

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie živočichů

Oddělení fyziologie živočichů a člověka



Diplomová práce na téma:

**Identifikace a kvantifikace těžkých řetězců myosinu
v srdci u samců a samic potkana pod vlivem tyroidních
hormonů.**

Petra Arnoštová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.²

Konzultant: RNDr. Tomáš Soukup, CSc.¹

¹Fyziologický ústav, AV ČR

²PřF UK

Praha, květen 2008

Prohlášení

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

V Praze dne 11. května 2008

A handwritten signature in black ink, reading "Petra Arnoštová", written over a horizontal dotted line.

Bc. Petra Arnoštová

Poděkování

Ráda bych vyjádřila neskonale díky své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, PhD. za její laskavý přístup, velkou podporu a zejména trpělivost při vedení mé diplomové práce. Chtěla bych velmi poděkovat svému konzultantovi RNDr. Tomášovi Soukupovi, CSc. za jeho cenné odborné rady ve zkoumané problematice, důvěru ve mne vloženou a za finanční a experimentální zajištění celého projektu. Ráda bych vznesla díky také Mgr. Petrovi Jedelskému za identifikaci sledovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF/TOF a kolegovi Bc. Ondřejovi Přenosilovi za pomoc se statistickým hodnocením. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi po celou dobu pomáhali, věřili mi a drželi mi palce, především své rodině, svému příteli, kolegům na pracovišti a přátelům.

Obsah

Seznam zkratk	5
Úvod	8
Cíle diplomové práce	9

Literární přehled

I. Srdeční isoformy těžkých řetězců myosinu.....	10
II. Expres srdečních MyHC ve vývoji.....	11
III. Faktory ovlivňující expresi MyHC isoformem.....	13
3.1. Hormonální vlivy.....	13
3.1.1. Tyroidní hormony a regulace genové exprese MyHC.....	14
3.1.1.1. Biogeneze a metabolismus tyroidních hormonů.....	14
3.1.1.2. Tyroidní receptory.....	15
3.1.1.3. Signální dráha tyroidních hormonů.....	16
3.1.2. Působení tyroidních hormonů na funkci srdečního svalu.....	17
3.1.2.1. Hypertyroidismus a kontraktilita.....	18
3.1.2.2. Hypertyroidismus a hemodynamická rovnováha.....	20
3.1.2.3. Hypotyroidismus.....	21
3.1.3. Sympatický systém a tyroidní hormony.....	23
3.1.4. Růstové hormony.....	24
3.1.5. Diabetes, tyroidní hormony a renin-angiotenzní systém.....	25
3.2. Tlakové a objemové přetížení.....	26
3.3. Stárnutí.....	28
VI. Expres srdečních MyHC u samců a samic potkana.....	28
V. Závěr literárního přehledu.....	30

Experimentální část

VI. Metodika.....	31
6.1. Experimentální zvířata a navození tyroidních stavů.....	31
6.2. Metoda SDS-PAGE.....	32
6.2.1. Příprava vzorků.....	32
6.2.2. Homogenizace LV srdce.....	32
6.2.3. Extrakce SOL.....	33
6.2.4. Separace MyHC pomocí SDS-PAGE.....	33

6.3. Barvení pomocí stříbra.....	34
6.4. Barvení pomocí „Coomassie Blue“ s „Bismark Brown R“.....	34
6.5. Relativní kvantifikace isoformem MyHC.....	34
6.6. Statistické hodnocení.....	36
6.7. Metoda hmotnostní spektrometrie (MS MALDI TOF/TOF).....	36
6.7.1. Příprava vzorku pro MS analýzu.....	36
6.7.2. MS MALDI TOF/TOF analýza.....	37
VII. Výsledky.....	38
7.1. Identifikace srdečních MyHC isoformem.....	38
7.2. Vliv změny tyroidního stavu na fenotyp MyHC levé komory srdce u samců a samic.....	42
7.3. Pohlavní rozdíly v reakci na změnu tyroidního stavu u MyHC fenotypu levé komory srdce potkanů.....	44
VIII. Diskuse.....	45
IX. Závěr.....	48
X. Přílohová část.....	49
10.1. Příloha 1: ilustrační tabulky.....	49
10.2. Příloha 2: ilustrační obrázky.....	51
10.3. Příloha 3: použité roztoky.....	54
10.4. Příloha 4: použité chemikálie.....	58
Internetové zdroje.....	59
Reference.....	60

Seznam zkratk

AC	adenylylcykláza
α_1 -AR	α_1 -adrenergní receptor
ANF	atriový natriuretický faktor
Ang II	angiotenzin II
Antisense RNA	doplňující RNA řetězec k mRNA
AT1	angiotenzní receptor
ATP	adenosintrifosfát
ATPáza	adenosintrifosfatáza
BB	Bismark Brown R
β -AR	β -adrenergní receptor
β_1 -AR	β_1 - adrenergní receptor
β_2 -AR	β_2 - adrenergní receptor
BNP	natriuretický peptid B-typu
Ca	vápenaté ionty
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CB	Coomassie Blue
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPG	difosfatydylglycerol
E2	estradiol
ER	estrogenový receptor
ER α	estrogenový receptor α
ERE	estrogen-responzivní element
EU	eutyroidní stav
GH	růstové hormony
HAT	histon-acetyltransferáza
HDAC	histon-deacetyláza
hnRNA	heterogenní jaderná RNA
HPT	hypothalamohypofyzárně-tyroidální osa
HRE	hormon-responzivní element
Hsp	protein tepelného šoku
HY	hypotyroidní stav

IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor 1
IP3	inositoltrifosfát
LV	levá komora srdce
MS MALDI TOF	hmotnostní spektrometrie využívající ionizaci laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu
mQ	voda filtrovaná přes Millipore filtry (0,22 μm)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Myh	geny těžkých myosinových řetězců
MyHC	těžký řetězec myosinu
MyHC α	isoforma těžkého řetězce myosinu α
MyHC β	isoforma těžkého řetězce myosinu β
MyLC	lehký řetězec myosinu
NCoA	koaktivátory jaderných receptorů
NCoR	korepresory jaderných receptorů
OD	optická denzita
PC	cholin-fosfoglyceridy
PE	ethanolamin-fosfoglyceridy
PKC	proteinkináza C
PKC β	proteinkináza C β
PL	fosfolipidy
PLB	fosfolamban
R-A systém	renin-angiotenzní systém
RNA	ribonukleová kyselina
RXR	receptor retinoidů
RXR α , - β , - γ	isoformy receptoru retinoidů α , - β , - γ
SD	směrodatná odchylka
SDS-PAGE	sodná dodecyl sulfátová – polyakrylamidová gelová elektroforéza
SERCA	Ca ²⁺ -ATPáza sarkoplazmatického retikula
SERCA2	Ca ²⁺ -ATPáza sarkoplazmatického retikula typu 2a
SOL	pomalý sval m. soleus
SR	sarkoplazmatické retikulum
T3	3, 3', 5-trijod-L-tyronin
T4	tyroxin, tetrajodtyronin
TH	hypertyroidní stav

TR	tyroidní receptor
TR α , β	isoformy tyroidního receptoru α , β
TRAP	proteiny asociující s tyroidními receptory
TRE	T3-responzivní element
TSH	tyreotropin
UCP1	rozpřahující protein 1
V1, V2, V3	typy srdečního myosinu

Úvod

Výkonnost a kvalita kontraktility srdečního svalu přímo souvisí se zastoupením srdečních isoform těžkých řetězců myosinu (MyHC) α a β (Schwartz *et al.*, 1981; Morano *et al.*, 1988), které odpovídá velikosti organismu, způsobu života a zatížení srdce.

Expres obou MyHC isoform v srdci je spuštěna již v raném období prenatalního vývoje a v dalších obdobích se pak mění pouze poměr jejich zastoupení v komorách a síních v závislosti na hormonálních hladinách, srdeční frekvenci a fyziologické či patofyziologické zátěži. V mnoha případech jde o kombinaci více těchto faktorů, které mohou společně vést k rozvoji srdečních onemocnění a v extrémních případech až k srdečnímu selhání.

Jedním z významných fyziologických i patofyziologických jevů jsou změny v metabolismu tyroidních hormonů, které přímo ovlivňují kontraktilní vlastnosti myokardu změnou exprese srdečních isoform MyHC. Zároveň jejich dlouhodobé podávání indukuje změny hemodynamických poměrů, které sekundárně ovlivňují MyHC fenotyp srdce. Cílené navození změny exprese MyHC podáváním 3,5,3'-trijodtyroninu (T3) může mít terapeutické využití v určitých klinických situacích, například u lidí se srdečním selháním vede k výraznému zlepšení srdeční funkce (Pingitore a Iervasi, 2008). Obecně nárůst hladiny T3 aktivuje expresi MyHC α , naopak její pokles inaktivuje její expresi, což vede ke zvýšení množství MyHC β isoformy.

Cílem mé diplomové práce bylo zavést na pracovišti metodiku pro kvantifikaci srdečních isoform MyHC α a β , porovnat zastoupení těchto isoform v levé srdeční komoře u eutyroidních (EU), hypotyroidních (HY) a hypertyroidních (TH) potkanů, a zhodnotit pohlavní rozdíly v uvedených stavech.

Práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část. V teoretické části jsou shrnuty především obecné poznatky o srdečních MyHC, jejich expresi a přeměně v průběhu vývoje a pod vlivem různých faktorů, jejichž působení souvisí se

srdeční funkcí. Experimentální část obsahuje kapitoly týkající se metodiky, výsledků a závěrečné diskuse.

Cíle diplomové práce

- Cíl 1: Závést na pracovišti metodiku SDS-PAGE pro separaci srdečních MyHC.
- Cíl 2: Porovnat zastoupení isoformy α a β u eutyroidních (EU), hypotyroidních (HY) a hypertyroidních (TH) potkanů. Zhodnotit pohlavní rozdíly v uvedených stavech.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

I. Srdeční isoformy těžkých řetězců myosinu

Těžké řetězce myosinu (MyHC) jsou majoritním proteinem molekul myosinu, vedle dvou lehkých řetězců myosinu, a nesou ATPázovou aktivitu, která určuje rychlost svalové kontrakce. Srdeční sval obsahuje dvě isoformy MyHC α a β , které jsou kódovány samostatnými geny *Myh 6* [1] a *Myh 7* [2] (Mahdavi *et al.*, 1982). Isoformy se liší ATPázovou aktivitou i přes téměř identické molekulové hmotnosti (~223 kDa). Jejich nukleotidové a aminokyselinové sekvence jsou z 93% identické a liší se pouze ve 131 aminokyselinách z celkového počtu 1938. MyHC α reprezentuje „rychlý“ myosin s vyšší ATPázovou aktivitou a vyšší rychlostí kontrakce. Naopak MyHC β představuje „pomalý“ typ myosinu s nižší ATPázovou aktivitou a nižší rychlostí kontrakce (McNally *et al.*, 1989).

V srdečních komorách se podílejí obě isoformy MyHC na tvorbě tří typů srdečního myosinu (V1, V2, V3), které se liší zastoupením isoformem α a β , mobilitou v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek a ATPázovou aktivitou (Hoh *et al.*, 1978; d'Albis *et al.*, 1979; Hoh *et al.*, 1979) (Příloha 2, Obr. 1.). V1 typ je homodimerem MyHC α ($\alpha\alpha$), heterodimer V2 typ obsahuje po jedné isoformě MyHC α a MyHC β ($\alpha\beta$) a V3 typ je tvořen dvěma isoformami MyHC β ($\beta\beta$). Pomocí SDS-PAGE je možné rozlišit jednotlivé monomery α a β (Reiser a Kline, 1998; Sant'Ana Pereira *et al.*, 2001; Piao *et al.*, 2003; Warren a Greaser, 2003).

V srdečních předsíních převažuje typ V1 ($\alpha\alpha$) u všech druhů savců, zatímco komory se liší poměrným zastoupením α a β isoformy, tzn. poměrem V1, V2 a V3 (Swynghedauw, 1986). Fenotyp srdeční komory je přímo závislý na rychlosti srdeční frekvence, čili na velikosti zvířete, ale také na jeho životním stylu. Malí savci, jako jsou potkani, myši a křečci, mají rychle se kontrahující srdeční komory, které obsahují převážně V1 typ ($\alpha\alpha$). Větší savci, např. morčata, domácí králíci a prasata mají srdeční komory se středně velkou aktivitou a kromě dominujícího V3 typu ($\beta\beta$) obsahují také menší zastoupení V1 typu ($\alpha\alpha$) a V2 typu ($\alpha\beta$). Naopak u volně žijících zajíců a divokých prasat převažuje v srdečních komorách V1 typ ($\alpha\alpha$) (Rupp a Jacob,

1986). „Pomalou pracující“ srdeční komory se nacházejí u velkých savců včetně člověka a obsahují též všechny tři V typy s převahou V3 typu ($\beta\beta$), naopak V1 typu ($\alpha\alpha$) se vyskytuje méně než 10% (Morkin, 2000). Zastoupení α a β isoformy se také liší v jednotlivých morfologických vrstvách srdce. Například u králíka se v epikardiální vrstvě levé komory vyskytuje převážně MyHC α , zatímco v myokardu a endokardiální vrstvě převažuje MyHC β (Eisenberg *et al.*, 1985). U potkana převažuje ve všech vrstvách MyHC α , avšak za patologických podmínek se objevuje odlišná distribuce MyHC β isoformy. Endokardiální vrstva hypertrofovaného srdce, které bylo vystaveno objemovému přetížení, obsahuje větší množství MyHC β (Bugaisky *et al.*, 1990) než vrstva epikardiální. Na druhé straně u hypertrofovaného srdce, které bylo vystaveno tlakovému přetížení, došlo k nárůstu MyHC β v epikardiální vrstvě na rozdíl od endokardiální vrstvy (Dool *et al.*, 1995).

II. Exprese srdečních MyHC ve vývoji

Soustava MyHC genů (Myh) je podobná soustavě u člověka, potkana, myši, králíka a křečka. Tyto geny vznikaly transpozicí s následnou genovou duplikací a poté divergovaly do zmíněných savčích druhů (Morkin, 1993; 2000). Srdeční MyHC geny se u savců nacházejí na stejném chromozomu a jsou uspořádány v tandemu oddělené mezigenovými sekvencemi o velikosti 4500 párů bazí (Saez *et al.*, 1987). Z mezigenových sekvencí se syntetizuje „antisense“ RNA, která může hrát roli v negativní regulaci MyHC β exprese (Danzi a Klein, 2005). V neonatálním srdci potkana je přibližně poloviční exprese antisense RNA vůči sense mRNA MyHC (Luther *et al.*, 1997).

V čerstvě zformovaném srdečním svalu fetu myši a potkana v období mezi 7,5 a 8 dny po oplodnění se začíná exprimovat mRNA kódující MyHC α a MyHC β isoformy (Sassoon *et al.*, 1988; Lyons *et al.*, 1990). V průběhu perinatálního vývoje se tyto mRNA exprimují nerovnoměrně v srdečních komorách a předsíních. Dochází tak ke zvýšení exprese MyHC β v srdečních komorách a zároveň ke snížení exprese MyHC α . Naopak v srdečních předsíních stoupá exprese MyHC α .

V srdečních komorách potkana dochází na počátku postnatálního vývoje k velkému nárůstu MyHC α . Ve 20. embryonálním dni obsahuje srdce potkana méně než 15% MyHC α . V prvním postnatálním dni vzroste množství MyHC α na 35% a v osmém postnatálním dni je dosaženo 80% celkové hladiny MyHC v srdečních komorách (Briggs *et al.*, 1992) (Příloha 2, Obr. 2.).

Cummins a Lambert (1986) provedli vývojovou a anatomickou studii výskytu MyHC a MyLC (lehké řetězce myosinu) v srdečních předsíních a komorách u skotu a člověka. V srdečních komorách všech sledovaných vývojových stádií (fetální, neonatální, dospělé) převažuje MyHC β (nad 95%) kromě neonatálního stádia u skotu. V srdečních předsíních převažuje MyHC α , MyHC β se objevuje uprostřed těhotenství a později během stárnutí (Cummins a Lambert, 1986).

Zhruba po dvou týdnech od narození dochází u savců ke zvýšené cirkulaci tyroidních hormonů (Lompre *et al.*, 1984) v krvi a především T3 přispívá k vytvoření fenotypových charakteristik srdeční svaloviny v závislosti na jednotlivých druzích. Srdce malých savců exprimující převážně MyHC α má mnohem větší rychlost kontrakce, srdce větších savců s převahou MyHC β je schopné vyšší energetické hospodárnosti (Holubarsch *et al.*, 1985; Alpert a Mulieri, 1989). Normální hladina T3 v krvi pozitivně řídí a reguluje expresi α isoformy i relativní poměr α a β isoform v levé srdeční komoře u mnoha savců (Morkin *et al.*, 1983). U potkana během dospívání dochází k potlačení MyHC β v srdečních komorách na hladinu kolem 10-15% (Swynghedauw, 1999) a dominantní se stává MyHC α (nad 90%) (Lompre, 1979; Mercadier *et al.*, 1981; Izumo *et al.*, 1987). U člověka tato záměna nenastává, MyHC β je dominantní isoformou v srdečních komorách (nad 95%) po celý život (Everett, 1986; Kubabayashi *et al.*, 1988).

III. Faktory ovlivňující expresi MyHC isoforem

V průběhu ontogenetického vývoje potkana je fenotyp srdeční svaloviny pod přímou kontrolou tyroidních hormonů a přeměny isoforem MyHC β v MyHC α se také účastní glukokortikoidy a β -adrenergní stimulace (Bian *et al.*, 1992; Briggs *et al.*, 1992).

Během postnatálního období souvisejí změny v expresi MyHC genů s adaptací srdce na působení vnitřích a vnějších faktorů, tedy na změny hladin cirkulujících hormonů, hemodynamické zatížení a fyzickou zátěž, metabolické poruchy, energetickou nerovnováhu a změny způsobené stárnutím včetně všech změn patologických (pro přehled Morkin, 1993, 2000; Baldwin a Haddad, 2001; Kahaly a Dillmann, 2005).

Zahájení exprese MyHC genů je součástí molekulárního programu, který je zodpovědný za vznik fenotypu srdečního svalu v průběhu prenatálního vývoje. Během rané embryogeneze je exprese MyHC β genu kontrolována transkripčními faktory NKX-2.5, MEF-2C a GATA-4/5/6 (Morkin, 2000). Na rozdíl od kosterní svaloviny, kde jsou isoformy MyHC kontrolovány geny MyoD, myogenin, myf-5 a MRF4/Herculin/myf6, nebyly transkripty těchto a homologních genů v srdci nalezeny. Naopak zesílení exprese MyoD ve vyvíjejícím se srdci u transgenních myši způsobí morfologické změny vedoucí nakonec k úmrtí (Tapscott a Weintraub, 1991; Miner *et al.*, 1992).

3.1. HORMONÁLNÍ VLIVY

Na formování srdečního fenotypu se nejvyšší mírou podílejí tyroidní hormony. Nezanedbatelný vliv však mají i další hormony a faktory, jejichž samotné působení nebo spolupůsobení s tyroidními hormony na srdce vede ke změnám v expresi MyHC isoforem. Mezi nejdůležitější z nich patří katecholaminy, angiotenzin II (Ang II), inzulín, inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) a obecně růstové hormony (GH).

3.1.1. Tyroidní hormony a regulace genové exprese MyHC

3.1.1.1. Biogeneze a metabolismus tyroidních hormonů

Tyroidní hormony, tetrajodtyronin (T4) a trijodtyronin (T3), jsou produkovány štítnou žlázou v molárním poměru přibližně 7:1. Veškeré enzymatické kroky v syntéze a sekreci T4 a T3 jsou regulovány tyreostimulačním hormonem tyreotropinem (TSH), který je pulsně sekretován tyrotrofními buňkami v adenohipofýze (Levey a Klein, 1998). Fyziologicky aktivní forma tyroidních hormonů, trijodtyronin, vzniká primárně 5'monodejodací tetrajodtyroninu v játrech, ledvinách a v menší míře v hypofýze (Pachucki *et al.*, 2001). V ostatních tkáních, včetně myokardu, nedochází ke konverzi T4 na T3 a tkáně jsou závislé na cirkulujícím T3 ze séra (Schimmel a Utiger, 1977). T4 a T3 cirkulují v krvi z více než 95% vázány na hormon-vázající proteiny (Demers a Spencer, 2003). Volný hormon, konkrétně T3, působí v zásadě na všechny typy buněk včetně srdečních myocytů a reguluje expresi specifických genů (Danzi a Klein, 2004). T3 má velmi krátký poločas rozpadu, např. u potkana 7 h (Goslings *et al.*, 1976; Danzi *et al.*, 2003). Byly pozorovány změny v MyHC α transkripci paralelně se změnami hladiny sérového T3 během 24 h periody (Danzi *et al.*, 2003). Z této studie vyplývá, že regulace MyHC α transkripce je citlivá ke změnám hladiny sérového T3. Pravidelným podáváním T3 hypotyroidním potkanům v dávkách 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ se normalizuje sérový T3 a obnovuje se transkripce vedoucí k eutyroidnímu stavu (Danzi *et al.*, 2005). * Na hladinu tyroidních hormonů působí běžně podávaná anitdepresiva, která tak mohou nepřímo ovlivňovat kontraktilitu srdečního svalu (Masařík, 2001).

