

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyziologie živočichů
Praha



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Diferenciace typů svalových vláken a exprese těžkých řetězců
myosinu v kosterních svalech potkana.
Vliv tyroidních hormonů v průběhu postnatálního vývoje.**

Bc. Ondřej Přenosil

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.

Katedra fyziologie živočichů

Konzultant: RNDr. Tomáš Soukup, CSc.

oddělení Funkční morfologie, Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.

2008

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce RNDr. Jitky Žurmanové, PhD. na PřF UK a pod vedením externího garanta RNDr. Tomáše Soukupa, CSc. ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v. v. i., odd. Funkční morfologie za použití níže uvedených literárních zdrojů.

V Praze dne 23. dubna 2008

Bc. Ondřej Přenosil v.r.

Poděkování

Děkuji své vedoucí diplomové práce RNDr. Jitce Žurmanové, PhD. za odborné a laskavé vedení při sestavování této diplomové práce, za poskytnuté cenné rady a celkovou pracovní i duchovní podporu. Děkuji také konzultantovi RNDr. Tomáši Soukupovi, CSc. za poskytnutí vřelého a pevného zázemí pro práci na půdě Akademie věd, za obětavý přístup a ochotné vedení. Děkuji Mgr. Daniele Horníkové za trpělivou pomoc po metodické stránce práce.

V neposlední řadě děkuji všem členům oddělení Funkční morfologie AV ČR, v. v. i., jejichž ochota mi velmi pomáhala při komponování práce a při metodických postupech a samozřejmě děkuji své rodině a svým blízkým, bez kterých by mé studium nebylo umožněno, za jejich pomoc, trpělivost a podporu během celého studia.

Obsah

Úvod	6
Cíle práce	8
Seznam zkratk	9
Literární přehled	11
1. Myosin a jeho těžké a lehké řetězce	11
1.1 Isoformy těžkých řetězců myosinu třídy II (MyHC).....	13
2. Typy svalových vláken	15
3. Mechanismy tranzice svalových vláken	17
3.1 Koexprese MyHC	18
3.2 Degradace MyHC a jejich syntéza „de novo“	18
3.3 Molekulární mechanismy tranzice	20
4. Prenatální vývoj kosterního svalu obratlovců	21
5. Postnatální vývoj svalu potkana	25
6. Plasticita svalového fenotypu	28
6.1 Inervace a nervosvalová aktivita	28
6.2 Trénink a cvičení	29
6.3 Vliv zvýšení či snížení mechanického zatížení svalu (mechanical loading/unloading)	29
6.4 Hormony a vliv pohlaví	30
6.5 Stáří	32
7. Tyroidní hormony a jejich receptory	33
8. Vliv tyroidních hormonů na sval	36
8.1 Experimentálně navozený hypotyreoidismus	37
8.2 Experimentálně navozený hypertyreoidismus	38
Metodika	40
9. Navození alterovaných tyroidních stavů	41
10. Experimentální skupiny.....	42
11. Odběr a příprava vzorků	42
12. Imunohistochemická detekce svalových vláken	43
13. Separace MyHC pomocí SDS-PAGE	44
13.1 Extrakce MyHC	44
13.2 SDS-PAGE	44
13.3 Barevná detekce proteinů stříbrem	45
14. Stereologická měření a jejich reprodukovatelnost	46
15. Statistické hodnocení.....	46
Výsledky	48
16. Postnatální vývojové schéma zastoupení pomalých a rychlých vláken a míry koexprese.....	48

16.1	SOL	48
16.2	EDL	51
17.	Zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v závislosti na tyroidním stavu	53
18.	Zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v závislosti na lateralitě končetiny	55
19.	Zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v závislosti na pohlaví	58
20.	Ilustrace vlivu tyroidních hormonů na zastoupení isoformem MyHC metodou SDS-PAGE	61
21.	Ilustrace vlivu tyroidních hormonů na zastoupení pomalých a rychlých vláken v SOL a EDL	62
Diskuse		64
Závěr		67
Příloha		69
	Příloha 1. Vliv hladiny tyroidních hormonů na tranzici isoformem MyHC	69
	Příloha 2. Seznam chemikálií a jejich dodavatelů	70
	Příloha 3. Přístroje a materiál	71
	Příloha 4. Použité roztoky	72
Seznam použité literatury		74

Úvod

Kosterní svaly dospělého potkana sestávají z vláken obsahujících čtyři isoformy těžkých řetězců myosinu (MyHC – myosin heavy chain). Zastoupení jednotlivých isoform MyHC umožňuje odlišení jednotlivých typů vláken na vlákna „pomalá“ a „rychlá“. Za experimentální modely pomalého a rychlého svalu u potkana jsou běžně užívány m. soleus (SOL) a m. extensor digitorum longus (EDL). SOL s vysokým zastoupením „pomalých“ vláken obsahuje převážně „pomalou“ isoformu MyHC I a minoritně „rychlou“ isoformu MyHC IIa; EDL s převahou „rychlých“ vláken obsahuje převážně tři „rychlé“ isoformy MyHC IIa, IIx/d a IIb a minoritně isoformu MyHC I.

Je známo, že procentuální zastoupení těchto typů vláken se mění významně v průběhu časného postnatálního vývoje a též u dospělých potkanů pod vlivem nejrůznějších vnějších podmínek. Jedná se o podmínky „fyzikálního“ charakteru jako je například svalová práce či změna působení gravitace a další nebo molekulárně signalizačního charakteru, jako jsou například nervově trofické či hormonální vlivy. Nervově trofické vlivy hrají velmi významnou roli při diferenciaci svalových vláken a také při vzájemné přeměně pomalých a rychlých vláken. Tyroidní hormony zastávají významnou modulační roli v průběhu vývoje svalu a současně se uplatňují i v dospělosti při přeměně svalových vláken a regulaci jejich fenotypu.

Pod vlivem periferního působení trijódtyroninu (T3) dochází k přednostní expresi rychlých isoform MyHC bez ohledu na typ svalu, zvětšuje se tím tedy i podíl rychlých vláken ve svaly. V případě nedostatku tohoto hormonu naopak dochází k utlumení exprese rychlých isoform MyHC a tím k poměrnému nárůstu pomalých isoform.

Fyziologická hladina T3 je odvislá od věku jedince a pohlaví a může být experimentálně změněna. Rozeznáváme tři typy úrovně hladiny tyroidních hormonů: fyziologickou - eutyroidní (EU), sníženou - hypotyroidní (HY) a zvýšenou - hypertyroidní (TH).

Tato práce byla prováděna na potkanech *Rattus norvegicus* inbrední linie Lewis, u kterých byla experimentálně navozena změna tyroidního stavu. Tento model je dlouhá léta používán v laboratoři RNDr. Tomáše Soukupa, CSc.

Cílem práce bylo přispět k ucelení poznatků o procentuálních změnách obsahu pomalého a rychlého typu svalových vláken v SOL a EDL v závislosti na věku, pohlaví, hladině tyroidních hormonů i lateralitě končetiny. Výsledky práce poskytnou referenční údaje pro pokusy s heterochronní isotransplantací (Jirmanová a Soukup, 1995), které jsou prováděny na jedincích různého stáří.

Těžištěm mé práce je hodnocení imunohistochemicky barvených řezů proti rychlým a pomalým vláknům ze svalů SOL a EDL samic a samců potkana pěti věkových skupin a tří tyroidních stavů pomocí stereologické analýzy.

Cíle práce

1. Kvantifikovat změnu procentuálního zastoupení typů svalových vláken v SOL a EDL potkana *Rattus norvegicus* linie Lewis v závislosti na stupni vývoje od časně postnatálních jedinců po jedince dospělé.

2. Kvantifikovat vliv experimentálně navozené změny hladiny tyroidních hormonů na procentuální zastoupení typů svalových vláken v SOL a EDL.

3. Zhodnotit možnou existenci rozdílů v procentuálním zastoupení jednotlivých typů svalových vláken mezi pravou a levou končetinou týchž jedinců.

4. Porovnat rozdílnosti v procentuálním zastoupení typů svalových vláken mezi samci a samicemi. Z níže popsaných důvodů nejsou samci často používáni v laboratoři RNDr. Tomáše Soukupa CSc. Smyslem intersexuálních porovnání je zjistit, zda je nutné zkoumat samce jako samostatnou skupinu či lze využít dat získaných na samicích i pro popis změn svalového fenotypu samců.

Seznam zkratek

aF	- primární protilátka „anti fast“ proti rychlým isoformám MyHC typu II
APS	- amonium persulfát
aS	- primární protilátka „anti slow“ proti pomalé isoformě MyHC typu I
ATPáza	- enzym adenosin trifosfatázové aktivity
bFGF	- základní fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor)
CLFS	- chronická nízkofrekvenční stimulace (chronic low-frequency stimulation)
DAB	- 3,3-diaminobenzidin
DPX	- distren, změkčovač a xylén (distrene, plasticizer, xylene)
DTT	- dithiotreitol
EDL	- musculus extensor digitorum longus
EDTA	- etylen diamin tetraoctová kyselina
EGTA	- etylen glykol tetraoctová kyselina
EU	- eutyroidní, fyziologický stav hladiny tyroidních hormonů
HRP	- křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
HY	- hypotyroidní, snížený stav hladiny tyroidních hormonů
IGF	- inzulinu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)
MAPK(ERK)	- mitogenem aktivovaná protein kináza/kináza regulovaná extracelulárním signálem (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase)
M_r	- relativní molekulová hmotnost
MRF	- myogenní regulační faktor (myogenic regulatory factor)
mRNA	- informační (messenger) ribonukleová kyselina
MyHC	- těžký řetězec myosinu (myosin heavy chain)
MyLC	- lehký řetězec myosinu (myosin light chain)
NDS	- oslí sérumalbumin (normal donkey serumalbumine)
NFAT	- jaderné faktory aktivovaných T buněk (nuclear factors of activated T cells)
PBS	- fosfátový pufr s přídavkem chloridu sodného (phosphate buffer saline)
pH	- záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů – protonů
PHFS	- rychlá fázická vysokofrekvenční stimulace (phasic high-frequency stimulation)
RXR	- receptor X retinoidních látek
SD	- standardní odchylka (standard deviation)
SDS	- sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	- sodium dodecyl sulfát – polyakrylamidová gelová elektroforéza
SOL	- musculus soleus
T3	- trijódtyronin
T4	- tyroxin
TBS	- TRIS pufr s přídavkem chloridu sodného (TRIS buffer saline)
TEMED	- tetrametyletylen diamin
TH	- hypertyroidní, stav zvýšené hladiny tyroidních hormonů
TR	- receptor pro tyroidní hormony (thyroid hormone receptor)
TRE	- regulační sekvence DNA vážící receptor tyroidního hormonu (thyroid hormone response element(s))

TRH - TSH-uvolňující hormon (TSH releasing hormone)
TRIS - 2-amino-2-hydroxymetyl-propan-1,3-diol
TSH - hormon stimulující štítnou žlázu
WBN/Kob - linie potkanů Wistar Bonn/Kobori

Literární přehled

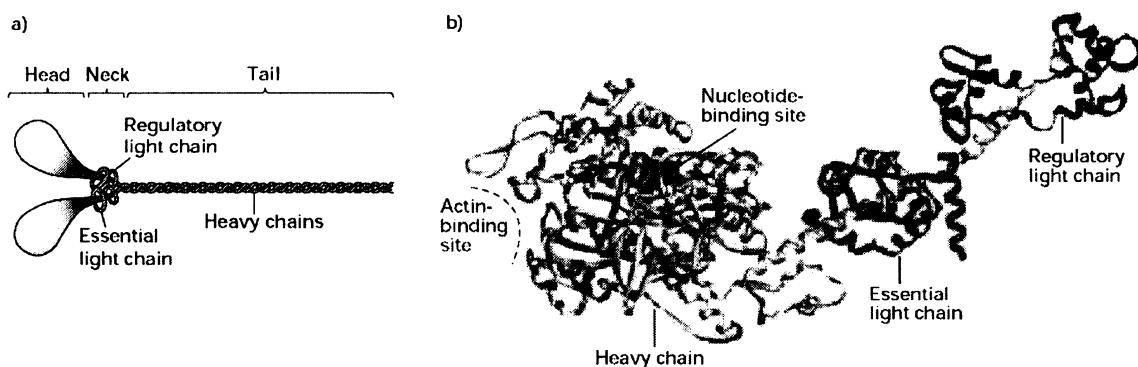
1. Myosin a jeho těžké a lehké řetězce

Myosin je klíčový protein kontraktálního aparátu kosterního svalu tvořící velké komplexy a vyskytující se téměř u všech známých druhů organismů. Nacházíme jej u prvoků, rostlin i živočichů a postrádá jej pouze několik taxonů, například červené řasy či diplomonádní protista (Vale, 2003). Jedná se o molekulární motor schopný pohybu po vláknech F-aktinu. Doména myosinu zodpovědná za generování lokomoční aktivity (S1 fragment) je napříč evolucí konzervativní oproti zbytku molekuly. Z hlediska své stavby byly různé druhy myosinových komplexů rozděleny do 24 tříd (Goodson a Dawson, 2006) označovaných římskými číslicemi. Některé třídy byly nalezeny pouze v rostlinách (VIII a XI), jiné zase jen u obratlovců (IX). Většina tříd myosinu se vyskytuje napříč celou skupinou eukaryot. Myosiny jsou buňkami využívány k transportu vesikulů, organel a jiného nákladu, pro stabilizaci cytoskeletu, k pohybu buněk, invazi vnitrobuněčných parazitů a také ke svalové kontrakci, tedy pro aktivní pohyb živočichů. Myosinové komplexy se skládají z těžkých a lehkých řetězců (MyLC – myosin light chain) (Obrázek 1.). Těžké řetězce zpravidla dimerizují, avšak u myosinů tříd I, III, IX a XIV zůstávají monomerní. Lehké řetězce mají význam funkčně modulační. Všechny myosiny, s výjimkou myosinu třídy VI, se pohybují směrem k plus konci F-aktinu.

Molekuly myosinu kontraktálního aparátu kosterního svalu spadají do myosinové třídy II. Myosinové molekuly třídy II se nacházejí i v nesvalových buňkách, avšak této skupině myosinů nebude v této práci věnována pozornost (pro přehled Alberts et al., 2002). Myosiny třídy II jsou homodimerní multiproteinové komplexy, kde každý monomer je heterotrimerem. Jeden celý myosinový komplex má M_r řádově 460 000. Součástí heterotrimeru je těžký řetězec o M_r řádově 200 000 a dva lehké řetězce, esenciální a regulační, oba s M_r řádově 15 – 17 000. MyLC jsou vápník vazebné proteiny nekovalentně vázané k MyHC v oblasti krčku (Obrázek 1.). MyLC jemně doladují vlastnosti celého komplexu myosinu. U různých typů myosinů lze najít různé kombinace isoform MyLC a MyHC, které poskytují širokou škálu isoform

celých myosinových komplexů (Bottinelli et al., 1994). Tyto se jemně odlišují ve svých biochemických, fyzikálních a biofyzikálních vlastnostech. MyHC dimerizují prostřednictvím svých α -helikálních oblastí tvořících v dimeru strukturu nadšroubovice, tzv. „coiled coil“. Na C-konci každé molekuly MyHC se nachází vláknitý α -helikální krček, který pojí globulární S1 fragment s oblastí „coiled coil“. Hlavička nese aktin vázající doménu a ATP vazebné místo s ATPázovou aktivitou; má tedy veškerou enzymatickou aktivitu MyHC, která je nepostradatelná pro posun myosinu po aktinu a tedy pro kontrakci svalu (d'Albis a Butler-Browne, 1993; pro přehled Murray: Harperova biochemie, 2001) (Obrázek 1.)

Odhaduje se, že myosin zaujímá zhruba 25% celého proteinového obsahu buňky kosterního svalu (Baldwin a Haddad, 2001).



Obrázek 1. **Terciální a kvartérní struktura molekuly myosinu třídy II.** Nalevo (a) je zobrazeno prostorové uspořádání celého myosinového komplexu. Jsou znázorněny těžké řetězce a rozložení obou typů lehkých řetězců. Molekula je rozdělena na hlavní strukturální celky, tedy na globulární hlavičku, krček spojující filamentární část s hlavičkou a na filamentární část. Vpravo (b) je patrné třidimenzionální detailní uspořádání lehkých řetězců okolo krčku a struktura globulární části molekuly. Jsou zvýrazněna vazebná místa pro aktin a ATP. Filamentární část není uvedena.

Převzato a upraveno podle Lodish et al., 2003.

1.1 Isoformy těžkých řetězců myosinu třídy II (MyHC)

Isoformy MyHC se obecně dělí do dvou základních skupin, které reprezentují pomalé isoformy typu I a rychlé isoformy typu II. Pro kosterní sval dospělého hlodavce jsou typické následující isoformy: MyHC I (také β či I β) a MyHC IIa (Danieli-Betto et al., 1986), MyHC IIx/d (také IId, IIx či IIxd) (LaFramboise et al., 1990) a MyHC IIb (Danieli-Betto et al., 1986). Tyto isoformy jsou u potkana kódovány geny MYH 7, MYH 2, MYH 1 a MYH 4 v uvedeném pořadí (pro přehled Přenosil, Bakalářská práce, 2006). U člověka a dalších velkých savců nedochází k expresi MyHC IIb (Smerdu et al., 1994), přestože gen pro tuto isoformu mají (Weiss et al., 1999a, 1999b). Tato isoforma nebyla zjištěna ani u kočky (Talmadge et al., 1996).

ATPázová aktivita isoform MyHC vzrůstá podle schématu I \rightarrow IIa \rightarrow IIx/d \rightarrow IIb (pro přehled Pette a Staron, 2001). Míra ATPázové aktivity odpovídá rychlosti pohybu dané isoformy po vlákně aktinu a tedy i kontrakce svalu.

Vyjma výše uvedených isoform MyHC mohou být v kosterním svalu přítomny ještě isoformy embryonální (E) a perinatální (P), které jsou nezbytné pro vyvíjející se sval (Hoh a Yeoh, 1979). Tyto isoformy jsou u potkana kódovány geny MYH 3 a MYH 8 (pro přehled Přenosil, Bakalářská práce, 2006). Jejich ATPázová aktivita je podobná jako u dospělých rychlých isoform MyHC a nelze je odlišit pomocí metod vizualizace ATPázové aktivity (Fitzsimons a Hoh, 1981). Tyto dvě isoformy jsou mimo vyvíjející se svaly přítomny i v regenerujících svalových vláknech či v dospělých extraokulárních svalech potkana (Kjellgren et al., 2003), žvýkacích svalech potkana (Whalen et al., 1981), myši (d'Albis et al., 1986) a člověka (Butler-Browne et al., 1988) a v napínači bubínku (musculus tensor tympani) krávy a prasete (Scapolo et al., 1991). Existují i další svalově i druhově vysoce specifické isoformy MyHC. Mezi ně patří superrychlé „superfast“ isoformy žvýkacích svalů (MyHC II_m) popsané u kočky (Rowlerson et al., 1981) a dalších karnivorů, u primátů mimo člověka (Rowlerson et al., 1983) a u extraokulárních svalů (MyHC eom) (Kjellgren et al., 2003). Dále do této skupiny patří pomalé tonické „slow-tonic“ MyHC (MyHC I_{ton}) extraokulárních svalů člověka (Kjellgren et al., 2003) a potkana (Mascarello a Rowlerson, 1992), žvýkacích svalů (Mascarello a Rowlerson, 1992) a intrafusálních vláken svalových vřetének (pro přehled Soukup a Jirmanová, 1999). Srdeční

isoforma MyHC I α (také α) byla popsána v lidských extraokulárních svaích (Kjellgren et al., 2003), svalových vřetěnkách (Pedrosa et al., 1990), bránici (Hämäläinen a Pette, 1997), žvýkacích svaích králíka (d'Albis et al., 1993a), člověka a klokana (d'Albis et al., 1991b; d'Albis et al., 1993a, Hoh et al., 2000). Další minoritní isoformou MyHC je laryngeální isoforma MyHC IIL svalů regulujících funkci laryngu (např. musculus thyroarytenoideus, cricoarytenoideus či cricotyroideus) (pro celkový přehled d'Albis a Butler-Browne, 1993). Je však také možné, že superrychlé, extraokulární a laryngeální isoformy MyHC jsou vlastně jedna a tatáž isoforma či pouze pre- nebo post-translačně modifikované isoformy (Lucas et al., 1995). Pro základní úvahy však platí, že každá isoforma MyHC kosterního svalu je kódována vlastním genem a má svou typickou ATPázovou aktivitu (Schiaffino a Reggiani, 1996).

Expese isoformem MyHC je regulována na úrovni transkripce, translace a současně na úrovni alternativního sestřihu primárních transkriptů a stability mRNA (pro přehled Schiaffino a Reggiani, 1996). Bylo prokázáno, že svaly SOL a EDL transkribují mRNA všech isoformem MyHC dospělých svalů, přestože sval může, ale nemusí translatovat všechny tyto typy mRNA (Caiozzo et al., 1998; Vadászová, 2006). V SOL dochází k transkripci mRNA pro všechny čtyři isoformy MyHC dospělého svalu, tedy MyHC I, IIa, IIx/d a IIb, přestože v detekovatelné míře pomocí SDS-PAGE jsou translatovány pouze MyHC I a IIa. Důvod, proč k tomuto jevu dochází, není zcela objasněn (Caiozzo et al., 1998; Vadászová et al., 2006).

2. Typy svalových vláken

U dospělých svalů sestávají ze čtyř základních typů isoform MyHC čtyři základní typy svalových vláken, tedy I, IIA, IIX/D a IIB s korelujícím vzestupem ATPázové aktivity (Bottinelli et al., 1991).

Ve fetálním a perinatálním stádiu vývoje obsahují svalová vlákna embryonální a perinatální isoformy MyHC (perinatální isoforma MyHC bývá také označována jako neonatální (N)) (pro přehled d'Albis a Butler-Browne, 1993).

