

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie
Oddělení fyziologie živočichů a člověka

Bakalářská práce na téma:

**Vliv tyriodních hormonů na fenotyp kosterní a srdeční
svaloviny u samců a samic potkana.**

Petra Arnoštová

Školitel: RNDr. Jitka Žurmanová²

Konzultant: RNDr. Tomáš Soukup, CSc.¹

¹Fyziologický ústav, AV ČR

²PřF UK

Praha, květen 2006

Poděkování

V úvodu bych chtěla především vyzdvihnout ochotu a trpělivost mé školitelky RNDr. Jitky Žurmanové, která mě v mé práci velmi podporovala. Dále bych chtěla vznést dík celému oddělení Funkční morfologie Fyziologického ústavu AV ČR, zejména RNDr. T. Soukupovi, Csc., za příjemné pracovní prostředí, za teoretické i praktické zkušenosti. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli najít cestu k půvabné vědecké disciplíně, jakou je právě fyziologie živočichů a člověka. „Děkuji Vám, pane profesore Vyskočile.“

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala zcela samostatně s použitím odborné literatury.

.....

Obsah

Abstrakt	2
Seznam zkratk	3
Úvodní slovo autora	4
1. Těžké řetězce myosinu a typy svalových vláken	5-6
2. Změny fenotypu svalových vláken vlivem působení vnějších faktorů	7-13
2.1. Které faktory ovlivňují fenotyp kosterní svaloviny?	7-11
2.1.1. Hormony	7-9
2.1.2. Inervace	9-10
2.1.3. Fyzická zátěž	10
2.1.4. Mechanické faktory	10-11
2.1.5. Stárnutí	11
2.2. Které faktory ovlivňují fenotyp srdeční svaloviny?	11-13
2.2.1. Hormony	11-12
2.2.2. Tlakové přetížení	12-13
2.2.3. Cukrovka	13
2.2.4. Stárnutí	13
3. Regulace genové transkripce tyroidními hormony	14-16
3.1. Superrodina jaderných receptorů steroidních a tyroidních hormonů	14
3.2. Signální dráha steroidních hormonů	15
3.3. Signální dráha tyroidního hormonu, retinové kyseliny a vitamínu D	15-16
4. Cíl diplomové práce	16
5. Metody	16-18
5.1. Imunocytochemická metoda	16-17
5.2. Histochemická metoda	17
5.3. SDS-PAGE	17
5.4. Stereologická měření	17-18
6. Závěr	18-25
7. Přílohová část: tabulky a obrázky k textu	25-27
8. Použitá literatura	28-36

Abstrakt

Fenotyp kosterní a srdeční svaloviny je představován isoformami MyHC, které se mezi sebou liší ATPázovou aktivitou a dávají vznik různým typům svalových vláken. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken určuje typ svalu (pomalý resp. rychlý sval). Expresi genů MyHC regulují vnitřní a vnější faktory. Významnou roli mají tyroidní hormony. Působí na vývoj kosterní a srdeční svaloviny ovlivněním regulace genové transkripce, které je zprostředkováno přes tyroidní receptory působící jako ligandem aktivované transkripční faktory. K detekci isoform MyHC se používají metody imunocytochemické a histochemické reakce a SDS-PAGE analýza. Moje předběžné výsledky naznačují ve shodě s literaturou, že tyroidní hormony ovlivňují fenotyp svalu a že existují rozdíly v jejich účinku u samic a samců.

Seznam zkratek

MyHC	myosin heavy chain = těžký řetězec myosinu
MyLC	myosin light chain = lehký řetězec myosinu
MyHC IIa	isoforma MyHC IIa
MyHC IIA	svalové vlákno typu IIA
ATPáza	adenosin trifosfatáza
SOL	musculus soleus
EDL	musculus extensor digitorum longus
CLFS	chronic low frequency stimulation = stimulace trvale nízkou frekvencí
PHFS	phasic high frequency stimulation = stimulace fázickou vysokou frekvencí
CNS	centrální nervový systém
PNS	periferní nervový systém
T3	3,3', 5-trijod-L-tyronin
T4	tyroxin
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
IGF-1	Insuline-like Growth Factor 1 = inzulinu podobný růstový faktor 1
GH	Growth hormones = růstové hormony
ANF	Atrial Natriuretic Factor = atriový natriuretický faktor
HRE	hormon-responzivní element
P-box	proximální box
D-box	distální box
Hsp	heat-shock protein = protein tepelného šoku
TR α , β	tyroidní receptor α , β
RAR α , $-\beta$, $-\gamma$	receptor retinové kyseliny α , $-\beta$, $-\gamma$
RXR α , $-\beta$, $-\gamma$	receptor retinoidů α , $-\beta$, $-\gamma$
HRP	Horseradish peroxidase = křenová peroxidáza
DAB	3,3-diaminobenzidin
PO $_4^{3-}$	fosfát
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = dodecyl sulfát sodná polyakrylamidová elektroforéza

Úvodní slovo autora

Ve čtvrtém ročníku gymnázia jsem navštívila dny otevřených dveří oboru biologie na PřF-UK. Největší dojem na mne udělala katedra antropologie a genetiky člověka. V průběhu léta jsem začala spíše tíhnout k zelené biologické větvi, oboru zoologie, pro kterou mám slabost dodnes. Ovšem během prvního ročníku na Přírodovědecké fakultě jsem podlehla fyziologii živočichů a člověka. Aktivně se věnuji sportu, proto se velmi zajímám o kosterní svaly a srdce, jak po fyziologické, tak i po morfologické stránce. A tento zájem mě přivedl až k námětu mé bakalářské práce.

Téma mé bakalářské práce bylo již z určitých pohledů prozkoumáno, avšak nejsou publikované údaje o rozdílech závislých na pohlaví. Proto jsem si položila otázku: Jaké jsou fenotypové změny kosterní a srdeční svaloviny u samic a samců potkanů se změněnou hladinou tyroidních hormonů? Tato práce je napsaná formou tzv. literární rešerše a zahrnuje přehled o fenotypu kosterní a srdeční svaloviny a jeho změnách za různých podmínek. V navazující diplomové práci bych se chtěla zaměřit především na pohlavní rozdíly u eu-, hypo- a hypertyroidních potkanů.

1. Těžké řetězce myosinu a typy svalových vláken

Myosin obsahuje dva těžké (MyHC) a čtyři lehké řetězce (MyLC). MyHC jsou jedny z molekul zodpovědné za rychlost kontrakce. Různé typy MyHC jsou pravděpodobně základem různých typů svalových vláken. Během evoluce a fyziologické adaptace docházelo ke genovým duplikacím a mutacím a postupně vznikla řada genů, které exprimují různé MyHC isoformy. Bylo popsáno 10 odlišných MyHC (viz Obr. 1., 26). Dnes existují v kosterních svalech savců, včetně člověka, geny pro čtyři základní isoformy MyHC: pomalá MyHC I (MyHC I β) a rychlé MyHC IIa, MyHC IId/x, MyHC IIb. Dalšími MyHC, které byly objeveny, jsou: MyHC_{emb} (embryonální), MyHC_{neo} (neonatální či perinatální), MyHC II_m („superfast“), MyHC_{com} (extraokulární svaly), MyHC I_{ton} (pomalé tonické svaly) a MyHC α (pro přehled *d'Albis a Butler-Browne 1993; Pette a Staron 2000*). Embryonální a neonatální (perinatální) MyHC jsou exprimovány zejména ve vyvíjejících se kosterních svalech a můžeme je také najít v regenerujících vlákních již dospělých svalů (*d'Albis et al. 1988*), ve specializovaných dospělých svalech (m. masseter) (*d'Albis et al. 1986*), extraokulárních svalech (*Weiczorek et al. 1985*) a v intrafusálních vlákních svalových vřetének (*Soukup et al. 1995*). Isoformy MyHC α a MyHC β (MyHC I) se vyskytují především v srdeční svalovině. MyHC α je kromě srdce obsažen v dospělých svalech, např. m.masseter, bránici a extraokulárních svalech (*Pedrosa et al. 1992*). Pomalý tonický MyHC I_{ton} (*Mascarello et al. 1982*) a MyHC_{com} (*Sartore et al. 1987*) se nachází v extraokulárních a hrtanových svalech. Zato „superfast“ MyHC II_m najdeme pouze ve svalech žvýkacích (*Mascarello et al. 1982*).

Isoformy MyHC I, MyHC IIa, MyHC IId/x, MyHC IIb dávají vznik stejnojmenným svalovým vláknům (MyHC I, MyHC IIA, MyHC IID/X, MyHC IIB). Výjimkou je isoforma MyHC IIb, která se u člověka nevyskytuje, ale existují vlákna typu IIB, která obsahují isoformu MyHC IId/x (viz Tab. 1., str. 25) (*Ennion et al. 1995; Smerdu et al. 1994; Talmadge 2000*). Svalová vlákna typu I obsahující MyHC I jsou pomalá, mají nízkou ATPázovou aktivitu a jsou oxidativní (*d'Albis a Butler-Browne 1993*). Rychlá svalová vlákna mají vysokou ATPázovou aktivitu a jsou tří typů IIA, IID/X a IIB (obsahující odpovídající MyHC IIa, IId/x a IIb) (*Bär a Pette 1988; Schiaffino et al. 1989*). Vlákna typu IIA mají oxidativně glykolytický metabolismus a jsou z rychlých vláken nejpomalejší, vlákna IIB mají glykolytický metabolismus a jsou nejrychlejší (mají nejkratší dobu kontrakce) (*Pette a Staron 1990*) a vlákna IIX/D mají intermediární vlastnosti (*LaFramboise et al. 1990*). Procentuální

zastoupení pomalých a rychlých vláken určuje typ svalu (pomalý či rychlý). Pomalý sval je například *musculus soleus* (SOL), který zastává antigravitační funkci, a rychlý typ svalu je např. *extensor digitorum longus* (EDL), který umožňuje extenzi (natažení) nohy a prstů. SOL obsahuje vysoké procento pomalých vláken typu I a malé množství vláken IIA. EDL obsahuje všechny typy vláken obsahujících isoformy MyHC I, MyHC IIa, MyHC IId/x a MyHC IIb (viz Obr. 2., str. 27).

Kromě svalových vláken základních typů MyHC isoform (MyHC I, MyHC IIa, MyHC IID/X, MyHC IIB), tzv. čistých vláken, existují také svalová vlákna hybridní (smíšená), obsahující dva a více MyHC. Společný výskyt MyHC I a MyHC IIa dává vznik vláknům typu IC (MyHC I > MyHC IIa) a IIC (MyHC IIa > MyHC I). MyHC IIa a MyHC IId/x tvoří vlákna typu IIAD/X (MyHC IIa > MyHC IId/x) a IID/XA (MyHC IId/x > MyHC IIa). MyHC IId/x a MyHC IIb jsou obsaženy ve vláknech typu IID/XB (MyHC IId/x > MyHC IIb) a IIBD/X (MyHC IIb > MyHC IId/x). Hybridní vlákna se objevují zejména během transformace, avšak vyskytují se v minimálním množství, i za klidových podmínek (pro přehled *Pette a Staron 2001*).