*Antidepresiva mohou potenciálně interferovat na různých stupních biosyntézy tyroidních hormonů. Různé druhy antidepresiv, podávané pacientům s depresí, ovlivňují hypothalamohypofyzárně-tyroidální (HPT) osu. Masařík (2001) stanovoval specifické enzymové aktivity jodtyronin-dejodáz typu I-III v různých tkáních laboratorních potkanů po semichronickém podávání antidepresiva Prozacu, T3 a kombinace Prozacu s T3. Jodtyronin-dejodázové aktivity typu I a III po podávání T3 vzrostly prakticky ve všech tkáních přirozeného výskytu. Dejodázová aktivita typu II se v hypofýze velmi významně snížila. Vlivem podávání Prozacu v kombinaci s T3 nedochází oproti vlivu samotného T3 k významnějšímu nárůstu enzymové aktivity jodtyronin-dejodáz typu I a III. U jodtyronin-dejodázy typu II dochází v hypofýze k signifikantnímu snížení enzymové aktivity (Masařík, 2001).

3.1.1.2. Tyroidní receptory

Tyroidní receptory patří společně se steroidními receptory a receptory retinoidů do superrodiny jaderných receptorů (Lazar, 1991; Brent, 1994; Mangelsdorf *et al.*, 1995). Tyto receptory mají homologní strukturu (zejména DNA-vazebnou doménu) a působí jako ligandem aktivované transkripční faktory (Mester a Baulieu, 1995). Tyroidní receptory mohou tvořit monomery, homodimery nebo heterodimery. Signalizace tyroidními hormony prochází nejčastěji přes heterodimer receptorů tyroidního a retinoidního (Brent, 1994; Harvey a Williams, 2002). Receptor retinoidů je kódován třemi geny (RXR α , - β , - γ), pro tyroidní receptor existují geny dva: TR α a TR β (Lazar, 1993; Chin a Yen, 1997). TR α gen produkuje RNA transkript procházející alternativním sestřihem a dávající vznik dvěma isoformám TR α 1 a TR α 2, které mají na konci řetězce karboxylovou skupinu. TR α 1 a TR α 2 jsou transkribovány z promotoru v intronu 7 TR α genu (Chassande *et al.*, 1997). TR β gen produkuje dvě isoformy TR β 1 a TR β 2 s aminovou skupinou na konci řetězce (Hodin *et al.*, 1990; Lazar, 1993). Nedávno byla identifikována třetí TR β 3 isoforma (Williams, 2000). TR α 1, TR β 1 a TR β 2 mohou vázat tyroidní hormony a aktivovat tak transkripci genů MyHC v promotorové oblasti daných genů (Forman *et al.*, 1988; Dillmann, 1990). TR α 2 není schopen vázat tyroidní hormony, protože se od předchozích isoform liší strukturou ligand-vazebné domény, a vystupuje jako negativní regulátor (Yang *et al.* 1996).

V srdci potkana zaujímá přibližně 40% celkové vazebné kapacity TR α 1, podobné procentuální zastoupení má TR β 1 a jen 20% poskytuje TR β 2 (Schwartz *et al.*, 1994). Odlišný poměr se nachází v myším srdci, kde TR α 1 představuje 70% a TR β 1 30% z celkové hladiny mRNA TR (Johansson *et al.*, 1998; Gloss *et al.*, 2001). V průběhu postnatálního vývoje u prasat převažuje v srdci exprese TR α isoformy nad expresí TR β isoformy. Pokud porovnáme zastoupení jednotlivých isoform mezi sebou tak zjistíme, že exprese TR α 2 je až dvakrát vyšší než exprese TR α 1 a že exprese TR β 1 převažuje nad TR β 2. Kvalitativní i kvantitativní zastoupení jednotlivých isoform TR souvisí s expresí isoform MyHC. Převaha TR α 1 vede k expresi rychlých MyHC (v srdci MyHC α), naopak převaha TR α 2 vede k expresi pomalých MyHC (v srdci MyHC β). Nedostatek TR α 1 vede k vysoké expresi MyHC β . Poměr TR α 1:TR α 2 hraje určitou roli v negativní regulaci exprese MyHC β a je také velmi důležitý pro správný vývoj srdce a jeho optimální funkci (White a Dauncey, 1999).

Ve fetálním období je fyziologická hladina cirkulujícího T3 nízká a TR α fungují jako represory exprese některých genů v srdci, které jsou naopak pozitivně regulovány T3 v průběhu postnatálního života (Mai *et al.*, 2004). Na hladině tyroidních hormonů je též silně závislá exprese TR v srdci. U hypotyroidních zvířat je zvýšená hladina mRNA obou isoform TR α . Po uplynutí 72 hodin od podání tyroidních hormonů došlo k poklesu mRNA TR α pod kontrolní hladinu (Balkman *et al.*, 1992). Studie zabývající se srdečními poruchami popisují vliv patologických změn myokardu na expresi TR a ve spojení se změnou hladiny T3 také vliv na fenotyp levé komory srdce (Gick *et al.*, 1993; Klein a Ojamaa, 2001). Posttranslační modifikace TR, jako je fosforylace, mohou dále měnit citlivost k T3 (Sugawara *et al.*, 1994; Danzi a Klein, 2004).

3.1.1.3. Signální dráha tyroidních hormonů

Receptory tyroidních hormonů rozpoznávají specifické regulační sekvence TRE (T3-responzivní element) v aktivovaném i inaktivovaném stavu, které jsou zpravidla lokalizovány v promotorech příslušných genů (Glass a Holloway, 1990).

Přítomnost T3 aktivuje TR a navodí jeho konformační změny, které způsobí následné uvolnění korepresoru NCoR (korepresor jaderných receptorů) a interakci receptoru s histon-acetyltransferázou (HAT). HAT rozvolní chromatinovou strukturu DNA pomocí acetylace. Poté receptor vymění HAT za komplex koaktivátorů NCoA (koaktivátor jaderných receptorů) a proteinů TRAP (proteiny asociující s tyroidním receptorem) a aktivuje transkripci (Xu *et al.*, 1999; Hu a Lazar, 2000; Ito a Roeder, 2001; Harvey a Williams, 2002). Korepresory a koaktivátory jsou transkripční intermediární faktory, které regulují transkripci prostřednictvím přímé interakce se základními transkripčními mechanismy nebo prostřednictvím modifikace chromatinové struktury v oblasti promotoru (Hatina a Reischig 2000). Trichostatin A (inhibitor histon-deacetylázy) spolu s T3 významně zvyšují transkripci MyHC α v srdečních myocytech již po 30 h, což demonstruje potenciální roli histonů jako kofaktorů v regulaci MyHC α transkripce pomocí T3 (Danzi *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2005).

Tyroidní receptory se váží na DNA i v inaktivovaném stavu, to jest při absenci T3 (Lazar, 1993; Brent, 1994). Inaktivované TR interagují s NCoR a SMRT (mediátor tlumící aktivitu TR a RXR), které asociují se SIN3 (korepresor transkripce) a histon deacetylázou (HDAC), což vede k aktivnímu potlačení transkripce (McKenna *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Leo a Chen, 2000). Ukázalo se, že přímá interakce mezi korepresorem NCoR, koaktivátorem ATCR a TR β 1 tvořících jeden komplex je spojena s potlačením transkripce a že T3 slouží k reorientaci komplexu v oblasti promotoru (Li *et al.*, 2002).

Signální dráha tyroidních hormonů se od signální dráhy steroidních hormonů liší ve fázi inaktivace receptoru. Při absenci pohlavního hormonu dochází k inaktivaci steroidního receptoru navázáním dvou molekul proteinu tepelného šoku hsp 90 a některých dalších proteinů jako hsp 70 a imunofilin p59 (Pratt a Toft, 1997). Zatímco při absenci T3 nedochází k asociaci proteinů tepelného šoku s inaktivovaným tyroidním receptorem.

3.1.2. Působení tyroidních hormonů na funkci srdečního svalu

Tyroidní hormony jsou důležité pro správný růst a vývoj celého organismu, stimulují spotřebu kyslíku ve většině buněk, účastní se regulace metabolismu lipidů a sacharidů a udržují fyziologické procesy v normě. Změny hladin tyroidních hormonů v krvi vedou k narušení mnoha fyziologických dějů v organismu a vyvolávají četná onemocnění (Příloha 1, Tab. 1.). Tyroidní hormony působí pozitivně ionotropně a chronotropně na srdeční činnost, ovlivňují zejména citlivost sympatického systému (Kap. 3.1.3.), genovou expresí a vedou k hemodynamickým změnám, tj. ke zvýšení srdečního plnění a k modifikacím srdeční kontrakce. Hypertyroidismus vede ke zvýšení srdečního výdeje a rychlosti srdeční kontrakce, zatímco hypotyroidismus vede k jejich poklesu.

3.1.2.1. Hypertyroidismus a kontraktilita

Kontraktilní a elektrickou aktivitu srdce ovlivňují tyroidní hormony na více úrovních, například zvýšením počtu pomalu se inaktivujících Na⁺-kanálů (Dudley a Baumgarten, 1993), změnou aktivity K⁺-kanálů (Shimoni a Severson, 1995) a Ca²⁺-kanálů (Kim *et al.*, 1987; Götzsche, 1994), nebo zvýšením pacemakerového iontového proudu I_f v sinoatriálním uzlu (Kahaly a Dillmann, 2005). Několik iontových transportérů plazmatické membrány, jakými jsou Na⁺/K⁺-ATPáza, Na⁺/Ca²⁺-výměník a napětově ovládané draselné kanály (Kv1.5, Kv4.2, Kv4.3), je také regulováno jak na transkripční, tak na translační úrovni tyroidními hormony (Gick *et al.*, 1990; Ojamaa *et al.*, 1999). Pro správné fungování buněčného transportu je velmi důležité lipidové složení buněčné membrány cardiomyocytů (Novák *et al.*, 2006). Tyroidní hormony hrají esenciální roli ve vývoji fosfolipidových komponent v srdeční membráně během raného postnatálního období a ovlivňují profil fosfolipidů a jejich mastných kyselin v buněčné membráně dospělého myokardu. T3 zvyšuje koncentraci všech fosfolipidů (PL), dále koncentraci cholin-fosfoglyceridů (PC), ethanolamin-fosfoglyceridů (PE) a difosfatidylglycerolu (DPG) (Hamplová *et al.*, 2003).

Tyroidní hormony působí na změny toků iontů, čili na aktivitu iontových kanálů a receptorů, též na mimojaderné úrovni. Na rozdíl od genomických dějů (přímé regulace exprese), které trvají nejméně 0,5-2 h, dochází k extranukleárnímu působení velmi rychle (v několika minutách). Typickým příkladem je zvýšení aktivity transportéru Ca²⁺-ATPáza v plazmatické membráně v přítomnosti T3 (Rudinger *et al.*, 1984; Mylotte *et al.*, 1985; Segal, 1990). Dalším příkladem může být vliv tyroidních hormonů na transport cukrů a aminokyselin přes plazmatickou membránu (Segal, 1989). Extranukleární a nukleární děje mohou na sebe navazovat a vzájemný vztah obou dějů je důležitý pro udržování homeostatických poměrů na plazmatické membráně v eutyroidním stavu.

Tyroidní hormony (T3) též přímo ovlivňují expresi MyHC genů jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Citlivost MyHC genů k T3 se u jednotlivých savců liší. Nejcitlivější geny jsou u potkanů a králíků, méně citlivé u telat a paviánů a velmi málo citlivé geny se nachází u psů (Morkin, 1993). Pokud dojde k nárůstu T3 v krvi, je podporována exprese

MyHC α (hypertyroidní fenotyp). Naopak při nedostatku T3 klesá exprese MyHC α a převažuje exprese MyHC β (hypotyroidní fenotyp) (Morkin *et al.*, 1983; Morkin, 2000).

Působením tyroidních hormonů se výrazně zvyšuje exprese MyHC α u hypotyroidního srdce a zvýšení bylo zaznamenáno i u srdce eutyroidního (Ojamaa a Klein, 1993). Již za 30 min po aplikaci T3 (0,5 μ g/100 g tělesné hmotnosti) byl detekován nárůst hnRNA MyHC α v srdci hypotyroidních zvířat, což svědčí o působení T3 na srdeční myocyty paralelně se vzrůstající hladinou T3 (Everts *et al.*, 1996). Naopak první pokles transkripce MyHC β (15%) byl nejdříve zaznamenán až 6 h po podání, tj. v době, kdy transkripce MyHC α byla plně aktivovaná. Časový vztah mezi působením T3 na MyHC α a potlačením MyHC β transkripce se zdá být oddělený a rozdílný. Oba procesy jsou citlivé ke změnám hladiny T3 v krvi. Potlačení transkripce MyHC β vyvolané T3 je pomalejší a více komplexnější proces než stimulace transkripce MyHC α (Danzi *et al.*, 2003). Mezi aktivací transkripce MyHC α a potlačením transkripce MyHC β je tedy časový rozdíl i rozdíl v mechanismu.

V současné době jsou intenzivně studovány mechanismy regulace transkripce obou *Isidorem*, avšak ucelený pohled na tyto děje ještě není zdaleka znám.

Mechanismus regulace transkripce mRNA MyHC isoformem souvisí s expresí mezigenové DNA, tedy s přítomností MyHC β antisense RNA v srdci potkana (Haddad *et al.*, 2003; Danzi a Klein, 2005). Geny MyHC α a MyHC β jsou exprimovány protichůdně vlivem patologických podmínek, např. diabetu, hyper- a hypotyroidismu. Exprese β -antisense RNA koreluje pozitivně s expresí α -sense mRNA a negativně s β -sense mRNA, z čehož vyplývá, že mezigenová DNA kontroluje transkripci α -sense a β -antisense genů a že negativní regulace exprese MyHC β je zprostředkována transkripcí β -antisense genu (Giger *et al.*, 2007). Mezigenová DNA tedy vykazuje obousměrnou transkripční aktivitu: jedním směrem přepisuje MyHC α gen a opačným směrem se syntetizuje MyHC β antisense RNA (Haddad *et al.*, 2003; Haddad *et al.*, 2008). Posttranskripční mechanismy jsou zapojeny do regulace obsahu mRNA pro oba MyHC geny destabilizací MyHC β mRNA a stabilizací MyHC α mRNA (Wright *et al.*, 1999; Danzi a Klein, 2005).

V regulaci MyHC exprese má významnou úlohu microRNA, což je malá nekódující RNA (intron z MyHC α genu), která degraduje příslušnou RNA a tím inhibuje translaci (Kloosterman a Plasterk, 2006). Tato microRNA je důležitá pro aktivaci exprese MyHC β za patologických podmínek, jakými jsou tlakové přetížení a

hypothyroidismus. U hypothyroidního srdce reguluje microRNA expresi MyHC β přes tyroidní receptory a s nimi asociujícími proteiny TRAP (van Rooij *et al.*, 2007).

3.1.2.2. Hypertyroidismus a hemodynamická rovnováha

Hypertyroidismus, tj. zvýšení hladiny volného T3 a T4 v séru nad normu (Příloha 1, Tab. 2.), má obecně stimulační účinek na srdeční funkci i fenotyp (pro přehled Kahaly a Dillmann, 2005). Velmi podobné projevy, spojené se změnami srdečního výkonu a se změnami v morfologii srdce (Biondi *et al.*, 2000), byly pozorovány i u subklinického hypertyroidismu, který je představován nízkou hladinou TSH (<0,1 mU/L u člověka) a normálními koncentracemi T3 a T4 (Toft, 2001).

Hypertyroidismus způsobuje tachykardii a atriální fibrilace (chronotropní účinky), zvyšuje srdeční kontraktilitu, srdeční výdej, systolický tlak, tepovou frekvenci a rychlost spřažení kontrakce a relaxace (ionotropní účinky). U chronicky hypertyroidních zvířat roste koncentrace enzymu konvertujícího angiotenzin (Kap. 3.1.5.), což zvyšuje absorpci sodíku v ledvinách a následně je zvýšen celkový objem krve a plazmy; zvyšuje se koncentrace erythropoetinu a roste počet erytrocytů (Toft a Boon, 2000; Danzi a Klein, 2003). Na druhé straně se snižuje systémová vaskulární rezistence a diastolický tlak (Olshausen *et al.*, 1989; Polikar *et al.*, 1993; Klein a Ojamaa, 1995; Danzi a Klein, 2003). Změny kardiovaskulárních hemodynamických poměrů, jako například pokles systémové vaskulární rezistence, umožní zvýšení průtoku krve, což vede k posílení perfúze v periferních tkáních (Klein a Ojamaa, 2001). Základem hemodynamických změn je přímé působení tyroidních hormonů jak na srdeční myocyty, tak na vaskulární buňky hladké svaloviny a endothelium (Příloha 2, Obr. 3.). Hypertyroidismus může být primární příčinou objemového přetížení (Kap. 3.2.), neboť zvýšený objem plazmy a zvýšené přepětí následně vede k nárůstu objemu srdeční komory a tloušťky její stěny přímo úměrně ke zvyšujícímu se poloměru komory (Klein, 1991; Biondi *et al.*, 2002).

Předešlá práce uvádí, že hypertyroidismus u křečků se zdravým srdcem může vyvolat srdeční dilataci způsobenou přílišným prodloužením myocytů, a následnou dysfunkci srdečních komor, která vede až k srdečnímu selhání. Naproti tomu u kardiomyopatických křečků nedochází k srdeční dilataci a tyroidní hormony v tomto

případě stimulují angiogenesi, působí anti-fibroticky a tím zabraňují vývoji ischemických lézí (Kuzman *et al.*, 2005). Tyroidní hormony tedy mohou být ve fyziologických nebo téměř fyziologických koncentracích částečně kardioprotektivní u zvířat s ischemickým srdcem a přispět tak k zachování funkce myokardu po kardiopulmonárním bypassu u lidí (Mentzer *et al.*, 2003).

Hypertyroidní srdce relaxuje s vyšší rychlostí (lusitropní aktivita), a to u všech savců, neboť T3 znatelně zkracuje fázi diastolické relaxace. Zatímco u hypotyroidního srdce je diastolická fáze prodloužena (Mintz *et al.*, 1991). Rozhodujícím faktorem vedoucím k rychlé diastolické relaxaci je rychlý pokles koncentrace volného vápníku v cytosolu, k čemuž nejvíce přispívá Ca²⁺-ATPáza (SERCA2) na membráně sarkoplazmatického retikula (SR) (Rohrer a Dillmann, 1988). Uvolnění a zpětné vycytání vápenatých iontů SR jsou určujícími faktory systolické kontraktilní funkce a diastolické relaxace (Fazio *et al.*, 2004). Aktivita SERCA2 je regulována fosfolambanem a jeho fosforylací, která je ovlivněna tyroidními hormony (Kiss *et al.*, 1994; Kiss *et al.*, 1998; Ojamaa *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 2000; Carr a Kranias, 2002). T3 též vyvolává zvýšení počtu ryanodinových kanálů SR v reakci na zvýšené uvolňování vápenatých iontů ze SR během systoly, což pravděpodobně vysvětluje zvýšení systolické kontraktilní aktivity u hypertyroidního srdce.

Hypertyroidismus zvyšuje celkovou proteosyntézu v srdečních myocytech (Liang *et al.*, 2003), čímž se zvyšuje hmotnost srdce (Soukup *et al.*, 2001) a mírný stupeň srdeční hypertrofie, který se podílí na zvýšení kontraktility a exprese MyHC α (Liang *et al.*, 2003). Naproti tomu srdeční fibroblasty se neúčastní procesu hypertrofie a hladina kolagenu v hypertyroidním srdci klesá (Yao a Eghbali, 1992). Hypertrofie vyvolaná nadbytkem T3 je zcela reverzibilní s návratem do eutyroidního stavu.

3.1.2.3. Hypotyroidismus

Hypotyroidismus ovlivňuje srdeční funkci i fenotyp srdečního svalu opačným způsobem než hypertyroidismus, nárůstem systémové rezistence vyvolává bradykardii, slabý puls a hypertenzi (Klein a Ojamaa, 2001; Danzi a Klein, 2003).

Dále dochází ke zvýšení diastolického tlaku, snížení srdečního výdeje a srdeční kontraktility (Klein, 2004; Kahaly a Dillmann, 2005).

U hypofyzektomovaných i tyroidektomovaných potkanů byl pokles srdeční rychlosti podobný a úměrný snížené hladině T3 (Olshausen *et al.*, 1989). Vlivem hypotyroidismu se snižuje aktivita SERCA2 a zhoršuje se tak Ca-cyklus. To má za následek zhoršení plasticity myokardu a zvýšení diastolické dysfunkce levé komory srdeční (Biondi *et al.*, 2002). Ve spojení se změnami kontraktility a rychlosti srdce dochází ke zvýšení exprese MyHC β , zatímco exprese MyHC α klesá (Fletcher a Weetman, 1998; Stevenson, 2002). Tato transformace je reverzibilní podáním T3 (Fletcher a Weetman, 1998).