Rozdílné ATPázové aktivity se využívá pro vizualizaci jednotlivých typů svalových vláken pomocí histochemické metody barvení. Původní metoda a její modifikace využívají rozdíly v pH stabilitě ATPázové aktivity MyHC v daném vlákně (Guth a Samaha, 1969). Pomalá vlákna tedy vykazují nižší a rychlá vlákna vyšší ATPázovou aktivitu. Touto metodou však nelze spolehlivě odlišit vlákna IIX/D od vláken IIA a IIB *. Toto odlišení je však možné pomocí imunohistochemického značení, které využívá specifické monoklonální protilátky proti MyHC. Tak je možné snadno odlišit všechny isoformy i isoformu MyHC IIX/d a tím příslušná IIX/D svalová vlákna na trvalém preparátu. Všechny isoformy lze též detekovat i elektroforeticky pomocí SDS-PAGE (Talmadge a Roy, 1993; Soukup et al., 2002).

Pomocí výše uvedených metod bylo zjištěno, že existují nejenom „čistá“ vlákna obsahující pouze jednu isoformu MyHC, ale i vlákna smíšená, hybridní, obsahující dvě i více isoform MyHC (Termin et al., 1989). Hybridní vlákna jsou označována dle přítomných isoform MyHC, označení před lomítkem uvádí převažující isoformu MyHC. Hybridní vlákna tedy jsou: I/IIA (také IC), IIA/I (také IIC), IIA/D, IID/A, IID/B a IIB/D. Z označení je patrné, že jsou zpravidla pohromadě v jednom vlákně právě sousední isoformy MyHC v řadě stoupající ATPázové aktivity. Celková ATPázová aktivita hybridních vláken odpovídá aktivitě ležící mezi dvěma sousedními „čistými“ vlákny a s ní spojená rychlost kontrakce svalu tedy stoupá v pořadí vláken:

I → I/IIA → IIA/I → IIA → IIA/D → IID/A → IID → IID/B → IIB/D → IIB

(Pette et al., 1999).

Za zvláštních experimentálních podmínek, které kombinují například změnu hladiny tyroidních hormonů a zároveň mechanickou úlevu svalů od zátěže, byla pozorována i hybridní vlákna, která obsahovala isoformy MyHC nesousedící v řadě stoupající ATPázové aktivity (Caiozzo et al., 1998). Hybridní vlákna byla nalezena jak během procesu přeměny svalových vláken, tak i mimo tuto fázi. Tato pozorování mohou poukazovat na skutečnost, že smíšená vlákna nejsou jen dočasný projev přeměny svalového vlákna, ale že jsou trvale přítomná a funkčně výhodná (Pette a Staron, 2001).

Porovnání naměřených dat zastoupení typů svalových vláken v SOL a EDL potkanů různých linií (Lewis, Wistar, Sprague-Dawley a WBN/Kob nondiabetic) ukázalo, že kompozice svalových vláken různých typů v EDL a SOL je mezi těmito liniemi podobná. Jinými slovy kompozice různých typů svalových vláken se mezi inbredními liniemi potkanů Lewis a liniemi outbredními liší jen velmi málo. Jedinou výjimkou byl nález signifikantně většího množství vláken typu I v SOL linii Lewis u 4 a 6 měsíčních jedinců oproti linii Sprague-Dawley. Existuje však významná variabilita v zastoupení typů svalových vláken mezi jednotlivými potkany a to jak u outbredních tak i u inbredních linií (Soukup et al., 2002). Tato variabilita se přiřazuje genetickým faktorům a předpokládá se, že je proto větší u outbredních linií. V kosterních svalech existují 3 typy variability poměrného zastoupení typů svalových vláken: a) variabilita mezi jednotlivými potkany stejného stáří, b) variabilita odrážející věkové rozdíly a to především v SOL, c) variabilita mezi liniemi (ústní sdělení RNDr. Tomáše Soukupa, CSc).

* Histochemické odlišení vláken IIX/D je umožněno modifikací využívající preinkubaci ve formaldehydu s následnou alkalizací a adicí PbN_2O_6 do média (Hämäläinen a Pette, 1993).

3. Mechanismy tranzice svalových vláken

Sval je schopen se přizpůsobit určité zátěži či stimulaci změnou procentuálního zastoupení pomalé a rychlých isoform MyHC respektive změnou zastoupení jednotlivých typů vláken. V anglosaské literatuře je tato změna označována pojmem tranzice.

Expresí určité isoformy MyHC daného svalového vlákna dospělého savce obecně je výsledek kombinace vnitřního genetického programu linie myoblastů, ze které se sval vytváří a vnějších vlivů, jako je inervace, mechanické a hormonální faktory. Samozřejmě že vnější vlivy působí pouze v mantinelech vytyčených genetickými možnostmi svalu či svalového vlákna (d'Albis a Butler-Browne, 1993).

Jak již bylo zmíněno, na úrovni poměrného zastoupení isoform MyHC dochází k tranzicím mezi jednotlivými isoformami MyHC. Ta může být směrem k isoformám pomalejším nebo rychlejším. Téměř vždy sleduje obecné schéma postupné náhrady, které bylo odvozeno z časově závislých změn v poměrném zastoupení isoform MyHC svalů procházejících přechodem od pomalého svalu k rychlejšímu či naopak (Pette et al., 1999) podle vzorce:

MyHC I β ↔ MyHC IIa ↔ MyHC IIx/d ↔ MyHC IIb (Bottinelli et al., 1994).

Příloha 1. dokládá obecné schéma tranzice MyHC fenotypu kosterního svalu v závislosti na tyroidním stavu.

3.1 Koexprese MyHC

Termínem koexprese se rozumí současná exprese více typů isoform MyHC v rámci jednoho hybridního svalového vlákna. Tento jev se projevuje současnou pozitivní reakcí vlákna na více než jednu protilátku proti různým isoformám MyHC a může dokládat právě probíhající tranzici isoform MyHC.

Změna MyHC v SOL navozená tyroidními hormony u starých i mladých potkanů zapříčinila, že některá vlákna koexprimovala MyHC I a IIa, zatímco jiná koexprimovala MyHC I, IIa a IIx/d. Schiaffino et al. (1990) předpokládají existenci alespoň dvou populací vláken typu I v normálním SOL potkana, které reagují na změnu koncentrace tyroidních hormonů odlišným způsobem. Tato skutečnost souhlasí s dalšími nálezy (Caiozzo et al., 1998), které též podporují koncepci existence zvláštní subpopulace vláken typu I v SOL. U této subpopulace též byla pozorována odlišnost v rychlosti reakce na tyroidní hormony a mechanickou úlevu („handlimb suspension“) svalu od zátěže od ostatních vláken téhož typu.

3.2 Degradace MyHC a jejich syntéza „de novo“

Důležitou úlohu ve vzniku nového pomalého či rychlého fenotypu kosterního svalu hraje degradace stávajících proteinů vedle probíhající exprese genů pro nové isoformy MyHC. Degradace je důležitá pro rychlou náhradu nepotřebných isoform MyHC. Během chronické nízkofrekvenční stimulace (CLFS) byla zjištěna silná aktivace proteolytického systému buňky (Sultan et al., 2001). Též hypertyroidismus zvyšuje míru degradace proteinů (Carter et al., 1981).

Dalším důležitým mechanismem je inkorporace nově syntetizované isoformy MyHC do myosinových filament, přesný mechanismus ovšem není znám. Saad a spolupracovníci (1991) ukázali, že extensivní výměna molekul myosinu probíhá podél celé délky umělého myosinového filamenta. Bohužel se jedná pouze o přibližný model, neboť experiment byl prováděn *in vitro* a myosinové filamentum bylo složeno též *in vitro*. Naopak Staron a Pette (1987) pozorovali neuniformní myosinovou expresi podél jediného vlákna musculus tibialis anterior králíka při stimulaci pomocí CLFS. Vysoká koordinace exprese isoform MyLC a MyHC byla

detekována ve vláknech SOL u mladých i starých hypertyroidních potkanů. Autoři tím dokládají, že míra koordinace inkorporace myosinových isoformů do myosinového filamenta navozená tyroidními hormony není věkem ovlivněna (Li et al., 1996).

Z uvedených výsledků vyplývá, že tyroidní hormony spolu s dalšími faktory jako jsou mechanické a neurální vlivy, mohou ovlivnit syntézu a degradaci molekul myosinu i jejich inkorporaci do myosinových filament.

3.3 Molekulární mechanismy tranzice

Následující odstavce nejsou zdaleka úplným výčtem všech regulačních mechanismů podílejících se na tranzici isoform MyHC, neboť existuje mnoho signálních drah a proteinů podílejících se na tomto ději. Zde jsou uvedeny pouze dva nejzákladnější regulační mechanismy ve spíše ilustračním kontextu pro zdůraznění složitosti, komplexnosti a náročnosti procesů tranzice isoform MyHC.

Významnou kaskádou je v cytoplazmě probíhající defosforylace jaderných faktorů NFAT (jaderné faktory aktivovaných T buněk – nuclear factors of activated T cells) calcineurinem (Ca^{2+} /calmodulin-dependentní serin/threoninová protein-fosfatáza), který umožňuje jejich translokaci do jádra (Rao et al., 1997). V jádře se NFAT proteiny váží na specifické nukleotidové sekvence promotorů a enhancerů a spouštějí tak transkripci genů specifických pro pomalá vlákna. Různá aktivace genů specifických pro rychlá a pomalá vlákna přes calcineurinovou cestu může být spojena s množstvím Ca^{2+} uvolněného do cytoplazmy a dobou trvání tohoto výlevu (Dolmetsch et al., 1997), která je podmíněna vzorcem neuronálních impulsů inervujících sval či zátěží na sval vyvíjenou (Olson a Williams, 2000).

Druhá signální dráha zahrnuje Ras-dependentní mitogenem aktivovanou protein kinázu (MAPK), která by se též mohla podílet na podpoře nervově dependentní exprese pomalé isoformy MyHC I (Murgia et al., 2000). V in vivo studii bylo prokázáno, že konstitutivně aktivní Ras a Ras mutanta, které selektivně aktivují MAPK(ERK) kaskádu u denervovaného SOL, jsou schopni napodobit efekt inervace pomalého motoneuronu na expresi myosinových genů. Aktivita kinázy MAPK(ERK) narůstá pod vlivem inervace SOL a CLFS. Podle této studie je tedy Ras plně postačující k aktivaci exprese pomalé isoformy MyHC v denervovaném regenerujícím SOL. Dále bylo zjištěno, že pomalé motoneurony nemohou indukovat expresi MyHC I, když je signalizace pomocí Ras inhibována. Z údajů vyplývá, že pomalá nervová stimulace indukující expresi MyHC I v SOL aktivuje Ras dependentní MAPK(ERK) signalizační dráhu.

4. Prenatální vývoj kosterního svalu obratlovců

Kosterní svaly mají původ v mezodermálních somitech, konkrétně v jejich částech zvaných myotomy (Holtzer et al., 1957). Nejranější formace svalových vláken je patrná v rostrálně lokalizovaných somitech, odkud lze pozorovat kaudální směr jejího pokračování (Buonanno a Rosenthal, 1996). Některé buňky laterálních částí myotomů migrují do končetin jako svalové prekurzory, kde začnou exprimovat myogenní regulační faktory (Ott et al., 1991). Následuje přehled těch nejdůležitějších z nich.

Myogenní regulační faktory (MRF „myogenic regulatory factors“) jsou transkripční faktory, které spouštějí expresi významných proteinů nezbytných pro správný vývoj svalu. Skupinu MRF tvoří čtyři hlavní, strukturně si podobné proteiny - myogenin, MyoD, myf5 a MRF4. Patří do rodiny základních helix-loop-helix proteinů (bHLH) a vytvářejí heterodimery s E-proteiny, což umožňuje jejich vazbu na DNA do oblasti E-boxu. Tato vazba je regulována na kompetitivní úrovni inhibičním heterodimerem MRF/Id. Id je též protein ze skupiny bHLH. MyoD a myogenin mají svou úlohu i v procesu diferenciaci fenotypu u dospělých svalů (pro přehled Olson, 1993). Podle výsledků Eftimie a spolupracovníků (1991) je obsah myogeninu a MyoD regulován inervací svalu, neboť denervace způsobuje jejich nárůst.

Genetické studie ukázaly, že mezi jednotlivými faktory panuje hierarchické uspořádání v regulaci myogeneze. MRF jsou exprimovány čistě jen v buněčných liniích dávajících vzniknout kosternímu svalu (Buonanno a Rosenthal, 1996). MyoD či myf5 jsou potřebné pro formaci a přežití myoblastů, zatímco myogenin hraje roli až později během vývoje a je nezbytný pro terminální diferenciaci myotub na svalová vlákna (pro přehled Miller, 1992), která jsou již pod vlivem dalších faktorů. Na myších bylo ukázáno, že v buněčné kultuře interaguje T3 s genem myoD, který působí jako regulátor. Tato interakce zvyšuje schopnost proliferace myoblastů a tím i svalovou regeneraci (Anderson et al., 1998). Existují i další faktory, které myogenezi stimulují (např. skupina IGF) nebo naopak potlačují (např. základní fibroblastový růstový faktor bFGF) (pro přehled Florini et al., 1991).

Zjednodušeně řečeno svalová vlákna vznikají zráním mnohojaderných myotub, které vznikají fúzí jednojaderných myoblastů. Myoblasty jsou heterogenní skupinou buněk a jejich geneticky dané rozdíly, vymezující jejich typ, interagují s vnějšími faktory nezbytnými pro vznik optimálního fenotypu svalu (pro přehled Miller a Stockdale, 1986). Dle období jejich výskytu a exprese proteinů dělíme myoblasty na tři typy. Jedná se o typ embryonální, fetální a dospělý, které jsou také označovány jako primární, sekundární a satelitní v uvedeném pořadí (Stockdale a Miller, 1987). Hoh a spolupracovníci (1988) vyslovili hypotézu, že myoblasty jsou původně homogenní skupinou buněk, která se stává heterogenní (vznikají různé typy myoblastů) vlivem okolních podmínek ve svalu. Autoři také předpokládají, že různé typy myoblastů jsou předprogramovány na expresi různých typů myosinu během dalšího vývoje.

Bylo prokázáno, že embryonální myoblasty končetinových pupenů myši dávají vzniknout myotubám exprimujícím pomalou i rychlé isoformy MyHC, zatímco fetální myoblasty dávají vzniknout myotubám, jež prvotně exprimují pouze rychlé isoformy MyHC. Narozdíl od fetálních myoblastů nemohou embryonální myoblasty tvořit vlákna exprimující perinatální isoformu MyHC. Fetální myoblasty jsou pozorovány v období, kdy je formace vláken již ovlivněna inervací (pro přehled Stockdale, 1992). In vitro studie ukázaly, že dospělé myoblasty rychlých svalů exprimují pouze rychlé isoformy MyHC a dospělé myoblasty pomalých svalů dávají vzniknout vláknům exprimujícím buď pouze rychlé isoformy MyHC či vláknům, která exprimují pomalou i rychlé isoformy MyHC zároveň (pro přehled Stockdale, 1992).

Embryonální myoblasty fúzí v primární myotuby, které se postupně prodlužují a jejich řetězce se pojí na protilehlé šlachy svalu. Proces formace primárních myotub není závislý na přítomnosti motorické inervace (pro přehled Condon et al., 1990). Fetální myoblasty se podél primárních myotub na jejich povrchu, sloužícím jako lešení, spojují v sekundární myotuby, které se dále prodlužují. Tento proces probíhá lokalizován pod společnou bazální laminou (Miller a Stockdale, 1989) a zároveň v blízkosti motorické inervace primární myotuby (Ross et al., 1987b), přestože jsou myoblasty rozmístěny ve svalu rovnoměrně (Duxson et al., 1989). Nakonec se oba typy myotub od sebe oddělí bazální laminou. Je pravděpodobné, že inervace primárních myotub je nutná pro indukci proliferace

myoblastů a následně pro vznik sekundární myotuby (Condon et al., 1990). K dozrávání sekundární myotuby dochází po zániku prvotní polyneurální inervace (inervace více motoneurony) a následné polyterminální inervace (inervace jedním motoneuronem více synapsemi) a po vzniku inervace monoterminální. Až po té se může vyvinout zralé svalové vlákno inervované monoaxonálně a monoterminálně a uplatnit vliv frekvence impulsů na expresi specifických isoform MyHC (pro přehled Pette a Vrbová, 1985; Condon et al., 1990). Naproti tomu výsledky Butler-Browne a spolupracovníků (1982) ukazují, že je-li provedena denervace později během života sekundární myotuby, přesto dojde k diferenciaci svalového vlákna. Ross se spolupracovníky (1987b) dokonce prokázali, že v embryonálním stádiu vývoje se nové sekundární myotuby tvoří i po destrukci postsynaptické membrány nervosvalového spojení β -bungarotoxinem v místě, kde inervace před zničením probíhala. Dle Harrise a spolupracovníků (1989) se sekundární myotuby liší od primárních způsobem, jakým myoblasty fúzí za jejich vzniku.

U potkanů (Ross et al., 1987b) a myší (Ontell a Kozeka, 1984) existuje zhruba dvoudenní odstup mezi dobou tvorby primárních a sekundárních myotub. Množství sekundárních myotub závisí na různých faktorech, například na výživě v těhotenství (Wilson et al., 1988), zatímco počet myotub primárních je pevně daný.

U většiny obratlovců probíhá proces formace vláken ve dvou vlnách (formace primárních a sekundárních myotub a z nich se následně formují primární a sekundární vlákna) (Ontell a Kozeka, 1984; Ross et al., 1987a). U člověka byla navíc zaznamenána existence terciálních myotub v musculus quadriceps femoris. Tyto terciální myotuby vznikají těsně u myotub sekundárních (Draeger et al., 1987).

Divergence pomalých a rychlých vláken se objevuje časně během diferenciaci svalového vlákna; odlišnosti mezi prekurzorovými myotubami pro pomalá a rychlá vlákna se objevují již u myotub polyneurálně inervovaných a rozdíly mezi nimi přetrvávají i po denervaci (pro přehled Hoh, 1991). Nezbytným faktorem pro diferenciaci typu svalového vlákna je inervace, neboť typ nervové aktivity motoneuronu podmiňuje určité myosinové složení svalu, jak během postnatálního vývoje, tak v dospělých svaích (pro přehled Salmons a Henriksson, 1981; Soukup a Jirmanová, 2000).

Formace svalových vláken u hlodavců se plně rozvíjí během třetí třetiny fetálního vývoje (Condon et al., 1990) a trvá až do prvního týdne po narození (Betz et al., 1979). Přeměna vyvíjejících se vláken potkana ve vlákna dospělého jedince je většinou zakončena během třetího týdne života (Butler-Browne a Whalen, 1984). K úplné zralosti však dochází později (kapitola 5.).

Embryonální a perinatální isoformy MyHC jsou exprimovány v pozdní fázi fetálního vývoje a u novorozenců převažuje perinatální isoforma. Během prvních týdnů postnatálního života dochází k nástupu exprese pomalé isoformy MyHC I v pomalých svalech a rychlých isoformem MyHC IIa, IIx/d a IIb v rychlých svalech (Butler-Browne a Whalen, 1984).

Hoh a spolupracovníci (1988) spatřují důvody odlišnosti obsahu pomalé a rychlých isoformem MyHC v SOL a EDL ve vysokém poměru sekundárních myotub ku primárním v EDL. Dále ve vysokém podílu rychlých sekundárních myotub ku pomalým sekundárním myotubám a současně v neurogenní konverzi pomalých sekundárních myotub na rychlé. V SOL je situace přesně opačná, tedy je zde větší poměr primárních myotub ku sekundárním, většina sekundárních myotub je pomalá a většina rychlých myotub konverguje na pomalé. Zdá se tedy, že faktorem ovlivňujícím množství a tedy i poměr různých typů myoblastů jsou mimo inervace i lokálně působící agens, patrně genetického původu. To potvrzují nálezy Howalda (1982) dokládající, že regulace distribuce typů vláken u člověka je silně podmíněna dědičností.

Vliv inervace na vývoj svalu je dvojitý. První je specifický - kvalitativní, podmiňující výskyt isoformem MyHC, tedy celkově myoregulační a diferenciací. Druhý je obecný - kvantitativní, myotrofický, umožňující růst svalové hmoty. Inervace asociovaná se sekundární myotubou spíše umožní expresi isoformy MyHC předurčené myoblasty, než aby determinovala, jaké isoformy MyHC se budou v myotubě exprimovat. Nervová trofizace vláken však nabývá na silnějším vlivu teprve v dalším vývoji (Hoh et al., 1988).

Podle prací Rubinstein a Kelly (1978) a Gambke et al. (1983) je vývoj rychlých svalů nervově nezávislý, zatímco vývoj svalů pomalých nikoli.

5. Postnatální vývoj svalu potkana

Od období těsně před narozením do dospělosti prochází sval dvěma základními vývojovými etapami. První z nich, trvající přibližně od narození do 4. týdne, zahrnuje fáze diferenciaci a maturace svalu, druhá etapa zahrnuje fázi růstu. Diferenciací a maturací se rozumí období, kdy svalové buňky prodělávají rychlé kvantitativní a kvalitativní změny ve svých subcelulárních fyziologických, biochemických a metabolických vlastnostech (kapitola 4.) a současně se diferencují typy svalových vláken (Baldwin, 1984). Období růstu je fází, ve které sval zvětšuje své rozměry a většina jeho fyziologických a biochemických vlastností je již plně vyvinuta. Fáze růstu trvá u potkana od 4. do 16. týdne postnatálního života. Po tomto období je sval již zralý. Uměle navozenými podmínkami (např. stres) lze ovlivňovat vývoj svalu a MyHC fenotyp v každém období (kapitola 6.) (Baldwin, 1984).

V období diferenciaci svalových vláken lze rozlišit ranější období tvorby MyHC I z MyHC E a pozdější období exprese MyHC P jež slouží jako prekurzor tvorby isoform MyHC typu II (Condon et al., 1990). Adams se spolupracovníky (1999) zkoumali změnu zastoupení isoform MyHC E, P, I a IIa v EU a HY SOL od 7. dne po narození do konce 1. měsíce života a změnu zastoupení isoform MyHC E, P, I, IIa, IIx/d a IIb v EU a HY EDL ve stejném časovém rozmezí.

