics: Targeting the dark side of Myc. *Eur. J. Cancer* 41, 2485–2501.
- Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Martin, D., Lieu, F.K., Li Li Ji, and Herb, R.A. (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 265.

Powers, S.K., Demirel, H.A., Vincent, H.K., Coombes, J.S., Naito, H., Hamilton, K.L., Shanely, R.A., and Jessup, J. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275.

Powers, S.K., Murlasits, Z., Wu, M., and Kavazis, A.N. (2007). Ischemia-reperfusion-induced cardiac injury: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1529–1536.

Przyklenk, K., and Kloner, R.A. (1998). Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 40, 517–547.

Qian, S., Huang, H., and Tang, Q. Brown and beige fat: the metabolic function, induction, and therapeutic potential.

Qian, S., Huang, H., and Tang, Q. (2015). Brown and beige fat: the metabolic function, induction, and therapeutic potential. *Front. Med.* 9, 162–172.

Reusch, J.E.B. (2002). Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* 90, 19–26.

Ricci, M.R., Fried, S.K., and Mittleman, K.D. (2000). Acute cold exposure decreases plasma leptin in women. *Metabolism* 49, 421–423.

Richard, D., Carpentier, A.C., Doré, G., Ouellet, V., and Picard, F. (2010). Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int. J. Obes.* 34, S59–S66.

Rod Jackson, Carlene M M Lawes, Derrick A Bennett, Richard J Milne, A.R. (2005). Treatment with drugs to lower blood pressure and blood cholesterol based on an individual's absolute cardiovascular risk. *Lancet (London, England)* 365.

Rodríguez, A., Becerril, S., Valentí, V., Moncada, R., Méndez-Giménez, L., Ramírez, B., Lancha, A., Martín, M., Burrell, M.A., Catalán, V., et al. (2012). Short-term effects of sleeve gastrectomy and caloric restriction on blood pressure in diet-induced obese rats. *Obes. Surg.* 22, 1481–1490.

Rozec, B., and Gauthier, C. (2006). β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacol. Ther.* 111, 652–673.

- Salie, R., Moolman, J.A., and Lochner, A. (2011a). The role of β -adrenergic receptors in the cardioprotective effects of beta-preconditioning (β PC). *Cardiovasc. Drugs Ther.* 25, 31–46.
- Salie, R., Moolman, J.A., and Lochner, A. (2011b). The role of β -adrenergic receptors in the cardioprotective effects of beta-preconditioning (β PC). *Cardiovasc. Drugs Ther.* 25, 31–46.
- Sato, T., O'Rourke, B., and Marbán, E. (1998). Modulation of mitochondrial ATP-dependent K^+ channels by protein kinase C. *Circ. Res.* 83, 110–114.
- Schäfer, C., Ladilov, Y., Inserte, J., Schäfer, M., Haffner, S., Garcia-Dorado, D., and Piper, H.M. (2001). Role of the reverse mode of the Na^+/Ca^{2+} exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc. Res.* 51, 241–250.
- Schultz, J.E.J., Hsu, A.K., and Gross, G.J. (1996). Morphine Mimics the Cardioprotective Effect of Ischemic Preconditioning via a Glibenclamide-Sensitive Mechanism in the Rat Heart. *Circ. Res.* 78, 1100–1104.
- Schultz, J.J., Hsu, A.K., and Gross, G.J. (1997). Ischemic Preconditioning is Mediated by a Peripheral Opioid Receptor Mechanism in the Intact Rat Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 1355–1362.
- Sellers, A.J., Pallubinsky, H., Rense, P., Bijmens, W., van de Weijer, T., Moonen-Kornips, E., Schrauwen, P., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2021). The effect of cold exposure with shivering on glucose tolerance in healthy men. *J. Appl. Physiol.* 130, 193–205.
- Sepa-Kishi, D.M., Sotoudeh-Nia, Y., Iqbal, A., Bikopoulos, G., and Ceddia, R.B. (2017). Cold acclimation causes fiber type-specific responses in glucose and fat metabolism in rat skeletal muscles. *Sci. Rep.* 7.
- Shao, J., Miao, C., Geng, Z., Gu, M., Wu, Y., and Li, Q. (2019). Effect of eNOS on Ischemic Postconditioning-Induced Autophagy against Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Biomed Res. Int.* 2019.
- Sharma, V., Parsons, H., Allard, M.F., and McNeill, J.H. (2008). Metoprolol increases the expression of β_3 -adrenoceptors in the diabetic heart: Effects on nitric oxide signaling and forkhead transcription factor-3. *Eur. J. Pharmacol.* 595, 44–51.