V klinické praxi se můžeme setkat s tzv. „subklinickým hypotyroidismem“, který je charakterizován zvýšenou hladinou TSH (obvykle >5 mIU/L u člověka) za přítomnosti normálních koncentrací T3 a T4 (Danzi a Klein, 2004). U tohoto onemocnění dochází ke zhoršení funkce levé komory a k abnormalitám srdeční relaxace, které jsou způsobené prodloužením doby izovolumické relaxace (Biondi *et al.*, 1999; Monzani *et al.*, 2001).

Hypotyroidnímu fenotypu se také velmi podobá fenotyp srdečního selhání a „syndromu nízké hladiny T3“ (Lowe *et al.*, 1997; Danzi a Klein, 2004), u něhož dochází k poklesu exprese genu SERCA2, zhoršení srdeční kontraktility a ke změnám v expresi MyHC genů. Preventivním podáváním T3 je možné výše uvedeným změnám předejít (Katzeff *et al.*, 1997).

Hypotyroidismus často vede k onemocnění koronárních tepen. Jednou z příčin jsou metabolické a hemodynamické poruchy, hypercholesterolemie a hypertenze, které zvyšují riziko aterogeneze (Steinberg, 1968; Kinlaw, 1991; Cappola a Ladenson, 2003; Biondi a Klein, 2004). Druhou příčinou je negativní chronotropní a ionotropní efekt vedoucí k ischemii koronárních tepen (Kahaly a Dillmann, 2005). Onemocnění koronárních tepen je možné předejít podáváním T4 u hypotyroidních pacientů (Perk a O'Neill, 1997), který stimuluje srdeční funkci snížením cholesterolu v krvi (Young *et al.*, 1984). Bylo zjištěno, že podávání agonisty tyroidních receptorů „KB-141“ primátům mělo za následek výraznou redukci tělesné hmotnosti a snížení cholesterolu (Grover *et al.*, 2003).

U hypotyroidních zvířat byla pozorována další poškození jako je deformace myofibril, intersticiální fibróza, akumulace mukopolysacharidů a rozpad mitochondrií (Pehowich, 1995).

3.1.3. Sympatický systém a tyroidní hormony

Katecholaminy mají důležitou úlohu v regulaci exprese srdečních MyHC isoformem, neboť přes adrenergní receptory spouští signální dráhy vedoucí ke stimulaci obou isoformem α a β . Působením katecholaminů (např. norepinefrinu) přes α_1 -adrenergní receptory (α_1 -AR) (Waspe *et al.*, 1990) dochází k aktivaci protein-kinázy C β (PKC β) a inositol trifosfátové (IP3) cesty vedoucí ke zvýšení exprese MyHC β , přičemž hladina MyHC α se nemění (Gupta *et al.*, 1991a; Kariya *et al.*, 1993, 1994). Naopak aktivací adenylyl cyklázy (AC) dobutaminem přes β_2 -adrenergní receptory (β_2 -AR) nebo jen zvýšením cAMP působením forskolinu dochází k nárůstu MyHC α mRNA bez jakýchkoliv změn v expresi MyHC β (Winegrad *et al.*, 1986; Winegrad *et al.*, 1987; Gupta *et al.*, 1991b). Avšak použitím neselektivního β -adrenergního antagonisty (propranololu) byla podpořena exprese MyHC β (autoři však neuvádějí isoformu β -AR) (Pauletto *et al.*, 1985). Sucharov a spol. ukázali závislost aktivace β -AR na expresi MyHC isoformem, když vysokou dávkou β_1 -adrenergního agonisty (isoproterenolu) došlo k aktivaci exprese MyHC β a zároveň k potlačení exprese MyHC α . Přeměna MyHC isoformem byla pozorována pouze na mRNA stupni. Tyto změny jsou zprostředkovány přes β_1 -AR, který řídí expresi MyHC β , a přes β_2 -AR, který vede k expresi MyHC α (Sucharov *et al.*, 2006).

Je dobře známo, že působení tyroidních hormonů a katecholaminů na funkci kardiovaskulárního systému (Klein a Levey, 2000) je velmi podobné. Tyroidní hormony a sympatický systém spolu velmi úzce souvisejí, současně změny hladin katecholaminů a tyroidní hormony se vzájemně ovlivňují. U hypertyroidních pacientů byla popsána normální či snížená hladina katecholaminů v séru v porovnání s hypotyroidními pacienty, u kterých byla pozorována zvýšená hladina katecholaminů (epinefrinu a norepinefrinu) v séru (Levey a Klein, 1990). Tyroidní hormony zvyšují senzitivitu sympatoadrenálního systému tím, že zvyšují množství β -AR, zejména β_1 -

typu (Bahouth, 1991; Bahouth *et al.*, 1997), které stimulují aktivitu AC (Pracyk a Slotkin, 1991) a nárůst Gs proteinů v plazmatické membráně (Hammond *et al.*, 1987; Ransnas *et al.*, 1988), naopak množství Gi proteinů snižují (Novotný *et al.*, 1999). Způsob interakce β -AR s G proteiny může vést k aktivaci různých signálních drah v buňce (Kim *et al.*, 2004). Z uvedeného vyplývá, že zvyšování počtu β -AR pod vlivem tyroidních hormonů je pravděpodobně reakce na sníženou hladinu katecholaminů. Zda je tato snížená hladina důsledkem působení tyroidních hormonů a proč tyroidní hormony stimulují zejména nárůst β 1-AR není doposud známo.

Změna hladiny tyroidních hormonů též způsobuje zvýšenou aktivitu β -adrenergní signalizace v hnědé tukové tkáni malých savců. Netřesová termogeneze závisí na adrenergní stimulaci rozpráhujícího se proteinu 1 (UCP1), která vede k produkci tepla, ale i na adrenergní stimulaci jodtyronin-dejodázy typu II, která přeměňuje T4 na T3 (Silva, 1995). Ukázalo se, že způsob využití chemické energie uložené v ATP je odlišný u zvířat s různým tyroidním stavem. Hypertyroidní zvířata přeměnila nejvíce ATP na teplo, zatímco eutyroidní zvířata spotřebovala ATP na produkci efektivní kontraktilní energie. Způsob využití chemické energie může vysvětlovat následky zátěže dlouhotrvajícím a závažným hypertyroidismem, které vedou v konečném důsledku k srdečnímu selhání (Kahaly a Dillmann, 2005).

3.1.4. Růstové hormony

Růstové hormony (GH) a inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) pozitivně ovlivňují expresi MyHC α , avšak hladinu MyHC β nijak významně nemění (Donath *et al.*, 1997). IGF-1 navíc stimuluje syntézu α -aktinu (Young *et al.*, 1999). Ale hypofyzektomovaní potkani neexprimují MyHC α ani pod působením IGF-1 a GH. Zajímavé je, že MyHC β isoforma byla u těchto potkanů silně exprimována a výrazně stimulována IGF-1. Obecně však platí, že IGF-1 a GH snižují expresi ANF (atriový natriuretický faktor) v srdečních komorách a stimulují expresi MyHC α (Morkin, 2000).

Zvýšená tvorba IGF-1 a zvýšená aktivita sympatického systému jsou spojeny s fyziologickou hypertrofií, která je vyvolána chronickým fyzickým zatížením (Koziris *et al.*, 1999; Neri Serneri *et al.*, 2001) nebo samotným působením GH (2 IU/kg/den)

(Grimm *et al.*, 1998) a oba tyto vlivy způsobí zvýšení MyHC α isoformy v srdci potkana (Scheuer *et al.*, 1982; Rupp, 1989). U potkanů postižených infarktem myokardu pak GH výrazně potlačují expresi MyHC β a ANF v srdci (Jin *et al.*, 2002). U starých potkanů (30 měsíců) zlepšují GH diastolickou funkci levé komory, obnovují hladinu IGF-1, snižují hladinu Ang II (Groban *et al.*, 2006) a zlepšují kontraktlní vlastnosti srdce (Wannenburg *et al.*, 2001).

3.1.5. Diabetes, tyroidní hormony a renin-angiotenzní systém

Inzulín udržuje zejména metabolickou a hemodynamickou homeostázu organismu a současně ovlivňuje kontraktilitu srdce a s ní spojenou expresi srdečních MyHC isoform. Jeho nedostatek vede ke zvýšení exprese MyHC β isoformy (Belke *et al.*, 2002). Při současném poklesu plazmatické koncentrace tyroidních hormonů dochází u diabetických potkanů ještě k výraznější změně v expresi MyHC (Haddad *et al.*, 1997b) a k poklesu aktivity myosinové ATPázy (až o 45%). Dále dochází ke zpomalení kontrakce, což odpovídá potlačení MyHC α (na proteinové i mRNA úrovni), a zároveň k nárůstu MyHC β (na obou úrovních). Podáváním 3 μ g T3/100g tělesné hmotnosti/den nebo 10 μ g T4/100g tělesné hmotnosti/den potkanům s tímto onemocněním po dobu 4 týdnů došlo k normalizaci aktivity myosinové ATPázy a exprese MyHC (Dillmann, 1982). Podávání inzulínu mělo stejné účinky jako tyroidní hormony a vedlo u potkanů k přeměně V1 typu na V3 typ myosinu (Baum *et al.*, 1989). Zhoršená funkce myokardu, která je způsobena diabetem, může vést až k těžkým srdečním onemocněním. Je dobré si uvědomit, že existují nezávislé procesy spojené s tímto onemocněním, které ovlivňují výkonnost myokardu u experimentálních zvířat i u člověka (Malhotra a Sanghi, 1997).

V uvedených patologických procesech hraje roli renin-angiotenzní systém (R-A systém), který působí na MyHC expresi zvýšením exprese MyHC β a snížením exprese MyHC α . U diabetických pacientů vede působení R-A systému ke zhoršení srdeční činnosti a k rozvoji srdečních chorob (např. k onemocnění koronárních tepen, srdečnímu selhání). Zablokování R-A systému, např. inhibicí angiotenzin-konvertujícího enzymu nebo angiotenzního receptoru (AT1), vede k potlačení

rostoucí exprese MyHC β a zároveň k obnovení exprese MyHC α u potkana a tím k prevenci myokardu k srdečnímu selhání (Machackova *et al.*, 2004; Connelly *et al.*, 2007).

R-A systém hraje roli i v srdeční hypertrofii, tzv. patologické hypertrofii, která je adaptací srdce na hemodynamické přetížení, čili na hypertenzi. Při hypertenzi vzrůstá hladina angiotenzinu (Ang II) a endothelinu-1. Aktivací dráhy PKC a zvýšením množství MyHC β isoformy vyvolává Ang II hypertrofii, která může vést až k srdečnímu selhání. U takto vyvolané hypertrofie má podávání T3 reverzibilní účinek zprostředkovaný inhibicí exprese PKC a MyHC β a současnou aktivací exprese MyHC α . Tímto se zlepšuje funkčnost myokardu u potkana. Tyroidní hormony mohou být použity jako prevence patologické hypertrofie a zároveň mohou tak zabránit srdečnímu selhání (Wang *et al.*, 2006). Pravidelný pohyb a cvičení mají také preventivní účinky na patologickou hypertrofii srdce, neboť snižují hladinu mRNA angiotenzin-konvertujícího enzymu a endothelinu-1. Tím působí na přeměnu MyHC β v MyHC α (Lee *et al.*, 2006).

Rozvoj hypertrofie není zcela závislý na působení Ang II, protože u myší s vyřazeným genem pro AT1 receptor došlo v srdečních buňkách k rozvinutí hypertrofie. To znamená, že hlavním spouštěcím faktorem hypertrofie je mechanické pnutí podmíněné hypertenzí (Yamazaki *et al.*, 1999).

3.2. TLAKOVÉ A OBJEMOVÉ PŘETÍŽENÍ

Tlakové a objemové přetížení vyvolává u potkana pokles MyHC α isoformy a zvýšení množství MyHC β isoformy (Lompre *et al.*, 1979; Haddad *et al.*, 1995). Tento pokles byl kompenzován podáním T4, i když nebyl vyvolán snížením hladiny tyroidních hormonů (Imamura *et al.*, 1991). U králíka, v jehož levé srdeční komoře je oproti potkanovi převážně zastoupena isoforma MyHC β , dochází také vlivem tlakového přetížení k podpoře syntézy isoformy β . Zároveň dochází ke snížení procentuálního zastoupení MyHC α způsobeného spíše zvětšením poměru β : α než inhibicí syntézy α isoformy (Everett *et al.*, 1984). Použitím β 1-blokátoru společně s

T4 došlo k navrácení srdce do normálního stavu (Biondi *et al.*, 1994). Též samotný návrat tlaku do normálních hodnot má za následek pomalý a postupný úbytek MyHC β a rychlé navrácení obsahu MyHC α na původní hladinu (Gupta a Gupta, 1997).

Dlouhodobé tlakové či objemové přetížení může vést až k srdečnímu selhání, během něhož dochází k poklesu exprese MyHC α . Avšak mechanismus redukce MyHC α se zdá být odlišný u srdečního selhání vyvolaného tlakovým přetížením a spontánní hypertenzí než u srdečního selhání vyvolaného objemovým přetížením, kde se srdce nestačí adaptovat na daný stav a selhává (Freire, 2007).

U pacientů se srdečním selháním byl prokázán výrazný úbytek mRNA isoformy α oproti jedincům s neselehávajícím srdcem a jedincům se srdeční dysfunkcí (Nakao *et al.*, 1997; Lowes *et al.*, 1997). Na druhé straně procentuální zastoupení mRNA isoformy α u jedinců s neselehávajícím srdcem i u jedinců se srdeční dysfunkcí byl mnohem vyšší na rozdíl od množství proteinu isoformy α popsané u normálního lidského srdce (Swynghedauw, 1986). Množství proteinu MyHC α v srdci je tedy výrazně odlišné od hladiny mRNA MyHC α .

U neselehávajícího lidského srdce činí procentuální podíl proteinu MyHC α v levé srdeční komoře 7,2% z celkového množství MyHC proteinu ve srovnání s 35% mRNA MyHC α z celkového množství MyHC mRNA (Miyata *et al.*, 2000).

Mechanismus regulace exprese MyHC v hypertrofovaném srdci by mohl být spojen se zvýšenou intracelulární koncentrací vápenatých iontů [Ca²⁺]. Vápenatý ion, jakožto signální molekula, aktivuje kalcineurin, který defosforyluje transkripční faktor NF-AT3. NF-AT3 interaguje v jádře s transkripčním faktorem GATA-4 a společně aktivují řadu genů včetně MyHC β , kosterního α -aktininu a natriuretického peptidu B-typu (BNP) (Molkentin *et al.*, 1998; Morkin, 2000). Avšak u hypertrofovaného srdce nebyla nalezena žádná účast GATA-4 ani NF-AT3 v aktivaci MyHC β (McLean *et al.*, 2003; Bisping *et al.*, 2006). Pravděpodobně je regulace exprese MyHC β genu v klidovém stavu a v průběhu hypertrofie řízena odlišnými mechanismy (Hasegawa *et al.*, 1997). Pokusy prováděné na kulturách myocytů srdce, které bylo postiženo hypertrofií z tlakového přetížení, odhalily silnější efekt vnitrobuněčných signálů oproti změnám v koncentraci vápenatých iontů [Ca²⁺] na expresi MyHC isoform. Bylo tak poukázáno na přímou souvislost mezi inhibicí kontraktility buněk a snížením exprese

mRNA MyHC β při současném nárůstu exprese MyHC α (Qi *et al.*, 1997; Nikcevic *et al.*, 1999). Tyto výsledky na buněčných kulturách však dávají opačný profil isoformů než jaký vykazují na úrovni orgánu tlakově přetíženém srdci. Je však zřejmé, že hemodynamické poměry tedy mají významný vliv na vzájemnou přeměnu MyHC isoformů.

3.3. STÁRNUTÍ

Během stárnutí dochází u potkana k výraznému poklesu MyHC α společně s nárůstem MyHC β , ke snížení Ca²⁺-ATPázové aktivity a zpomalení kontrakce (Efron *et al.*, 1987). Změny MyHC isoformů závisí na vývoji a rozsahu srdeční hypertrofie v daném věku (Boluyt *et al.*, 1999). Bylo prokázáno, že T4 indukuje podobně jako T3 vzrůst MyHC α a může tak navrátit množství MyHC α na původní hladinu. Avšak schopnost T4 a T3 stimulovat expresi MyHC α klesá s přibývajícím věkem (Ball a Solaro, 1994), což patrně úzce souvisí se změnami v expresi tyroidních receptorů (TR) a receptorů retinoidů (RXR). Pokles exprese MyHC α může být bifázický a zapříčinený snížením TR α 1 a eventuálně i TR α 2. Zvýšení MyHC β exprese je pouze spojeno s nárůstem hladiny mRNA a proteinu TR β 1 and RXR γ (Long *et al.*, 1999).

IV. Exprese srdečních MyHC u samců a samic potkana

Levá srdeční komora dospělých samic potkana obsahuje větší celkové množství MyHC mRNA než u stejně starých samců, přičemž poměr v mRNA MyHC α u samic a samců je signifikantně vyšší než tento poměr v mRNA MyHC β (Rosenkranz-Weiss *et al.*, 1994). Rozdíly v expresi srdečních MyHC isoformů v závislosti na pohlaví byly pozorovány již u normálních postpubertálních potkanů a také u hypertenzních potkanů (Morano *et al.*, 1986), ale nikoliv u normálních neonatálních zvířat (Rosenkranz-Weiss *et al.*, 1994). Během postpubertálního období mohou expresi MyHC isoformů ovlivňovat také pohlavní hormony vzhledem k vyšší

(8-12krát) hladině estrogenu v séru u samic než u samců (Malhotra *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 1995).

Je známo, že infarktu myokardu podléhají spíše muži než ženy, které jsou chráněny pohlavními hormony (estrogeny) až do období klimakteria. V souladu s tím byl prokázán preventivní účinek estrogenu vůči rozvoji srdeční patologické hypertrofie u samic potkana (Pedram *et al.*, 2008). U potkanů s hypertrofií levé srdeční komory, indukovanou tlakovým přetížením, byly pozorovány rozdíly v expresi některých genů v závislosti na pohlaví navzdory stejnému vývoji hypertrofie. Exprese MyHC β a ANF byla vyšší u samců než u samic, exprese SERCA2 byla u samců potlačena na rozdíl od samic a exprese Na⁺/Ca²⁺-výměníku byla podobná u obou pohlaví (Weinberg *et al.*, 1999).

Podobné rozdíly byly zaznamenány u potkanů s indukovaným diabetem. Srdeční komory normálních zdravých potkanů exprimovaly téměř 100% MyHC α . U 6 týdnů starých diabetických potkanů se podle očekávání zvýšila exprese MyHC β , u samců byla signifikantně vyšší (až o 30%) než u samic. Hladina proteinu SERCA2a byla snížena, hladina proteinu fosfolambanu (PLB) byla naopak zvýšena v levé komoře diabetických potkanů bez pohlavních rozdílů. Podání inzulínu kompletně navrátilo koncentraci glukózy v krvi, hladiny proteinů SERCA2 a PLB k původním hodnotám, a vedlo ke snížení množství MyHC β u samců i samic (Zhong *et al.*, 2003).

Pohlavní rozdíly v zastoupení MyHC isoformem mohou být způsobeny tím, že signální dráhy tyroidních hormonů, které přímo působí na expresi MyHC, a steroidních hormonů se mohou navzájem ovlivňovat (Fujimoto *et al.*, 2004). Ačkoliv tyroidní receptor (TR) má vyšší afinitu k TRE než estrogenový receptor (ER), estrogen přesto může zasáhnout do transkripce genů závislé na tyroidních hormonech. Obráceně TR je také schopen interagovat s ERE (estrogen-responzivní element) (Scott *et al.*, 1997). Iniciace transkripce genů závisí na interakcích mezi jednotlivými isoformami TR a ER, na genovém promotoru a samozřejmě na typu buňky (Vasudevan *et al.*, 2002).

Mechanismus působení pohlavních hormonů na nukleární úrovni není ještě zcela objasněn, více jsou známy jejich extranukleární efekty, které vedou k potlačení

rozvoje hypertrofie u samic. Estradiol (E2) působí přes ER v plazmatické membráně (Zhang *et al.*, 2006) a inhibuje tak účinky Ang II, čímž potlačuje přeměnu MyHC α na MyHC β (Pedram *et al.*, 2008). Dlouhodobé působení agonisty ER α vede k expresi MyHC α , k rychlejší kontrakci myokardu a ke zlepšení funkce levé srdeční komory (Pelzer *et al.*, 2005) u potkana.

V. Závěr literárního přehledu

Závěrem této kapitoly lze říci, že poměr MyHC α a MyHC β v srdci potkana lze měnit navozením patologických podmínek, např. chronickým tlakovým přetížením nebo indukovanou hypertenzí, změnou hladiny tyroidních hormonů, diabetem, chronickou ztrátou energie, ale i vytrvalostním tréninkem.