Srdeční svalovina na rozdíl od kosterní obsahuje dvě isoformy MyHC: MyHC α a MyHC β . MyHC α reprezentuje „rychlý“ myosin – má vyšší rychlost kontrakce a ATPázovou aktivitu. Naopak MyHC β představuje „pomalý“ typ myosinu s nižší rychlostí kontrakce a ATPázovou aktivitou (*McNally et al. 1989*). Srdeční komory obsahují tři typy srdečního myosinu (V1, V2, V3), které se liší zastoupením řetězců α a β , elektroforetickou mobilitou a ATPázovou aktivitou (*Hoh et al. 1978*). V1 typ je tvořen dvěma isoformami MyHC α ($\alpha\alpha$), V2 typ obsahuje po jedné isoformě MyHC α a MyHC β ($\alpha\beta$) a V3 typ je tvořen dvěma isoformami MyHC β ($\beta\beta$). V Srdečních předsíních převažuje typ V1 ($\alpha\alpha$). Jednotlivé druhy savců (člověk, potkan, králík,...) se mezi sebou liší fenotypem srdeční svaloviny, a to zejména zastoupením MyHC α a MyHC β v srdečních komorách (V typy) (*Swynghedauw 1986*). Malí savci jakou jsou potkani a krysy mají rychle se kontrahující srdeční komory, které obsahují hlavně V1 typ ($\alpha\alpha$). Větší savci, např. králíci a morčata, mají srdeční komory se středně velkou aktivitou a kromě dominantního množství V3 typu ($\beta\beta$) obsahují také menší zastoupení V1 typu ($\alpha\alpha$) a V2 typu ($\alpha\beta$). „Pomalou pracující srdeční komory“ se nachází u velkých savců a člověka. Obsahují též všechny tři V typy s převahou V3 typu ($\beta\beta$), naopak V1 typu ($\alpha\alpha$) se vyskytuje méně než 10%.

2. Změny fenotypu svalových vláken vlivem působení vnějších faktorů

Kosterní svaly, jakožto součást pohybového aparátu, prochází neustálými změnami v průběhu ontogenetického vývoje. Během této dlouhé etapy jsou ovlivňovány řadou faktorů (pro přehled *Pette a Staron 2001*): inervací, hormony (tyroidními, pohlavními, růstovými...) (*d'Albis a Butler-Browne 1993; Soukup a Jirmanová 1999; Soukup a Jirmanová 2000*), fyzickou zátěží, růstem (hypertrofií) a stárnutím (atrofií), podpůrnými látkami (anabolika) či změnami spojenými se zraněním nebo vyvolanými neuromuskulárními a hormonálními poruchami. Podobnými faktory je ovlivněno také srdce, jehož intenzita činnosti je spojena s činností pohybové soustavy, ale srdce je výrazně ovlivňováno i stavem oběhového systému, např.: trvalým (chronickým) tlakovým přetížením (indukovanou, přivozenou hypertenzí), hypotyreoidismem a hypertyreoidismem, cukrovkou, trvalou (chronickou) ztrátou energie (kalorií) a vytrvalostním během (pro přehled *Baldwin a Haddad 2001; Morkin 2000*). Významnou roli hrají tyroidní hormony. Spolupůsobí na vývoj kosterní a srdeční svaloviny především v raném postnatálním období, a podmiňují přechod k dospělým isoformám. U dospělých jedinců se hormonální regulace také liší mezi pohlavími, neboť u samic dochází ke kompetici mezi tyroidními a pohlavními hormony o společný „jaderný receptor“. Schopnost kosterní a srdeční svaloviny se přizpůsobovat fyziologickým podmínkám ukazuje míru jejich plasticity.

2.1. Které faktory ovlivňují fenotyp kosterní svaloviny?

2.1.1. HORMONY

Koncentrace tyroidních hormonů T3 (3,3', 5-trijod-L-tyronin) a T4 (tyroxin) má vliv na expresi MyHC isoform. Koncentrace T3 je během embryonálního vývoje a u čerstvě narozených mláďat potkana zanedbatelná, začne vzrůstat pár dní po porodu a dosáhne maxima okolo dvou týdnů. Pak klesne na stálou hladinu u dospělých jedinců (*Dubios a Dussault 1977*). Spolu se zvyšující se koncentrací T3 dochází k potlačení a nahrazování embryonálního (MyHC_{emb}) a perinatálního (MyHC_{neo}) myosinu dospělými isoformami myosinu (*Bandman 1985*). Hypertyroidní zvířata vykazují rychlejší přechod na isoformy typické pro svaly dospělých jedinců (MyHC I, IIa, II_{d/x} a IIb), než tomu je u hypotyreoidních

zvířat (*Butler-Browne a Whalen 1984*). Rychlost přeměny není závislá pouze na koncentraci tyroidních hormonů, ale také na typu svalu. Jednotlivé svaly reagují na hyper- či hypotyroidní stav různě v závislosti na množství receptorů pro tyroidní hormony (např. v bránici dochází k přeměně MyHC_{emb} a MyHC_{neo} v MyHC II rychleji než v m.masseter) (*d'Albis et al. 1989*). Proces přechodu embryonálních a perinatálních myosinových isoform na dospělé rychlé isoformy myosinu probíhá se stejnou chronologií u samců i samic. Pouze ve dvou případech byly zaznamenány změny: m.masseter – záměna vývojových za dospělé isoformy nastane u samců 22.den, kdežto u samic 21.den (*d'Albis et al. 1986*); a m.levator ani, kde poločas přeměny u samců a samic činil rozdíl až 12-ti dní (♂ 20 dní, ♀ 32 dní) (*d'Albis et al. 1991*). Tyto výjimky naznačují odlišnou citlivost samců a samic na tyroidní hormony. Jak již bylo řečeno, tyroidní hormony podporují transformaci MyHC a změnu fenotypu svalu za různých experimentálních podmínek, např. vlivem hypertyroidismu dochází v m.soleus k signifikantnímu úbytku MyHC I a zároveň k nárůstu rychlé isoformy MyHC typu IIa. Tato transformace zvyšuje rychlost kontrakce původně výrazně pomalého svalu. U svalu obsahujícího pouze myosin typu II není vliv zvýšené hladiny tyroidních hormonů tak výrazný. Zato se zde uplatňuje hypotyroidismus vedoucí ke „zpomalování“ svalu a zvyšuje se množství pomalého I myosinu. Tyroidní hormony podporují tedy expresi MyHC isoform s vyšší ATPázovou aktivitou. Tzn., že v m.soleus bude zvýhodněn typ IIa, kdežto u masseteru, který obsahuje typ IIa a IIb, bude upřednostňován IIb, který má vyšší ATPázovou aktivitu (*Izumo et al. 1986*). Vliv tyroidních hormonů na expresi isoformy IId/x není dosud objasněn. Existuje však pomyslné transformační schéma myosinových isoform: I ↔ IIa ↔ IId/x ↔ IIb (*Mira et al. 1992; Schiaffino et al. 1988; Termin et al. 1989*). Předpokládá se, že pokud sval obsahuje hlavně typ I a IIa, bude u hypertyroidních zvířat exprimovat isoformu IId/x. Na druhé straně, jestliže by sval obsahoval zejména IId/x, exprimoval by u hypertyroidních zvířat IIb isoformu. Tyroidní hormony také ovlivňují myosinové isoformy v srdci (viz 2.2.1., str. 11-12).

Kromě tyroidních hormonů mají vliv na expresi isoform myosinu i hormony steroidní, i když ne v tak velké míře. Rozdíly můžeme pozorovat např. u anabolických steroidních hormonů, kdy vyšší koncentrace u samic vyvolá menší vzrůst IIA svalových vláken v EDL (*Egginton 1987*). U samic morčete testosteron indukuje syntézu IIa isoformy, opačně kastrace samců indukuje syntézu IIb isoformy (*Lyons et al. 1986*). Dalším příkladem je vliv steroidních hormonů na vývojovou expresi srdečního V1 typu v m.masseter králíka. Do druhého měsíce probíhá vývoj u samců i samic stejně. Změna nastává se startem

spermatogeneze, jejímž spouštěčem jsou androgenní hormony (Berger *et al.* 1989). Inhibice vlivu hormonů nebo kastrace samců má za následek ukončení exprese V1 (d'Albis *et al.* 1993).

Další hormony, které mohou ovlivnit expresi MyHC, jsou insulin a glukokortikoidy. U zvířat s experimentálně navozenou cukrovkou dochází k vzrůstu pomalé isoformy a k poklesu rychlých isoform. Tato reakce nastává pouze u rychlého typu svalu, ne u typu pomalého (Rutschmann *et al.* 1984).

2.1.2. INERVACE

Pomalé a rychlé svaly se liší inervací. Pomalý typ svalu je inervován tzv. pomalým nervem a rychlý typ svalu tzv. rychlým nervem. Pojmy „rychlý a pomalý nerv“ je třeba chápat ve smyslu nervosvalové aktivity. „Pomalý nerv“ má nízkou, ale stálou, frekvenci akčních potenciálů, naopak „rychlý nerv“ vede krátkodobé vzruchy s vysokou frekvencí. Jestliže bychom zaměnili nervová vlákna, došlo by k fenotypové změně svalů. Pomalý sval by se stal rychlým a naopak. Rychlý sval se změnil v pomalý, jestliže je reinervován „pomalým nervem“, a pomalý sval se stane rychlým po reinervaci „rychlým nervem“. Tyto změny můžeme též navodit přímým elektrickým drážděním svalu. Stimulace trvale nízkou frekvencí (CLFS), která simuluje aktivitu pomalého nervu, vede k fenotypu pomalého svalu (Salmons a Vrbová 1969), stimulace fázickou (občasné výboje) vysokou frekvencí (PHFS) k fenotypu rychlého svalu (Lömo *et al.* 1974). V krysím EDL jsou dominantní IIB a IID/X svalová vlákna. Při dráždění EDL CLFS dojde k postupné přeměně rychlých svalových vláken na svalová vlákna pomalejší („fast-to-slow“ transformace) podle následujícího schématu: MyHC IIB → MyHC IID/X → MyHC IIA (Pette a Staron 2001). Na druhou stranu v králičím EDL, kde je dominantní typ MyHC IID/X, proběhne transformace: MyHC IID/X → MyHC IIA → MyHC Iβ. Během poslední přeměny (MyHC IIA → MyHC Iβ) se začne přechodně exprimovat MyHC Ia, který se za normálních okolností v králičích kosterních svalech nevyskytuje (Hämäläinen a Pette 1997b; Peuker *et al.* 1999). „Fast-to-slow“ transformace je doprovázena zvýšeným počtem hybridních vláken, zvýšením koexprese rychlých isoform a pomalých isoform (Conjard *et al.* 1998). CLFS ovlivňuje kromě MyHC také ostatní myofibrilární proteiny, např. troponinové podjednotky, tropomyosin (Härtner *et al.* 1989; Härtner a Pette 1990; Leeuw a Pette 1993), α-aktinin (Schachat *et al.* 1988), různé proteiny

sarkoplasmatického retikula (*Briggs et al. 1990; Härmäläinen a Pette 1997a; Froemming et al. 2000*) a systém regulující cytosolický Ca^{2+} (*Huber a Pette 1996*) CLFS může být aplikována též na pomalý sval SOL. U denervovaného SOL může být jeho „pomalý fenotyp“ udržován stimulací o nízké frekvenci. Nebo-li CLFS zabraňuje atrofii denervovaného svalu a „slow-to-fast“ transformaci. (*Gorza et al. 1988*). Stimulace fázickou vysokou frekvencí vyvolá přeměnu pomalých svalových vláken ve svalová vlákna rychlá („slow-to-fast“ přechod) (*Gorza et al. 1988; Gundersen et al. 1988*), dokonce i indukci MyHC IID a MyHC IIB (*Ausoni et al. 1990; Härmäläinen a Pette 1996*). Kompletní transformace se nevyskytuje ve všech vláknech a i přes dlouhou stimulaci zůstane ve svalu signifikantní množství pomalé isoformy myosinu (*Bacou et al. 1996*).

2.1.3. FYZICKÁ ZÁTĚŽ

Vytrvalostní trénink navozuje přechod z rychlého svalu ve sval pomalý, snižuje se ATPázová aktivita a glykolytický metabolismus svalu přechází v metabolismus oxidativní. Dochází k „fast-to-slow“ přeměně jak u svalových vláken tak na myosinové (MyHC) úrovni. Vytrvalostní trénink vede ke zvýšené aktivitě oxidativního řetězce (pro přehled *Booth a Baldwin 1996*). Krátkodobá vysokofrekvenční fyzická zátěž (např. sprinty) vyvolává opačné změny, „slow-to-fast“ transformaci. ATPázová aktivita se zvyšuje a převládá glykolytický metabolismus – vyžadující minimální přísun kyslíku až anaerobní podmínky. Tyto transformace probíhají pomalu a ke změnám isoform MyHC dochází po pravidelném a dlouhodobém tréninku (vytrvalostním i vysokofrekvenčním). Nedávná studie ukazuje, že vytrvalostní trénink po dobu 5-ti týdnů vyvolává u potkanů pouze zlepšení vlastností kontrakce, jak u SOL, tak i EDL, ale nemá vliv na přeměnu MyHC isoform (*Joumaa a Léoty 2002*).