- Shechtman, O., Fregly, M.J., and Papanek, P.E. (1990). Factors Affecting Cold-Induced Hypertension in Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195, 364–368.
- Shibata, H., Perusse, F., Vallerand, A., and Bukowiecki, L.J. (1989). Cold exposure reverses inhibitory effects of fasting on peripheral glucose uptake in rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 257.
- Shiki, K., and Hearse, D.J. (1987). Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am. J. Physiol.* 253, H1470-6.
- Shinmura, K., Tamaki, K., Saito, K., Nakano, Y., Tobe, T., and Bolli, R. (2007). Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase. *Circulation* 116, 2809–2817.
- Shiva, S., Sack, M.N., Greer, J.J., Duranski, M., Ringwood, L.A., Burwell, L., Wang, X., MacArthur, P.H., Shoja, A., Raghavachari, N., et al. (2007). Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J. Exp. Med.* 204, 2089–2102.
- Sidossis, L., and Kajimura, S. (2015). Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 125, 478–486.
- Siems, W.G., van Kuijk, F.J.G.M., Maass, R., and Brenke, R. (1994). Uric acid and glutathione levels during short-term whole body cold exposure. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 299–305.
- Simonsen, L., Bulow, J., Madsen, J., and Christensen, N.J. (1992). Thermogenic response to epinephrine in the forearm and abdominal subcutaneous adipose tissue. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 263.
- Smith, O.L.K., and Davidson, S.B. (1982). Shivering thermogenesis and glucose uptake by muscles of normal or diabetic rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 11.
- Smith, R.M., and Hanna, J.M. (1975). Skinfolds and resting heat loss in cold air and water: temperature equivalence. <https://doi.org/10.1152/Jappl.1975.39.1.93> 39, 93–102.
- Šnorek, M., Hodyc, D., Šedivý, V., Ďurišová, J., Skoumalová, A., Wilhelm, J., Neckář, J., Kolář, F., and Herget, J. (2012). Short-term fasting reduces the extent of myocardial infarction and incidence of reperfusion arrhythmias in rats. *Physiol. Res.* 61, 567–574.

Sohal, R.S., and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* (80-.). 273, 59–63.

Solaini, G., and Harris, D.A. (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem. J.* 390, 377–394.

Spear, J.F., Prabu, S.K., Galati, D., Raza, H., Anandatheerthavarada, H.K., and Avadhani, N.G. (2007). β_1 -Adrenoreceptor activation contributes to ischemia-reperfusion damage as well as playing a role in ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 292, H2459–H2466.

Speechly-Dick, M.E., Mocanu, M.M., and Yellon, D.M. (1994). Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ. Res.* 75, 586–590.

Speciální cvičení z fyziologie živočichů

Šrámek, P., Šimečková, M., Janský, L., Šavlíková, J., and Vybíral, S. (2000). Human physiological responses to immersion into water of different temperatures. *Eur. J. Appl. Physiol.* 81, 436–442.

Staat, P., Rioufol, G., Piot, C., Cottin, Y., Cung, T.T., L'Huillier, I., Aupetit, J.F., Bonnefoy, E., Finet, G., André-Fouët, X., et al. (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation* 112, 2143–2148.

Starkopf, J., Bugge, E., and Ytrehus, K. (1997). Preischaemic bradykinin and ischaemic preconditioning in functional recovery of the globally ischaemic rat heart. *Cardiovasc. Res.* 33, 63–70.

Steel, R., Doherty, J.P., Buzzard, K., Clemons, N., Hawkins, C.J., and Anderson, R.L. (2004). Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 279, 51490–51499.

Steenbergen, C., Murphy, E., Levy, L., and London, R.E. (1987). Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ. Res.* 60, 700–707.

Stewart, S., MacIntyre, K., Capewell, S., and McMurray, J.J.V. (2003). Heart failure and the aging population: An increasing burden in the 21st century? *Heart* 89, 49–53.

Sun, Z., Fregly, M.J., and Cade, J.R. (1995). Effect of renal denervation on elevation of blood pressure in cold-exposed rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73, 72–78.

Sun, Z., Cade, J.R., and Fregly, M.J. (1997). Cold-induced hypertension. A model of mineralocorticoid-induced hypertension. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, (Blackwell Publishing Inc.), pp. 682–688.

Sun, Z., Cade, R., and Tatum, C. (2001). Central imidazoline and angiotensin II receptors in cardiovascular responses to chronic cold exposure in rats. *J. Therm. Biol.* 26, 513–518.

Sun, Z., Cade, R., Zhang, Z., Alouidor, J., and Van, H. (2003). Angiotensinogen gene knockout delays and attenuates cold-induced hypertension. *Hypertension* 41, 322–327.

Sun, Z., Bello-Roufai, M., and Wang, X. (2008). RNAi inhibition of mineralocorticoid receptors prevents the development of cold-induced hypertension. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 294.

Suzuki, K., Murtuza, B., Sammut, I.A., Latif, N., Jayakumar, J., Smolenski, R.T., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., and Yacoub, M.H. (2002). Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation* 106, I270-6.

T Asano, T.K.A.G.G.E.M.R. (1984). Activation of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase, Gi, by beta-adrenergic receptors in reconstituted phospholipid vesicles - PubMed. 9351–9354.

Takano, H., Bolli, R., Black, R.G., Kodani, E., Tang, X.L., Yang, Z., Bhattacharya, S., and Auchampach, J.A. (2001). A1 or A3 adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ. Res.* 88, 520–528.

Taylor, R.P., Harris, M.B., and Starnes, J.W. (1999). Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 276.

Teległów, A., Marchewka, J., Tabarowski, Z., Rembiasz, K., Głodzik, J., and Ścisłowska-Czarnecka, A. (2015). Comparison of selected morphological, rheological and biochemical parameters of winter swimmers' blood at the end of one winter swimming season and at the beginning of another. *Folia Biol.* *63*, 221–228.