Z fyziologického hlediska je zvyšování exprese MyHC β genu v srdečním svalu malých zvířat vynucenou potřebou zvyšování hospodárnosti srdce vzhledem k narůstajícímu mechanickému stresu způsobeného hypertenzí či objemovým přetížením, které může být doprovázeno vytrvalostním cvičením (Alpert a Mulieri, 1982; Swynghedauw, 1999). Na druhé straně v průběhu diabetu, při nedostatku tyroidních hormonů nebo trvalých energetických ztrátách je silná tendence k vysoké expresi MyHC β korelována vlastním funkčním stavem srdce, který je charakterizován nízkou kontraktilitou, srdeční rychlostí a srdečním výdejem.

Krátkodobé a rychlé působení tyroidních hormonů přes jaderné tyroidní receptory významně reguluje genovou expresi MyHC isoformem, tedy podporuje expresi MyHC α . To se odráží ve vyšší ATPázové aktivitě a rychlejší kontrakci srdce. Na druhé straně dlouhodobější působení tyroidních hormonů může ovlivnit zejména hemodynamickou rovnováhu srdce tím, že dojde k objemovému a tlakovému přetížení, jež srdce kompenzuje zvýšením exprese MyHC β . Tyto rozdílné účinky tyroidních hormonů na srdeční fenotyp závisí především na dávce a době podávání.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

VI. Metodika

6.1. Experimentální zvířata a navození tyroidních stavů

Pro experimentální část mé diplomové práce byly použiti samci a samice dospělých potkanů inbredního kmene Lewis. Zvířata byla chována na světelném režimu 12 h tma/12 h světlo a krmena standardní dietou ST1. 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. Práce byla podpořena granty: MYORES No. 511978, MSM 0021620858, AVOZ 50110509.

Změna tyroidního stavu byla navozena u 4 týdenních zvířat a minimální doba aplikace T3 respektive methimazolu byla 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) podávaném v pitné vodě.

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

Zvířata byla rozdělena do experimentálních skupin podle pohlaví (19 samců, 22 samic) a tyroidního stavu (13 EU, 13 HY, 15 TH).

6.2. Metoda SDS-PAGE

Srdeční isoformy MyHC jsou vysoce homologní proteiny s téměř identickou molekulovou hmotností. Pro jejich separaci se používá metoda SDS-PAGE. Prvním cílem v rámci mé diplomové práce bylo zvést tuto metodiku na pracovišti. Vyzkoušela jsem metodu podle Talmage a Roy (1993) a podle Piao *et al.* (2003), ale obě tyto metody nepřinesly uspokojivé výsledky. Pro separaci srdečních MyHC jsem nakonec použila metodu podle Sant'Ana Pereira *et al.* (2001) s menší modifikací v době běhu elektroforetické separace (7,5 h oproti 7 h) a v použití typu zdroje napětí (nepulsního oproti pulsnímu).

6.2.1. 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 kosterní sval m. soleus (SOL) a srdce, ze kterého byla oddělena levá komora (LV). Obě tkáně byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku. SOL byl následně příčně krájen na kryostatu Cryocut Leica CM 3000 s teplotou komory -20°C na řezy o tloušťce 10 µm. Levá komora byla ve třetí misce s tekutým dusíkem rozbita na menší kousky, které byly rychle zváženy a zmrazeny na -75 °C, aby se zabránilo degradaci tkáně. Tkáně tak byly připraveny na další zpracování, tj. homogenizaci a extrakci. Po zákroku byli jedinci usmrceni letální dávkou anestetika.

6.2.2. Homogenizace LV srdce

Homogenizace levé komory byla provedena v homogenizačním pufru (Příloha 3A) v poměru 1:40 (1 mg : 40 µl) pomocí ručního mechanického homogenizátoru-sklo/sklo. Homogenáty byly skladovány hluboko zmrazené při -75°C.

6.2.3. Extrakce SOL

Metodika procesu extrakce byla převzata od Dr. V. Smerdu, PhD. (Institut anatomie, Lékařská fakulta Lublaňské univerzity, Slovinsko) a zavedena Mgr. D. Horníkovou na našem pracovišti.

K SOL byl po jeho zvážení přidán promývací pufr (Příloha 3B) v poměru 1 mg : 5 μ l (pro vzorek těžší než 3 mg) nebo 1 mg : 25 μ l (pro vzorek lehčí než 3 mg). Následovala důkladná mechanická homogenizace chirurgickými očními nůžkami a centrifugace vzniklého homogenátu po dobu 5 minut při 12 000 otáčkách/min. Po odstranění supernatantu byl k sedimentu přidán extrakční pufr (Příloha 3B) v poměru 1 mg : 3 μ l. Mechanická homogenizace byla opakována a následně vzorky byly homogenizovány malými magnetickými míchadly po dobu 30 min. Dále byl vzorek centrifugován 10 minut při 12 000 otáčkách/min a poté byl supernatant odebrán a naředěn v poměru 1:1 87% glycerolem. Takto připravený extrakt SOL byl skladován při teplotě -75°C .

6.2.4. Separace MyHC pomocí SDS-PAGE

Z levé srdeční komory EU, HY, TH samců a samic dospělých potkanů byly metodou SDS-PAGE (Sant'Ana Pereira *et al.*, 2001) s použitím Mini Proteanu 3 separovány isoformy MyHC. Pro přípravu roztoků byla použita filtrovaná Millipore voda (mQ; filtry 0,22 μ m). Koncentrace polyakrylamidového separačního gelu byla 12% a zaostřovacího gelu 3,7%, oba gely obsahovaly 10% glycerol (Příloha 3C). Z homogenátu bylo odebráno po 10 μ l a naředěno vzorkovým pufrem (Příloha 3C) v poměru 10:15. Naředěné vzorky byly povařeny po dobu 5 min a nanесeny po 7 μ l do jamek v gelu. Jako kontrola byl použit HY kosterní pomalý sval soleus, který obsahuje téměř 100% pomalé isoformy typu I totožné se srdeční MyHC β . Extrakt SOL byl ředěn vzorkovým pufrem v poměru 1:19 a nanášen o objemu 4 μ l na jamku. Gely byly zality elektrodovým pufrem (Příloha 3C) a vloženy do lednice. Elektroforéza běžela při konstantním proudu 13 mA a teplotě $9,5^{\circ}\text{C}$ po dobu 7,5 h (Příloha 3C). Poté byly gely skladovány ve fixačním roztoku (Příloha 3C) s přidaným 37% formaldehydem při pokojové teplotě minimálně 1 h a maximálně po dobu tří dnů. Pro

vizualizaci proteinů byly gely barveny stříbrem (Blum *et al.*, 1987) nebo „Coomassie Blue“ s „Bismark Brown R“ (Choi *et al.*, 1996).

6.3. Barvení pomocí stříbra

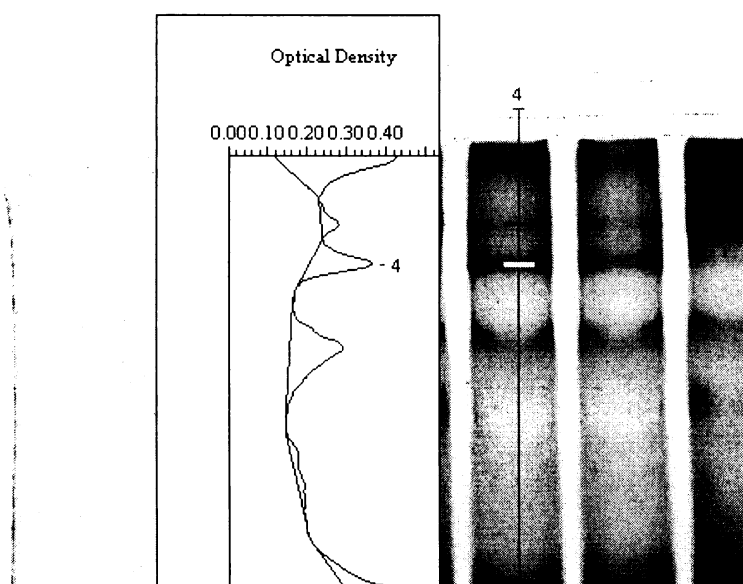
Gely byly promývány 3x20 min v 50% ethanolu (Příloha 3D) do mléčného zabarvení, dále 2x30 sec v 0,02% thiosíranu sodném (Příloha 3D) do vymytí ethanolu a zprůhlednění gelů a posléze 3x20 sec v destilované vodě. Po odstranění thiosíranu destilovanou vodou byly gely vloženy do 100 ml 0,2% roztoku AgNO_3 (Příloha 3D), do kterého bylo přidáno 75 μl 37% formaldehydu, a barveny ve tmě na třepačce po dobu 20 min. Po skončení barvení byly gely opět promyty destilovanou vodou 3x10 sec a následně vloženy do 100 ml vyvíjecího roztoku (Příloha 3D) s přidanými 50 μl 37% formaldehydu. Vyvolávání gelů bylo zastaveno fixačním roztokem.

6.4. Barvení pomocí „Coomassie Blue“ s „Bismark Brown R“

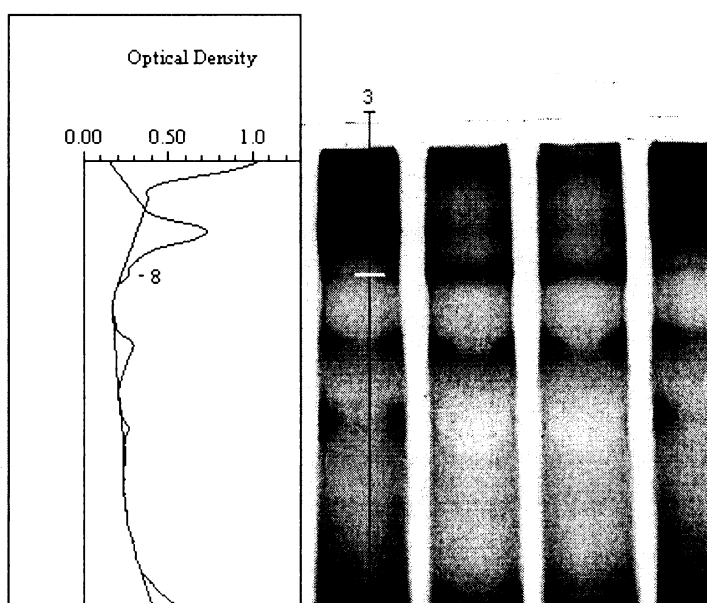
Gely byly barveny směsí Coomassie Blue (CB) s Bismark Brown R (BB) po dobu 25-30 min a poté odbarvovány destainem (Příloha 3D) dokud nebyly pruhy ostře viditelné bez známky modrého pozadí. Směs CB a BB je 100x tak citlivější než barvení samotnou CB, proto byla zvolena tato metoda.

6.5. Relativní kvantifikace isoform MyHC

Isoformy MyHC byly kvantifikovány denzitometricky pomocí softwaru QuantityOne (BioRad). Byla měřena hodnota optické denzity na definované ploše (dále jen OD) obou isoform u samců a samic v EU, HY, TH stavech (Obr. 1., Obr. 2.) a vypočítán poměr $\alpha:\beta$. Takto získané hodnoty poměrů byly testovány na normalitu rozložení, statisticky zhodnoceny a vyneseny do grafů (Kap 7.2. a 7.3.).



Obr. 1. Měření optické denzity isoformy α (spodní pruh) a isoformy β (horní pruh) u hypertyroidní dospělé (8m) samice.



Obr. 2. Měření optické denzity isoformy α (spodní pruh) a isoformy β (horní pruh) u hypothyroidní dospělé (8m) samice.

6.6. Statistické hodnocení

Výsledné naměřené hodnoty byly zpracovávány pomocí statistického programu STATISTICA 8 [3]. Grafy byly vytvořeny s pomocí statistického programu SigmaPlot 10 [4]. Získané hodnoty poměrů OD $\alpha:\beta$ byly testovány na normalitu rozložení pomocí Shapirova-Wilkova W testu a data nevykazovala normální rozložení na hranici $p < 0,05$. Pro porovnávání rozdílnosti souborů dat byl tedy zvolen často užívaný neparametrický Mannův-Whitneyův U test, který je přesným ekvivalentem nepárového t-testu a je určen pro data nenormálního rozložení. Signifikance rozdílu všech testů byla zvolena na hladině 5% ($p < 0,05$). Za uvedenými průměrnými hodnotami jsou vždy uvedeny hodnoty \pm SD .

6.7. Metoda hmotnostní spektrometrie (MS MALDI TOF/TOF)

Hmotnostní spektrometrie (MS) se využívá zejména pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, ale i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Výhodou je vysoká citlivost (0,1 Da) a rychlost měření. MS je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickomagnetickém poli. Ke stanovení vyšších molekulových hmotností se používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight) (Havliš, 1999).

6.7.1. Příprava vzorku pro MS analýzu

Pro identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie byly vybrané pruhy v oblasti MyHC vyříznuty a odbarveny v ultrazvukové čistící lázni roztokem 50 mM hydrogenuhličitanu amonného v 50% acetonitrilu. Během odbarvování byl roztok několikrát vyměněn a střídavě do něj přidáván 50 mM dithiotreitol pro redukci S-S můstků, v dalším kroku byl přidán 50 mM jodacetamid pro alkylaci volných cysteinů, a nakonec opět 50 mM dithiotreitol pro odstranění nezreagovaného jodacetamidu. Následně bylo přidáno asi 5 ng trypsinu pro sekvenační účely (Promega) v 50 mM

hydrogenuhlčitanu amonném a doplněno týmž pufrem, aby gel nasákl a zůstal převrstvený. U opakované analýzy bylo použito štěpení proteázami Asp-N a Lys-C. Následovala inkubace při 37 °C přes noc. Poté byl přidán acetonitril na výslednou koncentraci 50% a trifluoroctová kyselina na výslednou koncentraci 1%. Sonikací byly peptidy uvolněny z gelu. Pro analýzu bylo 0,5 µl vzorku nanášeno na pozici na terčiku pro MALDI. Po odpaření rozpouštědla byl vzorek převrstven 0,5 µl matricí (alfa-kyanohydroxyskořicová kyselina 7 mg/ml v 60% acetonitrilu). Po vykrytalizování matrice byl vzorek připraven pro měření MALDI.

6.7.2. MS MALDI TOF/TOF analýza

Hmotnostní analýza peptidů byla provedena na hmotnostním spektrometru 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems). Spektra byla sbírána v rozsahu 800-3500 Da, pro výsledné spektrum bylo nasčítáno 1000 spekter po jednotlivých pulsech laseru. Detekce píku byla provedena automaticky algoritmem, který vyhledává monoisotopické amplitudy (píky), které dosahují odstupu signálu od šumu alespoň 10. Identifikace proteinu a přiřazení peptidu bylo provedeno s použitím software Mascot [5]. Použité nastavení: karbamidace cysteinu jako fixní modifikace a případná oxidace methioninu. Tolerance hmotnosti 0,2 Da, maximálně 1 vynechané štěpící místo trypsinu v peptidu.

VII. Výsledky

7.1. Identifikace srdečních MyHC isoform

Prvním cílem práce bylo zavedení metodiky pro separaci a kvantifikaci srdečních isoform MyHC na pracovišti. Nejlepší zvolená metoda (Sant'Ana Pereira *et al.*, 2001) dávala velmi dobré výsledky, co se týká rozdělení obou isoform α a β , a změny zastoupení jednotlivých isoform odpovídaly změnám tyroidního stavu. Avšak pozice proteinů v akrylamidovém gelu byla opačná vzhledem k literárním údajům. Proto jsme dali jednotlivé separované proteiny v jednotlivých tyroidních stavech (Obr. 3) identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) MALDI TOF/TOF.

MS analýza přinesla vysoké pokrytí obou sekvencí (58% pro MyHC β a 52% pro MyHC α), které umožnilo spolehlivé odlišení sledovaných isoform těžkých řetězců myosinu. Z celkového počtu 61 tryptických peptidů MyHC β bylo 26 specifických pro tuto isoformu. Tryptické štěpení MyHC α poskytlo 14 specifických peptidů z celkového počtu 41 a štěpení Asp-N proteázou přineslo 5 specifických peptidů z celkového počtu 13 pro TH stav. Pro EU stav štěpení Asp-N proteázou potvrdilo 22 specifických peptidů z 51 a použitím endoproteinázy Lys-C bylo získáno 16 specifických peptidů z celkového počtu 37. U kontroly (SOL, HY) byla prokázána po tryptickém štěpení β isoforma. Získané specifické peptidy pro dané isoformy v jednotlivých tyroidních stavech jsou vyznačeny a barevně odlišeny v alignmentu porovnávajícím primární struktury MyHC α a MyHC β (Obr. 4). Sekvence pro MyHC α [6] a MyHC β [7] byly získány z NCBI databáze.

Naše výsledky ukazují, že v levé komoře eutyroidních a hypertyroidních potkanů je dominantní α isoforma s vyšší mobilitou v akrylamidovém gelu, zatímco hypotyroidní potkani obsahují MyHC β jako majoritní isoformu s nižší mobilitou (Obr. 3).


```

*****
alfa AKLYDNHLGKSNNFQKPRNVKKGQEAHFSLVHYAGTVDYNILGWLEKNKDPLNETVVGLY 609
beta AKLYDNHLGKSNNFQKPRNIKKGQEAHFSLIHYAGTVDYNILGWLQKNKDPLNETVVGLY 609
*****:*****:*****:*****

alfa QKSSLK[REDACTED]GGKKKGSSSFQTVSALHR[REDACTED] 669
beta QKSSLKLLSNLFANYAGADAP-VDKGGKAKKGSSSFQTVSALHRENLNKLMNLRSTPH 668
*****::*:*.**:.**** *****

alfa [REDACTED]ICRKGFPNRILYGDFRQRYRILNPA 729
beta FVRCIIPNETKSPGVMDNPLVMHQLRCONGVLEGIRICRKGFPNRILYGDFRQRYRILNPA 728
***** *:.*****

alfa AIPEGQFIDSGKGAEKLLGSLDIDHNQYKFGHTKVFFKAGLLGLEEMRDERLSRIITR 789
beta AIPEGQFIDSRKGAEKLLGSLDIDHNQYKFGHTKVFFKAGLLGLEEMRDERLSRIITRI 788
***** *****

alfa [REDACTED]IEFKMVER[REDACTED]LYFKIKPLLKSAETEKE 849
beta QAQSRGVLSRMEFKKLEERRDSELLIIQWNIRAFMGVKNWPWMKLYFKIKPLLKSAETEKE 848
*:*:* * *:.***:.*:*****

alfa MANMKEEFGRVKDALEKSEARRKELEEKMVSLLOEKNDLQVQAEQDNLADAEERCDQL 909
beta MANMKEEFGRVKDALEKSEARRKELEEKMVSLLOEKNDLQVQAEQDNLADAEERCDQL 908
*****

alfa IKNKIQLEAKVKEMTERLEDEEEMNAELTAKKRKLEDECSELKDIIDLELTLAKVEKEK 969
beta IKNKIQLEAKVKEMTERLEDEEEMNAELTAKKRKLEDECSELKRDIDLELTLAKVEKEK 968
*****:*****

alfa HATENKVK[REDACTED]DDLQAEEDKVNTLTKSK[REDACTED] 1029
beta HATENKVKNLTEEMAGLDEIIVKLTKEKKALQEAHQALDDLQAEEDKVNTLTAKVKLE 1028
*****.*****:*****

alfa [REDACTED] 1089
beta QQVDDLEGLDQDKKVRMDLERAKRKLEGLDGLKLTQESIMDLENDKQQLDERLKKKDFELN 1088
*****.*:***** **:*:***:*.:.

alfa [REDACTED]K[REDACTED] 1149
beta ALNARIEDEQALGSQLOKKLKELQARIEELEELEAERTARAKVEKLRSDLSRELEEISE 1148
*:*:*****.***** *****:*****

alfa [REDACTED]KREAEFQKMRDLLEATLQHEATAAALRKKHADSVAELGEQID 1209
beta RLEEAGGATSVQIEMNKKREAEFQKMRDLLEATLQHEATAAALRKKHADSVAELGEQID 1208
*****

alfa NLQRVKQKLEKEKSEFKLELDDVTSHMEQIIKAKANLEKVS[REDACTED] 1269
beta NLQRVKQKLEKEKSEFKLELDDVTSNMEQIIKAKANLEKMCRTLEDQMEHRSKAEETQR 1268
*****:*****:***** **:* * *:*:**

alfa [REDACTED] 1329
beta SVNDLTRQRAKLQOTENGELSRQLDEKEALISQLTRGKLTYTQQLDLKRQLEEEVKAKNA 1328
*:*:* *****:***:***** *****:***:***** *****

alfa [REDACTED]VLSKANSEVAQWRRTKYETDAIQRTEEELE 1389
beta LAHALQSARHDCDLLREQYEEETEAKAELQRVLSKANSEVAQWRRTKYETDAIQRTEEELE 1388
*****

alfa AKKKLAQRLQDAEEAVEAVNAKCSSLEKTKHR[REDACTED] 1449
beta AKKKLAQRLQDAEEAVEAVNAKCSSLEKTKHRLQNEIEDLMVDVERSNAAAAALDKKQRN 1448
*****