2.1.4. MECHANICKÉ FAKTORY

Napnutí a mechanické natažení mají vliv na transformaci k pomalému svalu – zvyšuje se množství pomalých vláken a isoformy MyHC I (na proteinové i mRNA úrovni) (*Gregory et al. 1990; Morgan a Loughna 1989; Tsika et al. 1987*). Pro studování mechanického zkrácení je možné použít tyto modely: tenotomie (přetětí šlachy), imobilizace v krátké pozici,

nadzvednutí zadních končetin anebo stav beztlíže (pro přehled *Fitts et al. 2000; Pette a Staron 1997*). Pomalý sval zbavený gravitační zátěže, tzv. unloaded, se stává rychlým (*Vrbová 1963*) – klesá počet vláken typu I a obsah MyHC I, zároveň vzrůstá MyHC IIA a MyHC IID (*Caiozzo et al. 1994; Campione et al. 1993*). Přejchod „slow-to-fast“ je podporován hypertyroidismem a naopak zpomalován hypotyroidismem (*Caiozzo, Baker, Baldwin 1998*). I zde se během transformace vyskytují hybridní vlákna (pro přehled *Pette a Staron 2001*).

2.1.5. STÁRNUTÍ

Proces stárnutí vede k atrofii svalů a k pozvolné a nevýrazné „fast-to-slow“ transformaci. U rychlého krysího svalu dochází k úbytku MyHC IIB, mírnému nárůstu MyHC IID/X, MyHC IIA a MyHC I (*Danieli-Betto et al. 1995*). U pomalého krysího svalu klesá koncentrace MyHC IIA a zároveň stoupá koncentrace MyHC I (*Sugiura et al. 1992*). Jelikož během stárnutí mohou hrát roli vnější i vnitřní faktory, nelze říci, které fenotypové změny svalových vláken a MyHC isoform jsou primárního a které sekundárního původu. Na svalovou atrofii mají vliv jak degenerativní procesy v CNS a PNS, tak změny hormonálních hladin. U svalů potkana bylo dokázáno, že adekvátním cvičením (pohybem) se docílí zpomalení negativních změn kosterního svalstva během stárnutí (*Gharakhanlou et al. 1999*).

2.2. Které faktory ovlivňují fenotyp srdeční svaloviny?

Během postnatálního vývoje podléhá genová exprese vnějším vlivům, mezi které patří např. pracovní zatížení srdce, hemodynamické poměry, změny způsobené stárnutím včetně patologických změn a hormonální vlivy.

2.2.1. HORMONY

V průběhu perinatálního vývoje se mRNA kódující MyHC α a MyHC β exprimují nerovnoměrně v srdečních komorách a předsíních. Dochází ke zvýšení exprese MyHC β v srdečních komorách a zároveň ke snížení exprese MyHC α . Naopak v srdečních předsíních stoupá exprese MyHC α . U potkana dochází zhruba 2 týdny po narození ke zvýšení hladiny

tyroidních hormonů (*Lompre et al. 1984*), především T3 (3,5,3'-trijodtyroninu), v krvi, což má za následek pozitivní regulaci exprese genu pro MyHC α a nárůst této isoformy v srdečních komorách, kde MyHC α téměř nahradí MyHC β . Během dospívání dochází k potlačení MyHC β na hladinu kolem 10-15% (*Swynghedauw 1999*). U člověka tato záměna nenastává, MyHC β je dominantní isoformou v srdečních komorách po celý život a MyHC α se hlavně exprimuje v srdečních předsíních (*Everett 1986*). Normální hladina T3 v krvi pozitivně kontroluje a reguluje expresi α isoformy. Pokud dojde k nárůstu T3, je podporována exprese MyHC α (hypertyroidní fenotyp) a naopak při nedostatku T3 v krvi klesá exprese MyHC α a převažuje exprese MyHC β (hypotyroidní fenotyp) (*Morkin 2000*). Nedávné výzkumy ukazují, že hypertyroidismus u křečků se zdravým srdcem může vyvolat srdeční dilataci, způsobenou přílišným prodloužením myocytů, a dysfunkci srdečních komor, což vede až k selhání srdce. U kardiomyopatických křečků nedochází k srdeční dilataci, tyroidní hormony stimulují angiogenesi a působí anti-fibroticky, nebo-li zabraňují vývoji ischemických lézí (*Kuzman et al. 2005*).

Kromě tyroidních hormonů ovlivňují fenotyp srdeční svaloviny v nemalé míře i růstové hormony a růstové faktory, např. IGF-1, insuline-like Growth Factor-1, který stimuluje syntézu srdeční isoformy MyHC α a syntézu α -aktinu (*Young et al. 1999*). IGF-1 a růstové hormony (GH) pozitivně ovlivňují expresi MyHC α , avšak hladinu MyHC β nijak významně nemění (*Donath et al. 1997*). IGF-1 a GH také snižují expresi ANF (Atrial Natriuretic Factor) v srdečních komorách, dále stimulují expresi myofibrilárních genů MyHC α , regulují koncentraci ANF mRNA a jsou, mimo jiné, zodpovědné za postupné nahrazování MyHC β isoformy MyHC α isoformou u potkana (*Morkin 2000*).

2.2.2. TLAKOVÉ PŘETÍŽENÍ

Tlakovém přetížení vyvolá u potkana pokles MyHC α a zvýšení množství MyHC β v srdečních předsíních (*Baldwin a Haddad 2001; Morkin 2000*). U králíka je vlivem tlakového přetížení podporována syntéza MyHC β a zároveň snižováno procentuální zastoupení MyHC α (*Everett et al. 1984*). Návrat tlaku do normálních hodnot má za následek pomalý a postupný úbytek MyHC β a navrácení obsahu MyHC α na původní hladinu (*Gupta a Gupta 1997*). Vlivem patologických podmínek, např. trvalým (chronickým) tlakovým

přetížením (indukovanou nebo přivolenou hypertenzí) (*Haddad et al. 1995; Lompre et al. 1979*), hypotyroidismem a hypertyroidismem (*Kahaly a Dillmann 2005*), cukrovkou (*Dillmann 1980; Haddad et al. 1997a*), trvalou (chronickou) ztrátou energie (kalorií) (*Swoap et al. 1994*) či vytrvalostním během (*Fitzsimons et al. 1990*), lze měnit poměr MyHC α a MyHC β v srdci potkana. Množství proteinu MyHC α v srdci se liší od množství MyHC α na mRNA úrovni. U zdravého lidského srdce činí procentuální zastoupení MyHC α v levé srdeční komoře 7,2% z celkového množství MyHC proteinu, ve srovnání s 35% z celkového množství MyHC mRNA (*Miyata et al. 2000*). Některé inhibitory, např. verapamil, KCl a 2,3-butanedione monoxime (BDM), snižují až zastavují srdeční aktivitu (*Qi et al. 1997*) a iniciují translaci MyHC α (*Nikcevic et al. 1999*).

2.2.3. CUKROVKA

S cukrovkou souvisí koncentrace insulinu a tyroidních hormonů v krvi. Nedostatek tyroidních hormonů (T3 hormonu) má za následek kompletní potlačení MyHC α na proteinovém i mRNA stupni a zároveň vzrůst množství MyHC β . Nedostatek tyroidních hormonů a insulinu společně působí na expresi isoformů MyHC výrazněji (*Haddad et al. 1997b*). Tyto faktory ovlivňují kromě exprese MyHC β také funkční stav srdce projevující se pomalejší kontrakcí. Tento stav je shodný se stavem u zvířat, které si ukládají na zimu zásoby (*Baldwin a Haddad 2001*).

2.2.4. STÁRNUTÍ

Během stárnutí dochází k výraznému poklesu MyHC α společně s nárůstem MyHC β , ke snížení Ca²⁺-ATPázové aktivity a zpomalení kontrakce (*Effron et al. 1987*). Změny MyHC isoformů závisí na vývoji a rozsahu srdeční hypertrofie v daném věku (*Boluyt et al. 1999*). Bylo prokázáno, že T4 indukuje podobně jako T3 vzrůst MyHC α a může vrátit množství MyHC α na původní hladinu. Avšak schopnost T4 a T3 stimulovat expresi MyHC α klesá s přibývajícím věkem (*Ball a Solaro 1994*).

3. Regulace genové transkripce tyroidními hormony

3.1. Superrodina jaderných receptorů steroidních a tyroidních hormonů

Receptory pro steroidní hormony, ať již pro pohlavní (estrogenový, progesteronový, androgenový receptor) nebo hormony kůry nadledvinek (mineralokortikoidový a glukokortikoidový receptor), dále receptor trijodtyroninu, vitamínů D a A mají homologní strukturu a tvoří jednu proteinovou rodinu (*Lazar 1991; Mangelsdorf et al. 1995*). Tyto receptory působí jako ligandem aktivované transkripční faktory.

Molekula receptoru obsahuje pět funkčních modulů: A/B-, C-, D-, E- a F-doménu. N-terminální konec nese A/B doménu, která je nejvariabilnější a liší se mezi jednotlivými receptory. Tato doména je schopna aktivovat iniciaci transkripce jaderným receptorem navázaným na hormon-responzivní element (HRE) v regulační oblasti genu. C-doména je představovaná DNA-vazebnou doménou rozeznávající příslušný HRE v promotoru či enhanceru genu. Za specifickou vazbu receptoru k odpovídajícímu HRE jsou zodpovědné dva sekvenční motivy: proximální box (P-box) a distální box (D-box). D-box má také význam pro dimerizaci dvou molekul receptoru. Jaderné receptory se váží obecně na DNA jako homo- nebo heterodimery. DNA-vazebná doména je sekvenčně i strukturně nejvíce homologní doménou v rámci celé molekuly receptoru a celé superrodiny jaderných receptorů (*Mester a Baulieu 1995*). D-doména je místem interakce molekuly receptoru s korepresory nebo koaktivátory (*Chin a Yen 1997*). Na C-terminálním konci se vyskytuje E-doména, ligand-vazebná doména, která rozeznává příslušný hormon s vysokou specifikou a afinitou (*Mester a Baulieu 1995*). Poslední F-doména může hrát roli v odlišení odpovědi na hormon a anti-hormon, avšak její obecný význam není dosud znám (*Katzenellenbogen et al. 1996*).

Přestože je struktura jaderných receptorů analogická a jejich sekvence vykazují homologii, z hlediska dráhy signální transdukce můžeme superrodinu rozdělit na dvě podrodiny: receptory steroidních hormonů a receptory tyroidních hormonů, kyseliny retinové a vitamínu D (*Hatina a Reischig 2000*).

3.2. Signální dráha steroidních hormonů

Při absenci ligandu dochází k inaktivaci receptoru navázáním dvou molekul proteinu tepelného šoku hsp 90 a některých dalších proteinů jako hsp 70 a imunofilin p59 (*Pratt a Toft 1997*). Vazba ligandu (hormonu) působí konformační změnu receptoru, navázané proteiny se uvolní, dochází k dimerizaci receptoru za vzniku homodimeru, heterodimerizace je možná u mineralokortikoidových a glukokortikoidových receptorů (*Funder 1996*), rozpoznání HRE v promotorových či enhancerových oblastech genu a aktivaci transkripce. HRE pro receptory steroidních hormonů má striktně palindromickou podobu, obrácenou repetici, při konstantním rozestupu obou základních sekvencí (half site) v délce 3pb (*Hatina a Reischig 2000*).