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, 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.

Torella, D., Rota, M., Nurzynska, D., Musso, E., Monsen, A., Shiraishi, I., Zias, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Sussman, M.A., et al. (2004). Cardiac Stem Cell and Myocyte Aging, Heart Failure, and Insulin-Like Growth Factor-1 Overexpression. *Circ. Res.* *94*, 514–524.

Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U.B., French, B.A., and Rassaf, T. (2016). A practical approach to remote ischemic preconditioning and ischemic preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury HHS Public Access. *J Biol Methods* *3*.

Tsibulnikov, S.Y., Maslov, L.N., Ivanov, V. V., Naryzhnaya, N. V., and Tsibulnikova, M.R. (2016). INFARCT-LIMITING EFFECT OF ADAPTATION TO CONTINUOUS COLD EXPOSURE. *Russ. Fiziol. Zhurnal Im. I.M. Sechenova* *102*, 1363–1368.

Tsibulnikov, 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. Role of glucocorticoid and thyroid hormones. *Gen. Physiol. Biophys.* *38*, 245–251.

Tsuchida, A., Miura, T., Miki, T., Shimamoto, K., and Iimura, O. (1992). Role of adenosine receptor activation in myocardial infarct size limitation by ischaemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* *26*, 456–461.

- Tsuneyoshi, H., Oriyanhan, W., Kanemitsu, H., Shiina, R., Nishina, T., Matsuoka, S., Ikeda, T., and Komeda, M. (2005). Does the β 2-agonist clenbuterol help to maintain myocardial potential to recover during mechanical unloading? *Circulation* 112.
- Uchida, K., Shiuchi, T., Inada, H., Minokoshi, Y., and Tominaga, M. (2010). Metabolic adaptation of mice in a cool environment. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 765–774.
- Vahlhaus, C., Schulz, R., Post, H., Rose, J., and Heusch, G. (1998). Prevention of ischemic preconditioning only by combined inhibition of protein kinase C and protein tyrosine kinase in pigs. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 197–209.
- Vallerand, A.L., Lupien, J., and Bukowiecki, L.J. (1983). Interactions of cold exposure and starvation on glucose tolerance and insulin response. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 8.
- Vallerand, A.L., Perusse, F., and Bukowiecki, L.J. (1987). Cold exposure potentiates the effect of insulin on in vivo glucose uptake. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 253.
- Vallerand, A.L., Frim, J., and Kavanagh, M.F. (1988). Plasma glucose and insulin responses to oral and intravenous glucose in cold-exposed humans. *J. Appl. Physiol.* 65, 2395–2399.
- Vallerand, A.L., Perusse, F., and Bukowiecki, L.J. (1990). Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 259.
- Vatner, D.E., Knight, D.R., Shen, Y.T., Thomas, J.X., Homcy, C.J., and Vatner, S.F. (1988). One hour of myocardial ischemia in conscious dogs increases β -adrenergic receptors, but decreases adenylate cyclase activity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20, 75–82.
- Venkatesh, N., Lamp, S.T., and Weiss, J.N. (1991). Sulfonylureas, ATP-sensitive K⁺ channels, and cellular K⁺ loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circ. Res.* 69, 623–637.
- Vincent H., H. M. in 't V.A.. B.F.. D.F.. S.M. (1985). Compound ICI 118,551, a beta 2-adrenoceptor antagonist, lowers blood pressure - PubMed. 247–249.
- Visscher, T.L.S., and Seidell, J.C. (2001). The public health impact of obesity. *Annu. Rev. Public Health* 22, 355–375.

- Vogelaere, P., Brasseur, M., Quirion, A., Leclercq, R., Laurencelle, L., and Bekaert, S. (1990). Hematological variations at rest and during maximal and submaximal exercise in a cold (0 ~ C) environment. *Int. J. Biometeorol.* *34*, 1–14.
- Vogelaere, P., Savourey, G., Deklunder, G., Lecroart, J., Brasseur, M., Bekaert, S., and Bittel, J. (1992). Reversal of cold induced haemoconcentration. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* *64*, 244–249.
- Vucetic, M., Otasevic, V., Korac, A., Stancic, A., Jankovic, A., Markelic, M., Golic, I., Velickovic, K., Buzadzic, B., and Korac, B. (2011). Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF-1 α and AMPK α . *BBA - Gen. Subj.* *1810*, 1252–1261.
- Vuorinen, K., Ylitalo, K., Peuhkurinen, K., Raatikainen, P., Ala-Rämi, A., and Hassinen, I.E. (1995). Mechanisms of ischemic preconditioning in rat myocardium: Roles of adenosine, cellular energy state, and mitochondrial F1F0-ATPase. *Circulation* *91*, 2810–2818.
- Wallis, E.J., Ramsay, L.E., and Jackson, P.R. (2002). Cardiovascular and coronary risk estimation in hypertension management. *Heart* *88*, 306–312.
- Wan, R., Camandola, S., and Mattson, M.P. (2003). Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *J. Nutr.* *133*, 1921–1929.
- Wang, W., and Seale, P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 691.
- Wang, T.-Y., Liu, C., Wang, A., and Sun, Q. (2015a). Intermittent cold exposure improves glucose homeostasis associated with brown and white adipose tissues in mice HHS Public Access. *Life Sci* *139*, 153–159.
- Wang, X., Wei, M., Kuukasjärvi, P., Laurikka, J., Järvinen, O., Rinne, T., Honkonen, E.L., and Tarkka, M. (2003). Novel pharmacological preconditioning with diazoxide attenuates myocardial stunning in coronary artery bypass grafting. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* *24*, 967–973.