V SOL bylo zjištěno, že do konce prvního měsíce života klesá množství embryonální isoformy MyHC E z 30 % pod detekovatelnou mez za EU i HY stavu. Perinatální isoforma MyHC P klesá z původního zastoupení 10 % pod úroveň detekce jen u EU jedinců. U HY jedinců byl na konci prvního měsíce obsah této isoformy měřitelný a vykazoval 7 % zastoupení. U isoformy MyHC I byl do konce prvního měsíce života zaznamenán nárůst z původních 55 % na 80 %, který byl u HY jedinců ještě o několik procent zvýšen. Největšího rozdílu mezi EU a HY stavem doznala isoforma MyHC IIa, u které se ustálilo plató už po dvou týdnech života. Její obsah po prvním měsíci života byl u EU jedinců pod hranicí 20 %, u HY jedinců poloviční. Její výchozí zastoupení bylo pod úrovní 5 % (Adams et al., 1999).

V EDL byly pozorovány velké rozdíly mezi EU a HY stavem u perinatální isoformy MyHC P, kde z původních 60 % kleslo do konce prvního měsíce života její zastoupení pod měřitelnou mez u EU stavu, avšak u HY stavu byl minimální pokles

pouze o několik procent. U embryonální isoformy MyHC v EU stavu došlo z původního množství 25 % k poklesu pod mez detekce už po třech týdnech života, u HY stavu o týden později. Množství pomalé isoformy MyHC I bylo po měsíci života EU jedinců nezměněno a udržovalo se na hranici 5 %, avšak u HY jedinců byl na konci prvního měsíce zaznamenán nárůst až na 15 %. Zatímco množství rychlé isoformy MyHC IIb silně vzrostlo z původních 2 % na 70 % u EU jedinců, u HY jedinců po přechodném zvýšení došlo ke konci prvního měsíce života pouze k malému nárůstu. Zastoupení isoformy MyHC IIx/d vzrostlo z původně nedetekovatelného množství až na 25 % u EU jedinců, u HY jedinců byl nárůst pouze na hranici 10 %. U isoformy MyHC IIa byl z původních 6% zaznamenám velice slabý nárůst okolo hranice 10 % u EU i HY jedinců (Adams et al., 1999).

Z těchto výsledků vyplývá, že kritická perioda nezbytná pro vytvoření dospělého fenotypu isoformem MyHC potkana je minimálně do konce prvního kalendářního měsíce od narození. To souhlasí s údaji Baldwina (1984). Dále bylo potvrzeno, že hypotyreoidní stav brzdí nástup dospělých isoformem MyHC a podporuje expresi pomalé isoformy MyHC I (Adams et al., 1999).

Raný postnatální vývoj svalových vláken se snažili zachytit Butler-Browne a Whalen (1984). Zjistili, že během prvního měsíce postnatálního života existují v SOL dvě skupiny vláken rovného zastoupení. Vlákná jedné skupiny mají ve věku jednoho týdne větší průměr a obsahují embryonální isoformu MyHC E a isoformu MyHC I. Podle autorů tato vlákna budou v dalších fázích vývoje obsahovat pouze isoformu MyHC I. V druhé skupině jsou vlákna ve věku prvního týdne menšího průměru a obsahují embryonální E a perinatální P isoformy MyHC a v dalších fázích vývoje budou obsahovat isoformu MyHC IIa. Dva týdny po narození jsou rozdíly v průměrech vláken menší. V této době vlákna reagující pouze s protilátkou proti MyHC I vykazovala histochemický profil vláken I a druhá skupina vláken byla dvojitě barvena pomocí protilátky proti embryonální E a perinatální P isoformě MyHC. Tato vlákna vykazovala histochemický profil vláken typu IIa. Většina vláken ve třetím týdnu postnatálního života obsahovala MyHC I nebo směs embryonální a perinatální isoformy MyHC a MyHC IIa; malá část vláken (pod 5 %) reagovala s protilátkami proti MyHC I a perinatální isoformě MyHC. Ve čtvrtém týdnu se podíl vláken reagujících s protilátkou proti MyHC I zvýšil k 70 % a v šestém týdnu vlákna

reagovala buď na protilátku proti MyHC I (80-90 %) či rychlým isoformám a pouze 0,2 % vláken reagovaly s protilátkami proti perinatální isoformě MyHC.

Tyto výsledky korelují se zjištěním Adamse a spolupracovníků (1999), že minimální doba pro vytvoření dospělého fenotypu isoform MyHC je jeden měsíc. Přítomnost mRNA isoform MyHC IIa, IIx/d a IIb byla detekována v SOL i EDL postnatálně nejdříve mezi 2. a 5. dnem (DeNardi et al., 1993).

Z výše uvedeného vyplývá, že minimální doba potřebná pro formaci dospělého svalu je jeden měsíc. Avšak plné myosinové diferenciaci svalu je dosaženo později, například u SOL až po 7 – 8 měsících (Soukup et al., 2002) a EDL po 2. měsíci postnatálního života (ústní sdělení RNDr. Tomáše Soukupa CSc.).

6. Plasticita svalového fenotypu

Sval se stále přizpůsobuje mnoha různým podnětům, které přicházejí z vnějšího i vnitřního prostředí organismu za účelem co největší efektivity práce za daných podmínek.

Plasticitou svalového fenotypu se v této práci rozumí schopnost svalu reagovat na změnu zátěže či stimulace iniciací tranzice.

Na spuštění tranzice isoformem MyHC má vliv mnoho faktorů. Jedná se o frekvenci nervových impulsů závislých na aktivitě motoneuronů, cvičení či jakékoli jiné zatížení svalu, stáří či hormonální hladiny (pro přehled Soukup a Jirmanová, 2000; Pette a Staron, 2001).

6.1 Inervace a nervosvalová aktivita

Dopad inervace na ustavení svalového fenotypu během vývoje i v dospělosti a následné udržení tohoto fenotypu byl demonstrován v mnoha pracích, například Pette a Vrbová, 1985; d'Albis et al., 1994. Po denervaci dochází obecně ke zpomalení rychlých svalů a zrychlení pomalých svalů (d'Albis et al., 1994) a to u i „totální“ denervace provedené přetětím míchy (Jiang et al., 1990). Stejný efekt navozuje křížová inervace (Buller et al., 1960), kdy se pomalý sval reinervuje rychlým nervem, tedy nervem vykazujícím vysokofrekvenční stimulaci a rychlý sval se reinervuje nervem pomalým vykazujícím nízkofrekvenční stimulaci. Práce tohoto autora byly první, které prokázaly úzký vztah mezi vlastnostmi svalů a typem jejich inervace. Efekt křížové inervace lze také simulovat elektrickou stimulací. CLFS u rychlého svalu vyvolá zpomalení jeho fenotypu, tedy tranzici isoformem MyHC směrem k pomalejším (Salmons a Vrbová, 1969). PHFS označuje fázickou vysokofrekvenční stimulaci (phasic high-frequency stimulation), kdy se naopak pomalý sval stimuluje k tranzici k rychlejším isoformám MyHC (Gorza et al., 1988). Bez ohledu na dobu působení těchto stimulů nedojde nikdy k úplné tranzici všech isoformem MyHC a transformaci vláken (Gorza et al., 1988).

6.2 *Trénink a cvičení*

Adaptace probíhající v důsledku cvičení jsou kvalitativně podobné avšak kvantitativně menší než ty, které probíhají pod vlivem CLFS či PHFS. Vytrvalostní cvičení má za následek změny podobné stimulaci CLFS, silové či dynamické cvičení simuluje stimulaci PHFS (Pette a Staron, 2001).

Výzkumy na lidských svalech ukázaly, že svaly špičkových maratónců obsahují až 95 % pomalých vláken. Naproti tomu svaly sprinterů a vzpěračů obsahují převážně IIA a IIX/D či hybridní IIA/ IIX/D vlákna (Andersen et al., 2000).

6.3 *Vliv zvýšení či snížení mechanického zatížení svalu (mechanical loading/unloading)*

Sval kompenzuje zvýšení či snížení mechanického zatížení změnou exprese MyHC isoformem. Mezi mechanickou úlevu patří metody přetětí šlachy, imobilizace končetiny ve skrčené pozici, zvednutí zadní končetiny nad podložku (tzv. „hindlimb suspension“) či poklesu gravitační síly (pro přehled Pette a Staron, 1997). Pomalé svaly se stávají rychlejšími (Vrbová, 1963) a rychlé svaly se ještě dále urychlují (Adams et al., 2000). Velmi zajímavé bylo zjištění, že tranzice isoformem MyHC v SOL potkana navozená mikrogravitací a pobytem ve vesmíru vedla k nárůstu isoformy MyHC IIX/d, nikoli IIA a isoforma MyHC IIX/d byla ve větším množství než IIA. V tomto případě tedy neplatí, že tranzice běží vždy k neblížíší sousední isoformě MyHC (Caiozzo et al., 1994, 1996). Ukazuje se, že vliv gravitace je nezbytný na správný vývoj pomalého antigravitačního svalu a odpovídá do určité míry tréninku. Při absenci gravitace dochází k menšímu nárůstu svalové hmoty a ke zvětšení exprese rychlé isoformy MyHC IIA (Adams et al., 2000).

Zvýšené mechanické zatížení je reprezentováno též přetětím šlachy, zkoumá se však sval antagonický oproti svalu, jemuž byla šlacha přeřata. Další možností navození mechanického zatížení je fixace končetiny v nataženém stavu (Pattullo et al., 1992). V těchto případech dochází k nárůstu rychlejších isoformem MyHC (Loughna et al., 1990). Při fixaci končetiny ve zkrácené poloze dochází k dočasnému poklesu elektrické stimulace pomalého i rychlého svalu (Fournier et al.,

1983). Při fixaci v poloze neutrální (svaly jsou ve své klidové délce) dochází k poklesu elektrické stimulace pomalého svalu, nikoli však rychlého a při fixaci v poloze prodloužené nedochází ke změně elektrické stimulace ani pomalého ani rychlého svalu (Pattullo et al., 1992). Nárůst zátěže svalu obecně způsobuje nárůst elektrické aktivace svalu a tomu odpovídající tranzici MyHC (Roy et al., 1991).

6.4 Hormony a vliv pohlaví

Fenotyp svalu reaguje na hladiny pohlavních i nepohlavních hormonů, případně dochází k jejich kombinovanému účinku.

Expresí MyHC závislá na pohlaví byla pozorována v souvislosti s hladinou T3. Při hypotyreoidismu byla zjištěna intenzivnější exprese MyHC IIa v SOL u samic než u samců. Isoforma MyHC α byla popsána i u hypertyroidních samců potkanů v SOL, nikoli však u samic (Larsson a Yu, 1997). Předpokládá se, že rozdílná odpověď rychlých a pomalých svalů na T3 je dána možnou kompeticí mezi receptory pro T3 a receptory pro pohlavní hormony (Zhu et al., 1996). O vlivu tyroidních hormonů je více pojednáno v kapitole 8.

Z práce Lyons et al. (1986) vyplývá, že pohlavní hormony mají specifický účinek na určité svaly. U morčat byl zjištěn pohlavní dimorfismus v případě musculus temporalis, kde bylo zaznamenáno, že u samců převládá isoforma MyHC IIa, zatímco u samic IIb. Uměle zvýšená hladina testosteronu u samic způsobila nástup isoformy MyHC IIa a kastrace samců způsobila nástup isoformy MyHC IIb (Lyons et al., 1986). Podle d'Albis a Butler-Browne (1993) nebyly zjištěny žádné další svaly vykazující podobnou intersexuální odlišnost. Dále exprese isoformy MyHC α ve žvýkacích svalech králíka (jedná se o expresi srdeční isoformy V1, což je homodimer MyHC α) je potlačována androgeny s nástupem spermatogeneze (Berger et al., 1976). Tento účinek lze zvrátit kastrací samců (d'Albis et al., 1993b).

Chronologická následnost tranzice isoform MyHC od embryonální a perinatální směrem k dospělým se mezi samci a samicemi potkana neliší (d'Albis a Butler-Browne, 1993). Avšak odlišnost byla zjištěna u musculus masseter. Perinatální isoforma MyHC přetrvává jeden den déle u samců než u samic (d'Albis et al., 1986).

V případě musculus levator ani potkana přetrvává tato isoforma u samic o 12 dní déle (d'Albis et al., 1991a).

Dalším hormonem majícím vliv na fenotyp kosterního svalu bez rozdílu pohlaví je insulin. Při uměle navozeném diabetu měl insulin vliv na pokles rychlých a nárůst pomalých isoform v rychlém svalu, zatímco fenotyp pomalého svalu zůstal nezměněn (Rutschmann et al., 1984).

Účinek na svalový fenotyp mají i další hormony a MRF. Patří mezi ně glukokortikoidy, které způsobují nástup pomalejších isoform MyHC (Falduto et al., 1990). MRF účinné ve fázi myogeneze mají svou úlohu v určení fenotypu i ve svalech dospělých jedinců. Myogenin podporuje tvorbu pomalejších isoform MyHC, tedy MyHC I a IIa. Jeho exprese v pomalých svalech je vyšší než exprese MyoD (Bottinelli et al., 1994), zatímco MyoD podporuje tvorbu rychlejších isoform MyHC IIx/d a IIb a jeho exprese je oproti expresi myogeninu vyšší v rychlých svalech (Hughes et al., 1993 a 1997).

6.5 Stáří

Ve stáří dochází ve svalu k mnoha degenerativním změnám obecně vedoucím ke zhoršení jeho výkonnosti. Dochází k prodlužování doby nástupu kontrakce i relaxace (Li et al., 1996). Dochází dále k nárůstu pomalejších isoform MyHC, ztrátě rychlých α motoneuronů, což vede ke snížení zastoupení rychlých vláken (pro přehled Larsson a Ansved, 1995). Projevuje se ztráta motorických jednotek. To má za následek, že zbylé motorické jednotky musí inervovat vlákna, jež inervaci ztratila (Booth et al., 1994). Sonntag (1987) předpokládal, že změny ve funkci svalové tkáně během stárnutí u člověka i u potkana jsou zčásti zapříčiněny změnami cirkulujících koncentrací tyroidních hormonů. Tuto hypotézu potvrzují studie dokládající, že změny nastávající během stárnutí lze alespoň částečně zvrátit pomocí zvýšené hladiny tyroidních hormonů či cvičením. Naopak navození hypotyroidního stavu může způsobit změny obdobné změnám v průběhu stárnutí (Montgomery, 1992). Dalším z faktorů degenerativních změn nervosvalového spojení je zhoršená kvalita axonálního transportu, která se prokazatelně zlepšuje zvýšenou pohybovou aktivitou (Kang et al., 1995).

7. Tyroidní hormony a jejich receptory

Tyroxin (T4) a trijódtyronin (T3) jsou hlavní hormony produkované štítnou žlázou na stimulační podnět TSH (hormon stimulující štítnou žlázu). Tvorba TSH je stimulována hormonem TRH (TSH-uvolňující hormon). Stavebním prekurzorem pro T3 a T4 je aminokyselina tyrosin, která je jodací metabolizována na dva prekurzory - monojódtyrosin a dijódtyrosin. Z těchto prekurzorů vzniká další enzymovou aktivitou T3, jež se následnou jodací mění na T4. T3 také může vznikat i zpětně dejodací T4 (Randall et al., 2002). Tato cesta tvorby T3 je majoritní a k dejodaci dochází na 5' pozici T4. Množství sekretovaného T4 je větší než u T3, přesto je T3 biologicky více aktivní, neboť se váže na příslušné receptory s desetkrát vyšší afinitou než T4. Dejodace je vykonávána pomocí selenoproteinů známých jako dejodázy. Jsou známy 3 isoformy vykazující tkáňovou specifitu (pro přehled Kohrle, 2000). Dejodázy jsou spolu s transportními proteiny pro tyroidní hormony hlavními regulátory intracelulární koncentrace tyroidních hormonů. Transportní proteiny jsou lokalizovány v plazmatické membráně a regulují vylučování tyroidních hormonů do buněk (Jansen et al., 2005). Tyroidní hormony senzitivizují tkáň na noradrenalin a stimulují buněčnou respiraci, spotřebu kyslíku a celkový metabolický obrát. Aktivují tedy celkový metabolismus organismu jako reakci na stres.

Tyroidní hormony jsou lipofilní povahy a na molekulární úrovni fungují obecně jako ligandy transkripčních faktorů specifických genů. Tyto transkripční faktory se označují jako receptory tyroidních hormonů (Randall et al., 2002).

Receptory tyroidních hormonů jsou uloženy intracelulárně v jádře buňky a spadají do velké rodiny jaderných receptorů. Do této rodiny patří také receptory pro estrogen, progesteron, androgeny, mineralo- i glukokortikoidy, vitamin A a retinoidní látky a vitamin D (Lazar, 1991). Tyroidní hormony se váží na dva typy receptorů, TR α a TR β (Murray et al., 1988), které jsou kódovány dvěma typy genů – Thra a Thrb (Oetting a Yen, 2007). Každý z genů je prekurzorem pro dvě isoformy. Tyto isoformy vznikají alternativním sestřihem genů. Hlavní isoformy receptorů * – TR α -1 a TR β -1 jsou exprimovány téměř ve všech typech tkání. Předpokládá se, že tyto dvě isoformy receptorů mají ze všech isoform nejvyšší vliv na sval (Oetting a Yen, 2007). Byla

prokázána nejvyšší exprese isoformy TR α -1 v tkáních a i ve svalové tkáni potkanů a to především ve svalech rychlých (Haddad et al., 1998).

Různá citlivost jednotlivých svalů na tyroidní hormony je způsobena nestejným množstvím receptorů na těchto svalech (pro přehled Soukup a Jirmanová, 2000) a její změna nemá vliv na vazebnou afinitu receptorů (Haddad et al., 1998).

Receptory tyroidních hormonů rozpoznávají specifické regulační sekvence – TRE (thyroid hormone response elements), které jsou zpravidla lokalizovány v promotorech příslušných genů (Glass a Holloway, 1990). Tyto receptory váží příslušné TRE konstitutivně, přičemž bez vazby hormonu dochází k represi exprese. Přestože byla zjištěna různá míra exprese různých isoform receptorů tyroidních hormonů v různých tkáních, není doposud známo, zda mají specifické isoformy také genově specifický dopad na regulaci transkripce. Celkový průběh, síla a regulace transkripce však samozřejmě závisí na mnoha dalších proteinech, receptorech a ligandech, koaktivátorech a korepresorech (pro přehled Oetting a Yen, 2007). Pro maximální účinek vazby receptorů tyroidních hormonů na TRE je nutná jejich heterodimerizace s receptorem X retinoidních látek (RXR) (Chin a Yen, 1997).

* Mimo tyto isoformy dále existují isoformy TR β -2 a c-erbA- α 2 (Koenig et al., 1989). Isoforma c-erbA- α 2 není schopná vázat T3, ale má roli hlavního negativního inhibitoru působení tyroidních hormonů. To je umožněno její kompeticí s ostatními isoformami receptorů tyroidních hormonů o vazbu na TRE – viz níže (Lazar et al., 1989a). Zvláštností genu Thra je schopnost transkribovat i opačný řetězec DNA. Výsledkem je mRNA pro Rev-erbA protein (Lazar et al., 1989b). Tento protein je exprimován ve svalech a adipocytech a podporuje adipogenezi (Chawla a Lazar, 1993).

Hormonální aktivace genové exprese je tedy obecně zprostředkována disociací korepresoru a/nebo asociací koaktivátoru transkripce s transkripčními faktory (Hatina a Reischig, 2000). Vazba tyroidního hormonu na receptor aktivuje transkripci příslušného genu působením přes transkripční faktory tím, že z receptoru s navázaným tyroidním hormonem oddisociuje korepresor. Současně vazba tyroidního hormonu na receptor spustí proces modelace chromatinu a posun nukleosomů. Díky tomu je plně umožněna exprese daného genu také ze sterického hlediska.

V případě nedostatku tyroidních hormonů, například u hypotyroidismu, funguje tedy samotný receptor jako aktivní represor transkripce a není pouze inaktivovaným receptorem. Toto platí v případě pozitivní regulace transkripce pomocí tyroidních hormonů.

Naproti tomu negativní regulace se ukazuje být zásadní zpětnovazebnou kontrolní regulací osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza. V případě negativní regulace transkripce tyroidní hormony nehrají roli transkripčních aktivátorů a schéma její funkce je oproti pozitivní regulaci opačné. V nepřítomnosti tyroidních hormonů je transkripce umožněna, za jejich přítomnosti potlačena.

8. Vliv tyroidních hormonů na sval

Vliv hladiny tyroidních hormonů na organismus je patrný na velikosti některých orgánů. Nedostatek tyroidních hormonů (ať už T3 nebo T4) způsobuje u potkana pokles tělesné váhy, absolutní i relativní pokles hmotnosti srdce a nárůst absolutní i relativní hmotnosti štítné žlázy. Nadměra tyroidních hormonů vede naopak k růstu absolutní i relativní hmotnosti srdce a k poklesu absolutní i relativní hmotnosti štítné žlázy. Tělesná hmotnost hypertyroidních potkanů se však od tělesné hmotnosti jedinců eutyroidních neliší (Soukup et al., 2001).

Perinatální vývoj je spojen se změnami hladin T3 a T4 v krevní plazmě. Biologicky účinnější je T3 (Soukup a Jirmanová, 1999), ale nebyla nalezena rozdílnost mezi následky aplikace T3 a T4 na některé tělesné parametry jako jsou tělesná hmotnost, hmotnost srdce, štítné žlázy aj. (pro přehled Soukup et al., 2001). Koncentrace T3 je u embryí na hranici detekce a začíná stoupat několik dnů před narozením. Maxima dosahuje cca 2 týdny po narození. Dále pomalu klesá a ustálí se plató typické pro dospělé jedince (Dubois a Dussault, 1977). Současně se vzestupem T3 ubývá embryonálních a perinatálních isoform myosinu a začínají převažovat isoformy MyHC typické u dospělých jedinců (Bandman, 1985). Toto schéma má obecnou platnost a bylo pozorováno ve svalech končetin všech studovaných savčích modelů (pro přehled Soukup a Jirmanová, 1999). U potkanů hypertyroidních dochází k této přeměně dříve, u hypotyroidních naopak později (Butler-Browne et al., 1984).