3.3. Signální dráha tyroidních hormonů, retinové kyseliny a vitamínu D

Tyroidní receptor a receptor kyseliny retinové jsou kódovány více jak jedním genem. Pro tyroidní receptor existují dva geny: TR α a TR β (*Chin a Yen 1997*). TR α gen produkuje RNA transkript, který prochází alternativním sestřihem a dává vznik dvěma isoformám TR α 1 a TR α 2, které mají na konci řetězce karboxylovou skupinu. TR β gen produkuje dvě isoformy TR β 1 a TR β 2 s aminovou skupinou na konci řetězce (*Lazar 1993*). TR α 1, TR β 1 a TR β 2 mohou vázat tyroidní hormony a aktivovat transkripci genů MyHC. TR α 2 není schopen vázat tyroidní hormony, protože se od předchozích isoform liší strukturou ligand-vazebné domény, a vystupuje jako negativní regulátor (*Yang et al. 1996*). Exprese TR α isoformy převažuje nad expresí TR β isoformy. Pokud porovnáme jednotlivé isoformy mezi sebou a jejich expresi v tkáních, u TR α 1 nevidíme žádné rozdíly, TR α 2 se nejvíce exprimuje v srdci (dvakrát tolik než v m. soleus a dvakrát více než TR α 1 v srdci), exprese TR β 1 i TR β 2 je vyšší v srdci než v m. soleus. Odlišná exprese a zastoupení isoform TR souvisí s expresí MyHC. Převaha TR α 1 vede k expresi rychlých MyHC, naopak převaha TR α 2 vede k expresi pomalých MyHC. TR β udržuje hladinu tyroidních hormonů na basální úrovni. Poměr TR α 1:TR α 2 je také velmi důležitý pro správný vývoj srdce a jeho optimální funkci (*White a Dauncey 1999*).

Třemi geny je kódován receptor retinové kyseliny (RAR α , - β , - γ) a receptor retinoidů (RXR α , - β , - γ) (*Pfahl a Chytil 1996; Zhang a Pfahl 1993*). Receptory mohou vytvářet homodimery i heterodimery, mají identickou sekvenci P-boxu (AGGTCA). Kromě strukturní diverzity se od subrodiny steroidních receptorů liší převážně ve vlastní signální dráze.

Při absenci hormonu nedochází k asociaci proteinů tepelného šoku s inaktivovaným receptorem, který je schopen se vázat na HRE. Hormonální regulace transkripce je zajištěna pomocí korepresorů a koaktivátorů. V inaktivovaném stavu interaguje receptor s korepresorem, což vede ke snížení iniciace transkripce. Vazba ligandu navodí konformační změny receptoru, následné uvolnění korepresoru a interakci s koaktivátorem, která aktivuje transkripci (viz Obr. 3., str. 27). Korepresory a koaktivátory, transkripční intermediární faktory, regulují transkripci prostřednictvím přímé interakce se základními transkripčními mechanismy nebo prostřednictvím modifikace chromatinové struktury v oblasti promotoru (*Hatina a Reischig 2000*).

4. Cíl diplomové práce

Bakalářská práce je napsaná formou tzv. literární rešerše a zahrnuje přehled o fenotypu kosterní a srdeční svaloviny a jeho změnách za různých podmínek.

V navazující diplomové práci bych se chtěla zaměřit především na tyto body:

- Porovnat fenotyp u eutyroidních, hypotyroidních a hypertyroidních potkanů
- Porovnat kosterní a srdeční svalovinu
- Porovnat pohlavní rozdíly: samci vs. samice

5. Metody

5.1. Imunocytochemická metoda

Imunocytochemické reakce jsou založené na principu reakce protilátky s antigenem, v našem případě s určitou isoformou MyHC. K detekci pomalých (I) a rychlých (II) typů MyHC a svalových vláken slouží monoklonální protilátky anti-fast (proti MyHC II) a anti-slow (proti MyHC I) (*Vadászová 2005*). K odlišení jednotlivých isoform MyHC I, IIa, IID/x, IIb a tím i svalových vláken I, IIa, IID/X, IIb se používají na našem pracovišti specifické myší primární protilátky (anti rat). Detekce je realizována sekundární protilátkou (anti mouse) konjugovanou HRP (Horseradish peroxidase). HRP rozkládá H_2O_2 na H_2O a O_2 . Po přidání např. DAB (3,3-diaminobenzidin), dojde k vizualizaci dané isoformy MyHC (oxidací DAB),

což se projeví na zbarvení celého svalového vlákna (*Sternberg 1986*). Protilátky proti MyHC mohou být např.: SC-71 (MyHC IIa), BAD-5 (MyHC I), BF-35 (negativní marker pro MyHC IId/x) a BFF-3 (MyHC IId) (viz Tab. 2., str. 26).

5.2. Histochemická metoda

Histochemická metoda využívá ATPázové aktivity svalových vláken. V inkubačním roztoku štěpí ATPáza ATP na ADP a P (PO_4^{3-}), který pak následně reaguje s CaCl_2 za vzniku prakticky nerozpustného fosforečnanu vápenatého ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Dalšími reakcemi v solných roztocích (CoCl_2 a $(\text{NH}_4)_2\text{S}$) dochází k převedení bílé sraženiny na sraženinu barevnou (CoS). Ve svalových vlákních s vysokou ATPázovou aktivitou je zbarvení intenzivní, ve vlákních s nízkou je světlé. Citlivost ATPázy jednotlivých isoform MyHC k pH je odlišná. Při pH 10,3 (alkalická preinkubace) se zabarvují rychlá svalová vlákna typu II, obsahující MyHC II. Naopak při pH 4,3 (kyselá preinkubace) se zbarvují pomalá svalová vlákna typu I, obsahující MyHC I. Pokud použijeme kyselou preinkubaci o pH 4,5-4,6 můžeme rozlišit tmavá svalová vlákna I, světlejší vlákna IIB a nezabarvená vlákna IIA (*Brooke a Kaiser 1970*).

5.3. SDS-PAGE

(*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SDS-elektroforéza je metoda používaná k separaci proteinů podle relativní molekulové hmotnosti (tedy i k rozdělení těžkých řetězců myosinu). Využívá pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli skrze polyakrylamidový gel definované koncentrace. SDS je anionický detergent, který proteiny denaturuje a udělí jim negativní náboj. Oddělené proteiny se poté detekují buď pomocí „Comassie brilliant blue“ nebo stříbra (viz Obr. 2., str. 24) (*Vadászová 2005*).

5.4. Stereologická měření

Pomocí této metody se počítá procentuální zastoupení jednotlivých typů svalových vláken ve svalu. Používá se matematický program CAST grid. Počítač je propojen s mikroskopem a snímá obraz preparátu. Pod malým zvětšením se řez svalu obkreslí, přepne se

na zvětšení větší a zvolí se taková velikost mřížky, která odpovídá rozvržení typů svalových vláken v řezu. Poté se nastaví reprezentativní počet bodů pro celý řez. Počet svalových vláken se zaznamenává pomocí bodové mřížky, která se posouvá po celé ploše svalu. Souběžně se počítají body, které zasáhly svalová vlákna. Údaje se dále zpracovávají matematickými vzorci (Zachařová a Kubínová 1995).

6. Závěr

Dosud bylo popsáno 10 isoform MyHC (viz Obr. 1., str. 26). V kosterní svalovině jsou zastoupeny čtyři isoformy MyHC: MyHC I (MyHC β) – pomalá isoforma, a MyHC IIa, MyHC II d/x, MyHC II b – rychlé isoformy. Pokud porovnáme fenotyp kosterní svaloviny potkana a člověka, zjistíme, že isoforma MyHC II b se u člověka nevyskytuje (viz Tab. 1., str. 25). Gen pro MyHC II b u člověka existuje, ale neexprimuje se do proteinové formy. Nebyly zatím provedeny žádné studie, které by tuto skutečnost vysvětlily. Sekvence genu pro MyHC II b (Myh4) je k dispozici v internetové databázi genů *expasy* (<http://www.expasy.org/uniprot/Q9Y623>), kde je Myh4 též uváděn pod názvem Myh4/fetal. Jestli pojmenování „fetal“ souvisí s expresí tohoto genu a jeho isoformy v průběhu fetálního období u člověka není uvedeno v žádných dostupných literárních či internetových zdrojích a tato problematika je stále otevřena dalšímu výzkumu.

Srdeční svalovina obsahuje dva typy MyHC: MyHC α a MyHC β . Rozdílné zastoupení obou isoform určuje tzv. V typ (V1, V2 a V3). Potkan a člověk se mezi sebou liší genotypem svaloviny srdečních komor. Srdeční komory potkana obsahují hlavně V1 typ ($\alpha\alpha$) a umožňují srdci rychlou kontrakci. U člověka se nachází pomalu pracující srdeční komory s převahou V3 typu ($\beta\beta$), naopak V1 typu ($\alpha\alpha$) se vyskytuje méně než 10%.

Základní čtyři isoformy MyHC (MyHC I, MyHC IIa, MyHC II d/x, MyHC II b) dávají vznik stejnojmenným svalovým vláknům (MyHC I, MyHC IIa, MyHC II d/X, MyHC II b), která obsahují pouze jednu isoformu MyHC a můžeme je proto označit jako „čistá“ svalová vlákna. Kromě nich existují v kosterních svalech vlákna smíšená (hybridní), která obsahují dvě a více isoform MyHC. Smíšená vlákna se objevují zejména během transformace, vyskytují se ale i za normálních podmínek. Počet isoform obsažených v těchto vláknech

závisí na síle a délce působení, případně na kombinaci, vnějších faktorů (inervace, hormonů, fyzické zátěže, mechanických faktorů a stárnutí), případně na kombinaci vlivu více faktorů.

Svalová vlákna prochází neustálými změnami vlivem vnějších faktorů: inervace, hormonů (tyroidních, pohlavních, růstových...), fyzické zátěže, růstu (hypertrofie) a stárnutí (atrofie) atd... Transformace „slow-to-fast“ u kosterní svaloviny je stimulována reinervací pomalého svalu „rychlým nervem“, fázickou stimulací vysokou frekvencí (PHFS), krátkodobou vysokofrekvenční fyzickou zátěží (sprinty), stavem beztlíže (např. zavěšením zadní končetiny) a hypertyroidismem; u srdeční svaloviny hypertyroidismem a růstovými hormony. Na druhé straně transformaci „fast-to-slow“ dokáže u kosterní svaloviny vyvolat reinervace rychlého svalu pomalým nervem, chronická stimulace nízkou frekvencí (CLFS), vytrvalostní trénink, mechanické zatížení (napnutí), hypotyroidismus a stárnutí; u srdeční svaloviny jsou to chronické tlakové přetížení, hypertenze, cukrovka, hypotyroidismus, trvalá ztráta energie a vytrvalostní běh.

Z hormonů mají největší vliv tyroidní hormony. Jsou důležité pro správný vývoj a růst kosterní i srdeční svaloviny. Koncentrace tyroidních hormonů, zejména T3, rychle narůstá po narození a navozuje přeměnu MyHC_{emb} a MyHC_{neo} v dospělé isoformy MyHC v kosterní svalovině. Vysoká hladina T3 (hypertyroidismus) může u dospělých isoform MyHC vyvolat transformaci slow-to-fast: MyHC I → MyHC II. Naopak nedostatek T3 (hypotyroidismus) stimuluje opačný proces fast-to-slow: MyHC II → MyHC I. Rychlost přeměny není závislá jenom na koncentraci tyroidních hormonů, ale také na typu svalu. Jednotlivé svaly reagují na hyper- či hypotyroidní stav různě v závislosti na množství receptorů pro tyroidní hormony. Srdeční svalovina, která obsahuje MyHC α a MyHC β , se vyvíjí také pod vlivem T3. V perinatálním období převažuje exprese MyHC β v srdečních komorách a exprese MyHC α v srdečních předsíních. U potkana se krátce po narození zvyšuje koncentrace T3, což má za následek zvýšení exprese MyHC α a zároveň úbytek MyHC β v srdečních komorách. U člověka tato záměna nenastává, MyHC β je dominantní isoformou v srdečních komorách po celý život. Exprese isoform souvisí s fenotypem a rychlostí kontrakce srdečních komor u potkana a člověka.