Wang, X., Che, H., Zhang, W., Wang, J., Ke, T., Cao, R., Meng, S., Li, D., Weiming, O., Chen, J., et al. (2015b). Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs. *Int. J. Biol. Sci.* *11*, 1171–1180.

Weiss, J.N., Korge, P., Honda, H.M., and Ping, P. (2003). Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ. Res.* *93*, 292–301.

Weiszenstein, M., Shimoda, L.A., Koc, M., Seda, O., and Polak, J. (2016). Inhibition of Lipolysis Ameliorates Diabetic Phenotype in a Mouse Model of Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *55*, 299–307.

Wenzel, D., Knies, R., Matthey, M., Klein, A.M., Welschoff, J., Stolle, V., Sasse, P., Röhl, W., Breuer, J., and Fleischmann, B.K. (2009). β 2-adrenoceptor antagonist icl 118,551 decreases pulmonary vascular tone in mice via a G i/o protein/nitric oxide-coupled pathway. *Hypertension* *54*, 157–163.

Westenbroek, C., Den Boer, J.A., Veenhuis, M., and Ter Horst, G.J. (2004). Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats. *Brain Res. Bull.* *64*, 303–308.

Wilson, T.E., and Crandall, C.G. (2011). Effect of Thermal Stress on Cardiac Function. *Exerc. Sport Sci. Rev.* *39*, 12–17.

Wilson, T.E., Sauder, C.L., Kearney, M.L., Kuipers, N.T., Leuenberger, U.A., Monahan, K.D., and Ray, C.A. (2007). Skin-surface cooling elicits peripheral and visceral vasoconstriction in humans. *J. Appl. Physiol.* *103*, 1257–1262.

Wilson, T.E., Gao, Z., Hess, K.L., and Monahan, K.D. (2010). Effect of aging on cardiac function during cold stress in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *298*, R1627-33.

Wu, H., Ye, M., Liu, | Di, Yang, J., Ding, J.-W., Zhang, J., Wang, X.-A., Dong, W.-S., Fan, Z.-X., and Yang, J. (2019). UCP2 protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury via induction of mitochondrial autophagy.

- Van Wylen, D.G.L., Schmit, T.J., Lasley, R.D., Gingell, R.L., and Mentzer, R.M. (1992). Cardiac microdialysis in isolated rat hearts: Interstitial purine metabolites during ischemia. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 262.
- Xiao, R.P., and Lakatta, E.G. (1993). β 1-Adrenoceptor stimulation and β 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca^{2+} , and Ca^{2+} current in single rat ventricular cells. *Circ. Res.* 73, 286–300.
- Xiao, R.-P., Avdonin, P., Zhou, Y.-Y., Cheng, H., Akhter, S.A., Eschenhagen, T., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J., and Lakatta, E.G. (1999). Coupling of β_2 -Adrenoceptor to G_i Proteins and Its Physiological Relevance in Murine Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 84, 43–52.
- Xing, J.-Q., Zhou, Y., Chen, J.-F., Li, S.-B., Fang, W., and Yang, J. (2014). Effect of cold adaptation on activities of relevant enzymes and antioxidant system in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 4232–4237.
- Yamagishi, T., Bessho, M., Yanagida, S., Nishizawa, K., Kusuhara, M., Ohsuzu, F., and Tamai, S. (2010). Severe, short-term food restriction improves cardiac function following ischemia/reperfusion in perfused rat hearts. *Heart Vessels* 25, 417–425.
- Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T., and Hori, M. (1999). Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J. Exp. Med.* 189, 1699–1706.
- Yellon, D., Baxter, G.F., Garcia-Dorado, D., Heusch, G., and Sumeray, M.S. (1998). Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc. Res.* 37, 21–33.
- Yeung, H.M., Kravtsov, G.M., Ng, K.M., Wong, T.M., and Fung, M.L. (2007). Chronic intermittent hypoxia alters Ca^{2+} handling in rat cardiomyocytes by augmented Na^+/Ca^{2+} exchange and ryanodine receptor activities in ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C2046-56.
- Young, J.B., Mullen, D., and Landsberg, L. (1978). Caloric restriction lowers blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism* 27, 1711–1714.

Zaugg, M., Xu, W., Lucchinetti, E., Shafiq, S.A., Jamali, N.Z., and Siddiqui, M.A.Q. (2000). β -Adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Circulation* *102*, 344–350.

Zhao, Z.Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.P., Guyton, R.A., and Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *285*.

Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Guyton RA, V.-J.J. (2003). Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting reactive oxygen species-triggering mitochondrial calcium overload. *Circulation* *108 (suppl)*, 174.