Tyroidní hormony mají na fenotyp svalu účinky modulační a mění fenotyp svalu pouze v mantinelech vytyčených geneticky podmíněnými adaptačními možnostmi (Soukup a Jirmanová, 2000). Účinek tyroidních hormonů závisí přímo úměrně na množství receptorů v daném svalu (d'Albis a Butler-Browne, 1993). Avšak další práce (White a Dauncey, 1999) poukazuje na klíčový význam poměrného zastoupení jednotlivých isoform receptorů pro tyroidní hormony.

Krátkodobý vliv tyroidních hormonů na aktivaci exprese MyHC se projevuje na úrovni mRNA v řádu dní (Izumo et al., 1986; Russell et al., 1988). Odhaduje se, že doba života molekul MyHC je 4 až 7 dní (Caiozzo et al., 1998) Haddad a spolupracovníci (1998) provedli porovnání hladin proteinu isoformy MyHC I a její

mRNA ve svalech SOL a vastus intermedius v EU, HY a TH stavu. Zjistili rozdíly zvláště u EU a TH stavu, kdy se množství proteinu a mRNA od sebe lišily, ale v HY stavu signifikantní rozdíly nezaznamenali.

8.1 Experimentálně navozený hypotyroidismus

Hypotyroidní stav, navozený krátce po narození blokadou syntézy tyroidních hormonů pomocí propylthiouracilu, vede k potlačení tělesného růstu. Dochází k narušení prakticky všech důležitých organel a subsystémů svalových vláken, tedy oxidativních schopností mitochondrií, myofibrilární ATPázy, sarkoplazmatického retikula a glykogenolytické enzymové aktivity. Tento stav lze zvrátit podáváním malých dávek exogenního tyroxinu během období vývoje (Baldwin et al., 1978). Snížené množství tělesné hmoty se odráží v potlačení svalového růstu (Baldwin et al., 1978). Na druhé straně podávání 0,05 % roztoku methimazolu v pitné vodě nevede ke změnám tělesné ani svalové hmotnosti (Soukup et al., 2001).

Dále má hypotyroidismus inhibiční vliv na proliferaci, diferenciaci a fúzi svalových prekurzorů a in vitro totálně reprimuje expresi MyHC IIa v SOL. Zajímavé je i zjištění, že vysoké dávky T3 v in vitro médiu diferenciaci myoblastů nezvyšují a lehce inhibují proliferační aktivitu satelitních buněk (Jacobs et al., 1996).

V průběhu perinatálního vývoje má hypotyroidismus za následek prodloužení doby exprese isoform MyHC E a P, což vede ke zpoždění nástupu exprese dospělých isoform MyHC (Caiozzo et al., 1992). Obecně hypotyroidismus způsobuje přeměnu isoform MyHC směrem k pomalejším (Ianzuzo et al., 1977) a tím blokuje i přeměnu hybridních vláken (např. IIC) na vlákna čistá s vyšší ATPázovou aktivitou (např. IIA) (Butler-Browne a Whalen, 1984). Hypotyroidismus též brání nárůstu hmoty svalových vláken (Sugie a Verity, 1985).

V rané postnatální ontogenezi, podle Harrisona a spolupracovníků (1996), způsobuje hypotyroidismus „down-regulaci“ sarkolemální Na^+K^+ ATPázy a Ca^{2+} ATPázy sarkoplazmatického retikula. Tyto dvě ATPázy jsou pro práci svalu esenciální a jejich „down-regulace“ je zodpovědná za redukci míry hydrolýzy ATP. Tyto změny spolu s navýšeným zastoupením pomalých vláken I patří mezi ty nejdůležitější, jež jsou zodpovědné za svalovou slabost. Mezi další následky

prepubertálního hypotyreoidismu patří pokles glykogenolýzy a syntézy svalově specifických proteinů (Katzeff et al., 1994).

V dospělém svalu způsobuje hypotyreoidismus akumulaci glykogenu, nárůst pojivové tkáně a v závažnějších případech byla pozorována i nekróza (Sugie a Verity, 1985; Lomax a Robertson, 1992; Kaminsky a Ruff, 1994). Podílí se na změně fenotypu svalových vláken. U dospělých potkanů linie Lewis byl vlivem hypotyreoidismu způsoben nárůst vláken I a isoformy MyHC I o 3 a 4 % v SOL a dosáhly tím tak 100 % oproti EU stavu. Zastoupení vláken IIA a MyHC IIA kleslo z původních 3 a 4 % k nule v obou případech. V EDL byl zaznamenán pokles rychlých vláken IIA i isoformy MyHC IIA z původních 24 % a 14,8 % na nulu za HY stavu. Obsah isoformy MyHC IIB poklesl ze 47,2 % na 37 % v HY stavu. Nárůst pomalé isoformy MyHC I dosáhl vlivem HY stavu pouze 7 % z původních 4,9 % v EU stavu (Vadászová et al., 2004).

8.2 Experimentálně navozený hypertyroidismus

Hypertyroidismus způsobuje v buňkách kosterního svalu alkalizaci narušením rovnováhy antiportu sodných iontů a protonů (Thompson et al., 1993). Byl také pozorován silný nárůst glykolytické aktivity a akumulace laktátu při cvičení (Kaminsky et al., 1993). Dalšími popsány následky hypertyroidismu jsou změny tvaru a struktury mitochondrií a atrofie svalových vláken (Crespo Armas et al., 1993).

Chronický hypertyroidismus navozený podáváním T3 obden po dobu dvaceti týdnů způsobil v SOL potkana signifikantní pokles pomalé isoformy MyHC I z 93 % na 69 % a nárůst rychlé isoformy IIA ze 7 % na 31 %. Naproti tomu nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v zastoupení isoform MyHC v rychlém svalu (Caiozzo et al., 1991; Vadászová-Soukup a Soukup, 2007).

U dospělých potkanů linie Lewis byl pod vlivem hypertyroidismu zaznamenán pokles pomalých vláken I a isoformy MyHC I z původních 97 % a 96 % u EU stavu na 93,5 % a 81,3 % v SOL a pokles vláken I z 5,7 % v EU stavu na 2,5 % v EDL (Vadászová et al., 2004).

Kombinace indukovaného hypertyroidismu s denervací zadní končetiny u časně novorozenech potkanů způsobila nástup rychlé isoformy MyHC IIB (Russell et

al., 1988), což svědčí o expresi této rychlé isoformy MyHC i bez přispění inervace. Denervace zabránila vlivu vzorce nervových impulsů i vlivu tyroidních hormonů na urychlení vývoje nervosvalového spojení (Kawa a Obata, 1982). Tyroidní hormony účinkující přímo na tkáň svalu tedy plně dostačují k indukci transkripce i translace rychlé isoformy MyHC. Autoři uvádějí možnost, že tyroidní hormony takto neúčinkují přímo, ale prostřednictvím jiných, tyroidními molekulami indukovaných působků (Russell et al., 1988).

Je důležité si uvědomit, že účinek tyroidních hormonů se různí v závislosti na typu svalu. Například T3 podporuje expresi isoformy MyHC IIa SOL, ale v musculus masseter expresi této isoformy blokuje a podporuje expresi isoformy MyHC IIb (Izumo et al., 1986). Je tedy patrné, že účinkem hypertyroidismu je upřednostněna exprese té isoformy, která má ze všech isoform MyHC svalu nejvyšší ATPázovou aktivitu. V případě hypotyroidního stavu je naopak upřednostněna isoforma MyHC s nižší ATPázovou aktivitou. Určitý gen pro MyHC může na různé hladiny tyroidních hormonů reagovat svou expresí „oběma směry“ v závislosti na výchozím myosinovém složení daného svalu. Bylo prokázáno, že na proteinové úrovni jsou pomalé svaly (SOL) daleko více senzitivní na změnu hladiny tyroidních hormonů než svaly rychlé (EDL) (Fitzsimons et al., 1990).

Metodika

Tato diplomová práce je součástí rozsáhlého experimentu analyzujícího vliv tyroidních hormonů na expresi fenotypu regenerovaných svalů. V celé práci byly použity kontrolní intaktní svaly ze zadních končetin potkanů inbrední linie Lewis. Zvířata byla chována na světelném režimu 12 h tma / 12 h světlo, krmena standardní dietou ST1 a inbrednost byla udržována křížením bratr x sestra. Podrobnější charakterizaci těchto potkanů lze nalézt ve firemní brožuře LEW/CrIBR Lewis Ratte, Vol. 3, No. 2, Charles River Deutschland, 1989.

Chování a veškeré zacházení s pokusnými zvířaty bylo v souladu se směrnicí Evropské Unie – EU Council Directive (86/609EEC) a experimenty byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR v. v. i.

Detailní popis celého experimentu je k dispozici pod kódy projektů MYORES No. 511978, MSMT CR LC554, GACR 304/05/0327 a AV0Z 50110509.

9. Navození alterovaných tyroidních stavů

Změna tyroidního stavu byla navozena u čtyřtýdenních zvířat a minimální doba aplikace T3 respektive methimazolu byla minimálně 8 týdnů. Z tohoto důvodu byli analyzováni jedinci se změněným tyroidním stavem od 12. týdne věku.

Hypotyroidní stav byl navozen 0,05 % roztokem methimazolu (2-mercapto-1-methylimidazol, Sigma) v pitné vodě. Takto ošetřená zvířata mají hladiny T3 a T4 v krevním séru cca desetkrát i více nižší než zvířata eutyroidní (Soukup et al., 2001).

Hypertyroidní stav byl navozen intraperitoneálními injekcemi 3,3',5-trijód-L-tyroninu (T3 jako sodná sůl, Sigma) v dávce 150 µg/kg tělesné hmotnosti třikrát týdně (Soukup et al., 2001).

Při vyšší dávce T3 300 µg/kg tělesné hmotnosti a frekvenci aplikace každý druhý den po dobu 8 týdnů byla úmrtnost pokusných jedinců téměř 80 %. To bylo způsobeno pravděpodobně tachykardií či srdeční arytmií. Samice však poruchami srdeční činnosti trpěly daleko méně a vykazovaly tak menší úmrtnost (Larsson et al., 1994). V metodice této práce byly z tohoto důvodu užity převážně samice (vyjma zhodnocení rozdílností mezi samci a samicemi) a zároveň byla snížena dávka T3 na polovinu, která je stále dostatečná pro navození fyziologických změn (Soukup et al., 2001). Těmito kroky bylo docíleno menších ztrát na životech pokusných jedinců.

10. Experimentální skupiny

Pro zmapování vývojového schématu zastoupení pomalé a rychlých isoform MyHC byli jedinci rozděleni do pěti věkových skupin:

- 1) 2.-6. týden: období maximálních změn zastoupení pomalých a rychlých vláken a isoform MyHC v SOL
- 2) 6.-12. týden: období pohlavního dospívání
- 3) 12.-26. týden: 1. skupina dospělých potkanů (první polovina období maximální aktivity potkanů)
- 4) 26.-39. týden: 2. skupina dospělých potkanů (druhá polovina období maximální aktivity potkanů)
- 5) nad 39. týden: 3. skupina dospělých potkanů (začátek pozvolného stárnutí)

11. Odběr a příprava vzorků

Anestézie potkanů byla prováděna intraperitoneální injekcí Nembutalu (pentobarbital sodný, Sigma) v dávce 40 mg/kg tělesné hmotnosti a po dočerpání jeho zásob Narkamonem (5 %) v dávce 100 mg/kg tělesné hmotnosti nebo Rometarem (2 %) v dávce 10 mg/kg tělesné hmotnosti. Následně byly odebrány SOL a EDL. Svaly byly ihned zamrazeny v tekutém dusíku a následně příčně krájeny na kryostatu Cryocut Leica CM 3000 s teplotou komory -20°C na řezy o tloušťce 10 µm. Pro řezy byly použity centrální části svalu. Po zákroku byli jedinci usmrceni letální dávkou anestetika.

12. Imunohistochemická detekce svalových vláken

Imunohistochemické barvení svalových řezů využívá monoklonálních aS a aF protilátek. Vizualizace detekovaných typů vláken s navázanou primární protilátkou probíhá za pomoci sekundární protilátky Biotin-SP-conjugated antimouse, která je konjugována s HRP. HRP katalyzuje za přítomnosti peroxidu vodíku oxidaci DAB na žlutohnědý produkt.

Prvním krokem bylo ponoření svalových řezů do citrátového pufru (Příloha 4.) a jejich následná inkubace v mikrovlnné troubě po dobu 2 x 3 minuty s výkonem 600 W. Následovalo 20 minut temperace na pokojovou teplotu a poté oplach omývacím pufrem (Příloha 4.) po dobu 3 x 5 minut. Dále byla provedena preinkubace 20 minut při pokojové teplotě ve zvlhčeném prostředí pomocí blokačního pufru (Příloha 4.), který byl dávkován 0,1 ml na 1 řez. Dalším krokem byla inkubace s primární protilátkou ředěnou blokačním pufrem v poměru 1:250 při teplotě 4°C ve zvlhčeném prostředí přes noc. Po ukončení této inkubace byly řezy temperovány 30 minut na pokojovou teplotu a následně omyty omývacím pufrem po dobu 3 x 5 minut. Následovala jejich inkubace s roztokem sekundární protilátky (Příloha 4.) ředěné v poměru 1:200 po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Tento roztok byl aplikován v množství cca 1 ml na 4 podložní skla s 6 řezy. Poté byly řezy omyty omývacím pufrem po dobu 3 x 5 minut a následovala inkubace řezů a barvení pomocí přefiltrovaného DAB roztoku (Příloha 4.) po dobu 6 minut. Po tomto kroku byly řezy omývány po dobu 20 minut vodou. Takto připravené řezy byly po barevné detekci odvodňovány 5 minut v 50% a 5 minut v 75% a následně 2 x 15 minut v 96% etanolu a nakonec 2 x 15 minut v xylenu. Posledním krokem bylo zapečetění řezů pomocí DPX za vzniku trvalých preparátů, které byly dále stereologicky zpracovávány.

13. Separace MyHC pomocí SDS-PAGE

13.1 Extrakce MyHC

Metodika procesu extrakce byla převzata od Dr. V. Smerdu, PhD. (Institut anatomie, Lékařská fakulta Lublaňské univerzity, Slovinsko).

Ke vzorkům svalů získaných excizí z pokusného jedince byl po zvážení přidán promývací pufr (Příloha 4.) v následujícím objemu: pro vzorek těžší než 3 mg byl objem (μl) přidaného promývacího pufru roven pětinásobku hmotnosti (mg) vzorku, ke vzorkům lehčím než 3 mg bylo přidáno 25 μl promývacího pufru. Následovala důkladná mechanická homogenizace chirurgickými očními nůžkami a centrifugace vzniklého homogenátu po dobu 5 minut při 12 000 otáčkách za minutu. Po odstranění supernatantu byl k sedimentu přidán objem (μl) extrakčního pufru (Příloha 4.) rovný trojnásobku hmotnosti (mg) vzorku svalu. Následovala opětovná mechanická homogenizace a promýchávání vzorků malými magnetickými míchadly po dobu 30 min. Dále byly vzorky centrifugovány 10 minut při 12 000 otáčkách za minutu a poté byl supernatant odebrán a naředěn v poměru 1:1 87 % glycerolem. Takto připravené vzorky se uchovávaly při teplotě -80°C .

13.2 SDS-PAGE

Pro veškeré roztoky na extrakci MyHC, SDS-PAGE a následné barvení byla užívána pouze deionizovaná voda následně filtrovaná přes mikrobiální filtry firmy Millipore s průměrem pórů 0,22 μm .

MyHC analýza svalových vzorků byla provedena pomocí metody SDS-PAGE (sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza) dle metodiky Talmadge a Roy (1993) s mírnou modifikací složení gelů.

Extrakty ze svalů EU, HY i TH EDL a SOL byly naředěny vzorkovým puftrem (Příloha 4.) v objemovém poměru 1:19 a 5 minut povařeny. Následovala centrifugace při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty. Vzorky byly do aparatury pro SDS-PAGE nanášeny v objemu 4 μl na jamku. Koncentrace akrylamidu pro zaostřovací

gel byla 4 % a pro dělicí gel 8 % (Příloha 4.). Dělicí gely byly ponechávány v chladničce při teplotě 4°C přes noc.

Doba elektroforetické separace byla 28 hodin při výchozím nastavení 20 mA a konstantním napětí 72 V. Pro poslední 4 hodiny byly podmínky přestaveny na 100 mA a konstantní napětí 200 V. Proces byl prováděn v chladničce při teplotě 4°C.

Elektrodové pufrы dle Talmadge a Roy (1993) byly užívány dvojího složení. Vnitřní pufr (Příloha 4.) sloužil k vyplnění prostoru mezi gely a vnější pufr (Příloha 4.) pro vyplnění vnějšího objemu aparatury k chlazení.

13.3 Barevná detekce proteinů stříbrem

Barevná detekce proteinů v gelech SDS-PAGE využívá tvorby rozpustných komplexů stříbra (Blum et al., 1987).

Gely byly po vyjmutí z aparatury pro SDS-PAGE fixovány po dobu 1 hodiny na třepačce ve 100 ml fixačního roztoku (Příloha 4.) s přidanými 50 µl 37% formaldehydu při pokojové teplotě. Ve fixačním roztoku mohou být gely uchovávány až 3 dny. Po fixaci následovalo promývání gelů v 50% etanolu po dobu 3 x 20 minut do zbělení a dále promývání po dobu 2 x 30 sekund 0,02% roztokem thiosíranu sodného do zprůhlednění gelu. Dalším krokem bylo promývání gelů vodou po dobu 3 x 20 sekund pro odstranění thiosíranu a jejich následné ponoření do 100 ml 0,2% roztoku dusičnanu stříbrného s přidanými 75 µl 37% formaldehydu. Dále byly gely ponechány 20 minut ve tmě na třepačce a poté promývány po dobu 3 x 10 sekund vodou. Následně byly gely ponořeny do vyvíjecího roztoku (Příloha 4.) s přidanými 50 µl 37% formaldehydu až do dosažení požadované intenzity barvení. Následovalo rychlé promytí gelů vodou po dobu 10 sekund a barvicí reakce byla zastavena fixačním roztokem. Gely byly uchovávány vložením mezi dva listy porézniho celofánu.

14. Stereologická měření a jejich reprodukovatelnost

Stereologická měření jsou časově náročná a náchylná k subjektivní chybě. Zastoupení pomalých a rychlých vláken na svalových řezech bylo hodnoceno systémem Cast-Grid (Zachařová a Kubínová, 1995). Pro ověření reprodukovatelnosti měření bylo použito dvou pětic za sebou jdoucích řezů. Pětice byly z pravého a levého EDL téhož zvířete a barveny protilátkou aS. Tři vyškolení pracovníci měřili procentuální zastoupení aS pozitivních vláken u každého vzorku dvakrát posobě. Bylo zjištěno, že naměřené hodnoty průměrů jednotlivých pracovníků byly velmi blízké s maximální odchylkou 1,98 procentního bodu od celkového průměru všech pracovníků, který byl 13,68 procentního bodu pro EDL dx a maximální odchylkou 1,4 procentního bodu od celkového průměru pro EDL sin, který činil 9,86 procentního bodu. Naopak rozdíly v jednotlivých měřeních jednotlivých pracovníků byly větší, ale nepřekročily vzájemnou rozdílnost 6,5 procentního bodu. Tyto individuální rozdíly jsou podmíněny subjektivním vnímáním jednotlivých pracovníků.

15. Statistické hodnocení

Měření procentuálního obsahu isoformu MyHC ve svalových řezech bylo provedeno na poloautomatickém počítačovém systému Cast-Grid, Dánsko (Zachařová a Kubínová, 1995) a každý řez byl hodnocen na pozitivně i negativně detekovaná vlákna danou protilátkou. Ke statistickému hodnocení byly použity průměry naměřených hodnot z pravé a levé nohy poté, co mezi nimi nebyly prokázány podstatné rozdíly.

Naměřené výsledné hodnoty byly zpracovávány pomocí statistického programu STATISTICA 8. Grafy byly tvořeny s pomocí statistického programu SigmaPlot 10.

Naměřené hodnoty procentuálního zastoupení aS pozitivních (pomalá vlákna) a aF pozitivních (rychlá vlákna) vláken v SOL a EDL byly testovány na normalitu rozložení pomocí Shapirova-Wilkova W testu. Bylo zjištěno, že data nejsou normálního rozložení na hranici $p < 0,05$. Pro porovnávání rozdílnosti souborů dat byl

tedy zvolen často užívaný neparametrický Mannův-Whitneyův U test. Jedná se o statistický algoritmus ekvivalentní klasickému t-testu pro nezávislé vzorky, který je vhodný pro data nenormálního rozložení. Pro určení odlišnosti závislých vzorků (rozdílnosti mezi pravou a levou nohou týchž jedinců a rozdíly mezi samci a samicemi) byl zvolen Wilcoxonův párový test (Wilcoxon matched pair test). Tento test je neparametrickou alternativou ke klasickému t-testu pro závislá data.

Signifikance rozdílu všech testů byla zvolena na hladině 5 % ($p < 0,05$). Za uvedenými průměrnými hodnotami jsou vždy uvedeny hodnoty \pm SD .

Výsledky

Za pomoci imunohistochemických metod bylo zkoumáno procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese u svalů SOL a EDL potkanů inbrední linie Lewis v závislosti na věku, vlivu tyroidních hormonů, laterality končetiny a pohlaví. Pro názornou demonstraci vlivu tyroidních hormonů na distribuci isoformů MyHC bylo užito metody SDS-PAGE.

Termínem koexprese se rozumí současná pozitivní reakce jednoho svalového vlákna jak na aS tak na aF protilátku. Součet procentuálního zastoupení pomalých a rychlých vláken může být vyšší než 100 % a hodnota přesahující 100 % je považována za míru koexprese.

16. Postnatální vývojové schéma zastoupení pomalých a rychlých vláken a míry koexprese

Byly studovány změny procentuálního zastoupení pomalých a rychlých vláken a míry koexprese pomalé a rychlých isoformů MyHC v závislosti na věku reprezentovaného 5 věkovými skupinami (2.-6. týden, 6.-12. týden, 12.-26. týden, 26.-39. týden a nad 39. týden života).

16.1 SOL

V rámci pěti sledovaných věkových skupin byl zjištěn s věkem rostoucí nárůst pomalých vláken v SOL. Procentuální zastoupení tohoto typu vláken vzrostlo z původních průměrných 64,15 % \pm 3,35 % u nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne až na přibližných 99 % u nejstarších skupin.