Tyroidní hormony regulují transkripci genů MyHC vazbou na tyroidní receptory, které fungují jako transkripční faktory (viz Obr. 3., str. 27). Existují čtyři typy TR (TR α 1, TR α 2, TR β 1 a TR β 2) s různou afinitou k T3. TR mají homologní strukturu se steroidními receptory

a tvoří společnou superrodinu jaderných receptorů. Podobnost mezi tyroidními a steroidními receptory je pravděpodobně jedním z důvodů odlišného vlivu T3 u samic a samců.

V bakalářské práci jsem se pokusila zpracovat současné poznatky o isoformách MyHC v kosterní a srdeční svalovině a jejich transformacích vlivem vnějších faktorů tak, jak byly dosud zkoumány. V diplomové práci bych se chtěla zaměřit na vliv tyroidních hormonů na fenotyp kosterní a srdeční svaloviny u potkana včetně porovnání účinku pohlavních rozdílů u eu-, hypo- a hypertyroidních samců a samic potkanů.

Na závěr bych chtěla uvést své předběžné výsledky naznačující ve shodě s literaturou, že tyroidní hormony ovlivňují fenotyp svalu a že existují rozdíly v jejich účinku u samic a samců. K detekci MyHC isoform a tím i svalových vláken byly použity histochemické a imunocytochemické metody, jejichž matematického zpracování stereologickou metodou jsem se účastnila. V následujících grafech porovnávám procentuální zastoupení typů svalových vláken v SOL a EDL u mladých a dospělých samců a samic potkanů. Také srovnávám fenotyp SOL a EDL u eu-, hypo- a hypertyroidních samců a samic potkanů.

Vysvětlivky ke grafům:

ATP I, ATP IIA a ATP IIB = detekce svalových vláken typu I, IIA a IIB pomocí histochemické metody (viz 5.2, str. 17).

aS = detekce pomalých svalových vláken pomocí imunocytochemické metody (viz 5.1, str. 16-17).

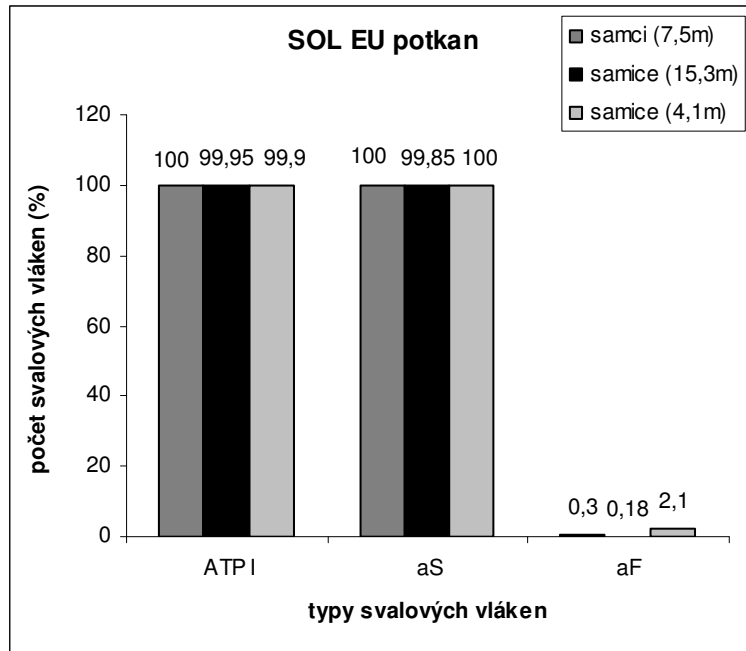
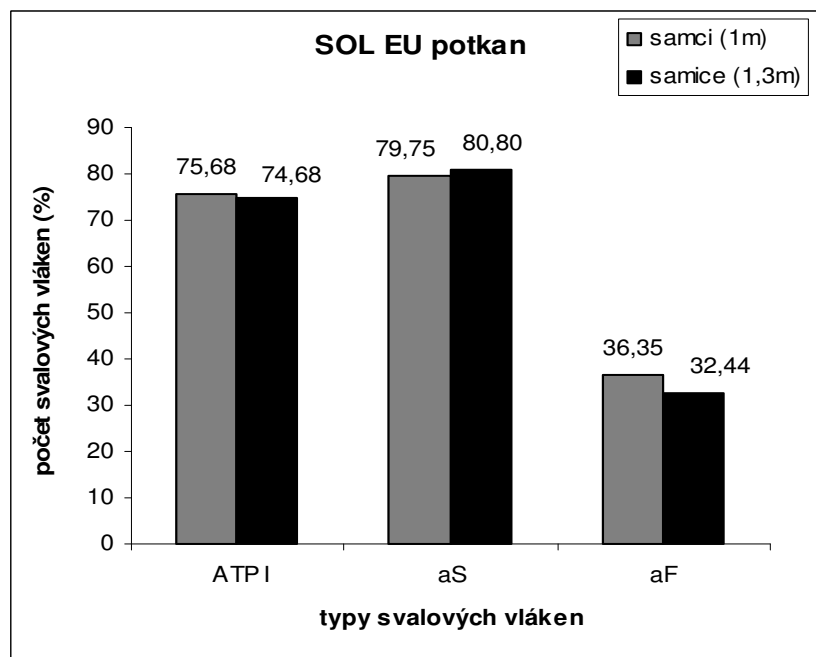
aF = detekce rychlých svalových vláken pomocí imunocytochemické metody (viz 5.1, str. 16-17).

EU = eutyroidní stav

HY = hypotyroidní stav

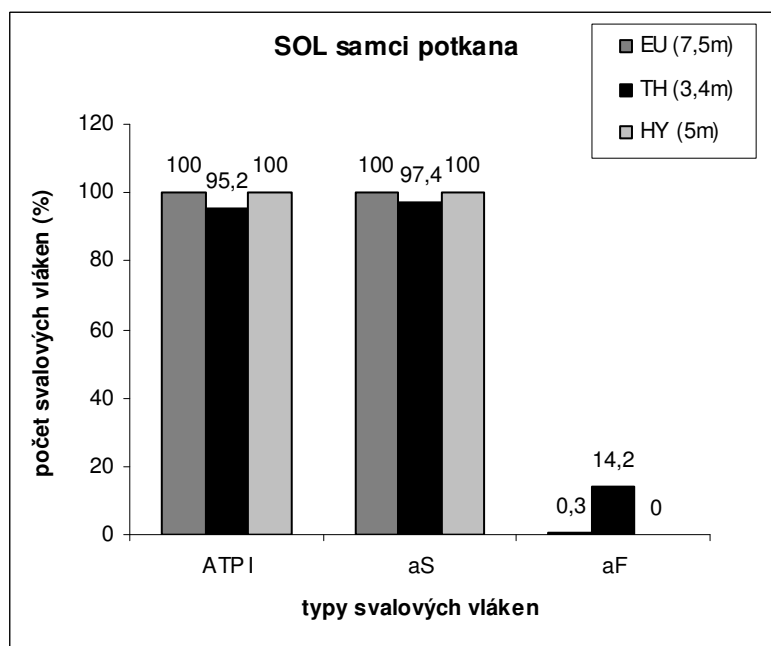
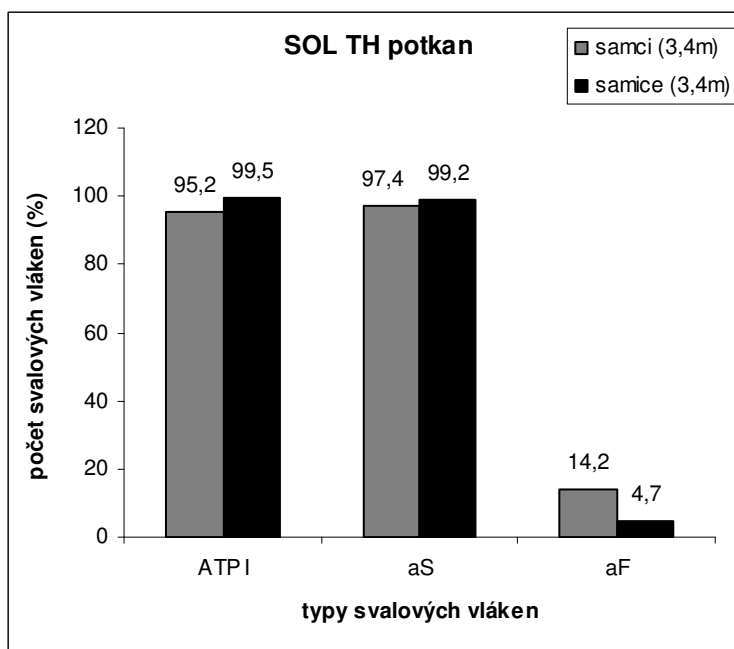
TH = hypertyroidní stav

Graf 1. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v SOL eutyroidních mladých potkanů: V grafu nepozorujeme žádné signifikantní rozdíly mezi samci a samicemi stejné věkové skupiny. Typické je vyšší procento rychlých svalových vláken (aF) v této věkové skupině.



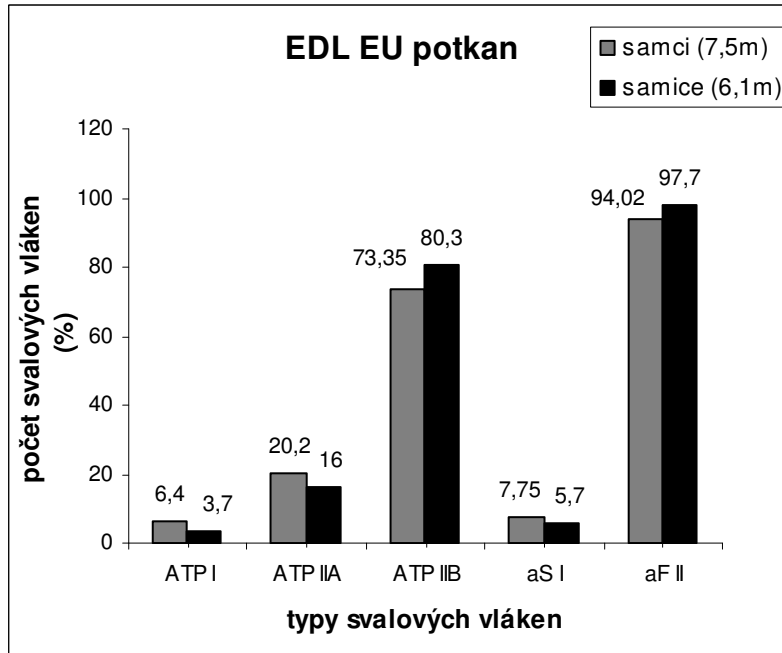
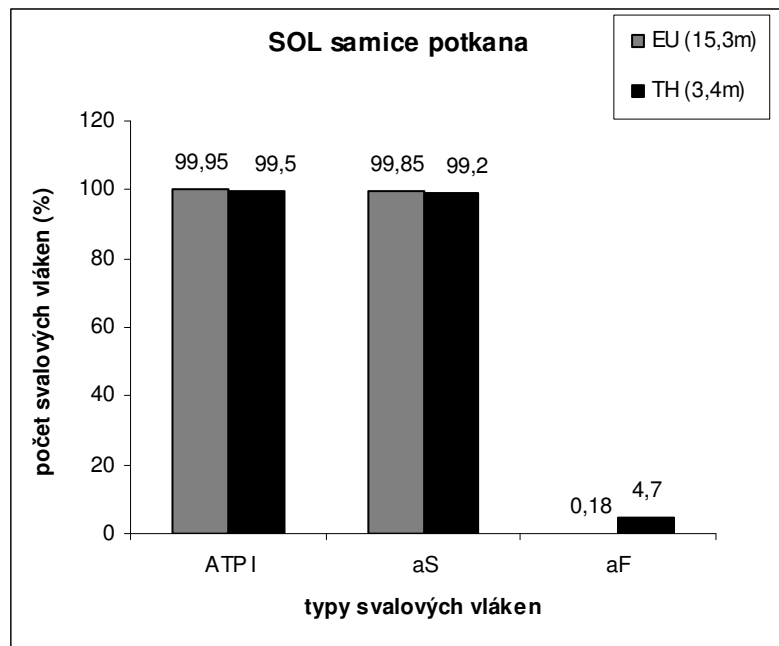
Graf 2. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v SOL eutyroidních dospělých potkanů: Tento graf opět ukazuje, že nejsou žádné signifikantní rozdíly mezi samci a samicemi ve skupině dospělých potkanů. Množství rychlých svalových vláken je zde silně redukováno, neboť SOL je typický pomalý sval s trvalou aktivitou danou jeho antigravitační funkcí.