Zhu, B.Q., Simonis, U., Cecchini, G., Zhou, H.Z., Li, L., Teerlink, J.R., and Karliner, J.S. (2006a). Comparison of pyrroloquinoline quinone and/or metoprolol on myocardial infarct size and mitochondrial damage in a rat model of ischemia/reperfusion injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *11*, 119–128.

Zhu, P., Zhang, Z.H., Huang, X.F., Shi, Y.C., Khandekar, N., Yang, H.Q., Liang, S.Y., Song, Z.Y., and Lin, S. (2018). Cold exposure promotes obesity and impairs glucose homeostasis in mice subjected to a high-fat diet. *Mol. Med. Rep.* *18*, 3923–3931.

Zhu, W.-Z., Xie, Y., Chen, L., Yang, H.-T., and Zhou, Z.-N. (2006b). Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *40*, 96–106.

Zhu, W.Z., Zheng, M., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J., Kobilka, B.K., and Xiao, R.P. (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1607–1612.

Zweier, J.L., Flaherty, J.T., and Weisfeldt, M.L. (1987). Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 1404–1407.

13 Internetové zdroje

<https://www.czso.cz/csu/czso/prumerny-cech-trpi-mirnou-nadvahou>

14 Seznam obrázků a tabulek

- Obrázek 1:** Schéma ischemicko-reperfúzního poškození; volné kyslíkové radikály (ROS), sarkoplazmatické retikulum (SR), mitochondriální pór přechodné propustnosti (MPTP). Převzato z (Hausenloy and Yellon, 2013b); doi: 10.1172/JCI62874..... 14
- Obrázek 2:** Schéma signální dráhy farmakologického preconditioningu; inhibiční G-protein (Gi), fosfolipáza C (PLC), fosfolipáza D (PLD), mitogenem aktivovaná proteinkináza p38 (p38MAPK), mitochondriální draselný kanál citlivý na ATP (K_{ATP}), volné kyslíkové radikály (ROS), proteinkináza C(PKC). Převzato z (Loubani and Galiñanes, 2002); doi 10.1186/1472-6793-2-10. 18
- Obrázek 3:** Časový průběh krátkodobé a dlouhodobé chladové expozice ve zvolených režimech: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontrol (C)..... 36
- Obrázek 4:** Ukázka hnědé tukové tkáně (BAT) v interskapulární oblasti u kontrolní skupiny (A) a po chronické chladové expozici (B) a po izolaci (vpravo); (autor: Mgr. Pavel Vebr). .. 37
- Obrázek 5:** Grafické zobrazení oblasti podvazu; přední levá sestupná koronární artérie (LAD), pravá komora srdeční (RV), levá komora srdeční (LV), aorta (A), plicnice (PA), pravé ouško (RA), levé ouško (LA). Převzato z (Aljinović et al., 2010); DOI: 10.14670/HH-25.1507..... 38
- Obrázek 6:** Srdce obarvené 3% manganistanem draselným (autor obrázku: Mgr. Pavel Vebr). 39
- Obrázek 7:** Ukázka příčného řezu levé komory po obarvení 1% roztokem 2,3,5 - triphenyltetrazolium chloridu v PBS (autor: Mgr. Pavel Vebr)..... 40
- Obrázek 8:** Průběhový hmotnostní graf u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), u 5 týdnů chladu a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C) z chovného jádra FGÚ AV ČR; n= 8..... 42
- Obrázek 9:** Tělesná hmotnost (BW) (A; D); hmotnost hnědé tukové tkáně (W_BAT) (B; E); poměr BAT/BW (C; F); ve zvolených chladových expozicích: 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chladu a 2-týdenní regrese (CLR) a u příslušných kontrol (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05); ***p <0,001 vs C; ####p <0,001 vs 3D; **p <0,01 vs CL; #p <0,05 vs CL; n= 6. 43
- Obrázek 10:** Rychlost metabolismus po infúzi noradrenalinu ve zvolených chladových expozicích (A; B): 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u příslušných kontrol (C); bazální metabolismus (BM), postaplikační fáze

noradrenalinu (1,8 ug/ml na 100 g, 5 min; PAP). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05); *p <0,05 vs BM_{3D}; ***p <0,001 vs BM_{10D}; ###p <0,001 vs PAP_C; n= 6..... 44

Obrázek 11: Průběh glukózového tolerančního testu ve zvolených chladových expozičních: 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontrolní skupiny (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05). ***p <0,001 3D vs C; ~p <0,01 3D vs 10D; ###p <0,001 3D vs CL; >p <0,05 3D vs CLR; n=9. 45

Obrázek 12: Maturace hnědé tukové tkáně (BAT): Tělesná hmotnost (BW, A); hmotnost hnědé tukové tkáně (W_BAT, B); poměr BAT/BW (C); u krátkodobé chladové expozice: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05); *p <0,05 vs C; †p <0,05 vs 1D; ††p <0,001 vs 1D; n= 6. 49

Obrázek 13: Velikost ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození (A) vyjádřeno jako poměr velikosti infarktu (IS) a velikosti zasažené oblasti ischemií (AR); velikost zasažené oblasti levé komory srdeční ischemií (B), vyjádřeno jako poměr AR a velikosti levé komory (LV) u krátkodobé chladové expozice: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05); *p <0,05 vs C; **p <0,05 vs C; †p <0,01 vs 1D; ††p <0,001 vs 1D; n= 9. 50