U věkové skupiny 6.-12. týdne bylo naměřeno průměrných 93,1 % \pm 4,81 %, u skupiny 12.-26. týdne 97,13 % \pm 3,15 %, u skupiny 26.-39. týdne 99,49 % \pm 1,22 % a u skupiny nad 39. týden 98,78 % \pm 1,69 %.

Největší procentuální zastoupení pomalých vláken bylo u věkové skupiny 26.-39. týdne (99,49 %). Ve srovnání s nejstarší věkovou skupinou, kde byly naměřeny mírně nižší hodnoty (98,78 %), není tento rozdíl signifikantní. Hodnoty

naměřené u věkové skupiny 2.-6. týdne byly signifikantně odlišné od hodnot ostatních věkových skupin, které se mezi sebou již signifikantně nelišily. To značí, že zastoupení pomalých vláken se stabilizovalo od skupiny 6.-12. týdne věku a to na průměrné hodnotě $97,13 \% \pm 2,86 \%$. Odlišnost skupin 2.-6. a 6.-12. týdne v naměřených hodnotách byla na hranici signifikantní prokazatelnosti ($p = 0,0814$) (Graf 1.).

Naproti tomu procentuální zastoupení rychlých vláken v SOL v závislosti na věku pozvolna klesalo z původních průměrných $44,64 \% \pm 3,57 \%$ u nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne až na přibližnou hodnotu 1 - 2 % u nejstarších skupin.

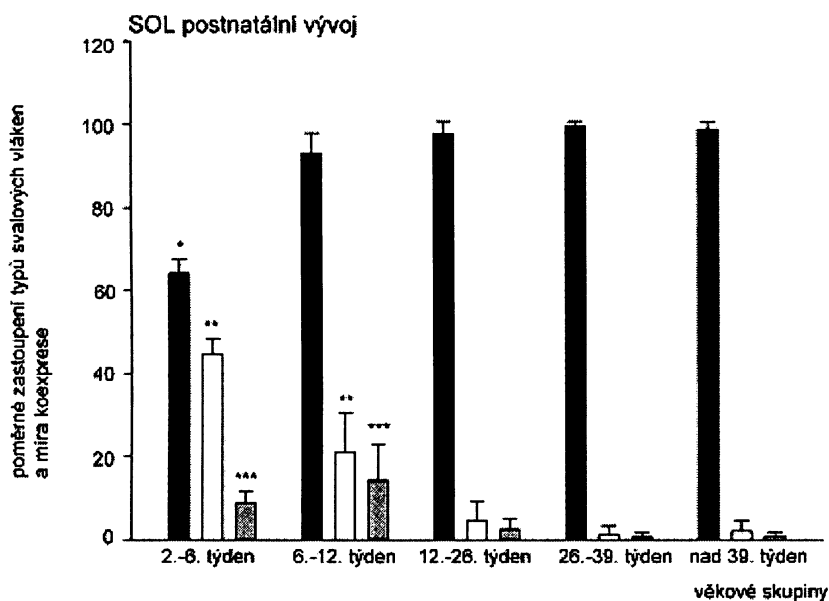
U věkové skupiny 6.-12. týdne byla naměřena průměrná hodnota $21,1 \% \pm 9,35 \%$, u skupiny 12.-26. týdne $5,1 \% \pm 4,81 \%$, u skupiny 26.-39. týdne $1,17 \% \pm 2,25 \%$ a u věkové skupiny nad 39. týden $2,04 \% \pm 2,47 \%$. Nejnižší hodnota byla tedy naměřena u skupiny 26.-39. týdne. Vzájemná signifikantní odlišnost byla zaznamenána v rámci skupin 2.-6. a 6.-12. týdne a též mezi skupinou 6.-12. týdne a skupinami staršími. V rámci těchto skupin (12.-26., 26.-39. a nad 39. týden) nebyla signifikantní odlišnost zjištěna.

Zastoupení rychlých vláken se stabilizovalo až od skupiny 12.-26. týdne věku na průměrné hodnotě $2,77 \% \pm 2,06 \%$ (Graf 1.).

Míra koexprese signifikantně rostla mezi skupinami 2.-6. a 6.-12. týdne. Poté se s věkem signifikantně snižovala až pod hodnotu jednoho procenta u věkových skupin starších 12. týdne, mezi kterými už nebyly zjištěny signifikantní odlišnosti.

U nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne byla naměřena průměrná hodnota $8,79 \% \pm 2,96 \%$, u skupiny 6.-12. týdne $14,25 \% \pm 8,74 \%$, u skupiny 12.-26. týdne $2,23 \% \pm 2,14 \%$, u skupiny 26.-39. týdne $0,66 \% \pm 1,04 \%$ a u skupiny nad 39. týden $0,83 \% \pm 1,03 \%$.

Míra koexprese se stabilizovala až od věkové skupiny 12.-26. týdne s průměrnou hodnotou $1,24 \% \pm 0,86 \%$ (Graf 1.).



Graf 1. Věková závislost procentuálního zastoupení pomalých a rychlých vláken a míry koexprese v EU SOL u pěti věkových skupin. Černé sloupce představují procentuální zastoupení pomalých vláken, bílé sloupce představují zastoupení rychlých vláken a šedé sloupce představují míru koexprese. Je patrné s věkem rostoucí zastoupení pomalých vláken signifikantně se liší pouze u nejmladší věkové skupiny, zatímco zastoupení rychlých vláken s věkem signifikantně klesá až do skupiny 6.-12. týdne, od které se dále signifikantně nemění. Zastoupení pomalých vláken se stabilizuje od skupiny 6.-12. týdne, zastoupení rychlých vláken se stabilizuje od 12.-26. týdne věku. Míra koexprese zprvu signifikantně narůstá mezi skupinami 2.-6. a 6.-12. týdne a od skupiny 12.-26. týdne se již signifikantně neodlišuje. Chybové úsečky představují \pm SD; $n(2.-6. \text{ týden}) = 6$; $n(6.-12. \text{ týden}) = 6$; $n(12.-26. \text{ týden}) = 8$; $n(26.-39. \text{ týden}) = 9$; $n(\text{nad } 39. \text{ týden}) = 13$.

16.2 EDL

V EDL docházelo v průběhu postnatálního vývoje k poklesu pomalých vláken z průměrných $11,55 \% \pm 3,54 \%$ u nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne na hodnoty kolem 6% u ostatních věkových skupin.

U věkové skupiny 6.-12. týdne byla naměřena průměrná hodnota $5,87 \% \pm 1,76 \%$, u skupiny 12.-26. týdne $6,38 \% \pm 0,87 \%$, u skupiny 26.-39. týdne $6,25 \% \pm 2,67 \%$ a u skupiny nad 39. týden $5,59 \% \pm 2,09 \%$.

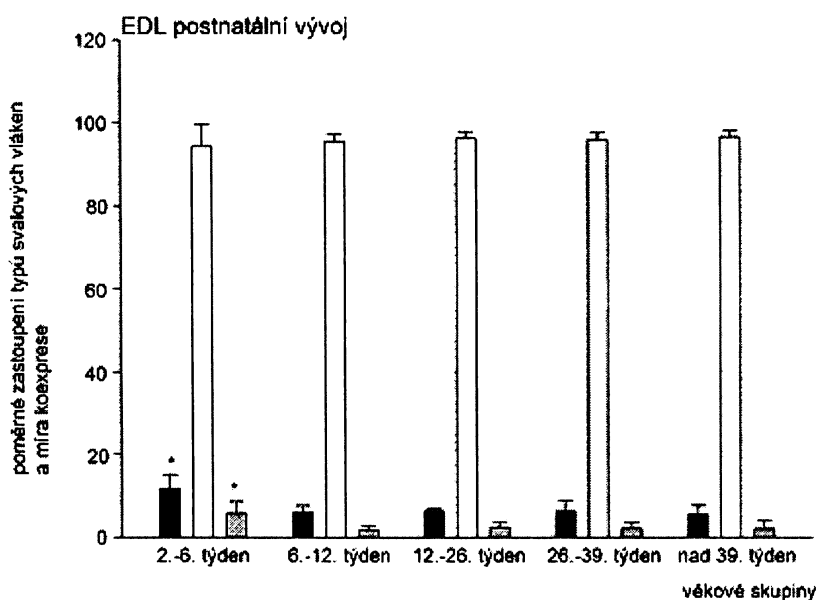
Hodnota $11,55 \%$ u věkové skupiny 2.-6. týdne je signifikantně vyšší než hodnoty naměřené u všech ostatních věkových skupin. Hodnoty ostatních věkových skupin se mezi sebou signifikantně neliší a lze je tedy považovat za stabilizované od věkové skupiny 6.-12. týdne věku s průměrnou hodnotou $6,02 \% \pm 0,36 \%$ (Graf 2.).

Podíl rychlých vláken se mezi všemi věkovými skupinami signifikantně neliší a kolísá kolem průměrných $95,49 \% \pm 0,82 \%$.

U nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne byla naměřena průměrná hodnota $94,2 \% \pm 5,35 \%$, u skupiny 6.-12. týdne $95,53 \% \pm 1,68 \%$, u skupiny 12.-26. týdne $95,44 \% \pm 1,39 \%$, u skupiny 26.-39. týdne $95,83 \% \pm 1,75 \%$ a u skupiny nad 39. týden $96,45 \% \pm 1,55 \%$. Hladina rychlých vláken se stabilizovala již krátce po narození od věkové skupiny 2.-6. týdne věku a dále nedošlo k signifikantním změnám (Graf 2.).

Průměrná nejvyšší míra koexprese byla u nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne $5,75 \% \pm 2,79 \%$. U věkové skupiny 6.-12. týdne byl naměřen signifikantní pokles průměrné hodnoty na $1,75 \% \pm 1,05 \%$. U skupiny 12.-26. týdne bylo naměřeno $1,81 \% \pm 1,16 \%$, u skupiny 26.-39. týdne $2,08 \% \pm 1,46 \%$ a u skupiny nad 39. týden $2,06 \% \pm 1,89 \%$. Míra koexprese se mezi skupinami staršími 6. týdne signifikantně nelišila.

Statisticky se míra koexprese stabilizovala od věkové skupiny 6.-12. týdne na průměrné hodnotě $1,92 \% \pm 0,17 \%$ (Graf 2.).



Graf 2. Věková závislost procentuálního zastoupení pomalých a rychlých vláken a míry koexprese v EU EDL u pěti věkových skupin. Černé sloupce představují procentuální zastoupení pomalých vláken, bílé sloupce představují zastoupení rychlých vláken a šedé sloupce představují míru koexprese. Zastoupení pomalých vláken je nejvyšší u nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne, která se od ostatních věkových skupin významně liší. V dalších věkových skupinách se již zastoupení pomalých vláken významně nemění. Zastoupení rychlých vláken je nejnižší u nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne, avšak není významně odlišné od ostatních věkových skupin, mezi kterými nebyla zaznamenána významná odlišnost. Míra koexprese je nejvyšší u nejmladší věkové skupiny 2.-6. týdne a od ostatních věkových skupin se významně liší. U ostatních věkových skupin nebyla zjištěna významná odlišnost. Z grafu je patrné, že procentuální zastoupení pomalých vláken a míra koexprese se ustalují od skupiny 6.-12. týdne věku, zastoupení rychlých vláken se ustaluje dříve, již od druhého týdne po narození. Chybové úsečky představují \pm SD; $n(2.-6. \text{ týden}) = 6$; $n(6.-12. \text{ týden}) = 6$; $n(12.-26. \text{ týden}) = 8$; $n(26.-39. \text{ týden}) = 8$; $n(\text{nad } 39. \text{ týden}) = 13$.

17. Zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v závislosti na tyroidním stavu

Procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese byla sledována a vzájemně porovnána ve třech tyroidních stavech (EU, HY, TH) u potkanů starších 12. týdne věku.

U HY a TH jedinců byly zjištěny statisticky významné rozdíly ve všech případech.

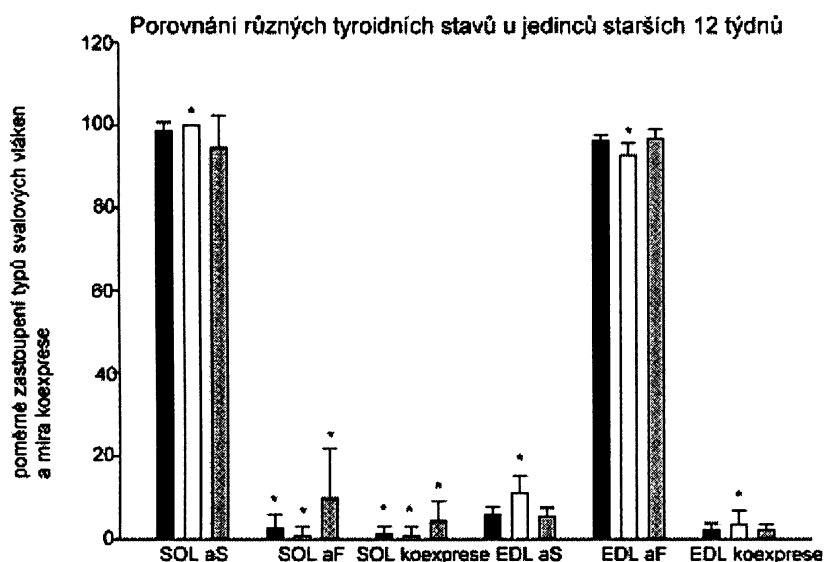
V SOL byl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl mezi EU (98,68 % \pm 2,04 %) a HY (99,99 % \pm 0,003 %) jedinci v zastoupení pomalých vláken, ne však mezi EU a TH (94,5 % \pm 7,94 %) jedinci.

Signifikantní rozdílnost v zastoupení rychlých vláken byla zjištěna jak mezi EU (2,56 % \pm 3,33 %) a HY (0,79 % \pm 2,12 %), tak mezi EU a TH (9,83 % \pm 11,86 %) jedinci.

Rovněž signifikantní rozdílnosti v míře koexprese byly zaznamenány mezi EU (8,13 % \pm 26,35 %) a HY (0,79 % \pm 2,1 %) i mezi EU a TH (4,34 % \pm 4,67 %) jedinci (Graf 3.).

V EDL byla situace zcela odlišná. Zde byly zjištěny signifikantní rozdílnosti v zastoupení pomalých a rychlých vláken a v míře koexprese mezi EU a HY a mezi HY a TH jedinci, nikoli však mezi EU a TH jedinci.

Průměrné hodnoty procentuálního zastoupení pomalých vláken byly naměřeny 6,02 % \pm 1,97 % u EU, 10,66 % \pm 4,2 % u HY a 5,61 % \pm 2,21 % u TH jedinců. Průměrné hodnoty procentuálního zastoupení rychlých vláken byly naměřeny 96,13 % \pm 1,6 % u EU, 92,42 % \pm 2,7 % u HY a 96,6 % \pm 2,45 % u TH jedinců. Průměrné hodnoty míry koexprese byly naměřeny 9,06 % \pm 26,32 % u EU, 3,08 % \pm 3,3 % u HY a 2,22 % \pm 1,05 % u TH jedinců (Graf 3.).



Graf 3. Procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v závislosti na tyroidním stavu v SOL a EDL u věkové skupiny starší 12. týdne. Černé sloupce představují EU skupinu, bílé sloupce představují HY skupinu a šedé sloupce představují TH skupinu. Signifikantní rozdílnost mezi HY a TH stavem byla zjištěna ve všech případech. V SOL byla zaznamenána odlišnost vlivu tyroidních stavů u detekce pomalých vláken pouze mezi EU a HY stavem a mezi HY a TH stavem. HY stav zvyšuje zastoupení pomalých vláken. Odlišnost vlivu tyroidních stavů u detekce rychlých vláken byla zaznamenána navzájem mezi všemi tyroidními stavy a stejná situace byla i v případě koexprese. HY stav v SOL snižuje zastoupení rychlých vláken i míru koexprese, TH stav má účinky opačné. V EDL byla zaznamenána odlišnost vlivu tyroidních stavů u detekce pomalých a rychlých vláken i míry koexprese pouze mezi EU a HY stavem a mezi HY a TH stavem. HY stav zvyšuje zastoupení pomalých vláken i míru koexprese a snižuje zastoupení rychlých vláken. Chybové úsečky představují \pm SD; n(EU SOL) = 28; n(EU EDL) = 29; n(HY) = 16; n(TH) = 19.

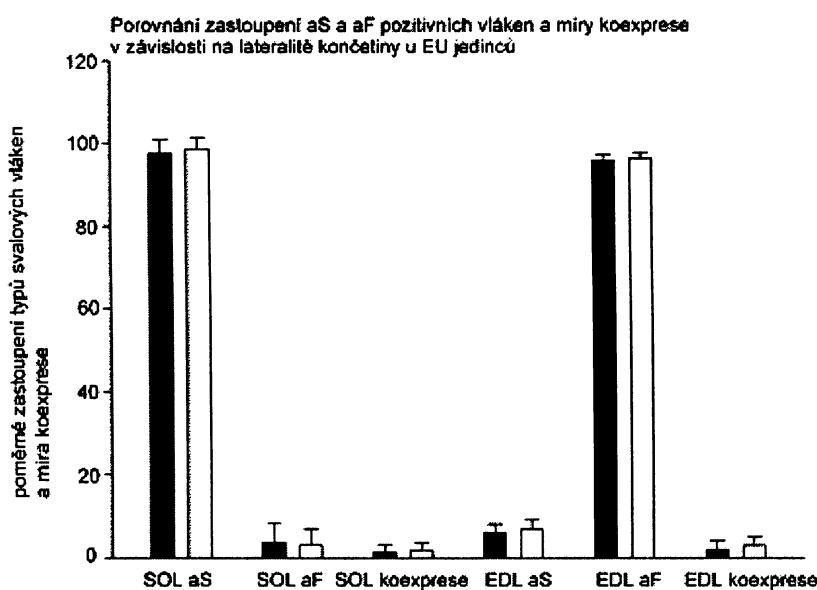
18. Zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v závislosti na lateralitě končetiny

Byly porovnávány rozdílnosti v zastoupení pomalých a rychlých vláken a míry koexprese mezi SOL a EDL týchž jedinců vždy u pravé a levé nohy u třech tyroidních stavů (EU, HY, TH).

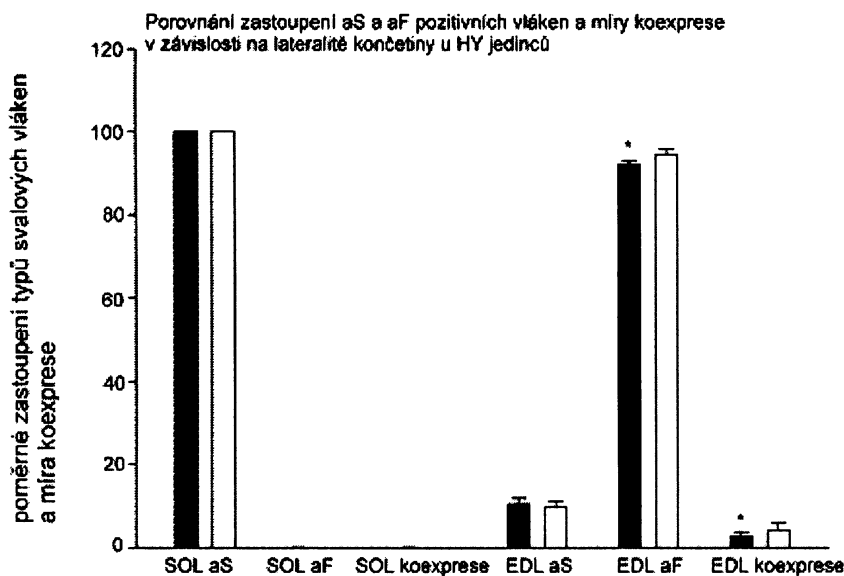
Nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly kromě zastoupení rychlých vláken a míry koexprese v HY EDL, kde byly naměřeny vyšší hodnoty u levé končetiny samic. Tyto rozdíly však byly na hranici statistické signifikance ($p = 0,0464$) (Graf 4., 5., 6.; Tabulka 1.).

	SOL aS dx	SOL aS sin	SOL aF dx	SOL aF sin	SOL dx koex	SOL sin koex
EU	97,61 3,33	98,75 2,68	3,75 4,71	3,05 3,84	1,36 1,68	1,80 1,95
HY	100,00 0,00	100,00 0,00	0,02 0,04	0,00 0,00	0,02 0,04	0,00 0,00
TH	97,56 4,27	97,79 4,77	5,41 5,80	4,31 7,65	2,97 2,63	2,10 2,99
	EDL aS dx	EDL aS sin	EDL aF dx	EDL aF sin	EDL dx koex	EDL sin koex
EU	6,02 2,03	6,75 2,43	95,88 1,40	96,19 1,56	1,92 2,11	2,94 1,94
HY	10,55 1,60	9,51 1,66	92,27 0,83	94,68 1,27	2,82 1,19	4,19 1,98
TH	6,65 2,07	6,08 1,61	95,19 2,54	96,02 1,65	1,84 1,61	2,10 1,20

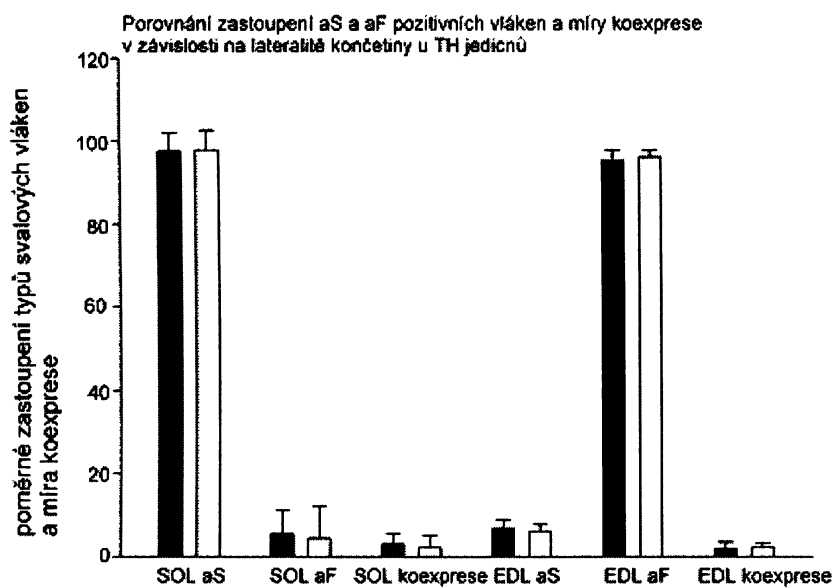
Tabulka 1. Průměrné procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v soleu (SOL) a extensoru (EDL) v závislosti na lateralitě končetiny za EU, HY a TH stavu. Dx značí pravou, sin levou končetinu. Koex značí míru koexprese. Horní údaj v políčku tabulky uvádí průměrnou hodnotu naměřenou pro danou skupinu, dolní údaj uvádí \pm SD. Hodnoty jsou uvedeny v procentech; $n(\text{EU}) = 17$; $n(\text{HY}) = 6$; $n(\text{TH}) = 11$.