Graf 3. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v SOL hypertyroidních potkanů: Z grafu vyplývá, že samci mají poněkud více rychlých svalových vláken (aF) v důsledku zvýšení hladiny tyroidních hormonů než je tomu u samic, což podporuje předpoklad, že u samic soupeří tyroidní hormony s estrogeny o „jaderný receptor“.



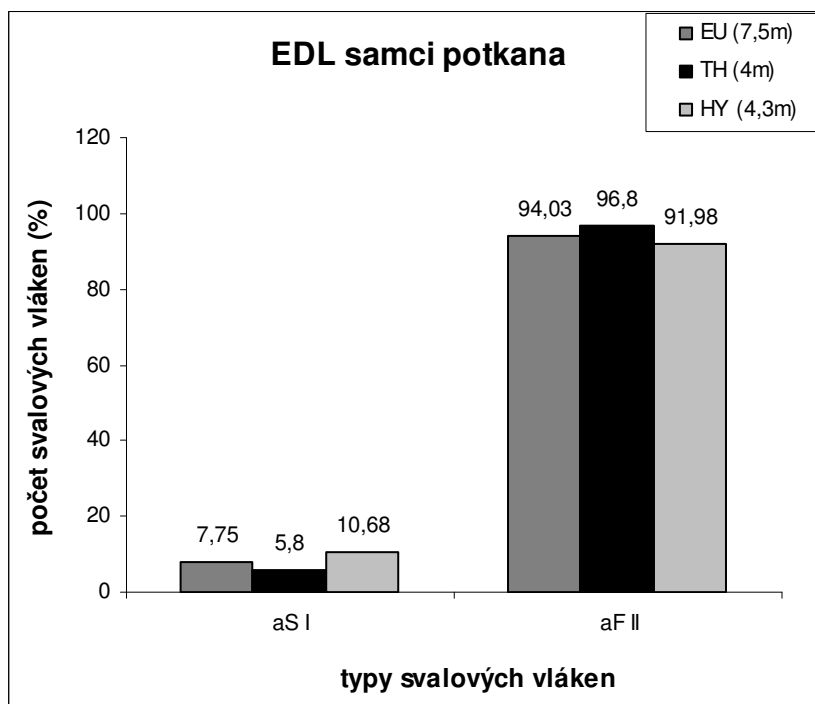
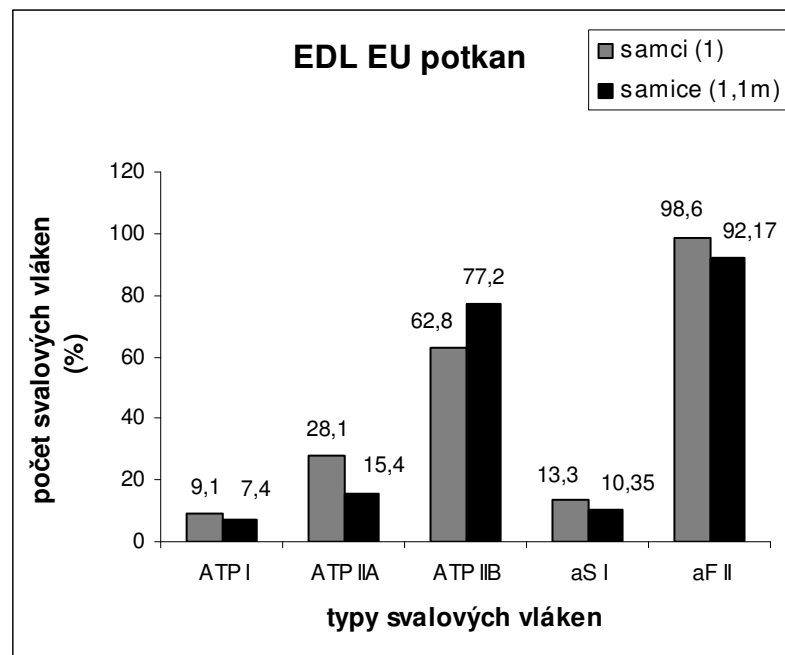
Graf 4. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v SOL eu-, hyper- a hypothyroidních samců potkana: Z grafu je patrný vliv tyroidních hormonů, a to navýšení rychlých svalových vláken. Naopak hypothyroidismus úplně „vynuluje“ přítomnost rychlých isoformů úplně.

Graf 5. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v SOL eu- a hypertyroidních samic potkana: Graf opět popisuje vliv hypertyroidismu a nárůst počtu rychlých svalových vláken (aF).



Graf 6. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v EDL eutyroidních dospělých potkanů: Zde jsou nevýrazné rozdíly mezi dospělými samci a samicemi.

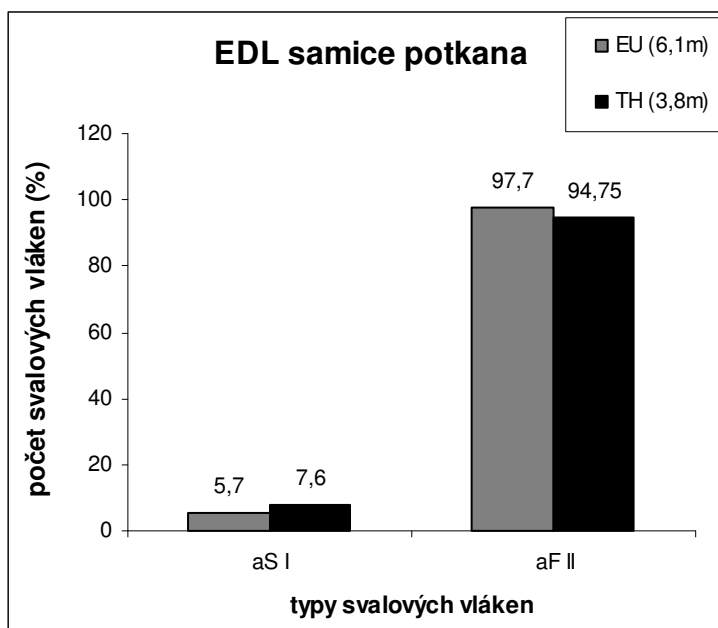
Graf 7. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v EDL eutyroidních mladých potkanů: U mladých samců a samic vidíme výraznější rozdíly v zastoupení jednotlivých typů svalových vláken (ATP I, IIA a IIB) než je tomu u dospělých potkanů. Samci mají také více rychlých isoform (aF), což naznačuje, že dospívají rychleji, co do obsahu rychlých svalových vláken v EDL.



Graf 8. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v EDL eu-, hyper- a hypotyroidních dospělých samců potkana: Opět pozorujeme zvýšení množství rychlých svalových vláken (aF) vlivem tyroidních hormonů a naopak pokles u HY, což potvrzuje vliv tyroidních hormonů na fenotyp EDL.

Graf 9. Zastoupení jednotlivých typů svalových vláken v EDL eu- a hypertyroidních samic potkana:

Z tohoto grafu se dá usoudit, že tyroidní hormony mají menší vliv na zvýšení množství rychlých svalových vláken v EDL než tomu je u samců (viz Graf 8.).



7. Přílohová část

Tab. 1. Isoformy MyHC a typy svalových vláken v kosterní svalovině potkana a člověka definované podle ATPázové aktivity. Za povšimnutí stojí fakt, že u člověka se nevyskytuje MyHC Iib isoforma, ale svalová vlákna typu IIB. (Talmadge 2000).

Isoformy MyHC (typy svalových vláken)	
potkan	Člověk
I (I)	I (I)
Ila (IIA)	Ila (IIA)
Ild/x (IID/X)	Ild/x (IIB)
Iib (IIB)	

Tab. 2. Působení protilátek na jednotlivé typy svalových vláken.

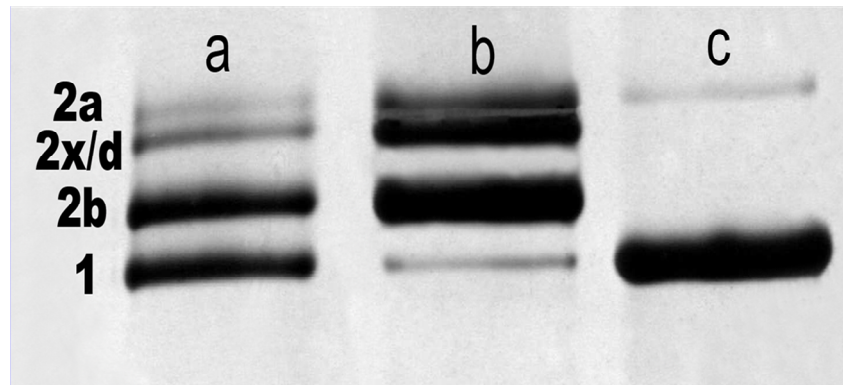
Protilátka	Typy svalových vláken	
	negativně zbarvená	pozitivně zbarvená
aF	I	II
aS	II	I
SC-71	SOL: I; EDL: I, IID/X, IIB	IIA
BAD-5	IIA, IID/X, IIB	I
BF-35	IID/X	I, IIA, IIB
BFF-3	I, IIA, IID/X	IIB

Obr. 1. Přehled dosud identifikovaných isoformů MyHC v kosterní a srdeční svalovině savců.