```

```

alfa ██████████QKYEESQSELESSQKEARSLSTELFKLK ██████████ 1509
beta FDKILVEWKQKYEESQSELESSQKEARSLSTELFKLKNAYEESLEHLETFKRENKNLQEE 1508
*****.*****

alfa ██████████IRKQLEVEKLELQSALEEEAEASLEHEEGKILRAQLEFNQI 1569
beta ISDLTEQLGSTGKSIHELEKIRKQLEAEKLELQSALEEEAEASLEHEEGKILRAQLEFNQI 1568
*****. *.:*****.

alfa KAEIERKLAEK ██████████ 1629
beta KAEIERKLAEKDEEMEQAKRNHLRVVDSLQTSLDAETRSRNEALRVKKKMEGDLNEMEIQ 1628
*****

alfa ██████████ 1689
beta LSHANRMAEAQKQVKSLSLLLKDTQIQLDDAVRANDDLKENIAIVERNNLLQAELEEL 1688
**.:**.:**.:**.:*.: *.:*****.

alfa ██████████SRKLAEQELIETSERVQLLHSQNTSLINQKKKMDADLSQLQTEVEEAVQEC 1749
beta RAVVEQTERSSRKLAEQELIETSERVQLLHSQNTSLINQKKKMDADLSQLQTEVEEAVQEC 1748
*****

alfa RNAEEKAKK ██████████GG 1809
beta RNAEEKAKKAITDAAMMAEELKKEQDSAHLERMKNNMEQTIKDLQHLRDEAEQIALKGG 1808
*****.:*****

alfa KKQLQKLEARVRELENELEAEQKRNAESVKGMRKSERRIK ██████████ 1869
beta KKQLQKLEARVRELENELEAEQKRNAESVKGMRKSERRIKELTYQTEEDRKNNLLRLQDLV 1868
*****.:**.:*****

alfa ██████████LQLKVKAYKRQAEAEQANTNLSKFRKVQHELDEAEERA ██████████ 1929
beta DKLQLKVKAYKRQAEAEQANTNLSKFRKVQHELDEAEERADIAESQVNKLRAKSRDIG 1928
*****

alfa ██████████DEE 1938
beta AKG-LNEE- 1935
** :::*

```

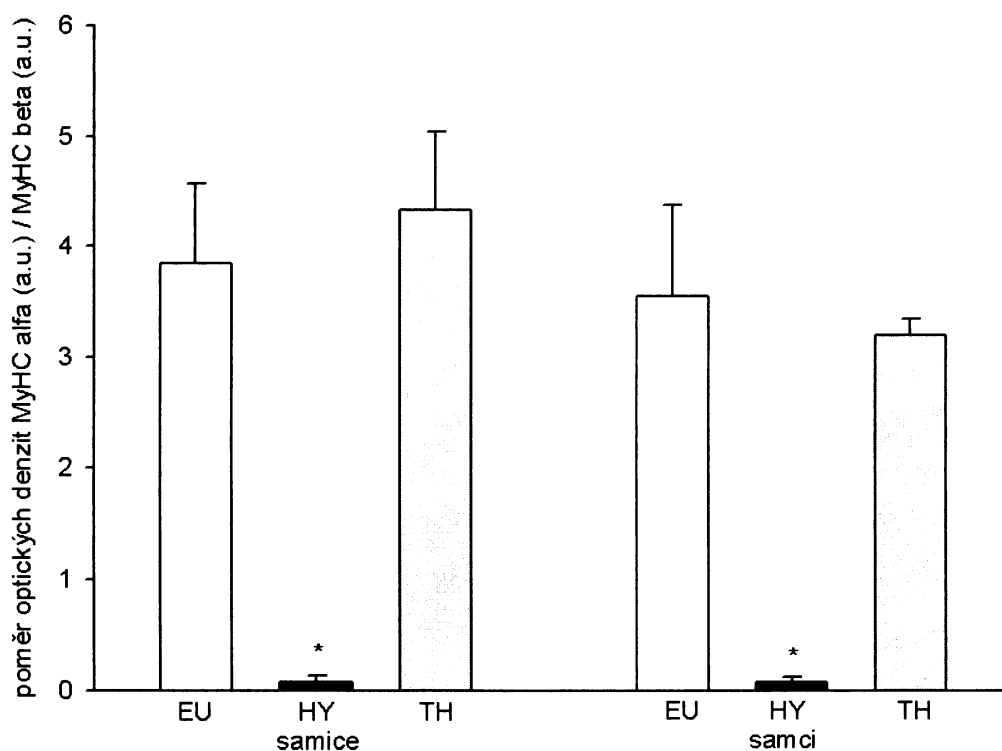
Obr. 4. Alignment MyHC α a MyHC β srdečních isoform (ClustalW 1.83 [6]) s vyznačenými specifickými peptidy získanými pomocí MS MALDI TOF/TOF po štěpení proteázami (trypsin, Asp-N a Lys-C). Specifické peptidy pro jednotlivé tyroidní stavy jsou vyznačeny následujícími barvami: žlutě - HY MyHC β , modře - ██████████, zeleně - ██████████, růžově - ██████████. Červený text - specifické aminokyseliny v dané sekvenci.

7.2. Vliv změny tyroidního stavu na fenotyp MyHC levé komory srdce u samců a samic

Cílem druhé části práce bylo porovnat zastoupení isoformy α a β u eutyroidních (EU), hypotyroidních (HY) a hypertyroidních (TH) potkanů (samic i samců). V uvedených tyroidních stavech byl stanoven poměr OD $\alpha:\beta$ v levé komoře srdce potkanů, který vyjadřuje relativní změny v zastoupení α a β isoformy MyHC. Výsledné hodnoty poměrů u EU a TH samic $3,84 \pm 0,72$, $4,39 \pm 0,63$ v uvedeném pořadí se signifikantně neliší a svědčí o dominanci isoformy α , avšak nepotvrdily signifikantní nárůst poměru OD $\alpha:\beta$ v TH stavu vůči EU stavu. V HY stavu tento poměr signifikantně poklesl na hodnotu $0,09 \pm 0,05$ proti TH i EU stavu. Pokles pod hodnotu 1 svědčí o převaze isoformy β (Graf 1, Obr. 5). U samců byl zaznamenán velmi mírný nesignifikantní pokles v TH stavu ($3,20 \pm 0,14$) vůči EU stavu ($3,55 \pm 0,82$). HY stav vyvolal významný signifikantní pokles ($0,08 \pm 0,05$) poměru proti EU a TH stavu, který svědčí o majoritní expresi isoformy β .



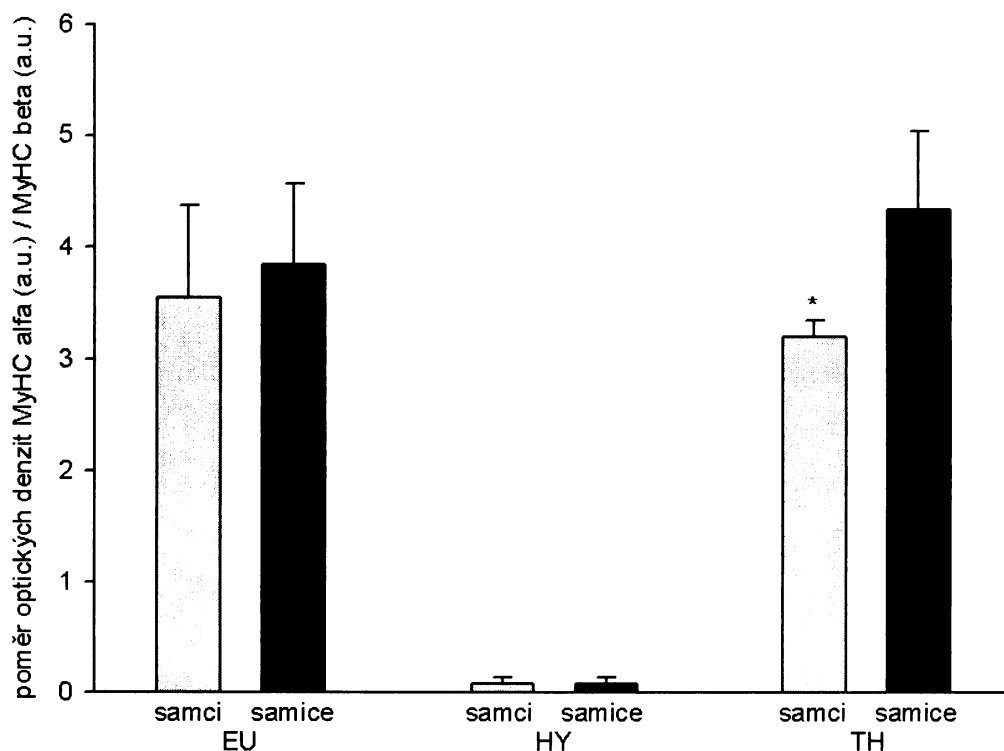
Obr. 5. Polyakrylamidový gel se separovanými isoformami MyHC α a β metodou SDS-PAGE u dospělých samic eutyroidních (EU), hypotyroidních (HY) a hypertyroidních (TH) potkanů inbrední linie Lewis ukazuje nárůst majoritní isoformy v daném tyroidním stavu. Jako kontrola pro MyHC β je použit SOL. Gel byl barven pomocí stříbra.



Graf1: Porovnání poměru $\alpha:\beta$ u eutyroidních (EU), hypotyroidních (HY) a hypertyroidních (TH) potkanů. Grafické znázornění zastoupení obou isoformů ukazuje u eutyroidních (bílý sloupec) a hypertyroidních (šedý sloupec) potkanů signifikantně vyšší poměr OD $\alpha:\beta$ na rozdíl od potkanů hypotyroidních (černý sloupec) u obou pohlaví. U eutyroidních samců byl zaznamenán vyšší poměr OD $\alpha:\beta$ než u hypertyroidních samců avšak nebyl signifikantní. Hypotyroidní stav způsobil u samců i samic signifikantní pokles poměru OD ($p < 0,05$). EU: $n=6$ (samice), $n=7$ (samci); HY: $n=7$ (samice), $n=6$ (samci); TH: $n=9$ (samice), $n=6$ (samci). * $p < 0,05$. Chybové úsečky představují \pm SD.

7.3. Pohlavní rozdíly v reakci na změnu tyroidního stavu u MyHC fenotypu levé komory srdce potkanů

Byly porovnány rozdíly v zastoupení α a β u samců a samic potkana v jednotlivých tyroidních stavech (EU, TH, HY). U EU a HY potkanů nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly v závislosti na pohlaví a naměřené poměry OD α : β dosahovaly hodnot $3,55 \pm 0,82$ a $0,08 \pm 0,05$ u samců, $3,84 \pm 0,72$ a $0,09 \pm 0,05$ u samic, v uvedeném pořadí. U TH potkanů byl poměr OD α : β signifikantně vyšší u samic ($4,39 \pm 0,63$) než u samců ($3,20 \pm 0,14$). Nebyla prokázána snížená citlivost u samic na TH stav (Graf 2.), viz Diskuse.



Graf 2: Porovnání poměru α : β u samců a samic potkana ve třech tyroidních

stavech. Grafické znázornění zastoupení obou isoformů ukazuje, že v EU a HY stavech nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly v poměru OD α : β mezi samci (šedý sloupec) a samicemi (černý sloupec). V TH stavu byl zaznamenán signifikantně vyšší poměr OD α : β u samic než u samců. EU – eutyroidní: n=6 (samice), n=7 (samci); HY – hypotyroidní: n=7 (samice), n=6 (samci); TH – hypertyroidní: n=9 (samice), n=6 (samci). * $p < 0,05$. Chybové úsečky představují \pm SD.

VIII. Diskuse

Výkonnost a kvalita kontraktility srdečního svalu přímo souvisí se zastoupením srdečních isoform těžkých řetězců myosinu (MyHC) α a β . Jedním z významných fyziologických i patofyziologických jevů, které přímo ovlivňují kontraktilní vlastnosti myokardu skrze změnu exprese srdečních isoform MyHC, jsou změny v metabolismu tyroidních hormonů.

Cílem práce bylo zavést metodiku pro kvantifikaci srdečních isoform a následně porovnat vliv tyroidních hormonů na expresi MyHC isoform v srdci u samců a samic potkana.

Již v první části práce se vyskytly neočekávané skutečnosti. Po zvolení vhodné separační SDS-PAGE metody (Sant'Ana Pereira *et al.*, 2001) byla mobilita dominantní isoformy na gelu opačná než uváděla literatura (Reiser a Kline, 1998; Sant'Ana Pereira *et al.*, 2001; Piao *et al.*, 2003; Warren a Greaser, 2003) a tudíž výsledek vzbuzoval dojem, že je nesprávný a opačný. Zároveň se však střídala pozice dominantní isoformy v souladu s tyroidním stavem, tzn., že v TH a EU stavu byla pozice majoritní isoformy shodná a lišila se od HY stavu (Obr. 3.). Na základě pozic pruhů MyHC isoform v jednotlivých tyroidních stavech jsme usoudili, že MyHC β představuje horní pruh, což souhlasilo s kontrolou SOL, který obsahuje isoformu typu I totožnou se srdeční isoformou β , a že MyHC α reprezentuje spodní pruh. Tato skutečnost nás vedla k ověření výsledků uváděných v literatuře, tedy k identifikaci jednotlivých isoform na gelu pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

MS MALDI TOF/TOF je jedna z nejcitlivějších a nepřesnějších metod pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin. Analýza přinesla vysoké pokrytí obou sekvencí (58% pro MyHC β a 52% pro MyHC α), což nám umožnilo spolehlivě odlišit sledované isoformy MyHC. Při citlivé detekci MyHC pomocí barvení stříbrem nebo směsí CB+BB se objevil další pruh (Obr. 6) nad MyHC β . Tento pruh však nebyl přítomen u všech vzorků a řešení tohoto jevu přesahovalo zadání této práce. V literatuře se násobné pruhy vyskytují (Sant'Ana Pereira *et al.*, 2001; Warren a Greaser, 2003). MS analýza potvrdila, že sledovaný pruh je také isoforma β . Naše výsledky ukazují, že v levé komoře eutyroidních a hypertyroidních potkanů je dominantní α isoforma s vyšší mobilitou v akrylamidovém gelu, zatímco hypotyroidní potkani obsahují MyHC β jako majoritní isoformu s nižší mobilitou.

Nebyla nalezena práce, která by popisovala identifikaci srdečních MyHC isoform pomocí hmotnostní spektrometrie. V předchozích studiích byly isoformy MyHC identifikovány pouze imunocytochemicky. V rámci diplomové práce jsem také vyzkoušela identifikaci isoform pomocí metody „western blotting“ s použitím specifických primárních protilátek „anti-cardiac“ proti oběma isoformám a „anti-slow“ (aS) proti pomalé isoformě β . S proteiny reagovala pouze „anti-cardiac“ a i přes opakované použití různého ředění aS protilátky nedošlo k pozitivnímu signálu, proto nemohly být isoformy α a β tímto způsobem odlišeny.

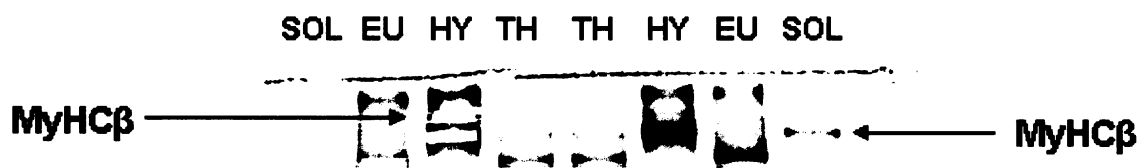
Použitá metoda MS MALDI TOF/TOF jednoznačně potvrdila odlišnou a opačnou mobilitu jednotlivých isoform vzhledem k literatuře, a tedy jejich obrácenou pozici na polyakrylamidovém gelu než je doposud uváděno.

Druhým cílem práce byla relativní kvantifikace isoform u samců a samic potkana v EU, HY, TH stavu, kterou jsem provedla porovnáním OD poměrů $\alpha:\beta$ mezi jednotlivými experimentálními skupinami.

Při porovnávání skupin s odlišným tyroidním stavem jsem zaznamenala signifikantně vyšší poměr OD $\alpha:\beta$ u eutyroidních a hypertyroidních potkanů proti hypotyroidním potkanům u obou pohlaví. Zajímavé je, že u eutyroidních samců byl oproti očekávání mírně vyšší poměr OD $\alpha:\beta$ než u hypertyroidních samců, avšak nebyl signifikantní. Jedním z možných vysvětlení tohoto trendu může být dlouhodobé podávání trijodtyroninu (T3) (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti po dobu 8 týdnů a déle), které ve svém důsledku mohlo vést k hemodynamickým změnám. Larsson *et al.* (1994) podávali samcům potkana kmene Wistar T3 v dvojnásobné dávce 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti a několik zvířat jim během pokusu uhynulo, nejspíše na tachykardii nebo srdeční arytmiie. Je totiž známo, že chronické působení T3 způsobuje objemové a tlakové přetížení (Klein, 1991; Biondi *et al.*, 2002), které srdce kompenzuje úspornějším výkonem spojeným s nárůstem exprese MyHC β (Lompre *et al.*, 1979; Haddad *et al.*, 1995). Proto se nárůst isoformy β mohl promítnout snížením poměru OD $\alpha:\beta$ u našich hypertyroidních samců. Otázkou zůstává, z jakých důvodů nebyl podobný pokles poměru OD $\alpha:\beta$ zaznamenán u hypertyroidních samic a co více, bylo prokázáno signifikantní snížení poměru OD $\alpha:\beta$ v TH stavu u samců proti samicím (Graf 2.) Nabízí se možné vysvětlení ve větším množství mRNA MyHC α i MyHC β v levé srdeční komoře u dospělé samice než u stejně starého samce (viz Kap. IV). Samci jsou náchylnější k patologickým změnám, jakými jsou například

tlakové přetížení či diabetes, a dochází u nich k vyšší expresi MyHC β než u samic. Důležitou roli zde budou hrát pohlavní hormony, zejména estrogen, které i u lidí chrání ženy před srdečními onemocněními. Pohlavní rozdíly v zastoupení MyHC isoformem mohou být způsobeny tím, že signální dráhy tyroidních hormonů, které přímo působí na expresi MyHC, a steroidních hormonů (kam patří i pohlavní hormony) se mohou navzájem ovlivňovat (Fujimoto *et al.*, 2004).

Shrneme-li dosažené výsledky, lze říci, že poměr $\alpha:\beta$ mezi samci a samicemi potkana nezaznamenal žádné signifikantní rozdíly v eutyroidním a hypotyroidním stavu. Nicméně u hypertyroidních zvířat byl poměr $\alpha:\beta$ signifikantně vyšší u samic než u samců, což je v souladu s výše uvedeným vysvětlením. Samci jsou citlivější na T3 než samice, ale dlouhodobé vystavení samců působení T3 může vést k hemodynamickým změnám a srdečnímu přetížení se všemi důsledky na srdeční fenotyp.



Obr. 6. Polyakrylamidový gel se separovanými isoformami MyHC α a β metodou SDS-PAGE u dospělých samic eutyroidních (EU), hypotyroidních (HY) a hypertyroidních (TH) potkanů inbrední linie Lewis ukazuje nález druhé isoformy MyHC β . Jako kontrola pro MyHC β je použit SOL. Gel byl barven pomocí směsi CB+BB.

IX. Závěr experimentální části

V rámci diplomové práce jsem dospěla k níže uvedeným závěrům:

1. Na pracovišti byla zavedena metoda SDS-PAGE podle (Sant'Ana Pereira *et al.*, 2001) pro separaci srdečních MyHC isoformem. Byly identifikovány srdeční isoformy MyHC pomocí hmotnostní spektrometrie a byla tak prokázána jejich opačná mobilita v akrylamidovém gelu než je uváděno v literatuře. Bylo tedy potvrzeno, že MyHC α má vyšší mobilitu než MyHC β za uvedených podmínek.
2. Byl prokázán vliv snížené hladiny tyroidních hormonů na expresi srdečních MyHC isoformem u samic i samců kmene Lewis, který vedl k signifikantnímu nárůstu MyHC β oproti EU stavu. Zvýšený tyroidní stav neprokázal u samic signifikantní změny a u samců způsobil snížení poměru OD α : β proti EU stavu bez známky signifikance.
3. U porovnání pohlavních rozdílů ve fenotypu MyHC v jednotlivých tyroidních stavech byl zaznamenán signifikantně vyšší poměr OD α : β u samic než u samců v TH stavu, což odpovídá zvýšené expresi β u TH samců. U EU a HY stavů nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly v závislosti na pohlaví.