Graf 4. Procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese u EU SOL a EDL v závislosti na lateralitě končetiny. Černé sloupce znázorňují pravou, bílé sloupce levou končetinu. Údaje nevykazují signifikantní odlišnosti. Chybové úsečky představují \pm SD; n = 17.



Graf 5. Procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese u HY SOL a EDL v závislosti na lateralitě končetiny. Černé sloupce znázorňují pravou, bílé sloupce levou končetinu. Bylo zjištěno signifikantně vyšší zastoupení rychlých vláken a míra koexprese v EDL levé končetiny, avšak na hranici signifikantní rozdílnosti ($p = 0,0464$). Ostatní hodnoty se signifikantně neliší. Chybové úsečky představují \pm SD; n = 6.



Graf 6. Procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese u TH SOL a EDL v závislosti na lateralitě končetiny. Černé sloupce znázorňují pravou, bílé sloupce levou končetinu. Naměřené údaje nevykazují signifikantní odlišnosti. Chybové úsečky představují \pm SD; $n = 11$.

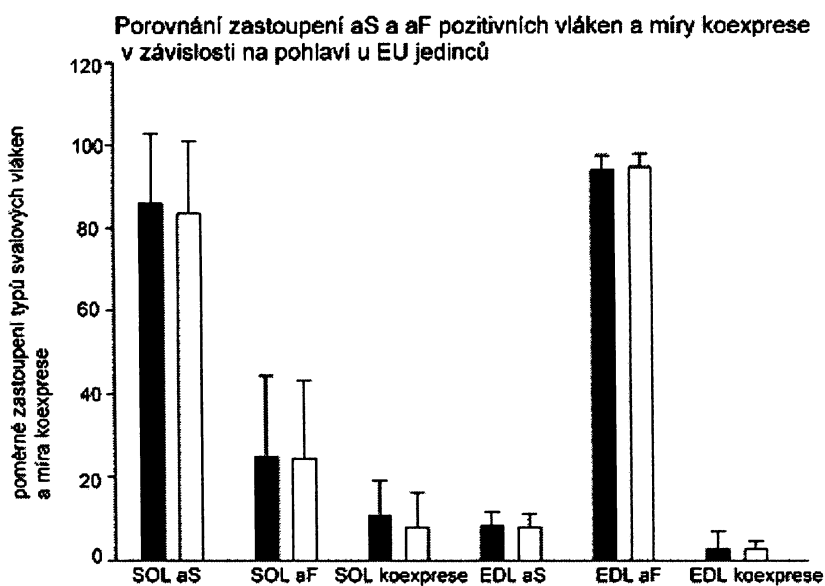
19. Zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v závislosti na pohlaví

Byly zjišťovány rozdílnosti v zastoupení pomalých a rychlých vláken a míře koexprese v závislosti na pohlaví jedinců u třech tyroidních stavů (EU, HY, TH). K porovnání byli použiti sourozenci z vrhu.

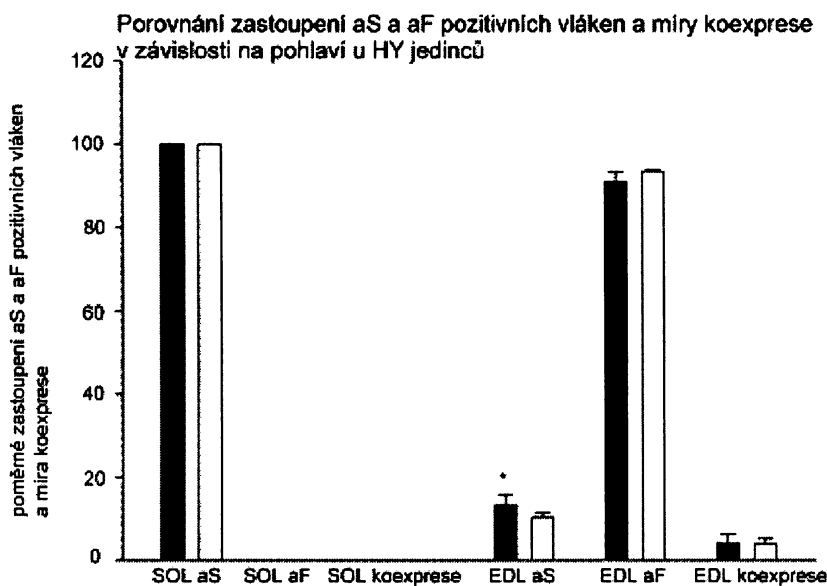
Signifikantní rozdílnost byla zjištěna pouze u HY EDL v zastoupení pomalých vláken, kde byly zaznamenány vyšší hodnoty u samců. Tato rozdílnost však byla na hranici statistické významnosti ($p = 0,0464$) (Graf 7., 8., 9.; Tabulka 2.).

	SOL aS	SOL aF	SOL koex	EDL aS	EDL aF	EDL koex
EU						
M	85,98 16,78	24,80 19,50	10,65 8,46	8,29 3,30	93,99 3,44	2,60 4,15
F	83,41 17,42	24,45 18,55	7,91 8,21	7,94 3,29	94,59 3,31	2,65 1,79
HY						
M	100,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	13,18 2,65	90,92 2,48	4,10 2,17
F	100,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00	10,33 1,07	93,47 0,48	3,80 1,37
TH						
M	96,20 4,52	9,73 6,48	7,20 4,26	7,20 1,56	94,97 0,59	2,20 1,25
F	97,83 2,43	6,70 2,05	4,53 0,47	6,53 0,21	95,57 0,35	2,10 0,26

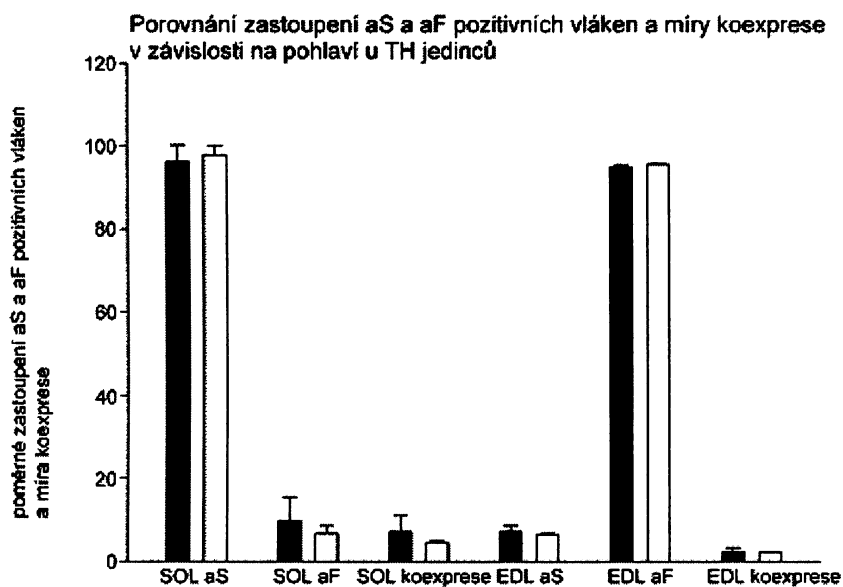
Tabulka 2. Průměrné procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese v soleu (SOL) a extensoru (EDL) v závislosti na pohlaví za EU, HY a TH stavu. M značí samce, F samice. Koex značí míru koexprese. Horní údaj v políčku tabulky uvádí průměrnou hodnotu naměřenou pro danou skupinu, dolní údaj uvádí \pm SD. Hodnoty jsou uvedeny v procentech; $n(\text{EU}) = 8$; $n(\text{HY}) = 6$; $n(\text{TH}) = 6$.



Graf 7. Procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese u EU SOL a EDL v závislosti na pohlaví. Černé sloupce znázorňují samce, bílé sloupce znázorňují samice. Naměřené údaje nevykazují signifikantní odlišnosti. Chybové úsečky představují \pm SD; n = 8.



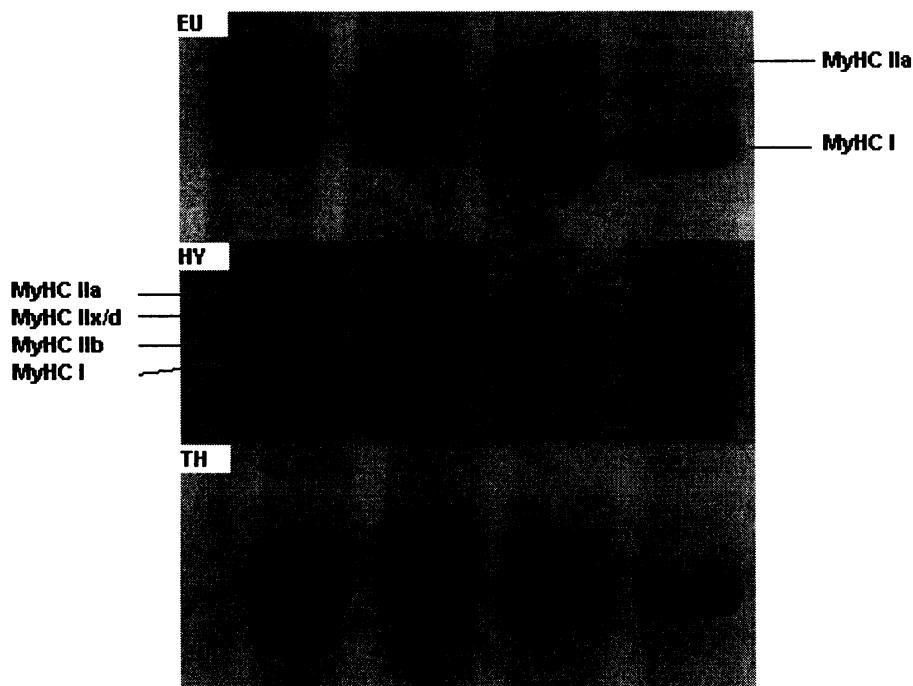
Graf 8. Procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míra koexprese u HY SOL a EDL v závislosti na pohlaví. Černé sloupce znázorňují samce, bílé sloupce znázorňují samice. Signifikantní odlišnost byla zjištěna pouze u EDL v zastoupení pomalých vláken, které je vyšší u samců, avšak na hranici signifikance ($p = 0,464$); ostatní naměřené hodnoty se signifikantně nelišily. Chybové úsečky představují \pm SD; n = 6.



Graf 9. Procentuální zastoupení pomalých a rychlých vláken a míry koexprese u TH SOL a EDL v závislosti na pohlaví. Černé sloupce znázorňují samce, bílé sloupce znázorňují samice. Signifikantní odlišnost nebyla zjištěna v žádné ze sledovaných skupin. Chybové úsečky představují \pm SD; n = 6.

20. Ilustrace vlivu tyroidních hormonů na zastoupení isoform MyHC metodou SDS-PAGE

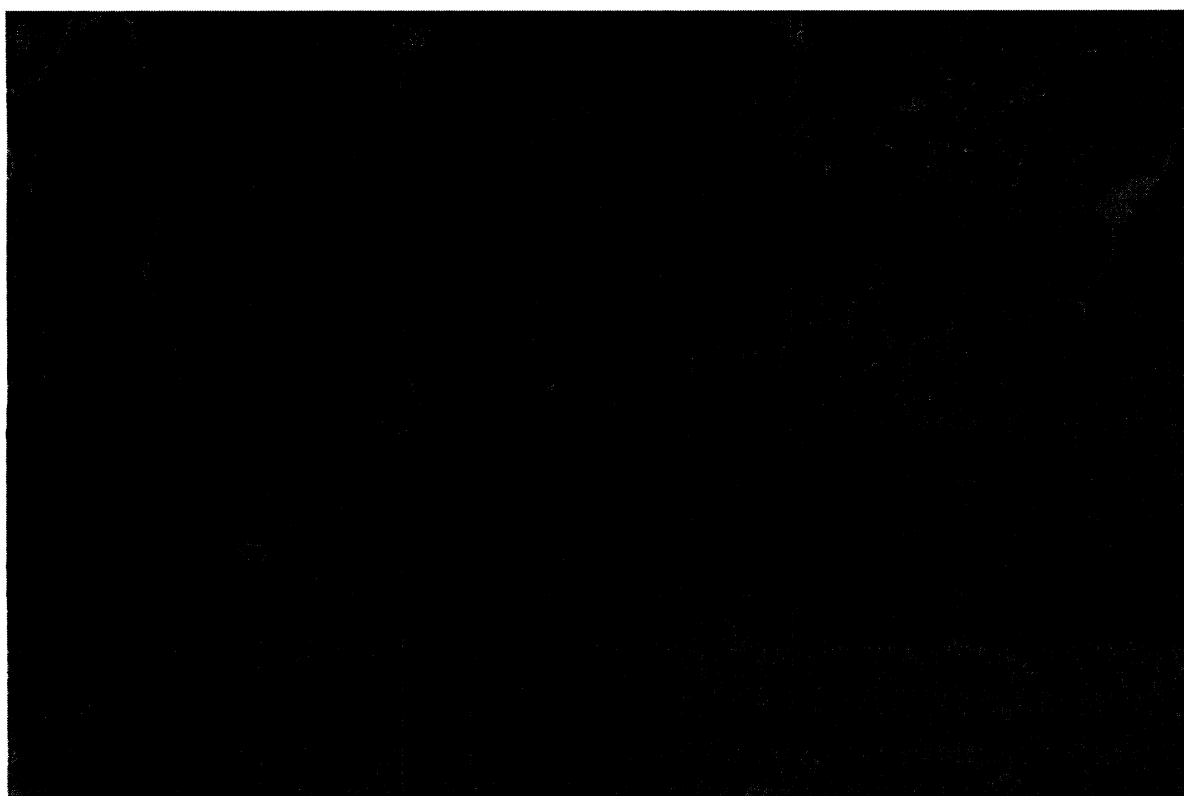
Pomocí metody SDS-PAGE je pro ilustraci znázorněno rozložení isoform MyHC v SOL a EDL za EU, HY i TH stavu. SDS-PAGE analýza byla provedena u vzorků z dospělých osmiměsíčních samic potkana (Obrázek 2.).



Obrázek 2. Vizualizace isoform MyHC I, IIa, IIx/d a IIb pomocí metody SDS-PAGE. Jsou uvedeny vzorky EU, HY i TH osmiměsíčních samic potkana. Dx značí pravou a sin levou končetinu. Zleva doprava jsou uvedeny vzorky EDL dx, EDL sin, SOL dx a SOL sin. U EDL je vždy patrná přítomnost všech isoform MyHC, zvláště pak isoforma MyHC IIx/d a nejrychlejší isoforma MyHC IIb. U EU a TH SOL jsou detekovány pouze dvě isoformy, majoritní MyHC I a minoritní IIa. U HY SOL isoforma MyHC IIa nebyla detekována.

21. Ilustrace vlivu tyroidních hormonů na zastoupení pomalých a rychlých vláken v SOL a EDL

Pro celistvý přehled o vlivu tyroidních hormonů na fenotyp kosterního svalu jsou uvedeny snímky řezů SOL a EDL za EU, HY i TH stavu osmiměsíčních samic potkana. Uvedené snímky řezů vizualizují detekovaná pomalá a rychlá vlákna (Obrázek 3., 4.).



Obrázek 3. **Příčné řezy SOL a EDL s imunohistochemickou detekcí pomalých vláken.** Snímky byly pořízeny světelným mikroskopem Olympus BX50 (zvětšení 400x). Detekce vláken byla provedena imunohistochemicky na řezech SOL a EDL osmiměsíčních samic potkana. a) EU SOL b) HY SOL c) TH SOL d) EU EDL e) HY EDL f) TH EDL. V SOL bylo za všech tyroidních stavů detekováno téměř 100% zastoupení pomalých vláken. V EDL je zastoupení pomalých vláken výrazně menší. Černá šipka značí pomalé vlákno v EDL.



Obrázek 4. **Příčné řezy SOL a EDL s imunohistochemickou detekcí rychlých vláken.** Snímky byly pořízeny světelným mikroskopem Olympus BX50 (zvětšení 400x). Detekce vláken byla provedena imunohistochemicky na řezech SOL a EDL osmiměsíčních samic potkana. a) EU SOL b) HY SOL c) TH SOL d) EU EDL e) HY EDL f) TH EDL. Je patrné téměř nulové zastoupení rychlých vláken v SOL, zatímco v EDL je jejich zastoupení vyšší. Černá šipka značí pomalé vlákno v EDL, bílá šipka značí rychlé vlákno v SOL.

Diskuse

Diplomová práce byla zaměřena na mapování zastoupení dvou základních typů svalových vláken ve svalech SOL a EDL v průběhu postnatálního vývoje, pod vlivem různých hladin tyroidních hormonů a v závislosti na pohlaví a lateralitě končetiny u potkanů inbrední linie Lewis. Výsledky práce jsou kontrolními hodnotami pro pokusy s heterochronní isotransplantací (Jirmanová a Soukup, 1995).

K identifikaci typů svalových vláken byly použity specifické monoklonální protilátky anti-Slow (aS) a anti-Fast (aF). Protilátka aS detekuje pomalou isoformu MyHC I a aF všechny tři typy rychlých isoform MyHC IIa, IIx/d, IIb zároveň. Tento přístup umožňuje hodnotit jednoduchým způsobem koexpresi pomalé a rychlých isoform ve vláknech svalových řezů SOL a EDL, jejíž míra byla stanovena jako hodnota součtu procentuálního zastoupení pomalých a rychlých vláken přesahující 100 %. Toto pojetí koexprese v literatuře nebylo téměř vůbec zaznamenáno; zpravidla se setkáváme s pojmem koexprese v pojetí konkrétních, zejména sousedních, isoform MyHC (např. Caiozzo et al., 1994, 1996; pro přehled Pette a Staron, 2001).

Použití detekce svalových vláken pomocí protilátky aS odpovídá zastoupení pomalé isoformy MyHC I detekované imunohistochemicky, avšak použití protilátky aF přináší komplikace při porovnávání naměřených údajů s další literaturou, kde byly nalezeny pouze tři publikace využívající tuto protilátku odpovídajícím způsobem (Snow et al., 2005; Zachařová et al., 2005; Soukup et al., 2008, v tisku).

Možností, jak vyřešit toto dilema, by bylo sečtení údajů o zastoupení jednotlivých rychlých isoform MyHC získaných pomocí jejich specifických protilátek a porovnání tohoto součtu s hodnotami zastoupení rychlých vláken. Mezi jednotlivými isoformami se však také skrývá možnost koexprese a výsledkem by mohly být zavádějící hodnoty. Přesto byly tyto hodnoty porovnány s vědomím, že koexprese pomalé a rychlých isoform MyHC se pohybovala v rozmezí od 0 do 14,25 %.

Údaje zastoupení pomalých vláken (aS) silně korelují s naměřeným zastoupením isoformy MyHC I a rovněž zastoupení rychlých vláken (aF) silně koreluje se součtem zastoupení rychlých isoform v EU, HY i TH EDL sedmiměsíčních jedinců potkana, zkoumaných Vadászovou a spolupracovníky

(2006). Soukup a spolupracovníci (2008) měřili zastoupení jednotlivých isoform MyHC v EU SOL a EDL 4, 8 a 14tíměsíčních jedinců. Zastoupení isoformy MyHC I a součet zastoupení rychlých isoform MyHC opět velmi silně koreluje s údaji získanými v této práci. Soukup a spolupracovníci (2008) zkoumali také v EU SOL 5, 8 a 14tíměsíčních potkanů zastoupení pomalých a rychlých vláken pomocí aS a aF protilátky. Jejich výsledky potvrzují poznatky získané touto prací, avšak autoři neuvádějí míru koexprese. Zachařová a spolupracovníci (2005) zkoumali zastoupení pomalé a rychlých isoform MyHC jak pomocí specifických protilátek, tak pomocí protilátek aS a aF a též mapovali zastoupení koexprese zjištěné součtem pomalých a rychlých vláken. Ve všech zkoumaných aspektech se jejich výsledky shodují s výsledky zjištěné touto prací. Z těchto porovnání je patrné, že míra zastoupení pomalých a rychlých vláken může být odhadována součtem zastoupení jednotlivých rychlých isoform MyHC, avšak je třeba mít na zřeteli, že se jedná o porovnání pouze přibližné a možné odlišnosti na detailní úrovni nejsou vyloučeny.

Vývojové schéma bylo sledováno na pěti věkových skupinách (2.-6., 6.-12., 12.-26., 26.-39. a nad 39. týden věku). V SOL došlo v rámci věkových skupin ke stabilizaci MyHC fenotypu později než v EDL. Tento fakt je v souladu s prací Soukupa a spolupracovníků (2002), která ovšem uvádí přibližně dvojnásobnou dobu potřebnou k ustálení MyHC fenotypu (7 – 8 měsíců). Je však otázka, zda jev časnějšího dozrávání EDL lze aplikovat univerzálně pro všechny pomalé a rychlé svaly.

V rámci starších věkových skupin (nad 6. týden) u SOL i EDL bylo zjištěno nesignifikantně vyšší zastoupení pomalých vláken u skupiny 26.-39. týdne než u skupiny následující (nad 39. týden). Tento trend koreluje s výzkumy Snowa a spolupracovníků (2005), kteří zaznamenali pokles pomalých vláken I s věkem.