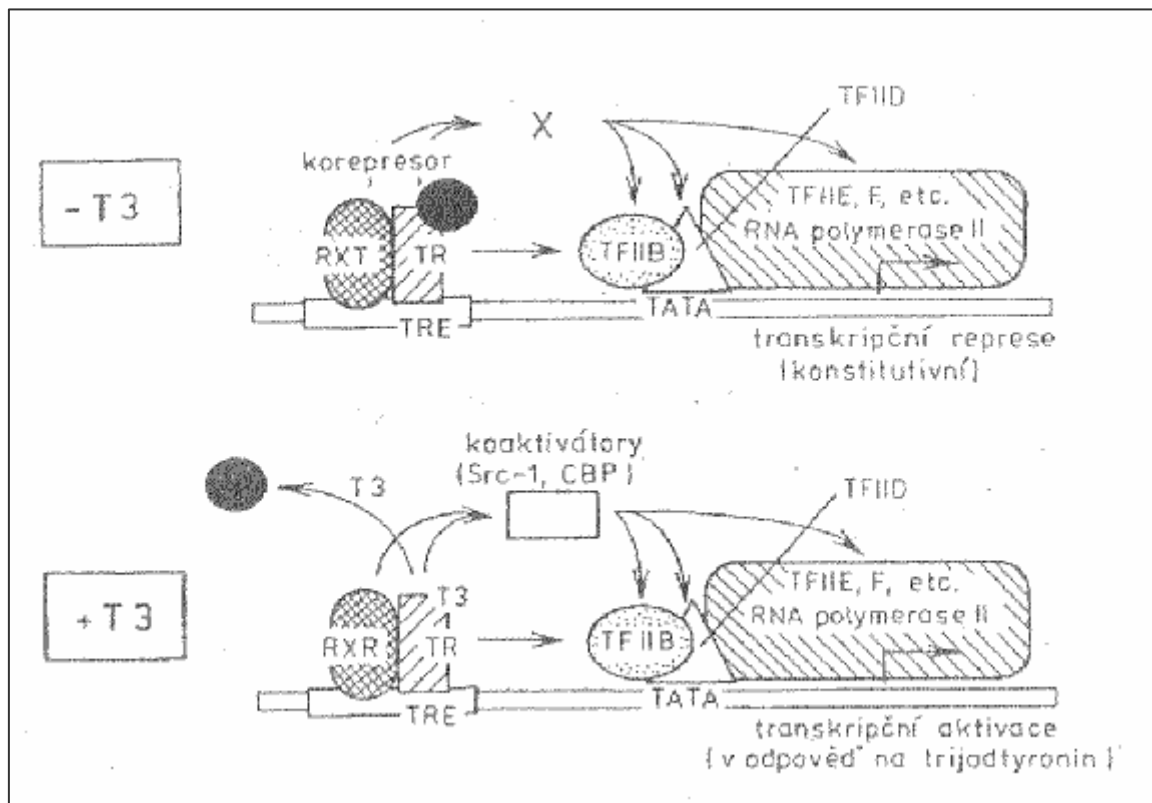
TABLE I
Myosin Heavy Chain Isoforms Identified in Mammalian Skeletal Muscles

Designation	Nomenclature	Muscle/fiber location
Fast-twitch	MHCIIb	Fiber types IIB, IIBD, IIAB
Fast-twitch	MHCII _{d/x}	Fiber types IID, IIBD, IIDA
Fast-twitch	MHCIIa	Fiber types IIA, IIAB, IIDA, IIC, IC
Fast-twitch	MHC _{com}	Extraocular and laryngeal muscles
Fast-twitch	MHCII _m	Masticatory muscles (carnivores, primates)
Slow-twitch	MHCI (MHCII β)	Fiber types I, IC, IIC + cardiac muscle
Slow-twitch	MHCI α	Extraocular, diaphragm, masseter muscles, fast-to-slow transforming fibers, intrafusal fibers + cardiac muscle
Slow-tonic	MHCI _{ton}	Extraocular, tensor tympani muscles, intrafusal fibers
embryonic	MHC _{emb}	Myotubes, extraocular muscles, intrafusal and regenerating extrafusal fibers
Neonatal	MHC _{neo}	Neonatal, extraocular, masseter muscles, intrafusal and regenerating extrafusal fibers

Obr. 2. Isoformy MyHC v SOL a EDL. Rozlišení pomocí metody SDS-PAGE. a = kontrola (SOL + EDL), b = EDL, c = SOL (4 měsíce staré samice potkana inbredního kmene Lewis). (Soukup, Zachařová a Smerdu 2002).



Obr. 3. Regulace transkripce MyHC tyroidními hormony. Signální dráha tyroidního hormonu, retinové kyseliny a vitamínu D: Tyto receptory působí jako heterodimery. Vážou příslušný HRE v promotorových a enhancerových oblastech genu. Absence ligandu → interakce s korepresorem → inhibice transkripce. Vazba ligandu → konformační změna molekuly receptoru → disociace korepresoru a interakce s koaktivátorem → aktivace transkripce. (Hatina a Reischig 2000).



8. Seznam použité literatury

1. **Ausoni S., Gorza L., Schiaffino S., Gundersen K., Lömo T.:** Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J. Neurosci.* 10: 153-160, 1990.
2. **Bacou F., Rouanet P., Barjot C., Janmot C., Vigneron P., d'Albis A.:** Expression of myosin isoforms in denervated, cross-reinnervated, and electrically stimulated rabbit muscles. *Eur. J. Biochem.* 236: 539-547, 1996.
3. **Baldwin K.M., Haddad F.:** Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Invited review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J. Appl. Physiol.* 90: 345-357, 2001.
4. **Ball K.L., Solaro R.J.:** Discoordinate regulation of contractile protein gene expression in senescent rat myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 26: 519-526, 1994.
5. **Bandman E.:** Myosin isoenzyme transitions in muscle development, maturation, and disease. *Int. Rev. Cytol.* 97: 97-131, 1985.
6. **Bär A., Pette D.:** Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235: 153-155, 1988.
7. **Berger F.G., Watson G.:** Androgen-regulated gene expression. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 51-65, 1989.
8. **Boluyt M.O., Devor S.T., Opitck J.A., White T.P.:** Regional variation in cardiac myosin isoforms of female F344 rats during aging. *J. Gerontol.* 54: B313-B317, 1999.
9. **Booth F.W., Baldwin K.M.:** Muscle plasticity: energy demanding and supply processes. In: Peachey L.D., Adrian R.H., Geiger S.R. (eds) *Handbook of Physiology*, section 12. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 1075-1123, 1996.
10. **Briggs F.N., Lee K.F., Feher J.J., Wechsler A.S., Ohlendieck K., Campbell K.:** Ca-ATPase isozyme expression in sarcoplasmic reticulum is altered by chronic stimulation of skeletal muscle. *FEBS Lett* 259: 269-272, 1990.
11. **Brooke M.H., Kaiser K.K.:** Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 670-672, 1970.
12. **Butler-Browne G.S. and Whalen R.G.:** Myosin isoenzyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.* 102: 324-334, 1984.
13. **Caiozzo V.J., Baker M.J., Baldwin K.M.:** Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.* 85 (6): 2237-2248, 1998.

14. **Caiozzo V.J., Baker M.J., Herrick R.E., Tao M., Baldwin K.M.:** Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J. Appl. Physiol.* 76: 1764-1773, 1994.
15. **Campione M., Ausoni S., Guezennec C.Y., Schiaffino S.:** Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 74: 1156-1160, 1993.
16. **Conjard A., Peuker H., Pette D.:** Energy state and myosin isoforms in single fibers of normal and transforming rabbit muscles. *Pflügers Arch.* 436: 962-969, 1998.
17. **d'Albis A., Butler-Browne G.:** The hormonal control of myosin isoform expression in skeletal muscle of mammals: a Review. *BAM* 3 (1): 7-16, 1993.
18. **d'Albis A., Couteaux R., Janmot C., Mira J.C.:** The same myosin isoforms are found in the female and male sexually dimorphic levator ani muscle of the rat, but their postnatal transitions are not synchronous. *FEBS Lett* 278: 41-44, 1991.
19. **d'Albis A., Couteaux R., Janmot C., Mira J.C.:** Opposite regulations by androgenic and thyroid hormones of V1 myosin expression in the two types of rabbit striated muscle: skeletal and cardiac. *FEBS Lett* 318: 53-56, 1993.
20. **d'Albis A., Couteaux R., Janmot C., Roulet A., and Mira J.C.:** Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur. J. Biochem.* 174: 103-110, 1988.
21. **d'Albis A., Couteaux R., Janmot C., Roulet A.:** Specific programs of myosin expression in the postnatal development of rat muscles. *Eur. J. Biochem.* 183: 583-590, 1989.
22. **d'Albis A., Janmot C., Béchet J.J.:** Comparison of myosin from the masseter muscle of adult rat, mouse and guinea-pig. Persistence of neonatal-type isoforms in the murine muscle. *Eur. J. Biochem.* 156: 291-296, 1986.
23. **Danieli-Betto D., Betto R., Megighian A., Midrio M., Salviati G., Larsson L.:** Effects of age on sarcoplasmic reticulum properties and histochemical composition of fast- and slow-twitch rat muscles. *Acta Physiol. Scand.* 154: 59-64, 1995.
24. **Dillmann W.H.:** Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes* 29: 579-582, 1980.
25. **Donath M.Y., Gosteli-Peter M.A., Hauri C., Froesch E.R., Zapf J.:** Insuline-like growth factor-I stimulates myofibrillar genes and modulates atrial natriuretic factor mRNA in rat heart. *Eur. J. Endocrinol.* 137: 309-315, 1997.
26. **Dubios J.D., Dussault J.H.:** Ontogenesis of thyroid function in neonatal rat. Thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) production rates. *Endocrinology* 101: 435-441, 1977.

27. **Effron M.B., Bhatnagar G.M., Spurgeon H.A., Ruano-Arroyo G., Lakatta E.G.:** Changes in myosin isoenzymes, ATPase activity, and contraction duration in rat cardiac muscle with aging can be modulated by thyroxine. *Circ. Res.* 60: 238-245, 1987.
28. **Egginton S.:** Effects of an anabolic hormone on striated muscle growth and performance. *Pflügers Arch.* 410: 349-355, 1987.
29. **Ennion S., Sant'ana Pereira J., Sargeant A.J., Young A., Goldspink G.:** Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16: 35-43, 1995.
30. **Everett A.W.:** Isomyosin expression in human heart in early pre- and post-natal live. *J. Mol. Cell Cardiol.* 18: 607-615, 1986.
31. **Everett A.W., Sinha A.M., Umeda P.K., Jakovcic S., Rabinowitz M.:** Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in alpha- and beta-myosin heavy chain levels in rabbit heart. *Biochemistry* 23: 15969-1599, 1984.
32. **Fitts R.H., Riley D.R., Widrick J.J.:** Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 89: 823-839, 2000.
33. **Fitzsimons D.P., Bodell P.W., Herrick R.E., and Baldwin K.M.:** Left ventricular functional capacity in the endurance-trained rodent. *J. Appl. Physiol.* 69: 305-312, 1990.
34. **Froemming G.R., Murray B.E., Harmon S., Pette D., Ohlendieck K.:** Comparative analysis of the isoform expression pattern of Ca²⁺-regulatory membrane proteins in fast-twitch, slow-twitch, cardiac, neonatal, and chronic low-frequency stimulated muscle fibers. *Biochim. Biophys. Acta* 1466: 151-168, 2000.
35. **Funder J.W.:** Mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor. *Clin. Endocrinol.* 45: 651-656, 1996.
36. **Gharakhanlou R., Chadan S., Gardiner P.:** Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* 89: 1229-1239, 1999.
37. **Gorza L., Gundersen K., Lömo T., Schiffano S., Westgaard R.H.:** Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic high-frequency stimulation in the rat. *J. Physiol.* 402: 627-649, 1988.
38. **Gregory P., Gagnon J., Essig D.A., Reid S.K., Prior G., Zak R.:** Differential regulation of actin and myosin isoenzyme synthesis in functionally overloaded skeletal muscle. *Biochem. J.* 265: 525-532, 1990.
39. **Gundersen K., Leberer E., Lömo T., Pette D., Staron R.S.:** Fibre types, calcium-sequestering proteins and metabolic enzymes in denervated and chronically stimulated muscles of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 398: 177-189, 1988.