Výsledky mé diplomové práce ukazují, že tyroidní hormony mají významný vliv na expresi srdečních isoformem těžkých řetězců myosinu a že existují pohlavní rozdíly v zastoupení α a β isoformy u hypertyroidních potkanů. Dále výsledky ukazují, že v levé komoře eutyroidních a hypertyroidních potkanů je dominantní α isoforma s vyšší mobilitou v akrylamidovém gelu, zatímco hypotyroidní potkani obsahují MyHC β jako majoritní isoformu s nižší mobilitou.

X. Přílohová část

10.1. Příloha 1

Tab. 1. Působení tyroidních hormonů na funkci organismu. Upraveno podle Greenspan a Baxter (1994).

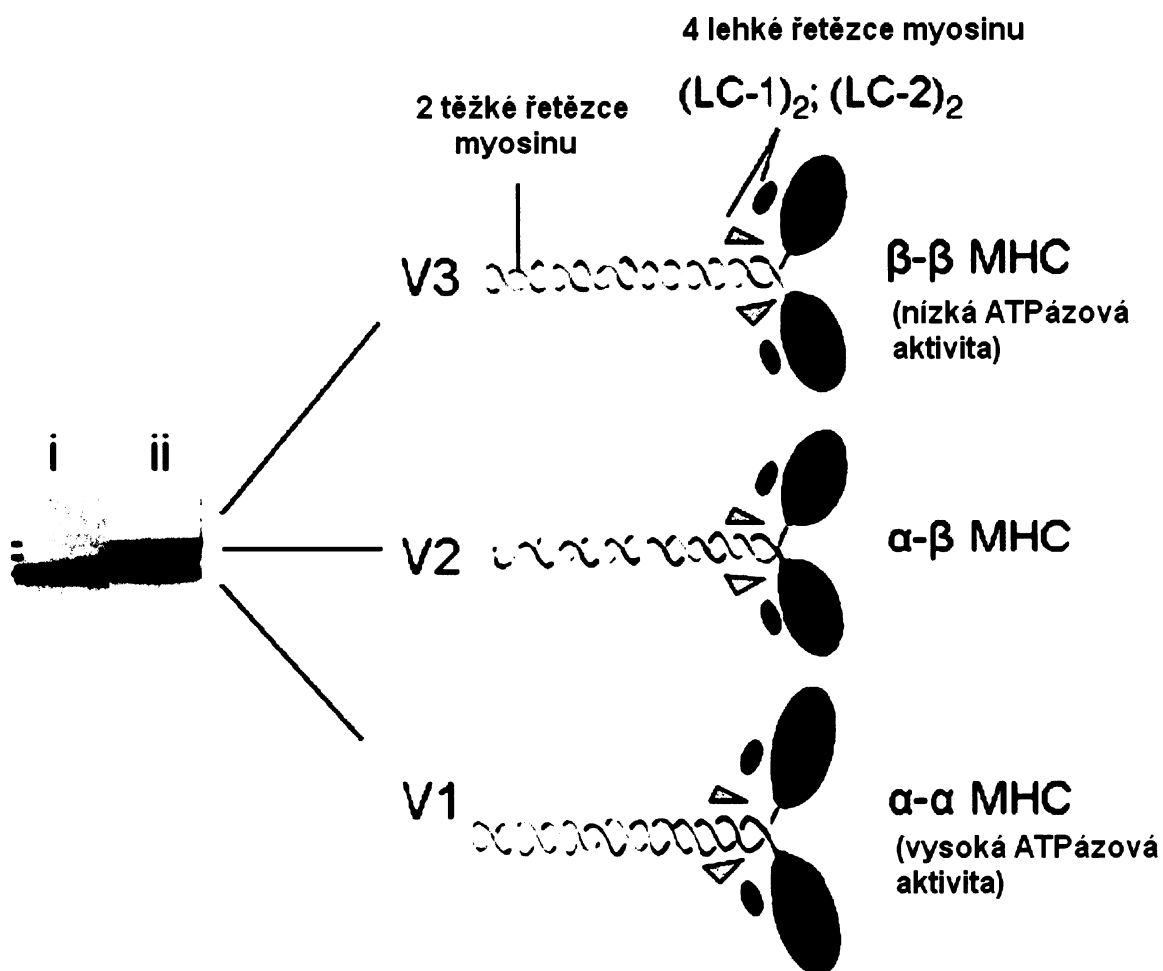
	normální funkce	hypotyroidismus (nedostatek tyroidních hormonů)	hypertyroidismus (nadbytek tyroidních hormonů)
fetální vývoj	skeletární dozrávání a vývoj mozku	mentální retardace a liliputánství (in utero)	nadměrně rozumově vyvinutý mozek - možný génius
růst	sekrece růstového hormonu vedoucí k normálnímu růstu	malý vzrůst (u dětí)	
spotřeba kyslíku a produkce tepla	zvýšení BMR (částečně stimulací Na/K ATPázy ve všech tkáních kromě mozku, sleziny a varlat?!)	stagnace, senzitivita k chladu	hyperaktivita, senzitivita k teplu
kardiovaskulární systém	zvýšení srdeční kontraktility (pozitivní inotropický a chronotropický efekt)	pokles srdečního výdeje a rychlosti	zvýšení srdečního výdeje a rychlosti
sympatikus	zvýšení počtu beta-adrenergních receptorů v srdci, kosterních svalech a tukové tkáni		zvýšení senzitivity ke katecholaminům (někdy léčeno beta blokátory!)
plicní systém	udržování normální hypoxické a hyperkarpnické tendence	hypoventilace (někdy vedoucí ke stavu požadujícího respiraci)	
hematopoetický systém	zvýšení BMR vedoucí ke zvýšení RBC produkce, zvýšení obsahu 2,3-BGP		
gastrointestinální systém	stimulace střevní motility	zácpa	průjem, pokles hmotnosti
opěrná soustava	způsobuje normální uzavření růstových destiček	myxedema - akumulace tekutiny v rukou, nohou a obličeji	zvýšení odbourávání kostní tkáně, úbytek kostní hmoty a v některých případech i hyperkalcémie
neuromuskulární systém	normální nervová a svalová funkce (včetně CNS)	stagnace, hyporeflexie	úbytek svalové hmoty, hyperreflexia (rychlejší svalová kontrakce!), hyperaktivita
metabolismus lipidů a karbohydrátů	regulace hladiny cukru v krvi, syntéza cholesterolu		zvýšení jaterní glukoneogeneze a glykogenolýzy, zvýšení sérového FFA, ale úbytek sérového cholesterolu!
endokrinní efekty	kontrola produkce a degradace mnoha hormonů		zvýšení obratu hormonů, zhoršení ovulace, atd..., exoftalmus (vystouplé oči)

Tab. 2. Koncentrace tyroidních hormonů v krvi [9] u člověka.

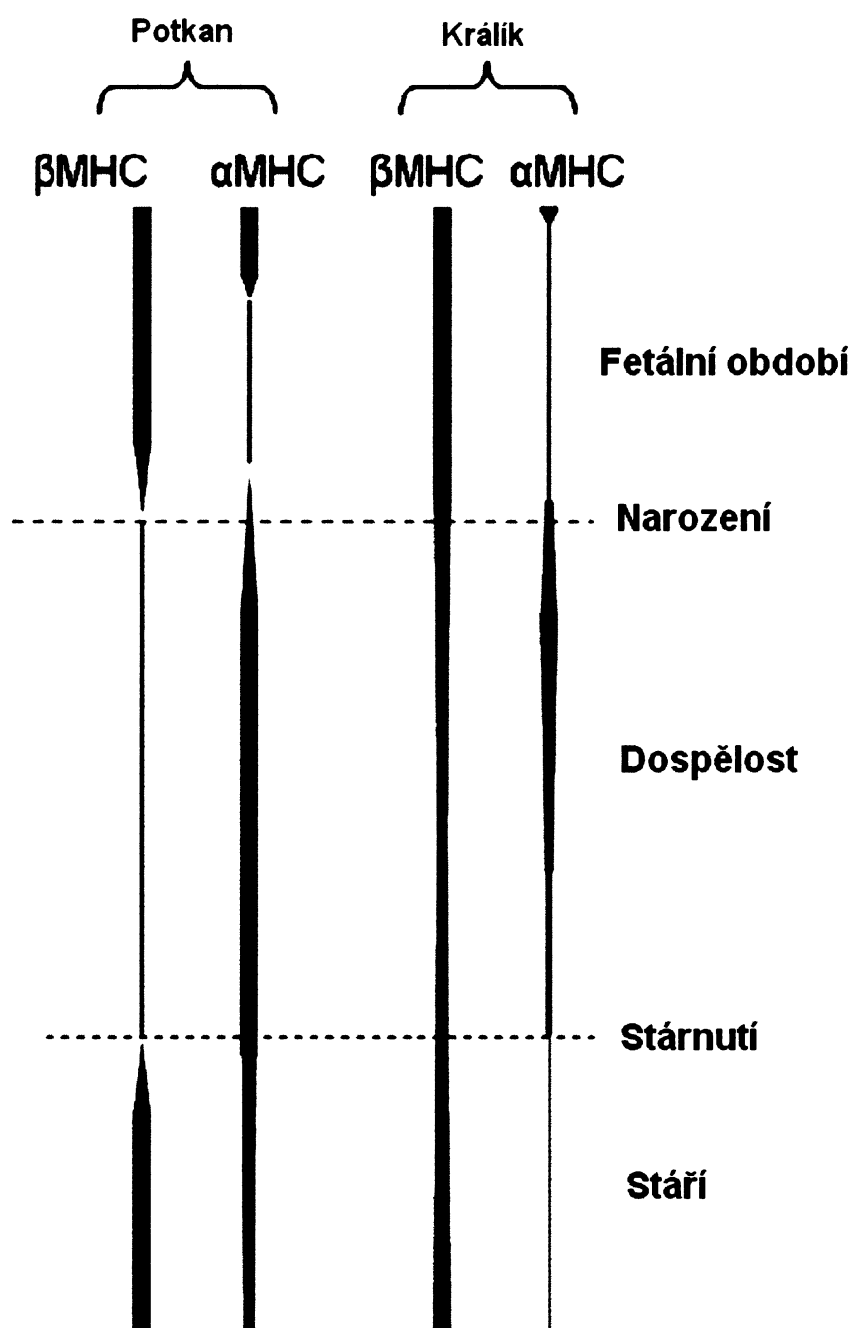
Tyroidní hormony	Koncentrace tyroidních hormonů v krvi
Trijodtyronin celkový T3 (nmol/l)	0,9 - 3,0
Trijodtyronin volný fT3 (pmol/l)	3,4 - 6,3
Tyroxin celkový T4 (nmol/l)	60 - 150
Tyroxin volný fT4 (pmol/l)	9,8 - 23,1
Tyreotropin TSH (U/l)	0,5 - 6,0

10.2. Příloha 2

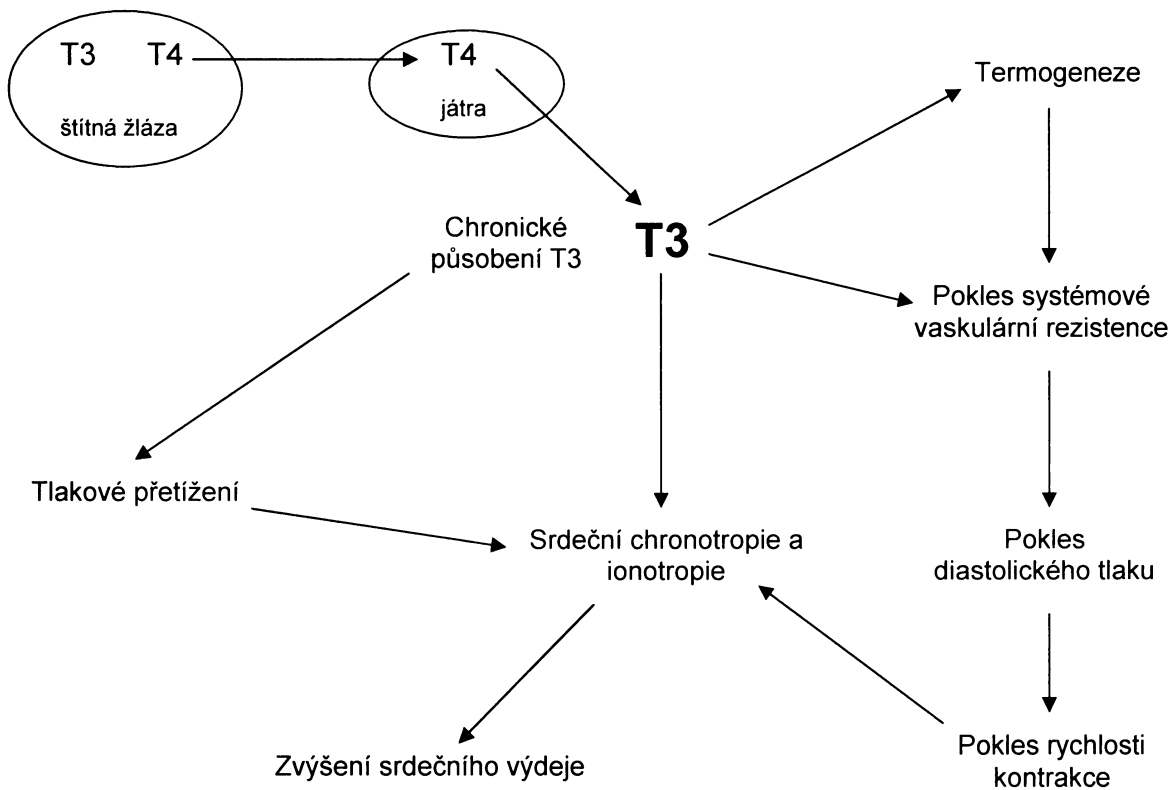
Obr. 1. Separace srdečního myosinu (V typu) u starého (i) a mladého dospělého potkana za nativních elektroforetických podmínek. Schematické znázornění struktury V1, V2 a V3 typu a zastoupení MyHC isoformem α a β . Upraveno podle Gupta *et al.* (2007).



Obr. 2. Schematické znázornění exprese srdečních MyHC isoform u potkana (MyHC isoformy vlevo) a králíka (MyHC isoformy vpravo) v průběhu ontogenetického vývoje. Upraveno podle Gupta *et al.* (2007).



Obr. 3. Působení tyroidních hormonů na srdce a kardiovaskulární systém. Upraveno podle Danzi a Klein (2004).



10.3. Příloha 3**A. Roztoky pro homogenizaci LV srdce****Homogenizační pufr:**

močovina	3 g
thiomočovina	1,55 g
tetrasodium pyrofosfát dekahydrát	45 mg
<u>merkaptoethanol</u>	<u>13 μl</u>
celkový objem	10 ml

B. Roztoky pro extrakci SOL**Promývací pufr (pH = 6,4):**

1 mM EGTA, pH 7,0	50 μ l
1 M chlorid sodný	200 μ l
4,0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	14,33 mg
<u>4,4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$</u>	<u>6,86 mg</u>
celkový objem	10 ml

Extrakční pufr (pH = 8,4):

0,2 M EGTA, pH = 7	250 μ l
0,25 M DTT	40 μ l
0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	9,71 ml
<u>celkový objem</u>	<u>10 ml</u>

C. Rostoky pro SDS-PAGE

Rostoky pro přípravu gelů:

Pufr A:

separační gel (12%): 50 ml 15 g akrylamidu + 0,075 g bisakrylamidu
(poměr 200:1) – skladovat ve tmavé láhvi

zaostřovací gel (3,7%): 12 ml 3,6 g akrylamidu + 0,18 g bisakrylamidu
(poměr 20:1) – skladovat ve tmavé láhvi

Pufr B: 10 ml 1 g SDS – skladovat při pokojové teplotě

Pufr C: 40 ml 9,692 g TRIS (2M); pH = 9,3 (separační gel)

Pufr D: 20 ml 1,213 g TRIS (0,5M); pH = 6,8 (zaostřovací gel)

Pufr G: 0,3 ml 30 mg APS (persíran amonný) – VŽDY ČERSTVĚ, zbytek
krátkodobě do mrazáku

Glycerol: 100 ml poměr 50:50 (glycerol 99% : filtrovaná voda mQ)

Postup přípravy gelů:

Rostoky	Separační gel (12%)	Zaostřovací gel (3,7%)
mQ H ₂ O	106 ul	2 ml
glycerol	2 ml	1 ml
pufr A	4 ml	667 ul

pufr C	3,75 ml	1,25 ml
pufr B	100 ul	50 ul
pufr G	30 ul	15 ul
<u>temed</u>	<u>14 ul</u>	<u>15 ul</u>
celkový objem	10 ml	5 ml

Vzorkový pufr:

0,1 % Bromfenolová modř	na špičku kopisty, aby byl roztok modrý
0,3 M DTT	0,5 ml
0,2 M EDTA, pH = 7,0	50 μ l
100 % Glycerol	2 ml
10% SDS	5 ml
<u>0,5 M TRIS, pH = 6,8</u>	<u>2,5 ml</u>
celkový objem	10 ml

Elektrodový pufr:

TRIS	6,07 g
SDS	0,1 g
<u>Glycine</u>	<u>28,53 g</u>
Celkový objem	1 l

Elektroforetické podmínky:

- konstantní proud 13 mA, na napětí nezáleží (max 300 V), teplota 9,5 °C, doba 7,5 h = 450 min
- zdroj napětí: PowerPac 300 (Biorad), nepulsní

Fixační roztok:

100% methanol	450 ml
mQ voda	450 ml
<u>99% kyselina octová</u>	<u>100 ml</u>
Celkový objem	1 l

D. Roztoky pro vizualizaci proteinů**Roztoky na barvení stříbrem:**

50% ethanol	500 ml 100% ethanolu:500 ml mQ vody
0,02% thiosíran amonný	2 g na 1000 ml mQ vody
0,2% AgNO ₃ (dusičnan stříbrný)	0,2 g na 100 ml mQ vody
6% Na ₂ CO ₃ (uhličitan sodný)	15 g na 250 ml mQ vody
<u>37% formaldehyd</u>	

Vyvíjecí roztok: 50 ml mQ vody + 50 ml Na₂CO₃ + 2 ml thiosíranu amonného + 25 μl 37% formaldehydu (těsně před vyvíjením)

Roztoky na barvení Coomassie Blue s Bismark brown R:

Směs CB a BB: 0,2% CB + 0,05% BB v poměru 1:0,75 (finální poměr 4,5:1)

Destain (odbarvovací roztok): 400 ml methanolu + 70 ml k.octové + 530 ml mQ vody

10.4. Příloha 4

Seznam použitých chemikálií

amonium persulfát (APS, persíran amonný): Sigma, Rakousko

akrylamid: Sigma, Rakousko

bromfenolová modř: Lachema, ČR

dihydrogenfosforečnan sodný ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): Lachema, ČR

dithiotreitol (DTT): Sigma, Rakousko

dusičnan stříbrný: Sigma, Rakousko

ethanol: Lachema, ČR

EDTA: Sigma, Rakousko

EGTA: Sigma, Rakousko

glycerol: Sigma, Rakousko

glycin: Sigma, Rakousko

hydrogenfosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): Lachema, ČR

chlorid sodný: Lachema, ČR

kyselina octová: Lachema, ČR

methanol: Lachema, ČR

methimazol (2-mercapto-1-methylimidazol): Sigma, Rakousko

močovina: Sigma, Rakousko

NN bisakrylamid: Sigma, Rakousko

pyrofosforečnan sodný ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$): Lachema, ČR

SDS (sodium dodecyl sulfát, lauryl sulfát): Sigma, Rakousko

TEMED: Sigma, Rakousko

tetrasodium pyrofosfát: Sigma, Rakousko

thiomočovina: Sigma, Rakousko

thiosíran sodný: Lachema, ČR

3,3',5-trijod-L-tyronin (T3 jako sodná sůl): Sigma, Rakousko

TRIS: Sigma, Rakousko

uhličitan sodný: Lachema, ČR

Internetové zdroje:

- [1] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=8393803>
(Myh6)
- [2] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=8393806>
(Myh7)
- [3] <http://www.statsoft.com>
- [4] <http://www.systat.com>
- [5] www.matrixscience.com
- [6] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=127741>
(MyHC α)
- [7] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=127748>
(MyHC β)
- [8] <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- [9] <http://www.ordinace.cz/laboratorni-hodnoty/T/>

Reference:

1. **Alpert N.R., Mulieri L.A.:** Increased myothermal economy of isometric force generation in compensated cardiac hypertrophy induced by pulmonary artery constriction in the rabbit. A characterization of heat liberation in normal and hypertrophied right ventricular papillary muscles. *Circ. Res.* 50: 491 – 500, 1982.
2. **Bahouth S.W.:** Thyroid hormones transcriptionally regulate the β 1-adrenergic receptor gene in cultured ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 15863-15869, 1991.
3. **Bahouth S.W., Cui X., Beauchamp M.J., Park E.A.:** Thyroid hormone induces β 1-adrenergic receptor gene transcription through a direct repeat separated by five nucleotides. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 3223-3237, 1997.
4. **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.
5. **Balkman C., Ojamaa K., Klein I.:** Time course of the *in vivo* effects of thyroid hormone on cardiac gene expression. *Endocrinology* 130: 2001-2006, 1992.
6. **Ball K.L., Solaro R.J.:** Discoordinate regulation of contractile protein gene expression in senescent rat myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 26: 519-526, 1994.
7. **Baum V.C., Clark W.A., Pelligrino D.A.:** Cardiac myosin isoenzyme shifts in non-insulin treated spontaneously diabetic rats. *Diabetes Res.* 10(4):187-190, 1989.