Zajímavý je signifikantní nárůst míry koexprese v SOL u skupiny 6.-12. týdne, kde byl očekáván v souladu s celkovým trendem pokles. Toto zjištění poukazuje na vysokou míru exprese pomalé isoformy a buď přetrvávající, leč nižší expresi rychlých isoform MyHC, nebo jejich pomalou degradaci. Po dosažení věku jednoho roku dochází k nárůstu koexprese pomalé a rychlých isoform (Snow et al., 2005), měřeno na 12, 30 a 36tíměsíčních potkanech. V mé práci byl zaznamenán trend

přesně opačný ve věku do jednoho roku, tedy pokles míry koexprese s věkem v tomto období.

Potkání s alterovaným tyroidním stavem byli použiti starší 12. týdne, proto pro porovnání vlivu různých hladin tyroidních hormonů byli použiti EU jedinci také pouze starší 12. týdne. Z výsledků zkoumání věkového schématu vyplývá, že ke stabilizaci MyHC fenotypu dochází v rámci věkových skupin po 12. týdnu věku, proto bylo možno jedince starší 12 týdnů sloučit do jedné skupiny pro hodnocení vlivu tyroidního stavu na zastoupení pomalých a rychlých vláken a míry koexprese. Ačkoli ke stabilizaci MyHC fenotypu u EDL dochází dříve než u SOL, pro uniformitu dat byly uvažovány hodnoty naměřené též od 12. týdne věku.

Hypotyroidismus způsobil nárůst pomalých vláken prostřednictvím úbytku vláken rychlých v SOL i EDL, což je v souladu s literaturou (Ianuzzo et al., 1977). Tím také tlumil tranzici vláken rychlých na pomalá (Butler-Browne a Whalen, 1984). V SOL s nízkým obsahem rychlých vláken tedy došlo zároveň k útlumu koexprese. Naproti tomu v EDL hypotyroidismus vedl k silnému nárůstu koexprese, neboť v EDL je dostatek rychlých vláken, která mohou TH vlivu podlehnout a iniciovat tranzici.

Hypertyroidní stav vyvolal silnou iniciaci tranzice v SOL směrem k rychlejším isoformám MyHC v souladu s literaturou (Caiozzo et al., 1991) a též míry koexprese, avšak v EDL TH stav neovlivňoval MyHC fenotyp. Zůstává otázkou, zda k tomuto jevu došlo vlivem silnější citlivosti pomalých svalů na tyroidní hormony (Soukup a Jirmanová, 2000), či zda byl TH stav navozován příliš slabými dávkami T3 (kapitola 9.).

V závislosti na lateralitě končetiny či pohlaví nebyla zaznamenána rozdílnost v zastoupení pomalých a rychlých vláken a míře koexprese kromě výjimek, které naznačovaly trendy ve vyšším zastoupení rychlých vláken a míře koexprese u HY EDL levé končetiny samic oproti končetině pravé a ve vyšším zastoupení pomalých vláken u HY EDL samců oproti samicím. Výjimečné odlišnosti však byly na hranici signifikantní průkaznosti a nelze je zobecnit pro další pozorování a pokusy. Je však zajímavé, že byly zaznamenány vždy za HY stavu. Navozením silnější míry hypotyroidismu by bylo možno ověřit, zda jsou odlišnosti podloženy biologickými tendencemi.

Závěr

V rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že:

1. Stabilizace MyHC fenotypu samic probíhá u EDL dříve než u SOL. U EDL dochází nejdříve ke stabilizaci zastoupení převažujících rychlých vláken a to krátce po narození do 2. týdne věku, později vláken pomalých a tím i míry koexprese mezi 6. a 12. týdnem věku. U SOL dochází dříve ke stabilizaci majoritních pomalých vláken a to mezi 6. a 12. týdnem věku, později vláken rychlých a míry koexprese mezi 12. a 26. týdnem věku.
2. Byl prokázán vliv tyroidních hormonů na MyHC fenotyp kosterního svalu samic potkanů linie Lewis. HY stav způsobil nárůst pomalých vláken a pokles rychlých v SOL i EDL a nárůst míry koexprese v EDL, v SOL míru koexprese snižoval. TH stav vedl k nárůstu rychlých vláken a míry koexprese v SOL, avšak neměl vliv na zastoupení pomalých vláken v SOL a EDL ani na míru koexprese a zastoupení rychlých vláken v EDL.
3. Nebyla prokázána rozdílnost v zastoupení pomalé a rychlých isoform MyHC u SOL a EDL v závislosti na lateralitě končetiny samičích jedinců a to ani pod různými tyroidními stavy s výjimkou slabého, přesto však signifikantního, účinku HY stavu na zastoupení rychlých vláken a míru koexprese v EDL, kde byly zaznamenány nižší hodnoty u pravé nohy.
4. Nebyla prokázána rozdílnost v zastoupení pomalé a rychlých isoform MyHC u SOL a EDL v závislosti na pohlaví a to ani pod různými tyroidními stavy s výjimkou slabého, přesto však signifikantního, účinku na zastoupení pomalých vláken u HY EDL, které bylo u samců vyšší.

Z uvedených závěrů vyplývá, že změna hladiny tyroidních hormonů může výrazně přispívat k diferenciaci a tranzici fenotypu MyHC u SOL a EDL. Fyziologická ani experimentálně navozená hladina tyroidních hormonů nevytváří výrazné rozdíly v

zastoupení pomalých a rychlých vláken ani v míře koexprese mezi pravou a levou končetinou týchž jedinců či mezi pohlavími.

Tyroidní hormony mají vliv a jsou nezbytně nutné k expresi rychlých isoform MyHC, ale za normálních podmínek je jejich koncentrace udržována organismem na určité rovnovážné úrovni. Tyroidní hormony působí jako regulační agens v mnoha metabolických dějích v mnoha orgánech. Pro organismus je tedy nepřipustné, aby zvyšoval jejich absolutní hladinu v krvi pouze pro potřeby svalového metabolismu více, než je únosné, jelikož by tím způsobil celé spektrum patologických stavů ve všech tkáních. V regulaci vzniku požadovaného svalového fenotypu se proto uplatňují i další mechanismy, jako je vzorec nervových impulsů či jiné hormony. (Soukup a Jirmanová, 2000).

Příloha

Příloha 1. Vliv hladiny tyroidních hormonů na tranzici isoforem MyHC

EU	HY	TH
MyHC I	I	IIa
MyHC IIa	I	IIx/d; IIb
MyHC IIx/d	IIa	IIb
MyHC IIb	IIx/d	IIb

Vliv hladiny tyroidních hormonů na tranzici isoforem MyHC. Údaje z tabulky dokazují, že při tranzici isoforem MyHC dochází k nástupu isoformy MyHC s nejbližší vyšší či nižší ATPázovou aktivitou. Převzato a upraveno podle d'Albis a Butler-Browne, 1993.

Příloha 2. Seznam chemikálií a jejich dodavatelů

Navození HY a TH stavu potkanů

- methimazol (2-mercapto-1-methylimidazol): Sigma, Rakousko
- 3,3',5-trijód-L-tyronin (T3 jako sodná sůl): Sigma, Rakousko

Extrakce MyHC

- DTT: Sigma, Rakousko
- EGTA: Sigma, Rakousko
- chlorid sodný: Lachema, ČR
- NaH₂PO₄.2H₂O: Lachema, ČR
- Na₂HPO₄.12H₂O: Lachema, ČR
- Na₄P₂O₇.10H₂O: Lachema, ČR

Barevná detekce proteinů

- dusičnan stříbrný: Sigma, Rakousko
- etanol: Lachema, ČR
- kyselina octová: Lachema, ČR
- metanol: Lachema, ČR
- thiosíran sodný: Lachema, ČR
- uhličitan sodný: Lachema, ČR

SDS-PAGE

- akrylamid: Sigma, Rakousko
- APS: Sigma, Rakousko
- bromfenolová modř: Lachema, ČR
- DTT: Sigma, Rakousko
- EDTA: Sigma, Rakousko
- glycerol: Sigma, Rakousko
- glycin: Sigma, Rakousko
- NN bisakrylamid: Sigma, Rakousko
- SDS: Sigma, Rakousko
- TEMED: Sigma, Rakousko
- TRIS: Sigma, Rakousko

Imunohistochemická detekce MyHC

- aF: Biotrend, Německo
- aS: Biotrend, Německo
- DAB: Sigma, Rakousko
- DPX: zalévací médium, Fluka
- etanol: Lachema, ČR
- hydroxid sodný: Penta, ČR
- kyselina citrónová: Sigma, Rakousko
- Nembutal: Sigma, Rakousko
- Narkamon: Sigma, Rakousko
- NDS: SpinChem, ČR
- PBS pufr (pH = 7,6 s 0,15 M chloridem sodným) v tabletě: Sigma, Rakousko
- peroxid vodíku: Lachema, ČR
- Rometar: Sigma, Rakousko
- sekundární oslí protilátka Biotin-SP-conjugated, antimouse: Spinchem, ČR
- Triton X 100 (dále jen Triton): Sigma, Rakousko
- TBS pufr (pH = 7,6 s 0,15 M chloridem sodným) v tabletě: Sigma, Rakousko
- xylen: Penta, ČR

Příloha 3. Přístroje a materiál

- analytické váhy AND GR 200 EC: Schoeller Instruments, Německo
- aparatura pro SDS-PAGE Biorad Miniprotean 3: Biorad, USA
- centrifuga Universal 32 R: Hettich, Německo
- chirurgické nástroje: Medin, ČR
- kolona na přípravu deionizované vody Elix S (filtrační aparát Progard 2): Millipore, USA
- kryostat Cryocut Leica CM 3000: Leica, Německo
- magnetická teflonová míchadla: Biotech, ČR
- magnetická míchačka Termolyne: Termolyne, USA
- mikrobiální filtry s průměrem pórů 0,22 μm : Millipore, USA
- mikroskop Olympus BX50: Olympus, Japonsko
- pH metr Orion, perpHecT 310: Orion, USA
- pipety v rozsazích 2-20, 20-200, 200-1000 μm : Eppendorf, Německo
- poloautomatický systém pro stereologické analýzy Cast – Grid : Dánsko
- předvážky PT 120 Portable: Sartorius, Německo
- třepačka Biosan Mini Rocker MR 1: Biotech, ČR
- zdroj pro aparaturu pro SDS-PAGE Lightning Volt OSP-250 L: Biotech, ČR

Příloha 4. Použité roztoky

Imunohistochemická detekce

Citrátový pufr (pH = 6)

- 0,25 %kyselina citrónová
- 0,1 % hydroxid sodný

Blokační pufr

- 0,5%NDS
- omývací pufr

DAB roztok

- DAB1 tableta
- H₂O15 ml
- 30 % peroxid vodíku ..15 µl
- TBS pufr1 tableta

Extrakce MyHC

Promývací pufr (pH = 6,4) o objemu 10 ml:

- 1 mM EGTA, pH 7,0 50 µl
- 1 M chlorid sodný 200 µl
- 4,0 mM Na₂HPO₄.12H₂O 14,33 mg
- 4,4 mM NaH₂PO₄.2H₂O 6,86 mg

Extrakční pufr (pH = 8,4) o objemu 10 ml:

- 0,2 M EGTA, pH = 7 250 µl
- 0,25 M DTT 40 µl
- 0,1 M Na₄P₂O₇.10H₂O 9,71 ml

Omývací pufr

- H₂O 200 ml
- PBS pufr.... 1 tableta
- Triton 0.4 ml

Roztok sekundární protilátky

- NDS5 µl
- roztok 1 tablety PBS1 ml
- sekundární protilátka5 µl
- Triton2 µl

SDS-PAGE

Dělicí gel:

- 87 % glycerol 4,3 g
- 30 % akrylamid +
NN-bisakrylamid (50:1) .. 2,667 ml
- TRIS (pH = 8,8) 1,333 ml
- 1 M glycin 1 ml
- 10 % SDS 0,4 ml
- H₂O 1 ml
- 10 % APS 0,1 ml
- TEMED 6 µl

Zaostřovací gel:

- 87 % glycerol..... 2,15 g
- 30 % akrylamid +
NN-bisakrylamid (50:1).. 0,7 ml
- 0,5 M TRIS (pH = 6,8) ... 0,7 ml
- EDTA (pH = 7,0) 0,2 ml
- 10 % SDS 0,2 ml
- H₂O 1,450 ml
- 10 % APS 50 µl
- TEMED 6 µl

Vzorkový pufr o objemu 10 ml

- 0,1 % Bromfenolová modř
- 0,3 M DTT 0,5 ml
- 0,1 M EDTA (pH = 7,0) 50 µl
- 100 % Glycerol 2 ml
- 10 % SDS 5 ml
- 0,5 M TRIS HCl (pH = 6,8) 2,5 ml

Vnitřní pufr o objemu 1 l

- 150 mM glycin
- 3,5 mM SDS
- 100 mM TRIS

Vnější pufr o objemu 1 l

- 75 mM glycin
- 1,75 mM SDS
- 50 mM TRIS

Barevná detekce proteinů stříbrem

Vyvíjecí roztok

- 2,9 hmotnostních % ..uhličitan sodný
- 0,0004 hmotnostních %.. thiosíran sodný

Fixační roztok

- 45 objemových %metanol
- 10 objemových %kyselina octová

Seznam použité literatury

1. **Adams, G. R.; Haddad, F.; McCue, S. A.; Bodell, P. W.; Zeng, M.; Qin, L.; Qin, A. X.; Baldwin, K. M.:** *Effect of space flight and thyroid deficiency on rat handlimb development. II. Expression of MHC isoforms.* J. Appl. Physiol. 88: 904 – 916, 2000.
2. **Adams, G. R.; McCue, S. A.; Zeng, M.; Baldwin, K. M.:** *Time course of myosin heavy chain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state.* Am. J. Physiol. 276 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 45: R954 – R961, 1999.
3. **Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.:** *Molecular biology of the cell; 4th edition.* Garland Science, New York: 907 – 983, 2002.
4. **Andersen, J. L.; Schjerling, P.; Saltin, B.:** *Muscle, genes, and athletic performance.* Sci. Am. 283: 48 – 55, 2000.
5. **Anderson, J. E.; Macintosh, L. M.; Moor, A. N.; Yablonka-Reuveni, Z.:** *Levels of MyoD protein expression following injury of mdx and normal limb muscle are modified by thyroid hormone.* J. Histochem. Cytochem. 46: 59 – 67, 1998.
6. **Baldwin, K. M.:** *Muscle Development: Neonatal to Adult.* Exercise and Sport Sciences Reviews 12: 1 – 19, 1984.
7. **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.
8. **Baldwin, K. M.; Hooker, A. M.; Campbell, P. J.; Lewis, R. E.:** *Enzyme changes in neonatal skeletal muscle: Effect of thyroid deficiency.* Am. J. Physiol. 235: C97 – C102, 1978.
9. **Bandman, E.:** *Myosin isoenzyme transitions in muscle development, maturation, and disease.* Int. Rev. Cytol. 97: 97 – 131, 1985.
10. **Berger, M.; Chazaud, J.; Jean-Faucher, C.; de Turckheim, M.; Veyssièr, G.; Jean, C.:** *Developmental patterns of plasma and testicular testosterone in rabbits from birth to 90 days of age.* Biol. Reprod. 15: 561 – 564, 1976.
11. **Betz, W. J.; Caldwell, J. H.; Ribchester, R. R.:** *The size of motor units during post-natal development of rat lumbrical muscle.* J. Physiol. 297: 463 – 478, 1979.
12. **Blum, H.; Beier, H.; Gross, J. H.:** *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.* Electrophoresis 8: 93 – 99, 1987.

13. **Booth, F. W.; Weeden, S. H.; Tseng, B. S.:** *Effect of aging on human skeletal muscle and motor function.* Med. Sci. Sports Exerc. 26: 556 – 560, 1994.
14. **Bottinelli, R.; Betto, R.; Schiaffino, S.; Reggiani, C.:** *Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle.* J. Muscle Res. Cell Motil. 15: 413 – 419, 1994.
15. **Bottinelli, R.; Canepari, M.; Reggiani, C.; Steinen, G. J. M.:** *Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres.* J. Physiol. (Lond.) 481: 663 – 675, 1994.
16. **Bottinelli, R.; Schiaffino, S.; Reggiani, C.:** *Force-velocity relationship and myosin heavy chain isoform composition of skinned fibres from rat skeletal muscle.* J. Physiol. (Lond.) 437: 655 – 672, 1991.
17. **Buller, A. J.; Eccles, J. C.; Eccles, R. M.:** *Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their response.* J. Physiol. (Lond.) 150: 417 – 439, 1960.
18. **Buonanno, A.; Rosenthal, N.:** *Molecular Control of Muscle Diversity and Plasticity.* Developmental Genetics 19: 95 – 107, 1996.
19. **Butler-Browne, G. S.; Bugaisky, L. B.; Cuenoud, S.; Schwartz, K.; Whalen, R. G.:** *Denervation of newborn rat muscles does not block the appearance of adult fast myosin heavy chain.* Nature (Lond.) 299: 830 – 833, 1982.
20. **Butler-Browne, G. S.; Eriksson, P. O.; Laurent, C.; Thornell, L. E.:** *Adult human masseter muscle fibres express myosin isozymes characteristic of development.* Muscle Nerve 11: 610 – 620, 1988.
21. **Butler-Browne, G. S.; Herlicoviez, D.; Whalen, R. G.:** *Effect of hypothyroidism on myosin isozyme transitions in developing rat muscle.* FEBS Lett. 166: 71 – 75, 1984.
22. **Butler-Browne, G. S.; Whalen, R. G.:** *Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle.* Dev. Biol. 102: 324 – 334, 1984.
23. **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: 2237 – 2248, 1998.
24. **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.

25. **Caiozzo, V. J.; Haddad, F.; Baker, M. J.; Herrick, R. E.; Prietto, N.; Baldwin, K. M.:** *Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle.* J. Appl. Physiol. 81: 123 – 132, 1996.
26. **Caiozzo, V. J.; Herrick, R. E.; Baldwin, K. M.:** *Influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles.* Am. J. Physiol. 261: C285 – C295, 1991.
27. **Caiozzo, V. J.; Herrick, R. E.; Baldwin, K. M.:** *Response of slow and fast muscle to hypothyroidism: maximal shortening velocity and isoforms.* Am. J. Physiol. 263: C86 – C94, 1992.
28. **Carter, W. J.; Benjamin, W. S. van der Weijden; Faas, F. H.:** *Effect of experimental hyperthyroidism on skeletal-muscle proteolysis.* Biochem. J. 194: 685 – 690, 1981.
29. **Condon, K.; Silberstein, L.; Blau, H. M.; Thompson, W. J.:** *Development of muscle fibre types in the prenatal hindlimb.* Dev. Biol. 138: 256 – 274, 1990.
30. **Crespo Armas, A.; Finol, H. J.; Anchustegui, B.; Cordero, Z.:** *Skeletal muscle ultrastructural and biochemical alterations induced by experimental hyperthyroidism.* Acta Cient. Venez. 44: 234 – 239, 1993.
31. **d'Albis, A.; Anger, M.; Lompré, A. M.:** *Rabbit masseter expresses the cardiac α myosin heavy chain gene. Evidence from mRNA sequence analysis.* FEBS Lett. 324: 178 – 180, 1993a.
32. **d'Albis, A.; Butler-Browne, G. S.:** *The Hormonal Control of Myosin Isoform Expression in Skeletal Muscle of Mammals: a Review.* BAM 3: 7 – 16, 1993.
33. **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, 1991a.
34. **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, 1993b.
35. **d'Albis, A.; Goubel, F.; Couteaux, R.; Janmot, C.; Mira, J. C.:** *The effect of denervation on myosin isoform synthesis in rabbit slow-type and fast-type muscles during terminal differentiation: denervation induces differentiation into slow-type muscles.* Eur. J. Biochem. 223: 249 – 258, 1994.
36. **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.

37. **d'Albis, A.; Janmot, C.; Mira, J. C.; Couteaux, R.:** *Characterization of a ventricular V1 myosin isoform in rabbit masticatory muscles. Developmental and neural regulation.* BAM 1: 23 – 34, 1991b.
38. **Danieli-Betto, D.; Zerbato, E.; Betto, R.:** *Type 1, 2A and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 981 – 987, 1986.
39. **DeNardi, C.; Moretti, P.; Gorza, L.; Velleca, M.; Buckingham, M.; Schiaffino, S.; Ausoni, S.:** *Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene.* J. Cell Biol. 123: 823 – 835, 1993.
40. **Dolmetsch, E. R.; Lewis, R. S.; Goodnow, C. C.; Healy, J. I.:** *Differential activation of transcriptional factors induced Ca^{2+} response amplitude and duration.* Nature 386: 855 – 858, 1997.
41. **Draeger, A.; Weeds, A. G.; Fitzsimons, R. B.:** *Primary, secondary and tertiary myotubes in developing skeletal muscle: a new approach to the analysis of human myogenesis.* J. Neurol. Sci. 81: 19 – 43, 1987.
42. **Dubois, J. D.; Dussault, J. H.:** *Ontogenesis of thyroid function in the neonatal rat. Tyroxin (T4) and triiodothyronin (T3) production rates.* Endocrinology 101: 435 – 441, 1977.
43. **Duxson, M. J.; Usson, Y.; Harris, A. J.:** *The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies.* Development. 107: 743 – 750, 1989.
44. **Eftimie, R.; Brenner, H. R.; Buonanno, A.:** *Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1349 – 1353, 1991.
45. **Falduto, M. T.; Czerwinski, S. M.; Hickson, R. C.:** *Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibres.* J. Appl. Physiol. 69: 1058 – 1062, 1990.
46. **Fitzsimons, D. P.; Herrick, R. E.; Baldwin, K. E.:** *Isomyosin distribution in rodent muscles: effects of altered thyroid state.* J. Appl. Physiol. 69: 321 – 327, 1990.
47. **Fitzsimons, R. B.; Hoh, J. F. Y.:** *Embryonic and foetal myosins in human skeletal muscle.* J. Neurol. Sci. 52: 367 – 384, 1981.
48. **Florini, J. R.; Ewton, D. Z.; Magri, K. A.:** *Hormones, growth factors, and myogenic differentiation.* Annu. Rev. Physiol. 53: 201 – 216, 1991.
49. **Fournier, M.; Roy, R. R.; Perham, H.; Simard, C. P.; Edgerton, V. R.:** *Is limb immobilisation a model of disuse?* Exp. Neurol. 80: 147 – 156, 1983.