Obrázek 14: Průběhový hmotnostní graf u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), u 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C) z chovného jádra Velaz s.r.o.; n = 24. 51

Obrázek 15: Tělesná hmotnost (BW, A); hmotnost hnědé tukové tkáně (W_BAT, B); poměr BAT/BW (C); u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05); ***p <0,001 vs C; #p <0,05 CL vs CLR; n= 12. 53

Obrázek 16: Velikost I/R poškození, vyjádřeno jako poměr velikosti infarktu (IS) a velikosti zasažené oblasti ischemií (AR) (A, B); velikost zasažené oblasti levé komory srdeční ischemií (C, D), vyjádřeno jako poměr AR a velikosti levé komory (LV) u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u příslušných kontrol (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05); ***p <0,001 vs C; **p <0,01 vs C; n=10. 54

Obrázek 17: Velikost ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození po podání inhibitoru inhibitor β 1 AR, metoprolol tartrát (I) a po podání fyziologického roztoku (F; A); velikost zasažené oblasti levé komory srdeční ischemií (B) u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL); 5 týdnů a 2-týdenní regrese (CLR) a u příslušných kontrol. Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); *** $p < 0,001$ vs C; # $p < 0,05$ C s inhibitorem vs C s fyziologickým roztokem; $n=12$ 57

Obrázek 18: Velikost ischemicko-reperfúzního (I/R) poškození, vyjádřeno jako poměr velikosti infarktu (IS) a velikosti zasažené oblasti ischemií (AR), po podání inhibitoru ICI 118,551 hydrochlorid (1mg/kg, I), po podání fyziologického roztoku (F, A) a velikost zasažené oblasti levé komory srdeční ischemií (B), vyjádřeno jako poměr AR a velikosti levé komory (LV), u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); ** $p < 0,001$ vs C; * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ CLR s inhibitorem vs CLR s fyziologickým roztokem; $^{\text{†††}}p < 0,001$ C s inhibitorem vs CL s inhibitorem; $n= 12$ 59

Obrázek 19: Srovnávací průběhový hmotnostní graf u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), u 5 týdnů chladu a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C) z chovného jádra FGÚ AV ČR; $n= 8$; vs z chovné jádro Velaz s.r.o.; $n= 24$ 61

Obrázek 20: Reprezentativní obrázek mitochondrií v BAT (červená barva, anti-OXPHOS Abs) a odpráhujícího proteinu UCP1 (zelená barva), modrá barva označuje barvení jader pomocí DAPI v průběhu expozice chladu 1 až 10 dní (1D, 3D, 10D). Třetí sloupec ukazuje kolokalizaci UCP1 s OXPHOS (žlutooranžová barva), černobílé obrázky ukazují odpovídající kolokalizaci pixelů (Mander's M2 korelující koeficient) kvantifikované v grafu A, B; ($n=5$). UCP-závislá respirace izolovaných mitochondrií, C; ($n=5-6$). (Marvanová et al. 2023); doi: 10.1038/s41598-023-44205-4. 62

Tabulka 1: Krevní obraz a biochemická analýza séra ve zvolených chladových expozicích: 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontrol (C). Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$). * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; *** $p < 0,001$ vs C; ~ ~ $p < 0,01$ vs 3D; ## $p < 0,01$ vs CL; # $p < 0,05$ vs CL; $n = 6$ 47

Tabulka 2: Základní parametry: tělesná hmotnost (BW); hmotnost hnědé tukové tkáně (BAT); poměr BAT/BW; rektální teplota (RT); hmotnost celého srdce (HW); poměr hmotnosti levé komory srdeční ku hmotnosti těla (LV/BW), poměr hmotnosti pravé komory srdeční ku hmotnosti těla (RV/BW) a poměr hmotnosti celého srdce ku hmotnosti těla (HW/BW) u krátkodobé chladové expozice: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C; $n = 8$ 48

Tabulka 3: Hemodynamické parametry: tepová frekvence a střední arteriální tlak v krátkodobé chladové expozici: 1 den (1D), 3 dny (3D), 10 dní (10D) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); * $p < 0,05$ vs C; $n = 9$ 49

Tabulka 4: Základní parametry: tělesná hmotnost (BW); hmotnost hnědé tukové tkáně (BAT); poměr BAT/BW; rektální teplota během prvního týdne ($RT_{1.tyden}$); rektální teplota v průběhu adaptace (RT); hmotnost celého srdce (HW); poměr hmotnosti levé komory srdeční ku hmotnosti těla (LV/BW), poměr hmotnosti pravé komory srdeční ku hmotnosti těla (RV/BW) a poměr hmotnosti celého srdce ku hmotnosti těla (HW/BW) u dlouhodobé chladové expozice: u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); *** $p < 0,001$ vs C; $n = 12$ 52

Tabulka 5: Hemodynamické parametry: tepová frekvence a střední arteriální tlak u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); * $p < 0,05$ vs C; $n = 12$ 53