8. **Belke D.D., Betuing S., Tuttle M.J., Graveleau Ch., Zouny M.E., Pham M., Zhang D., Cooksey R.C., McClain D.A., Litin S.E., Taegtmeyer H., Severson D., Kahn C.R., Abel E.D.:** Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J. Clin. Invest.* 109:629–639, 2002.
9. **Bian X., Briggs M.M., Schachat F.H., Seidler F.J., Slotkin T.A.:** Glucocorticoids accelerate the ontogenic transition of cardiac ventricular myosin heavy-chain isoform expression in the rat: promotion by prenatal exposure to a low dose of dexamethasone. *J. Dev. Physiol.* 18(1): 35-42, 1992.
10. **Biondi B., Fazio S., Carella C., Sabatini D., Amato G., Cittadini A., Bellastella A., Lombardi G., Sacca L.:** Control of adrenergic overactivity by β -blockade improves quality of life in patients on long-term suppressive therapy with levothyroxine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1028-1033, 1994.
11. **Biondi B., Fazio S., Palmieri E.A., Carella C., Panza N., Cittadini A., Bone F., Lombardi G., Sacca L.:** Left ventricular diastolic dysfunction in patients with subclinical hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 2064-2067, 1999.
12. **Biondi B., Klein I.:** Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. *Endocrine.* 24(1): 1-13, 2004.
13. **Biondi B., Palmieri E., Fazio S., Cosco C., Nocera M., Sacca L., Filetti S., Lombardi G., Perticone F.:** Endogenous subclinical hyperthyroidism affects quality of life and cardiac morphology and function in young and middle aged-patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 4701-4705, 2000.
14. **Biondi B., Palmieri E., Lombardi G., Fazio S.:** Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 968-974, 2002.

15. **Bisping E., Ikeda S., Kong S.W., Tarnavski O., Bodyak N., McMullen J.R., Rajagopal S., Son J.K., Ma Q., Springer Z., Kang P.M., Izumo S., Pu W.T.:** Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103:14471–14476, 2006.
16. **Blum H., Beier H., Gross H.J.:** Improved silver staining of plant proteins, RNA, DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99, 1987.
17. **Boluyt M.O., Devor S.T., Opitck J.A., White T.P.:** Regional variation in cardiac myosin isoforms of female F344 rats during aging. *J. Gerontol.* 54: B313-B317, 1999.
18. **Brent G.A.:** The molecular basis of thyroid hormone action. *N. Engl. J. Med.* 331: 847-854, 1994.
19. **Briggs M.M., Seidler F.J., Slotkin T.A., Schachat F.H.:** Ontogenic transition of cardiac myosin heavy chain isoforms in rat ventricle: effects of fetal exposure to beta-adrenergic agonists or antagonists. *J. Dev. Physiol.* 17(4): 201-206, 1992.
20. **Bugaisky L.B., Anderson P.G., Hall R.S., Bishop S.P.:** Differences in myosin isoform expression in the subepicardial and subendocardial myocardium during cardiac hypertrophy in the rat. *Circ. Res.* 66:1127–1132, 1990.
21. **Cappola A.R., Ladenson P.W.:** Hypothyroidism and atherosclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 2438-2444, 2003.
22. **Carr A.N., Kranias E.G.:** Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid* 12: 453-458, 2002.

23. **Connelly K.A., Boyle A.J., Kelly D.J.:** Angiotensin II and the cardiac complications of diabetes mellitus. *Curr. Pharm. Des.* 13(26): 2721-2729, 2007.
24. **Cummins P., Lambert S.J.:** Myosin transitions in the bovine and human heart. A developmental and anatomical study of heavy and light chain subunits in the atrium and ventricle. *Circ. Res.* 58: 846-858, 1986.
25. **d'Albis A., Pantaloni C., Bechet J.J.:** An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.* 99(2): 261-272, 1979.
26. **Danzi S., Dubon P., Klein I.:** Effect of serum triiodothyronine on regulation of cardiac gene expression: role of histone acetylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289: H1506-H1511, 2005.
27. **Danzi S., Klein I.:** Thyroid hormone and blood pressure regulation. *Curr. Hypertens. Rep.* 5: 513-520, 2003.
28. **Danzi S., Klein I.:** Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Minerva Endocrinol.* 29: 139-150, 2004.
29. **Danzi S., Klein I.:** Posttranscriptional regulation of myosin heavy chain expression in the heart by triiodothyronine. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H455-H460, 2005.
30. **Danzi S., Ojamaa K., Klein I.:** Triiodothyronine-mediated myosin heavy chain gene transcription in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H2255-H2262, 2003.
31. **Davis F.J., Pillai J.B., Gupta M., Gupta M.P.:** Concurrent opposite effects of trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, on expression of α -MHC and cardiac tubulins: implication for gain in cardiac muscle contractility. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H1477-H1490, 2005.

32. **Demers L.M., Spencer C.A.:** Laboratory medicine practice guidelines, laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 13: 4-126, 2003.
33. **Dillmann W.H.:** Influence of thyroid hormone administration on myosin ATPase activity and myosin isoenzyme distribution in the heart of diabetic rats. *Metabolism* 31(3):199-204, 1982.
34. **Dillmann W.H.:** Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am. J. Med.* 88: 626-630, 1990.
35. **Donath M.Y., Gosteli-Peter M.A., Hauri C., Froesch E.R., Zapf J.:** Insuline-like growth factor-I stimulates myofibrillar genes and modulates atrial natriuretic factor mRNA in rat heart. *Eur. J. Endocrinol.* 137: 309-315, 1997.
36. **Dool J.S., Mak A.S., Friberg P., Wahlander H., Hawrylechko A., Adams M.A.:** Regional myosin heavy chain expression in volume and pressure overload induced cardiac hypertrophy. *Acta Physiol. Scand.* 155(4): 396-404, 1995.
37. **Dudley S.C., Baumgarten C.M.:** Bursting of cardiac sodium channels after acute exposure to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Circ. Res.* 73: 301-313, 1993.
38. **Effron M.B., Bhatnagar G.M., Spurgeon H.A., Ruano-Arroyo G., Lakatta E.G.:** Changes in myosin isoenzymes, ATPase activity, and contraction duration in rat cardiac muscle with aging can be modulated by thyroxine. *Circ. Res.* 60: 238-245, 1987.
39. **Eisenberg B.R., Edwards J.A., Zak R.:** Transmural distribution of isomyosin in rabbit ventricle during maturation examined by immunofluorescence and staining for calcium-activated adenosine triphosphatase. *Circ. Res.* 56:548-55, 1985.

40. **Everett A.W.:** Isomyosin expression in human heart in early pre- and post-natal live. *J. Mol. Cell Cardiol.* 18: 607-615, 1986.
41. **Everett A.W., Sinha A.M., Umeda P.K., Jakovcic S., Rabinowitz M.:** Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in alpha- and beta-myosin heavy chain levels in rabbit heart. *Biochemistry* 23: 15969-15999, 1984.
42. **Everts M., Verhoeven F.A., Bezstarosti K., Moerings E., Hennemann G., Visser T.J., and Lamers J.:** Uptake of thyroid hormones in neonatal rat cardiac myocytes. *Endocrinology* 137: 4235-4242, 1996.
43. **Fazio S., Palmieri E.A., Lombardi G., Biondi B.:** Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog. Horm. Res.* 59: 31-50, 2004.
44. **Fletcher A.K., Weetman A.P.:** Hypertension and Hypothyroidism. *J. Hum. Hypertens.* 12: 79-82, 1998.
45. **Forman B.M., Yang R., Stanely F., Casanova J., Samuels H.H.:** C-erbA protooncogenes mediated thyroid hormone-dependent and independent regulation of the rat grow hormone and prolactin genes. *Mol. Endocrinol.* 2: 902-911, 1988.
46. **Freire G., Ocampo C., Ilbawi N., Griffin A.J., Gupta M.:** Overt expression of AP-1 reduces alpha myosin heavy chain expression and contributes to heart failure from chronic volume overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43(4): 465-78, 2007.
47. **Fujimoto N., Jinno N., Kitamura S.:** Activation of estrogen response element dependent transcription by thyroid hormone with increase in estrogen receptor levels in a rat pituitary cell line, GH3. *J. Endocrinol.* 181: 77-83, 2004.
48. **Gick G.G., Hatala D.C., Chon D., Ismail-Beigi F.:** Na, K-ATPase in several tissues of the rat: tissue-specific expression of subunit mRNAs and enzyme activity. *J. Membr. Biol.* 131: 229-236, 1993.

49. **Gick G.G., Melikian J., Ismail-Beigi F.:** Thyroidal enhancement of rat myocardial Na, K-ATPase: preferential expression of $\alpha 2$ activity and mRNA abundance. *J. Membr. Biol.* 115: 273-282, 1990.
50. **Giger J, Qin AX, Bodell PW, Baldwin KM, Haddad F.:** Activity of the beta-myosin heavy chain antisense promoter responds to diabetes and hypothyroidism. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 292(6): H3065-H3071, 2007.
51. **Glass C.K., Holloway J.M.:** Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor. *Biochem. Biophys. Acta* 1032: 157 – 176, 1990.
52. **Gloss B., Trost S., Bluhm W., Swanson E., Clark R., Winkfein R., Janzen K., Giles W., Chassande O., Samarut J., Dillmann W.:** cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor α a β . *Endocrinology* 142: 544-550, 2001.
53. **Goslings B., Schwartz H.L., Dillmann W., Surks M.I., Oppenheimer J.H.:** Comparison of the metabolism and distribution of L-triiodothyronine and triiodothyroacetic acid in the rat: a possible explanation of differential hormonal potency. *Endocrinology* 98: 666-675, 1976.
54. **Götzsche L.B.H.:** L-triiodothyronine acutely increases Ca^{2+} -uptake in the isolated, perfused rat heart. Changes in L-type Ca^{2+} -channels and β -receptors during short- and long-term hyper- and hypothyroidism. *Eur. J. Endocrinol.* 130: 171-179, 1994.
55. **Greenspan F.S., Baxter J.D., editors.:** Basic and clinical endocrinology. 4th ed. Newark: *Appleton and Lange*, 1994.
56. **Grimm D., Cameron D., Griese D.P., Riegger G.A.J., Kromer E.P.:** Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 40: 297–306, 1998.

Gupta M.P.: Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43: 388–403, 2007.

57. **Groban L., Pailes N.A., Bennett C.D., Carter C.S., Chappell M.C., Kitzman D.W., Sonntag W.E.:** Growth hormone replacement attenuates diastolic dysfunction and cardiac angiotensin II expression in senescent rats. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 61(1): 28-35, 2006.
58. **Grover G.J., Mellström K., Ye L., Malm J., Li Y., Bladh L.G., Sleph P.G., Smith M.A., George R., Vennström B., Mookhtiar K., Horvath R., Speelman J., Egan D., Baxter J.D.:** Selective thyroid hormone receptor- β activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 10067-10072, 2003.
59. **Gupta M., Gupta M.P.:** Cardiac hypertrophy old concepts, new perspectives. *Mol. Cell Biochem.* 1796: 273-279, 1997.
60. **Gupta MP, Gupta M, Zak R.:** The role of adrenergic system in regulation of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Basic. Res. Cardiol.* 86(3): 57-64, 1991a.
61. **Gupta M.P., Gupta M., Stewart A., Zak R.:** Activation of alpha-myosin heavy chain gene expression by cAMP in cultured fetal rat heart myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 1196 – 1203, 1991b.
62. **Haddad F., Bodell P.W., Baldwin K.M.:** Pressure-induced regulation of myosin expression in rodent heart. *J. Appl. Physiol.* 78: 1489-1495, 1995.
63. **Haddad F., Bodell P.W., Qin A.X., Giger J.M., Baldwin K.M.:** Role of antisense RNA in coordinating cardiac myosin heavy chain switching. *J. Biol. Chem.* 278(39): 37132-37128, 2003.
64. **Haddad F., Masatsugu M., Bodell P.W., Qin A., McCue S.A., Baldwin K.M.:** Role of thyroid hormone and insulin in control of cardiac isomyosin expression. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 559-569, 1997.

65. **Haddad F., Qin A.X., Bodell P.W., Jiang W., Giger J.M., Baldwin K.M.:** Intergenic transcription and developmental regulation of cardiac myosin heavy chain genes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294(1): H14-H15, 2008.
66. **Hammond H.K., White F.C., Buxton I.L., Saltzstein P., Brunton I.L., Longhurst J.C.:** Increased myocardial β -receptors and adrenergic responses in hyperthyroid pigs. *Am. J. Physiol.* 252: H283-H290, 1987.
67. **Hamplová B., Nováková O., Tvrzická E., Pelouch V., Novák F.:** Effect of hypo- and hyperthyroid states on phospholipid composition in developing rat heart. *Mol. Cell Biochem.* 252: 295-303, 2003.
68. **Harvey C.B., Williams G.R.:** Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid* 12: 441-446, 2002.
69. **Hasegawa K., Lee S.J., Jobe S.M., Markham B.E., Kitsis R.N.:** cis-Acting sequences that mediate induction of β -myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation* 96: 3943 – 3953, 1997.
70. **Hatina J., Reischig J.:** Hormonální regulace genové transkripce – jaderné receptory jako ligandem-aktivované transkripční factory. *Čs. Fyziol.* 49 (2): 61-72, 2000.
71. **Havliš J.:** Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* 78(8): 448, 1999.
72. **Hodin R., Lazar M., Chin W.:** Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 85: 101-105, 1990.
73. **Hoh J.F.Y., McGrath P.A., Hale P.T.:** Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effects of hypophysectomy and thyroid replacement. *J. Mol. Cell Cardiol.* 10: 1053-1076, 1978.

74. **Hoh J.F.Y., Yeoh G.P.S., Thomas M.A.W., Higginbottom L.:** Structural differences in the heavy chains of rat ventricular myosin isoenzymes. *FEBS Letters* 97(2): 330-334, 1979.
75. **Holubarsch C.H., Goulette R.P., Litten R.Z., Martin B.J., Mulieri L.A., Alpert N.R.:** The economy of force development, myosin isoenzyme pattern and myofibrillar ATPase activity in normal and hyperthyroid rat myocardium. *Circ. Res.* 56: 78-86, 1985.
76. **Hu X., Lazar M.:** Transcriptional repression by nuclear hormones receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 6-10, 2000.
77. **Chassande O., Fraichard A., Gauthier K., Flamant F., Legrand C., Savatier P., Laudet V., Samarut J.:** Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA α locus that encode inhibition of retinoic acid receptor- α and triiodothyronine receptor activities. *Mol. Endocrinol.* 11: 1278-1290, 1997.
78. **Chin W.W., Yen P.M.:** Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: L.E. Braveman (Ed.). *Contemporary Endocrinology: Diseases of the Thyroid*. Totowa, *Humana Press*, p: 1-15, 1997.
79. **Choi J.K., Yoon S.H., Hong H.Y., Choi D.K., Yoo G.S.:** A Modified Coomassie Blue Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels with Bismark Brown R. *Anal. Biochem.* 236: 82-84, 1996.
80. **Imamura S.I., Matsuoka R., Hiratsuka E., Kimura M., Nakanishi T., Nishikawa T., Furutani Y., Takao A.:** Adaptational changes in MHC gene expression and isozyme transition in cardiac overloading. *Am. J. Physiol.* 260: H73 – H79, 1991.
81. **Ito M., Roeder R.G.:** The TRAP/SMCC/ mediator complex and thyroidhormone function. *Trends Endocrinol. Metab.* 12: 127-134, 2001.

82. **Izumo S., Lompre A.M., Matsuoka R., Koren G., Schwartz K., Nadal-Ginard B., Mahdavi V.:** Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 79: 970-977, 1987.
83. **Johansson C., Wennstrom B., Thoren P.:** Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor- α 1-deficient mice is an intrinsic defect. *Am. J. Physiol.* 275: R640-R646, 1998.
84. **Jin H., Yang R., Lu H., Ogasawara A.K., Li W., Ryan A., Peale F., Paoni N.F.:** Effects of early treatment with growth hormone on infarct size, surfoval, and cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Growth Horm. IGF Res.* 12(4): 208-215, 2002.
85. **Kahaly G.J., Dillmann W.H.:** Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine Rev.* 26 (5): 704-728, 2005.
86. **Kariya K.I., Farrance I.K.G., Simpson P.C.:** Transcription enhancer factor-1 in cardiac myocytes interacts with an α ₁-adrenergic and β -protein kinase C-inducible element in the rat β -myosin heavy chain. *J. Biol. Chem.* 268: 26658 – 26662, 1993.
87. **Kariya K.I., Farrance I.K.G., Simpson P.C.:** An enhancer core element mediates stimulation of the β -myosin heavy chain promoter by α ₁-antagonist and activated β -protein kinase C in hypertrophy of cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 3775 – 3782, 1994.
88. **Katzeff H.L., Powell S.R., Ojamaa K.:** Alterations in cardiac contractility and gene expression during low-T3 syndrome: prevention with T3. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 273: 951-956, 1997.
89. **Kim B., Carvalho-Bianco S.D., Larsen P.R.:** Thyroid hormone and adrenergic signaling in the heart. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 48(1): 171-175, 2004.

90. **Kim D., Smith T.W., Marsh J.D.:** Effect of thyroid hormone on slow calcium function in cultured chick ventricular cells. *J. Clin. Invest.* 80: 88-94, 1987.
91. **Kinlaw W.B.:** Atherosclerosis and the thyroid. *Thyroid Today* 14: 1-19, 1991.
92. **Kiss E., Brittsan A.G., Edes I., Grupp I.L., Grupp G., Kranias E.:** Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban-deficient mouse hearts. *Circ. Res.* 83: 608-613, 1998.
93. **Kiss E., Jakab G., Kranias E.G., Edes I.:** Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression: regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport and myocardial relaxation. *Circ. Res.* 75: 245-251, 1994.
94. **Klein I.:** Thyroid hormone and blood pressure regulation. In: Laragh J.H., Brenner B.M., editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management.* New York: *Raven Press*, p. 1661-1674, 1991.
95. **Klein I.:** The cardiovascular system in hypothyroidism. In: Braverman L., Utiger R, editors. Werner & Ingbar's. *The thyroid: a fundamental and clinical text.* 9th ed. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*; 2004. In press.
96. **Klein I., Levey G.S.:** The cardiovascular system in thyrotoxicosis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's *the thyroid.* 8th ed. Philadelphia: *Lippincott Williams and Wilkins*; 596–604, 2000.
97. **Klein I., Ojamaa K.:** Thyroid hormone and blood pressure regulation. In: Laragh J.H., Brenner B.M., editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management.* New York: *Raven Press*, p. 2247-2262, 1995.
98. **Klein I., Ojamaa K.:** Thyroid hormone and the cardiovascular systém. *N. Engl. J. Med.* 344. 501-509, 2001.

99. **Kloosterman W.P., Plasterk R.H.:** The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell* 11:441–450, 2006.
100. **Koziris L.P., Hickson R.C., Chatterton Jr. R.T., Groseth R.T., Christie J.M., Goldflies D.G., Unterman T.G.:** Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. *J. Appl. Physiol.* 86:1436–1442, 1999.
101. **Kubabayashi M., Tsuchimochi H., Komuro I., Takaku F., Yazaki Y.:** Molecular cloning and characterization of human α - and β -myosin heavy chain cDNA clones: regulation of expression during development and pressure overload in human atrium. *J. Clin. Invest.* 82: 524 – 531, 1988.
102. **Kuzman J.A., Thomas T.A., Vogelsang K.A., Said S., Anderson B.E., Gerdes A.M.:** Effects of induced hyperthyroidism in normal and cardiomyopathic hamsters. *Journal of Applied Physiology* 99: 1428-1433, 2005.
103. **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.
104. **Lazar M.A.:** Steroid and thyroid hormone receptors. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Amer.* 20: 681-685, 1991.
105. **Lazar M.:** Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* 14: 184-193, 1993.
106. **Leo C., Chen J.D.:** The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245: 1-11, 2000.
107. **Lee Y.I., Cho J.Y., Kim M.H., Lee D.J., Lee K.S.:** Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. *Eur. J. Appl. Physiol.* 97(2): 216-224, 2006.