50. **Gambke, B.; Lyons, G. E.; Haselgrove, J.; Kelly, A. M.; Rubinstein, N. A.:** *Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles.* FEBS Lett. 156: 335 – 339, 1983.
51. **Glass, C. K.; Holloway, J. M.:** *Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor.* Biochim. Biophys. Acta 1032: 157 – 176, 1990.
52. **Goodson, H. V.; Dawson, S. C.:** *Multiplying myosins.* Proc. Natl. Acad. Sci. 10: 3498 – 3499, 2006.
53. **Gorza, L.; Gundersen, K.; Lømo, T.; Schiaffino, S.; Westgaard, R. H.:** *Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscle by chronic high-frequency stimulation in the rat.* J. Physiol. (Lond.) 402: 627 – 649, 1988.
54. **Guth, L.; Samaha, F. J.:** *Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle.* Exp. Neurol. 25: 138 – 152, 1969.
55. **Haddad, F.; Qin, A. X.; McCue, S. A.; Baldwin, K. M.:** *Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: effects of altered thyroid state.* Am. J. Physiol. 274 (Endocrinol. Metab. 37): E1018 – E1026, 1998.
56. **Hämäläinen, N.; Pette, D.:** *The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, IID, and IIA in Skeletal Muscle of Mouse, Rat, and Rabbit.* J. Histochem. Cytochem. 41: 733 – 743, 1993.
57. **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, 1997.
58. **Harris, A. J.; Duxson, M. J.; Fitzsimons, R. B.; Rieger, F.:** *Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles.* Development 107: 771 – 84, 1989.
59. **Harrison, A. P.; Tivey, D. R.; Clausen, T.; Duchamp, C.; Dauncey, M. J.:** *Role of thyroid hormones in early postnatal development of skeletal muscle and its implications for undernutrition.* British Journal of Nutrition 76: 841 – 855, 1996.
60. **Hatina, J.; Reischig, J.:** *Hormonální regulace genové transkripce – jaderné receptory jako ligandem-aktivované transkripční faktory.* Čs. Fyziol. 49: 61 – 72, 2000.
61. **Hoh, J. F. Y.:** *Myogenic regulation of mammalian skeletal muscle.* News Physiol. Sci. 6: 1 – 6, 1991.
62. **Hoh, J. F. Y.; Hughes, S.; Hale, P. T.; Fitzsimons, R. B.:** *Immunocytochemical and electrophoretic analyses of changes in myosin gene expression in cat limb fast and slow muscles during postnatal development.* J. Muscle Res. Cell Motil. 9: 30 – 47, 1988.

63. Hoh, J. F. Y.; Kim, Y.; Sieber, L. G.; Zhong, W. W.; Lucas, C. A.: *Jaw-closing muscles of kangaroos express α -cardiac myosin heavy chain*. J. Muscle Res. Cell Motil. 21: 673 – 680, 2000.
64. Hoh, J. F. Y.; Yeoh, G. P. S.: *Rabbit skeletal myosin isoenzymes from foetal, fast-twitch and slow-twitch muscles*. Nature (Lond.) 280: 321 – 323, 1979.
65. Holtzer, H.; Marshall, J. M.; Finck, H.: *An analysis of myogenesis by the use of fluorescent antimyosin*. J. Biophys. and Biochem. Cytol. 3: 705 - 724, 1957.
66. Howald, H.: *Training-induced morphological and functional changes in skeletal muscle*. Int. J. Sports Med. 3: 1 – 12, 1982.
67. Hughes, S. M.; Koishi, K.; Rudnicki, M.; Maggs, A. M.: *MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents*. Mech. Dev. 61: 151 – 163, 1997.
68. Hughes, S. M.; Taylor, J. M.; Tapscott, S. J.; Gurley, C. M.; Carter, W. J.; Peterson, A. C.: *Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones*. Development 118: 1137–1147, 1993.
69. Chawla, A.; Lazar, M. A.: *Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation*. Journal of Biological Chemistry 268: 16265 – 16269, 1993.
70. 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: 1 – 15, 1997.
71. Ianuzzo, D.; Patel, P.; Chen, V.; O'Brien, P.; Williams, C.: *Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin*. Nature 270: 74 – 76, 1977.
72. Izumo, S.; Nadal-Ginard, B.; Mahdavi, V.: *All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner*. Science 231: 597 – 600, 1986.
73. Jacobs, S. C. J. M.; Bär, P. R.; Bootsma, A. L.: *Effect of hypothyroidism on satellite cells and postnatal fibre development in the soleus muscle of rat*. Cell Tissue Res. 286: 137 – 144, 1996.
74. Jansen, J.; Friesema, E. C.; Milici, C.; Visser, J. T.: *Thyroid hormone transporters in health and disease*. Thyroid 15: 757 – 768, 2005.
75. Jiang, B.; Roy, R. R.; Edgerton, V. R.: *Expression of a fast fibre enzyme profile in the cat soleus after spinalization*. Muscle Nerve 13: 1037 – 1049, 1990.
76. Jirmanová, I.; Soukup, T.: *Critical period in muscle spindle regeneration in grafts of developing rat muscles*. Anat. Embryol. 192: 283 – 291, 1995.

77. **Kaminsky, P.; Klein, M.; Duc, M.:** *Control of muscular bioenergetics by the thyroid hormones.* Presse Med. 22: 774 – 778, 1993.
78. **Kaminski, H. J.; Ruff, R. L.:** *Endocrine myopathies.* In: Engel, A. G.; Franzini-Armstrong, C.: *Myology.* McGraw-Hill, New York, 1726 – 1753, 1994.
79. **Kang, C. M.; Lavoie, P. A.; Gardiner, P. F.:** *Chronic exercise increases SNAP-25 abundance in fast-transported proteins of rat motoneurons.* Neuroreport 6: 549 – 553, 1995.
80. **Katzeff, H. L.; Ojama, K. M.; Klein, I.:** *Effects of exercise on protein synthesis and myosin heavy chain gene expression in hypothyroid rats.* Am. J. Physiol. 30: E63 – E67, 1994.
81. **Kawa, K.; Obata, K.:** *Altered developmental changes of neuromuscular junction in hypo- and hyperthyroid rats.* Physiol. (Lond.) 329: 143 – 161, 1982.
82. **Kjellgren, D.; Thornell, L.-E.; Andersen, J.; Pedrosa-Domellöf F.:** *Myosin Heavy Chain Isoforms in Human Extraocular Muscles.* IOVS 44: 1419 – 1425, 2003.
83. **Koenig, R. J.; Lazar, M. A.; Hodin, R. A.; Brent, G. A.; Larsen, P. R.; Chin, W. W.; Moore, D. D.:** *Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing.* Nature 337: 659 – 661, 1989.
84. **Kohrle, J.:** *The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability.* Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders I: 49 – 58, 2000.
85. **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.
86. **Larsson, L.; Ansved, T.:** *Effects of ageing on the motor unit.* Progress in Neurobiology 45: 397 – 458, 1995.
87. **Larsson, L.; Li, X.; Teresi, A.; Salviati, G.:** *Effects of thyroid hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats.* J. Physiol. (London) 481: 149 – 161, 1994.
88. **Larsson, L.; Yu, F.:** *Gender-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the expression of myosin isoforms in young and old rats.* Acta Physiol. Scand. 159: 81 – 89, 1997.
89. **Lazar, M. A.:** *Steroid and thyroid hormone receptors.* Endocrinol. Metab. Clin. N. Amer. 20: 681 – 695, 1991.

90. **Lazar, M. A.; Hodin, R. A.; Chin, W. W.:** *Human carboxyl-terminal variant of a-type c-erbA inhibits transactivation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7771 – 7774, 1989a.
91. **Lazar, M. A.; Hodin, R. A.; Darling, D. S.; Chin, W. W.:** *A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbAa transcriptional unit.* Molecular and Cellular Biology 9: 1128 – 1136, 1989b.
92. **Li, X.; Hughes, S. M.; Salviati, G.; Teresi, A.; Larsson, L.:** *Thyroid hormone effects on contractility and myosin composition of soleus muscle and single fibres from young and old rats.* J. Physiol. 494: 555 – 567, 1996.
93. **Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, L.; Darnell, J.:** *Molecular Cell Biology 5th edition.* 81, W. H. Freeman and Company, 2003.
94. **Lomax, R. B.; Robertson, W. R.:** *The effects of hypo- and hyperthyroidism on fibre composition and mitochondrial enzyme activities in rat skeletal muscle.* J. Endocrinol. 133: 375 – 380, 1992.
95. **Loughna, P. T.; Izumo, S.; Goldspink, G.; Nadal-Ginard, B.:** *Disuse and passive stretch cause rapid alterations in expression of developmental and adults contractile protein genes in skeletal muscle.* Development 109: 217 – 223, 1990.
96. **Lucas, C. A.; Rughani, A.; Hoh, J. F. Y.:** *Expression of extraocular myosin heavy chain in rabbit laryngeal muscle.* J. Muscle Res. Cell Motil. 16: 368 – 378, 1995.
97. **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.
98. **Mascarello, F.; Rowlerson, A. M.:** *Myosin isoform transitions during development of extra-ocular and masticatory muscles in the fetal rat.* Anat. Embryol. 185: 143 – 153, 1992.
99. **Miller, J. B.:** *Myoblast diversity in skeletal myogenesis: how much and to what end?* Cell 69: 1 – 3, 1992.
100. **Miller, J. B.; Stockdale, F. E.:** *Developmental origins of skeletal muscle fibres: clonal analysis of myogenic cell lineages based on expression of fast and slow myosin heavy chain.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3860 – 3865, 1986.
101. **Miller, J. B.; Stockdale, F. E.:** *Multiple cellular processes regulate expression of slow myosin heavy chain isoforms during avian myogenesis in vitro.* Dev. Biol. 136: 393 – 404, 1989.

102. **Montgomery, A.:** *The time course of thyroid-hormone-induced changes in the isotonic and isometric properties of the rat soleus muscle.* Pflügers Arch. 421: 350 – 356, 1992.
103. **Murgia, M.; Serrano, A. L.; Calabria, E.; Pallafacchina, G.; Lomo, T.; Schiaffino, S.:** *Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes.* Nat. Cell. Biol. 2: 142 – 147, 2000.
104. **Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.:** *Harperova biochemie.* 684 – 687, H&H, 2001.
105. **Murray, M. B.; Zilz, N. D.; McCreary, N. L.; MacDonald, M. J.; Towle, H. C.:** *Isolation and characterization of rat cDNA clones for two distinct thyroid hormone receptors.* J. Biol. Chem. 263: 12770 – 12777, 1988.
106. **Oetting, A.; Yen, P. M.:** *New insights into thyroid hormone action.* Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 21: 193 – 208, 2007.
107. **Olson, E. N.:** *Signal transduction pathways that regulate skeletal muscle gene expression.* Molec. Endocrinol. 7: 1369 – 1378, 1993.
108. **Olson, E. N.; Williams, R. S.:** *Remodeling muscles with calcineurin.* Bioessays 22: 510 – 51, 2000.
109. **Ontell, M.; Kozeka, K.:** *The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study.* Am. J. Anat. 171: 133 – 148, 1984.
110. **Ott, M. O.; Bober, E.; Lyons, G.; Arnold, H.; Buckingham, M.:** *Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo.* Development 111: 1097 – 1107, 1991.
111. **Pattullo, M. C.; Cotter, M. A.; Cameron, N. E.; Barry, J. A.:** *Effects of lengthened immobilization on functional and histochemical properties of rabbit tibialis anterior muscle.* Exp. Physiol. 77: 433 – 442, 1992.
112. **Pedrosa, F.; Soukup, T.; Thornell, L. E.:** *Expression of an alpha cardiac-like myosin heavy chain in muscle spindle fibres.* Histochem. 95: 105 – 113, 1990.
113. **Pette, D.; Peuker, H.; Staron, R. S.:** *The impact of biochemical methods for single muscle fibre type analysis.* Acta Physiol. Scand. 166: 261 – 278, 1999.
114. **Pette, D.; Staron, R. S.:** *Mammalian skeletal muscle fibre type transitions.* Int. Rev. Cytol. 170: 143 – 223, 1997.
115. **Pette, D.; Staron, R. S.:** *Transition of muscle fibre phenotypic profiles.* Histochem. Cell. Biol. 115: 359 – 372, 2001.

116. **Pette, D.; Vrbová, G.:** *Invited review: neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibres.* Muscle Nerve 8: 676 – 689, 1985.
117. **Přenosil, O.:** *Isoformy těžkých řetězců myosinu kosterního svalu u člověka a laboratorního potkana.* Bakalářská práce, 2006.
118. **Randall, D.; Burggren, W.; French, K.:** *Eckert Animal Physiology – Mechanisms and Adaptations.* 339 – 340, W. H. Freeman and Company, New York, 2002.
119. **Rao, A.; Luo, C.; Hogan, P. G.:** *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function.* Annu. Rev. Immunol. 15: 707 – 747, 1997.
120. **Ross, J. J.; Duxson, M. J.; Harris, A. J.:** *Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles.* Development 100: 383 – 394, 1987a.
121. **Ross, J. J.; Duxson, M. J.; Harris, A. J.:** *Neural determination of muscle fibre in embryonic rat lumbrical muscles.* Development 100: 395 – 409, 1987b.
122. **Rowlerson, A.; Mascarello, F.; Veggetti, A.; Carpena, E.:** *The fibre-type composition of the first branchial arc muscles in Carnivora and Primates.* J. Muscle Res. Cell Motil. 4: 443 – 472, 1983.
123. **Rowlerson, A.; Pope, B.; Murray, J.; Whalen, R. B.; Weeds, A. G.:** *A novel myosin present in cat jaw-closing muscles.* J. Muscle Res. Cell Motil. 2: 415 – 438, 1981.
124. **Roy, R. R.; Baldwin, K. M.; Edgerton, V. R.:** *The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity.* In: (ed.) Holloszy, J. O.: Exercise and sport science reviews 19. Baltimore: Williams and Wilkins 269 – 312, 1991.
125. **Rubinstein, N. A.; Kelly, A. M.:** *Myogenic and neurogenic contributions to the development of fast and slow twitch muscles in rat.* Dev. Biol. 62: 473 – 485, 1978.
126. **Russell, S. D.; Cambon, D. N.; Nadal-Ginard, B.; Whalen, R. G.:** *Thyroid hormone induces a nerve-independent precocious expression of fast myosin heavy chain mRNA in rat handlimb skeletal muscle.* J. Biol. Chem. 263: 6370 – 6374, 1988.
127. **Rutschmann, M.; Dahlmann, B.; Reinauer, H.:** *Loss of fast-twitch isomyosins in skeletal muscles of the diabetic rat.* Biochem. J. 221: 645 – 650, 1984.
128. **Saad, A. D.; Denis, J. E.; Tan, I. P.; Fischman, D. A.:** *Visualization of myosin exchange between synthetic thick filaments.* J. Muscle Res. Cell Motil. 12: 225 – 234, 1991.
129. **Salmons, S.; Henriksson, J.:** *The adaptive response of skeletal muscle to increased use.* Muscle Nerve 4: 94 – 105, 1981.

130. **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.
131. **Scapolo, P. A.; Rowleson, A.; Mascarello, F.; Veggetti, A.:** *Neonatal myosin in bovine and pig tensor tympani muscle fibres.* J. Anat. 178: 255 – 263, 1991.
132. **Schiaffino, S.; Gorza, S.; Ausoni, S.; Bottinelli, R.; Reggiani, C.; Larsson, L.; Edstrom, K.; Lomo, T.:** *Muscle fibre types expressing different myosin heavy chain isoforms. Their functional properties and adaptive capacity. The Dynamic State of Muscle Fibres.* (ed.) Pette, D., Walter de Gruyter, Berlin, 329 – 341, 1990.
133. **Schiaffino, S.; Reggiani, C.:** *Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance.* Physiol. Rev. 76: 371 – 423, 1996.
134. **Smerdu, V.; Karsch-Mizrachi, I.; Campione, M.; Leinwand, L.; Schiaffino, S.:** *Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibres of human skeletal muscle.* Am. J. Physiol. 267: C1723 – C1728, 1994.
135. **Snow, L. M.; McLoon, L. K.; Thompson, L. V.:** *Adult and Developmental Myosin Heavy Chain Isoforms in Soleus Muscle of Aging Fisher Brown Norway Rat.* Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol. 286: A866 – A873, 2005.
136. **Sonntag, W. E.:** *Hormone secretion and action in aging animals and man.* Review of Biological Research in Aging 3: 299 – 335, 1987.
137. **Soukup, T.; Jirmanová, I.:** *Diverzita typů svalových vláken a některé její příčiny.* Čs. Fyziol. 48: 165 – 170, 1999.
138. **Soukup, T.; Jirmanová, I.:** *Regulation of Myosin Expression in Developing and Regenerating Extrafusil and Intrafusil Muscle Fibres with Special Emphasis on the Role of Thyroid Hormones.* Physiol. Res. 49: 617 – 633, 2000.
139. **Soukup, T.; Smerdu, V.; Maláčová, D.; Zachařová, G.:** *Fiber type composition of unoperated rat soleus and extensor digitorum longus muscles after unilateral isotransplantation of a foreign muscle in long-term experiments.* Physiol. Res., v tisku, 2008.
140. **Soukup, T.; Zachařová, G.; Smerdu, V.:** *Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats.* Acta Histochem. 104: 399 – 405, 2002.
141. **Soukup, T.; Zachařová, G.; Smerdu, V.; Jirmanová, I.:** *Body, Heart, Thyroid Gland and Skeletal Muscle Weight Changes in Rats with Altered Thyroid Status.* Physiol. Res. 50: 619 – 626, 2001.

142. **Staron, R. S.; Pette, D.:** *The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres.* Biochemical Journal 243: 687 – 693, 1987.
143. **Stockdale, F. E.:** *Myogenic cell lineages.* Developmental biology 154: 284 – 298, 1992.
144. **Stockdale, F. E.; Miller, J. B.:** *The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles.* Dev. Biol. 123:1 – 9, 1987.
145. **Sugie, H.; Verity, M. A.:** *Postnatal histochemical fibre type differentiation in normal and hypothyroid rat soleus muscle.* Muscle Nerve 8: 654 – 660, 1985.
146. **Sultan, K. R.; Dittrich, B. T.; Leisner, E.; Paul, N.; Pette, D.:** *Fiber type-specific expression of major proteolytic systems in fast- to slow-transforming rabbit muscle.* Am. J. Physiol. Cell Physiol. 280: C239 – C247, 2001.
147. **Talmadge, R. J.; Grossman, E. J.; Roy, R. R.:** *Myosin heavy chain composition of adult feline (*Felis catus*) limb and diaphragm muscles.* J. Exp. Zool. 275: 413 – 420, 1996.
148. **Talmadge, R. J.; Roy, R. R.:** *Electrophoretic separation of the rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms.* J. Apple. Physiol. 75: 2337 – 2340, 1993.
149. **Termin, A.; Staron, R. S.; Pette, D.:** *Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fibre types of rat muscle.* Histochemistry 92: 453 – 457, 1989.
150. **Thompson, C. H.; Anderson, Y.; Jagasia, D. H.; Radda, G. K.; Rajagopalan, B.:** *Effect of tri-iodothyronine administration on skeletal muscle intracellular pH in the rat.* Clin. Sci. (Lond.) 84: 645 – 649, 1993.
151. **Vadászová, A; Hudcová, S; Křižanová, O; Soukup, T.:** *Levels of Myosin Heavy Chain mRNA Transcripts and Protein Isoforms in the Fast Extensor Digitorum Longus Muscle of 7-Month-Old Rats with Chronic Thyroid Status Alterations.* Physiol. Res. 55: 707 – 710, 2006.
152. **Vadászová-Soukup, A.; Soukup, T.:** *Dual role of thyroid hormones in the rat soleus muscle MyHC isoform expression.* Physiol. Res. 56: 833 – 836, 2007.
153. **Vadászová, A.; Zachařová, G.; Macháčová, K.; Jirmanová, I.; Soukup, T.:** *Influence of Thyroid Status on the Differentiation of Slow and Fast Muscle Phenotypes.* Physiol. Res. 53: S57 – S61, 2004.
154. **Vale, R. D.:** *The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport.* Cell 112: 467 – 480, 2003.

155. **Vrbová, G.:** *The effect of tenotomy on the speed of contraction of fast and slow mammalian muscles.* J. Physiol. (Lond.) 166: 241 – 250, 1963.
156. **Weiss, A.; McDonough, D.; Wertman, B.; Acakpo-Satchivi, L.; Montgomery, K.; Kucherlapati, R.; Leinwand, L.; Krauter, K.:** *Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2958 – 2963, 1999a.
157. **Weiss, A.; Schiaffino, S.; Leinwand, L. A.:** *Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity.* J. Mol. Biol. 290: 61 – 75, 1999b.
158. **Whalen, R. G.; Sell, S. M.; Butler-Browne, G. S.; Schwarz, K.; Bouveret, P.; Pinset-Härström, I.:** *Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development.* Nature 292: 805 – 809, 1981.
159. **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.
160. **Wilson, S. J.; Ross, J. J.; Harris, A. J.:** *A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats.* Development 102: 815 – 821, 1988.
161. **Zachařová, G.; Kubínová, L.:** *Stereological methods based on point counting and unbiased counting frames for two-dimensional measurements in muscles: comparison with manual and image analysis methods.* L. Muscle Res. Cell. Motil. 16: 295 – 302, 1995.
162. **Zachařová, G.; Vadászová, A.; Smerdu, V.; Asmussen, G.; Soukup, T.:** *The Effect of a Unilateral Muscle Transplantation on the Muscle Fiber Type and the MyHC Isoform Content in Unoperated Hind Limb Slow and Fast Muscles of the Inbred Lewis Rats.* Physiol. Res. 54: 691 – 696, 2005.
163. **Zhu, Y.-S.; Yen, P. M.; Chin, W. W.; Pfaff, D. W.:** *Estrogen and thyroid hormone interaction on regulation of gene expression.* Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 12587 – 12592, 1996.

Internetové zdroje

164. **Statistica 8:** <http://www.statsoft.com>
165. **SigmaPlot 10:** <http://www.systat.com>