Tabulka 6: Hemodynamické parametry: tepová frekvence a střední arteriální tlak po podání 50 mg/kg za den inhibitoru metoprolol tartrát (I) a po podání fyziologického roztoku (F) u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou (* $p < 0,05$); * $p < 0,05$ vs

odpovídající kontrolní skupina, #p <0,05 vs odpovídající skupina bez inhibitoru, t p <0,05 vs odpovídající skupina ve stabilizaci; n= 12. 56

Tabulka 7: *Hemodynamické parametry: tepová frekvence a střední arteriální tlak po podání 1 mg/kg inhibitoru ICI 118,551 (I) a po podání fyziologického roztoku (F) u chronické chladové expozice 5 týdnů (CL), 5 týdnů chlad a 2-týdenní regrese (CLR) a u kontroly (C). Hodnoty představují středovou hodnotu se směrodatnou odchylkou (*p <0,05); n= 12. 58*

15 Přílohy

15.1 Záznam rektální teploty

Rektální teplota měřena u 10D						
10D	19.11.2018	21.11.2018	22.11.2018	26.11.2018	27.11.2018	28.11.2018
	1	36,5	37,3	36,8	35,4	37,4
2	35,6	35,8	36,9	37,2	37,5	37,3
3	37,0	36,8	36,7	36,6	36,9	36,6
4	37,1	36,3	36,8	36,5	36,7	36,4
5	36,7	36,4	36,6	37,0	36,8	36,6
6	36,3	36,4	36,7	37,4	37,3	36,7
7	37,0	36,7	36,3	36,8	36,5	36,9
8	37,0	37,0	36,6	37,1	36,7	36,9
9	37,6	36,8	36,8	36,7	37,2	37,4
10	37,5	37,0	36,4	36,8	37,3	37,1
11	37	35,8	36,8	37,1	36,8	36,9
12	37	36,9	37,4	37,1	37,5	36,6
průměr	36,9	36,6	36,7	36,8	37,1	36,9
odchylka	0,3	0,5	0,4	0,2	0,3	0,3

Rektální teplota měřena u prvních 10 zvířat ze skupiny C						
	1 den	6.den	11. den			
	31.10.2018	05.11.2018	12.11.2018	19.11.2018	26.11.2018	06.12.2018
	13 hod	9:45 hod	15 hod	13hod	13hod	13hod
1	37,5	37,0	37,3	37,0		
2	37,7	36,9	37	37,0		
3	37,7	37,0	37,0	37,4	37,3	36,8
4	37,7	37,2	37,1	36,9	37,0	36,7
5	38,1	37,3	36,3	36,9	36,6	36,8
6	38,0	37,6	37,4	37,3	37,3	37,2
7	37,5	37,0	37	36,8	37,2	37,0
8	37,6	37,3	37	37,1	37,1	37,0
9	37,7	37,0	37,1	36,6	37,1	37,2
10	37,0	37,3	36,7	37,0	36,8	37,0
průměr	37,7	37,2	37,0	37,0	37,1	37,0
odchylka	0,09	0,07	0,10	0,07	0,08	0,07

Rektální teplota měřena u prvních 10 zvířat ze skupiny CLR													
počáteční teplota	1 den	2 den	3 den	4 den	7 den	8 den	9 den	10 den	14 den	21 den	28 den	35 den	12.11.2018
	08.10.2018	10.10.2018	11.10.2018	12.10.2018	15.10.2018	16.10.2018	17.10.2018	18.10.2018	22.10.2018	29.10.2018	05.11.2018	12.11.2018	
11 hod	14:45 hod	13 hod	13hod	13hod	13hod	13hod	13hod	13hod	13hod	13hod	8:45hod	15:00hod	
1	37,0	37,1	37,1	36,9	37,0	36,9	36,9	37,1	37,3	36,5	37,1	36,5	
2	37,3	36,5	37,1	36,7	37,3	37,4	37,1	37,6	37,0	37,3	37,2	37,0	
3	37,8	37,4	37,3	36,7	37,1	36,9	36,8	36,7	36,6	36,4	36,2	36,8	
4	37,0	37,0	37,4	37,3	37,7	37,4	37,4	36,7	37,4	37,2	37,0	36,6	
5	37,2	37,7	36,7	36,8	37,0	36,6	36,8	37,1	37,5	37,5	36,6	36,8	
průměr	37,1	37,1	37,1	36,9	37,2	37,0	37,0	37,0	37,2	37,0	36,8	36,7	
odchylnka	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,2	
6	37,4	37,6	36,4	37,3	37,1	37,4	36,8	37,4	37,0	37,1	37,5	38,0	
7	37,4	37,2	37,7	36,8	37,0	37,4	36,8	37,0	36,7	36,9	37,4	36,4	
8	37,7	37,0	37,0	36,5	36,7	37,0	37,1	37,1	37,4	36,7	37,2	36,5	
9	38,0	37,5	37,1	37,1	37,5	37,0	37,0	36,9	37,2	37,9	37,7	36,8	
10	37,7	37,1	37,2	37,4	37,4	37,7	37,0	37,5	36,8	37,4	38,0	36,7	
průměr	37,5	37,3	37,0	37,0	37,2	37,2	37,1	37,2	37,0	37,3	37,7	36,6	
odchylnka	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,1	