40. **Gupta M., Gupta M.P.:** Cardiac hypertrophy old concepts, new perspectives. *Mol. Cell Biochem.* 1796: 273-279, 1997.
41. **Haddad F., Bodell P.W., and Baldwin K.M.:** Pressure-induced regulation of myosin expression in rodent heart. *J. Appl. Physiol.* 78: 1489-1495, 1995.
42. **Haddad F., Bodell P.W., McCue S.A., and Baldwin K.M.:** Effects of diabetes on rodent cardiac thyroid hormone receptor and isomyosin expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 272: E856-E863, 1997a.
43. **Haddad F., Masatsugu M., Bodell P.W., Qin A., McCue S.A., and Baldwin K.M.:** Role of thyroid hormone and insulin in control of cardiac isomyosin expression. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 559-569, 1997b.
44. **Hämäläinen N., Pette D.:** Slow-to-fast transitions in myosin expression of rat soleus muscle by phasic high-frequency stimulation. *FEBS Lett* 399: 220-222, 1996.
45. **Hämäläinen N., Pette D.:** Coordinated fast-to-slow transitions of myosin and SERCA isoforms in chronically stimulated fast-twitch muscles of euthyroid and hyperthyroid rabbits. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18: 545-554, 1997a.
46. **Hämäläinen N., Pette D.:** Expression of an α -cardiac-like myosin heavy chain in diaphragm, chronically stimulated, and denervated fast-twitch muscles of rabbit. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18: 401-411, 1997b.
47. **Härtner K-T., Kirschbaum B.J., Pette D.:** The multiplicity of troponin T isoforms. Normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.* 179: 31-38, 1989.
48. **Härtner K-T., Pette D.:** Fast and Slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.* 188: 261-267, 1990.
49. **Hatina J., Reischig J.:** Hormonální regulace genové transkripce – jaderné receptory jako ligandem-aktivované transkripční factory. *Čs. Fyziol.* 49 (2): 61-72, 2000.
50. **Hoh J.F.Y., McGrath P.A., Hale P.T.:** Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effects of hypophysectomy and thyroid replacement. *J. Mol. Cell Cardiol.* 10: 1053-1076, 1978.
51. **Huber B., Pette D.:** Dynamics of parvalbumin expression in low-frequency-stimulated fast-twitch rat muscle. *Eur. J. Biochem.* 236: 814-819, 1996.
52. **Chin W.W., Yen P.M.:** Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: L.E. Braveman (Ed.). *Contemporary Endocrinology: Diseases of the Thyroid.* Totowa, Humana Press, p: 1-15, 1997.

53. **Izumo S., Nadal-Ginard B., Mahdavi V.:** All members of the multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231: 597-600, 1986.
54. **Joumaa W.H., Léoty C.:** A comparative analysis of the effects of exercise training on contractile responses in fast- and slow-twitch rat skeletal muscles. *J. Comp. Physiol. B.* 172: 329-338, 2002.
55. **Kahaly G.J., Dillmann W.H.:** Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine Rev.* 26 (5): 704-728, 2005.
56. **Katzenellenbogen J.A., O'Malley B.W., Katzenellenbogen B.S.:** Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: Interactions with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.* 10: 119-131, 1996.
57. **Kuzman J.A., Thomas T.A., Vogelsang K.A., Said S., Anderson B.E., Gerdes A.M.:** Effects of induced hyperthyroidism in normal and cardiomyopathic hamsters. *Journal of Applied Physiology* 99: 1428-1433, 2005.
58. **LaFramboise W.A., Daood M.J., Guthrie R.D., Moretti P., Schiaffino S., Ontell M.:** Electrophoretic separation and immunological identification of type 2X myosin heavy chain in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1035: 109-112, 1990.
59. **Lazar M.A.:** Steroid and thyroid hormone receptors. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Amer.* 20: 681-685, 1991.
60. **Lazar M.A.:** Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews* 14: 184-193, 1993.
61. **Leeuw T., Pette D.:** Coordinate changes in the expression of troponin subunit and myosin heavy chain isoforms during fast-to-slow transition of low-frequency stimulated rabbit muscle. *Eur. J. Biochem.* 213: 1039-1046, 1993.
62. **Lömo T., Westgaard R.H., Dahl H.A.:** Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 187: 99-103, 1974.
63. **Lompre A.M., Nadal-Ginard B., Mahdavi V.:** Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.* 259: 6437-6446, 1984.
64. **Lompre A.M., Schwartz K., d'Albis A., Lacombe G., Van Thiem N., and Swynghedauw B.:** Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 282: 105-107, 1979.
65. **Lyons G.E., Kelly A.M., Rubinstein N.A.:** Testosterone-induced changes in contractile protein isoforms in the sexually dimorphic temporalis muscle of the guinea pig. *J. Biol. Chem.* 261: 13278-13284, 1986.

66. **Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M. et al.:** The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83: 835-839, 1995.
67. **Mascarello F., Carpené E., Veggetti A., Rowlerson A., Jenny E.:** The tensor tympani muscle of cat and dog contains II_m and slow-tonic fibres: an unusual combination of fibre types. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 3: 363-374, 1982.
68. **McNally E.M., Kraft R., Bravo-Zehnder M., Taylor D.A., Leinwand L.A.:** Full-length rat alpha and beta myosin heavy chain sequences. Comparison suggests a molecular basis for functional differences. *J. Mol. Biol.* 210: 665-671, 1989.
69. **Mester J., Baulieu E.-E.:** Nuclear receptor superfamily. In: L.J. DeGroot, M. Besser, H.G. Burger, J.L. Jameson, D.L. Loriaux, J.C. Marshall, W.D. Odell, J.T. Potts Jr., A.H. Rubenstein, G.F. Cahill, L. Martini, D.H. Nelson (Eds.). *Endocrinology* 3rd edition. Philadelphia, W.B. Saunders, p:93-118, 1995.
70. **Mira J.C., Janmot C., Couteaux R., d'Albis A.:** Reinnervation of denervated extensor digitorum longus of the rat by the nerve of the soleus does not induce the type I myosin synthesis directly but through a sequential transition of type II myosin isoforms. *Neurosci. Lett* 141: 223-226, 1992.
71. **Miyata S., Minobe W., Bristow M.R., and Leinwand L.A.:** Myosin heavy chain isoform expression in the failing and non-failing human heart. *Circ. Res.* 86: 386-390, 2000.
72. **Morgan M.J., Loughna P.T.:** Work overload induced changes in fast and slow skeletal muscle myosin heavy chain gene expression. *FEBS Lett* 255: 427-430, 1989.
73. **Morkin E.:** Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc. Res. Tech.* 50: 522-531, 2000.
74. **Nikcevic G., Heidkamp M.C., Perhone M., Russell B.:** Mechanical activity in heart regulates translation of alpha-myosin heavy chain mRNA but not its localization. *Am. J. Physiol.* 276: H2013-H2019, 1999.
75. **Pedrosa-Domellöf F., Eriksson P.O., Butler-Browne G.S., Thornell L.E.:** Expression of alpha cardiac myosin heavy chain in mammalian skeletal muscle. *Experientia* 48: 491-494, 1992.
76. **Pette D., Staron R.S.:** Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116: 1-76, 1990.
77. **Pette D., Staron R.S.:** Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.* 170: 143-223, 1997.
78. **Pette D., Staron R.S.:** Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* 50: 500-509, 2000.

79. **Pette D., Staron R.S.:** Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol.* 115: 359-372, 2001.
80. **Peuker H., Conjard A., Putman C.T., Pette D.:** Transient expression of myosin heavy chain MHC1 α in rabbit muscle during fast-to-slow transition. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 20: 147-154, 1999.
81. **Pfahl M., Chytil F.:** Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Ann. Rev. Nutr.* 16: 257-283, 1996.
82. **Pratt W.B., Toft D.O.:** Steroid receptors interactions with heat shock protein and immunophilin chaperons. *Endocr. Rev.* 18: 306-360, 1997.
83. **Qi M., Puglisi J.L., Byron K.L., Ojamaa K., Klein I., Bers D.M., Samarel A.M.:** Myosin heavy chain gene expression in neonatal rat heart cells: effects of [Ca²⁺]_i and contractile activity. *Am. J. Physiol.* 273: C394-C403, 1997.
84. **Rutschmann M., Dahlmann B., Reinauer H.:** Loss of fast-twitch isomyosins in skeletal muscles of the diabetic rat. *Biochem. J.* 221: 645-650, 1984.
85. **Salmons S., Vrbová G.:** The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J. Physiol. (Lond.)* 201: 535-549, 1969.
86. **Sartore S., Mascarello F., Rowlerson A., Gorza L., Ausoni S., Vianello M., Schiaffino S.:** Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 8: 161-172, 1987.
87. **Schachat F.H., Williams R.S., Schnurr C.A.:** Coordinate changes in fast thin filament and Z-line protein expression in the early response to chronic stimulation. *J. Biol. Chem.* 263: 13975-13978, 1988.
88. **Schiaffino S., Ausoni S., Gorza L., Saggin L., Gundersen K., Lömo T.:** Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10: 197-205, 1988.
89. **Schiaffino S., Gorza L., Sartore S., Saggin L., Ausoni S., Vianello M., Gundersen K., Lömo T.:** Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10: 197-205, 1989.
90. **Smerdu V., Karsch-Mizrachi I., Campione M., Leinwand L., Schiaffino S.:** Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 267: C1723-C1728, 1994.
91. **Soukup T., Jirmanová I.:** Diverzita typů svalových vláken a některé její příčiny. *Čs. Fyziol.* 48, No.4: 165-170, 1999.

92. **Soukup T., Jirmanová I.:** Regulation of myosin expression in developing and regenerating extrafusal and intrafusal muscle fibers with special emphasis on the role of thyroid hormones (minireview). *Physiol. Res.* 49: 617-633, 2000.
93. **Soukup T., Pedrosa-Domellöf F., Thornell L.E.:** Expression of myosin heavy chain isoforms and myogenesis of intrafusal fibers in the rat muscle spindles. *Microsc. Res. Tech.* 30: 390-407, 1995.
94. **Soukup T., Zachařová G., and Smerdu V.:** Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta histochem.* 104 (4): 399-405, 2002.
95. **Sternberg L.A.:** Immunocytochemistry. 3rd Ed. Wiley, New York NY, USA, 1996.
96. **Sugiura T., Matoba H., Miyata H., Kawai Y., Murakami N.:** Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat. *Acta Physiol. Scand.* 144: 419-423, 1992.
97. **Swoap S.J., Haddad F., Caiozzo V.J., Herrick R.E., McCue S.A., and Baldwin K.M.:** Interaction of thyroid hormone and functional overload on skeletal muscle isomyosin expression. *J. Appl. Physiol.* 77: 621-629, 1994.
98. **Swynghedauw B.:** Developmental and functional adaptations of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 66: 710-771, 1986.
99. **Swynghedauw B.:** Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev.* 79: 215-262, 1999.
100. **Talmadge R.J.:** Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle & nerve* 23: 661-679, 2000.
101. **Termin A., Staron R.S., Pette D.:** Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles – a single fibre study. *Eur. J. Biochem.* 186: 749-754, 1989.
102. **Tsika R.W., Herrick R.E., Baldwin K.M.:** Interaction of compensatory overload and hindlimb suspension on myosin isoform expression. *J. Appl. Physiol.* 62: 2180-2186, 1987.
103. **Vadászová A.:** Vplyv tyroidných hormónov na expresiu izoforiem MyHC v kostrových svaloch potkana. *Disertační práce*, 2005.
104. **Vrbová G.:** The effect of tenotomy on the speed of contraction of fast and slow mammalian muscles. *J. Physiol. (Lond.)* 198: 214-224, 1963.
105. **Weiczorek D.F., Periasamy M., Butler-Browne G.S., Whalen R.G., Nadal-Ginard B.:** Co-expression of multiple myosin heavy chain genes, in addition to a tissue-specific one, in extraocular musculature. *J. Cell Biol.* 101: 618-629, 1985.

106. **White P., Dauncey M.J.:** Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *Journal of Molecular Endocrinology* 23: 241-254, 1999.
107. **Yang Y.Z., Burgos-Trinidad M., Wu Y & Koenig R.J.:** Thyroid hormone receptor variant $\alpha 2$. Role of the ninth heptad in DNA binding, heterodimerization with retinoid X receptors, and dominant negative activity. *Journal of Biological Chemistry* 271: 28235-28242, 1996.
108. **Young L.H., Renfu Y., Hu X., Chong S., Hasan S., Jacob R., Sherwin R.S.:** Insuline-like growth factor I stimulates cardiac myosin heavy chain and actin synthesis in the awake rat. *Am. J. Physiol.* 276: E143-E150, 1999.
109. **Zacharová G., Kubínová L.:** Stereological methods based on point counting and unbiased counting frames for two-dimensional measurements in muscle: comparison with manual and image analysis methods. *J. Muscle Res. Cell Motil* 16: 295-302, 1995.
110. **Zhang X., Pfahl M.:** Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 4: 156-162, 1993.