15.2 Tabulka glukózového tolerančního testu

Control	Baseline	10 min	20	30	40	50	60	90	120 min
3	4,8	7,3	8,5	9,8	7,7	7,4	6,9	5,8	5,2
4	4,8	7,4	8,5	9,1	8,0	7,3	6,8	5,3	5,0
5	5,2	8,5	9,1	9,3	8,5	7,6	7,2	5,4	4,8
6	3,4	8,9	10,9	9,5	8,9	8,6	8,0	6,4	5,1
7	4,8	9,5				10,5	8,9	7,5	6,7
1CL	4,2	7,2	7,8	8,7	7,9	7,8	7,6	5,8	5,1
1CLR	5	6	8	8	8	7	7	6	5
mean	4,6	7,9	8,8	9,1	8,2	8,1	7,5	6,0	5,3
sd	0,6	1,1	1,1	0,6	0,5	1,2	0,7	0,8	0,6
Cold 10D	Baseline	10 min	20	30	40	50	60	90	120 min
1	4,6	7,8	9,3	8,9	8,2	7,0	7,1	6,2	5,8
2	5,0	9,8	10,5	9,8	8,7	8,2	7,2	6,2	5,8
3	4,7	6,5	9,2	9,2	8,5	7,7	7,3	6,3	6,1
4	4,9	11,6	9,7	9,3	7,5	7,3	6,8	6,8	5,7
5	5,8	9,5	10,7	9,8	9,0	8,9	7,7	5,7	6,0
6	4,4	11,4	12,5			9,9	8,7	6,7	6,5
7	4,5	9,6	11,3	9,6	7,9	8,2	7,6	6,0	5,9
mean	4,8	9,5	10,5	9,4	8,3	8,2	7,5	6,3	6,0
sd	0,5	1,8	1,2	0,4	0,5	1,0	0,6	0,4	0,3
Cold 3D	Baseline	10 min	20	30	40	50	60	90	120 min
1	5,2	8,9	13,9	12,7	10,9	10,2	9,0	6,8	6,1
2	4,9	9,0	11,0	10,5	8,7	8,4	7,6	6,9	6,6
3	4,6	12,8	14,3	13,2	11,9	10,8	10,1	8,4	7,5
4	4,7	6,0		7,8	7,8	7,6	7,2	6,2	5,5
mean	4,9	9,2	13,1	11,1	9,8	9,3	8,5	7,1	6,4
sd	0,3	2,8	1,8	2,5	1,9	1,5	1,3	0,9	0,8
CL	Baseline	10 min	20	30	40	50	60	90	120 min
1	4,7	9,1	9,9	8,5	7,9	7,5	7,3	6,3	5,4
2	5,3	7,3	7,3	6,8	6,2	6,0	6,3	6,0	5,4
3	5,5	9,9	10,1	9,6	8,8	8,6	8,4	6,7	6,2
4	5,2	7,0	7,2	7,2	7,0	7,2	7,2	6,0	5,9
5									
mean	5,2	8,3	8,6	8,0	7,5	7,3	7,3	6,3	5,7
sd	0,3	1,4	1,6	1,3	1,1	1,1	0,9	0,3	0,4
CLR	Baseline	10 min	20	30	40	50	60	90	120 min
1	5,2	7,9	8,3	8,0	7,4	6,8	6,7	5,8	5,2
2	5,3	8,9	11,8	10,0	9,3	9,2	9,0	7,3	6,1
3	4,9	7,7	9,8	9,3	9,0	8,5	8,0	6,7	6,0
4	5,3	7,8	8,4	8,4	8,5	7,9	8,0	7,5	6,3
5									
mean	5,2	8,1	9,6	8,9	8,6	8,1	7,9	6,8	5,9
sd	0,2	0,6	1,6	0,9	0,8	1,0	0,9	0,8	0,5

15.3 Seznam publikací

Continuous short-term acclimation to moderate cold elicits cardioprotection in rats, and alters β -adrenergic signaling and immune status.

Marvanova A, Kasik P, Elsnicova B, Tibenska V, Galatik F, Hornikova D, Zvolska V, Vebr P, Vodicka P, Hejnova L, Matous P, Szeiff Bacova B, Sykora M, Novotny J, Neuzil J, Kolar F, Novakova O, Zurmanova JM. Sci Rep. 2023 Oct 25;13(1):18287. doi: 10.1038/s41598-023-44205-4.

The cardioprotective effect persisting during recovery from cold acclimation is mediated by the β 2-adrenoceptor pathway and Akt activation.

Tibenska V, Marvanova A, Elsnicova B, Hejnova L, Vebr P, Novotný J, Kolar F, Novakova O, M Zurmanova J. J Appl Physiol (1985). 2021 Mar 1;130(3):746-755. doi: 10.1152/jappphysiol.00756.2020.

Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting β -adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling.

Tibenska V, Benesova A, Vebr P, Liptakova A, Hejnová L, Elsnicová B, Drahota Z, Hornikova D, Galatik F, Kolar D, Vybiral S, Alánová P, Novotný J, Kolar F, Novakova O, Zurmanova JM. J Appl Physiol (1985). 2020 Apr 1;128(4):1023-1032. doi: 10.1152/jappphysiol.00511.2019.