108. **Levey G.S., Klein I.:** Catecholamine-thyroid hormone interactions and the cardiovascular manifestations of hyperthyroidism. *Am. J. Med.* 88(6): 642-6, 1990.
109. **Levey G.S., Klein I.:** Disorders of the thyroid. In: Stein J.H., editor. Internal medicine. 5th ed. St. Louis: *Mosby*; p.1323-1349, 1998.
110. **Li X., Kimbrel E.A., Kenan D.J., McDonnell D.P.:** Direct interaction between corepressors and coactivators permit the integration of nuclear receptor-mediated repression and activation. *Mol. Endocrinol.* 16: 1482-1491, 2002.
111. **Liang F., Webb P., Marimuthu A., Zhang S., Gardner D.G.:** Triiodothyronine increases brain natriuretic peptide (BNP) gene transcription and amplifies endothelin-dependent BNP gene transcription and hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* 278:15073–15083, 2003.
112. **Lompre A.M., Nadal-Ginard B., Mahdavi V.:** Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.* 259: 6437-6446, 1984.
113. **Lompre A.M., Schwartz K., d'Albis A., Lacombe G., Van Thiem N., and Swynghedauw B.:** Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 282: 105-107, 1979.
114. **Long X., Boluyt M.O., O'Neill L., Zeng J.S., Wu G., Nitta Y.K., Crow M.T., Lakotta E.G.:** Myocardial retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and myosin heavy chain expression in the rat during aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 54B: 23 – 27, 1999.
115. **Lowes B.D., Minobe W., Abraham W.T., Rizeq M.N., Bohlmeyer T.J., Quaife R.A., Roden R.L., Dutcher D.L., Robertson A.D., Voelkel N.F., Badesch D.B., Groves B.M., Gilbert E.M., Bristow M.R.:** Changes in gene expression in the intact human heart. Down regulation of α -myosin heavy chain in

- hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J. Clin. Invest.* 100: 2315 – 2324, 1997.
116. **Luther H.P., Morwinski R., Wallukat G., Haase H., Morano I.:** Expression of sense and naturally occurring antisense mRNA of myosin heavy chain in rat heart tissue and cultivated cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 27 – 35, 1997.
117. **Lyons G.E., Schiaffino S., Sasson D., Barton P., Buckingham M.:** Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *Cell Biol.* 111: 2427 – 2436, 1990.
118. **Mahdavi V., Periasamy M., and Nadal-Ginard B.:** Molecular characterization of two myosin heavy chain genes in the adult heart. *Nature (London)* 297: 659-664, 1982.
119. **Machackova J., Liu X., Lukas A., Dhalla N.S.:** Renin-angiotensin blockade attenuates cardiac myofibrillar remodeling in chronic diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 261(1-2): 271-278, 2004.
120. **Mai W., Janier M.F., Allioli N., Quignodon L., Chuzel T., Flamant F., Samarut J.:** Thyroid hormone receptor alpha is a molecular switch of cardiac function between fetal and postnatal life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(28): 10332-10337, 2004.
121. **Malhotra A., Buttrick P., Scheuer J.:** Effects of sex hormones on development of physiological and pathological cardiac hypertrophy in male and female rats. *Am. J. Physiol.* 259:H866–71, 1990.
122. **Malhotra A., Sanghi V.:** Regulation of contractile proteins in diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* 34(1): 34-40, 1997.

123. **Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M.:** The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83: 835-839, 1995.
124. **Masařík M.:** Vliv antidepresiv na metabolismus thyroideálních hormonů u potkana. Diplomová práce. Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. 2001.
125. **McKenna N.J., Lanz R.B., O'Malley B.W.:** Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine. Rev.* 20: 321-344, 1999.
126. **McLean B.G., Lee K.S., Simpson P.C., Farrance I.K.:** Basal and alpha1-adrenergic induced activity of minimal rat betaMHC promoters in cardiac myocytes requires multiple TEF-1 but not NFAT binding sites. *J. Mol. Cell Cardiol.* 35:461-71, 2003.
127. **McNally E.M., Kraft R., Bravo-Zehnder M., Taylor D.A., Leinwand L.A.:** Full-length rat alpha and beta myosin heavy chain sequences. Comparison suggests a molecular basis for functional differences. *J. Mol. Biol.* 210: 665-671, 1989.
128. **Mentzer Jr. R.M., Lasley R.D., Jessel A., Karmazyn M.:** Intracellular sodium hydrogen exchange inhibition and clinical myocardial protection. *Ann. Thorac. Surg.* 75: S700-S708, 2003.
129. **Mercadier J.J., Lompre A.M., Wisnewsky C., Samuel J.L., Bercovici J., Swynghedauw B., Schwartz K.:** Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 49: 525-532, 1981.
130. **Mester J., Baulieu E.-E.:** Nuclear receptor superfamily. In: L.J. DeGroot, M. Besser, H.G. Burger, J.L. Jameson, D.L. Loriaux, J.C. Marshall, W.D. Odell, J.T. Potts Jr., A.H. Rubenstein, G.F. Cahill, L. Martini, D.H. Nelson (Eds.). *Endocrinology* 3rd edition. Philadelphia, *W.B. Saunders*, p:93-118, 1995.

131. **Miner J.H., Miller J.B., Wold B.J.:** Skeletal muscle phenotypes initiated by ectopic MyoD in transgenic mouse heart. *Development* 114: 853-860, 1992.
132. **Mintz G., Pizzarello R., Klein I.:** Enhanced left ventricular diastolic function in hyperthyroidism: noninvasive assessment and response to treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73: 146-150, 1991.
133. **Miyata S., Minobe W., Bristow M.R., Leinwand L.A.:** Myosin heavy chain isoform expression in the failing and non-failing human heart. *Circ. Res.* 86: 386-390, 2000.
134. **Molkentin J.D., Lu J.R., Antos C.L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S.R., Olson E.N.:** A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215–28, 1998.
135. **Monzani F., Di Bello V., Caraccio N., Bertini A., Giorgi D., Giusti C., Ferrannini E.:** Effect of levothyroxine on cardiac function and structure in subclinical hypothyroidism: a double blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1110-1115, 2001.
136. **Morano I., Arndt H., Gartner C. and Caspar-Ruegg J.:** Skinned fibers of human atrium and ventricle: myosin isoenzymes and contractility. *Circ. Res.* 62: 632-639, 1988.
137. **Morano I., Gagelmann M., Arner A., Ganten U., Ruegg J.C.:** Myosin isoenzymes of vascular smooth and cardiac muscle in the spontaneously hypertensive and normotensive male and female rat: a comparative study. *Circ. Res.* 59:456–62, 1986.
138. **Morkin E.:** Regulation of myosin heavy chain genes in the heart. *Circulation* 87: 1451-1460, 1993.
139. **Morkin E.:** Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc. Res. Tech.* 50: 522-531, 2000.

140. **Morkin E., Flink I.L., Goldman S.:** Biochemical and physiological effects of thyroid hormone on cardiac performance. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 25: 435 – 464, 1983.
141. **Mylotte K.M., Cody V., Davis P.J., Davis F.B., Blas S.D., Schoen L.:** Milrinone and thyroid hormone stimulate myocardial membrane Ca⁺⁺-ATPase activity and share structural homologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7074-7078, 1985.
142. **Nakao K., Minobe W., Roden R., Bristow M.R., Leinwand L.A.:** Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J. Clin. Invest.* 100: 2362 – 2370, 1997.
143. **Neri Serneri G.G., Boddi M., Modesti P.A., Cecioni I., Coppo M., Padeletti L., Michelucci A., Colella A., Galanti G.:** Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ. Res.* 89:977–82, 2001.
144. **Nikcevic G., Heidkamp M.C., Perhone M., Russell B.:** Mechanical activity in heart regulates translation of alpha-myosin heavy chain mRNA but not its localization. *Am. J. Physiol.* 276: H2013-H2019, 1999.
145. **Novák F, Tvrzická E, Hamplová B, Kolár F, Nováková O.:** Postnatal development of phospholipids and their fatty acid profile in rat heart. *Mol. Cell Biochem.* 293(1-2):23-33, 2006.
146. **Novotný J., Bourová L., Málková O., Svoboda P., Kolář F.:** G proteins, beta-adrenoreceptors and beta-adrenergic responsiveness in immature and adult rat ventricular myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31: 761-72, 1999.
147. **Ojamaa K., Kenessy A., Klein I.:** Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology* 151: 3139-2144, 2000.

148. **Ojamaa K., Klein I.:** In Vivo Regulation of Recombinant Cardiac Myosin Heavy Chain Gene Expression by Thyroid Hormone. *Endocrinology* 132(3): 1002-1006, 1993.
149. **Ojamaa K., Sabet A., Kenessy A., Shenoy R., Klein I.:** Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific. *Endocrinology* 140: 3170-3176, 1999.
150. **Olshausen K., Bischoff S., Kahaly G.J., Mohr-Kahaly S., Erbel R., Beyer J., Meyer J.:** Cardiac arrhythmias and heart rate in hyperthyroidism. *Am. J. Cardiol.* 63: 930-933, 1989.
151. **Pachucki J., Hopkins J., Peeters R., Tu H., Carvalho S.H., Kaulbach H., Abel E.D., Wondisford F.E., Ingwall J.S., Larsen P.R.:** Type 2 iodothyronine deiodinase transgene expression in the mouse heart causes cardiac-specific thyrotoxicosis. *Endocrinology* 142: 13-20, 2001.
152. **Pauletto P., Dalla Libera L., Vescovo G., Scannapieco G., Angelini A., Pessina A.C., Dal Palù C.:** Propranolol-induced changes in ventricular isomyosin composition in the rat. *Am. Heart J.* 109:1269–1273, 1985.
153. **Pedram A., Razandi M., Lubahn D., Liu J., Vannan M., Levin E.R.:** Estrogen Inhibits Cardiac Hypertrophy: Role of Estrogen Receptor Beta to Inhibit Calcineurin. *Endocrinology* (In press), 2008.
154. **Pehowich D.J.:** Hypothyroid state and membrane fatty acid composition influence cardiac mitochondrial pyruvate oxidation. *Biochem. Biophys. Acta* 1235: 231-238, 1995.
155. **Pelzer T., Jazbutyte V., Hu K., Segerer S., Nahrendorf M., Nordbeck P., Bonz A.W., Muck J., Fritzemeier K.H., Hegele-Hartung C., Ertl G., Neyses L.:** The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 67(4): 604-12, 2005.

156. **Perk M., O'Neill B.J.:** The effect of thyroid hormone therapy on angiographic coronary artery disease progression. *Can. J. Cardiol.* 13: 273-276, 1997.
157. **Piao S., Yu F., Mihm M.J., Reiser P.J., McCarthy P.M., Van Wagoner D.R., Bauer J.A.:** A simplified method for identification of human cardiac myosin heavy-chain isoforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 27-30, 2003.
158. **Pingitore A., Iervasi G.:** Triiodothyronine (T3) effects on cardiovascular system in patients with heart failure. *Recent Patents Cardiovasc. Drug Discov.* 3(1): 19-27, 2008.
159. **Polikar R., Burger A.G., Scherrer U., Nicod P.:** The thyroid and the heart. *Circulation* 87: 1435-1441, 1993.
160. **Pracyk J.B., Slotkin T.A.:** Thyroid hormone differentially regulates development of beta-adrenergic receptors, adenylate cyclase and ornithine decarboxylase in rat heart and kidney. *J. Dev. Physiol.* 16:251-261, 1991.
161. **Pratt W.B., Toft D.O.:** Steroid receptors interactions with heat shock protein and immunophilin chaperons. *Endocr. Rev.* 18: 306-360, 1997.
162. **Qi M., Puglisi J.L., Byron K.L., Ojamaa K., Klein I., Bers D.M., Samarel A.M.:** Myosin heavy chain gene expression in neonatal rat heart cells: effects of $[Ca^{2+}]_i$ and contractile activity. *Am. J. Physiol.* 273: C394-C403, 1997.
163. **Ransnas L., Hammond H.K., Insel P.A.:** Increased Gs in myocardial membranes from hyperthyroid pigs. *Clin. Res.* 36: 552A (abstract), 1988.
164. **Reed T.D., Babu G.J., Ji Y., Zilberman A., Ver Heyen M., Wuytack F., Periasamy M.:** The Expression of SR Calcium Transport ATPase and the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger are Antithetically Regulated During Mouse Cardiac Development and in Hypo/hyperthyroidism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32: 453-464, 2000.

165. **Reiser P.J., Kline W.O.:** Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am. J. Physiol.* 274 (*Heart Circ. Physiol.* 43): H1048–H1053, 1998.
166. **Rohrer D., Dillmann W.H.:** Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca⁺⁺ATPase in the rat heart. *J. Biol. Chem.* 263: 6941-6944, 1988.
167. **Rosenkranz-Weiss P., Tomek R.J., Mathew J., Eghbali M.:** Gender-specific differences in expression of mRNAs for functional and structural proteins in rat ventricular myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26(2): 261-271, 1994.
168. **Rudinger A., Mylotte K.M., Davis P.J., Davis F.B., Blas S.D., Schoen L.:** Rabbit myocardial membrane Ca⁺⁺-adenosine triphosphatase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 379-385, 1984.
169. **Rupp H.:** Differential effect of physical exercise routines on ventricular myosin and peripheral catecholamine stores in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 65:370–377, 1989.
170. **Rupp H., Jacob R.:** Myocardial transition between fast and slow-type muscle as monitored by the population of myosin isoenzymes. In: Rupp H., editor. *The regulation of heart function.* New York: *Thieme Inc.* pp. 271–91, 1986.
171. **Saez I.U., Gianola K.M., McNally E.M., Feghali R., Eddy R., Shows T.B., Leinwand L.A.:** Human cardiac myosin heavy chain genes and their linkage in the genome. *Nucleic. Acids. Res.* 15: 5443-5459, 1987.
172. **Sant'Ana Pereira JAA, Greaser M, Moss RL.:** Pulse Electrophoresis of Muscle Myosin Heavy Chains in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 291: 229- 236, 2001.

173. **Sassoon D.A., Garner I., Buckingham M.:** Transcript of α -cardiac and α -skeletal actins are early markers for myogenesis in mouse cardiac muscle. *Development* 104: 155 – 164, 1988.
174. **Scott R.E., Wu-Peng X.S., Yen P.M., Chin W.W., Pfaff D.W.:** Interactions of estrogen- and thyroid hormone receptors on a progesterone receptor estrogen response element (ERE) sequence: a comparison with the vitellogenin A2 consensus ERE. *Molecular Endocrinology* 11: 1581–1592, 1997.
175. **Segal J.:** Acute effects of thyroid hormone on the heart: an extranuclear increase in sugar uptake. *J. Mol. Cell Cardiol.* 21: 323-334, 1989.
176. **Segal J.:** Calcium is the first messenger for the action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane: first evidence for an acute effect of thyroid hormone on calcium uptake in the heart. *Endocrinology* 126: 2693-2702, 1990.
177. **Shimoni Y., Severson D.L.:** Thyroid status and potassium currents in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 268: H576-H583, 1995.
178. **Scheuer J., Malhotra A., Hirsch C., Capasso J., Schaible T.F.:** Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *J. Clin. Invest.* 70:1300–1305, 1982.
179. **Schimmel M., Utiger R.D.:** Thyroidal and peripheral production of thyroid hormones. Review of recent findings and their clinical implication. *Ann. Intern. Med.* 87: 760-768, 1977.
180. **Schwartz K., Lazar M.A., Oppenheimer J.H.:** Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone β 2 receptor (TR β 2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues. *J. Biol. Chem.* 269: 24777-24782, 1994.
181. **Schwartz K., Lecarpentier Y., Martin J.L., Lompre A.M., Mercadier J.J., Swynghedauw B.:** Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *J. Mol. Cell Cardiol.* 13(12):1071-1075, 1981.

182. **Silva JE.**: Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5:481-92, 1995.
183. **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.
184. **Steinberg A.D.**: Myxedema and coronary artery disease – a comparative autopsy study. *Ann. Intern Med.* 68: 338-344, 1968.
185. **Stevenson L.W.**: Beta-blockers for stable heart failure. *N. Engl. J. Med.* 346: 1346-1347, 2002.
186. **Sugawara A., Yen P.M., Apriletti J.W., Ribeiro R.C., Sacks D.B., Baxter J.D., Chin W.W.**: Phosphorylation selectively increases triiodothyronine receptor homodimer binding to DNA. *J. Biol. Chem.* 269: 433-437, 1994.
187. **Sucharov C.C., Mariner P.D., Nunley K.R., Long C., Leinwand L., Bristow M.R.**: A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* 291:H1299–H1308, 2006.
188. **Swynghedauw B.**: Developmental and functional adaptations of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 66: 710-771, 1986.
189. **Swynghedauw B.**: Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev.* 79: 215-262, 1999.
190. **Talmadge, R. J.; Roy, R. R.**: Electrophoretic separation of the rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.* 75: 2337 – 2340, 1993.
191. **Tapscott S.J., Weintraub H.**: MyoD and the regulation of myogenesis by helix-loop-helix proteins. *J. Clin. Invest.* 87: 1113-1138, 1991.

192. **Toft A.D.**: Subclinical hyperthyroidism. *N. Engl. J. Med.* 345: 512-516, 2001.
193. **Toft A.D., Boon N.A.**: Thyroid disease and the heart. *Heart* 84: 455-460, 2000.
194. **van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Hill J., Olson E.N.**: Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science* 316(5824): 575 – 579, 2007.
195. **Vasudevan N., Ogawa S., Pfaff D.**: Estrogen and Thyroid Hormone Receptor Interactions: Physiological Flexibility by Molecular Specificity. *Physiol. Rev.* 82: 923-944, 2002.
196. **Wang B., Ouyang J., Xia Z.**: Effects of triiodo-thyronine on angiotensin induced cardiomyocyte hypertrophy: reversal of increased beta-myosin heavy chain gene expression. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84: 935–941, 2006.
197. **Wannenburg T., Khan A.S., Sane D.C., Willingham M.C., Faucette T., Sonntag W.E.**: Growth hormone reverses age-related cardiac myofilament dysfunction in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281(2): H915- H922, 2001.
198. **Warren Ch.M., Greaser M.L.**: Method for cardiac myosin heavy chain separation by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 320: 149–151, 2003.
199. **Waspe H., Ordahl C.P., Simpson P.C.**: The cardiac β -myosin heavy chain gene is selectively induced in α_1 -adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J. Clin. Invest.* 85: 1206 – 1214, 1990.
200. **Weinberg E.O., Thienelt C.D., Katz S.E., Bartunek J., Tajima M., Rohrbach S., Souhlas P.S., Korelo B.H.**: Gender Differences in Molecular Remodeling in Pressure Overload Hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34(1): 264-273, 1999.

201. **White P., Dauncey M.J.:** Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *J. Mol. Endocrinol.* 23: 241-254, 1999.
202. **Williams G.R.:** Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor β isoforms. *Mol. Cell Biol.* 20: 8329-8342, 2000.
203. **Winegrad S., McClellan G., Weisberg A., Lin L.E., Weindling S., Horowitz R.:** Beta-adrenergic regulation of cardiac myosin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:606–609, 1987.
204. **Winegrad S., Weisberg A., Lin L.E., McClellan G.:** Adrenergic regulation of myosin adenosine triphosphatase activity. *Circ. Res.* 58:83–95, 1986.
205. **Wright C.E., Haddad F., Qin A.X., Bodell P.W., Baldwin K.M.:** In vivo regulation of β -MHC gene in rodent heart: role of T3 and evidence for an upstream enhancer. *Am. J. Physiol.* 276 (*Cell Physiol.* 45): C883–C891, 1999.
206. **Xu L., Glass C.K., Rosenfeld M.G.:** Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 140-147, 1999.
207. **Yamazaki T., Komuro I., Yazaki Y.:** Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am. J. Cardiol.* 83(12A): 53H-57H, 1999 .
208. **Yang Y.Z., Burgos-Trinidad M., Wu Y & Koenig R.J.:** Thyroid hormone receptor variant $\alpha 2$. Role of the ninth heptad in DNA binding, heterodimerization with retinoid X receptors, and dominant negative activity. *Journal of Biological Chemistry* 271: 28235-28242, 1996.
209. **Yao J., Eghbali M.:** Decreased collagen gene expression and absence of fibrosis in thyroid hormone-induced myocardial hypertrophy: response of cardiac fibroblasts to thyroid hormone in vitro. *Circ. Res.* 71: 831-839, 1992.

210. **Young Jr. W.F., Gorman C.A., Jiang N.S., Machacek D., Hay I.D.:** L-thyroxine contamination of pharmaceutical D-thyroxine: probable cause of therapeutic effect. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36: 781-787, 1984.
211. **Young L.H., Renfu Y., Hu X., Chong S., Hasan S., Jacob R., Sherwin R.S.:** Insuline-like growth factor I stimulates cardiac myosin heavy chain and actin synthesis in the awake rat. *Am. J. Physiol.* 276: E143-E150, 1999.
212. **Yuan H., Bowlby D.A., Brown T.J., Hochberg R.B., Maclusky N.J.:** Distribution of occupied and unoccupied estrogen receptors in the rat brain: effects of physiological gonadal steroid exposure. *Endocrinology* 136:96 –105, 1995.
213. **Zhang D., Trudeau V.L.:** Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 144(3): 306-315, 2006.
214. **Zhong Y., Reiser P.J., Matlib M.A.:** Gender differences in myosin heavy chain- β and phosphorylated phospholamban in diabetic rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: 2688-2693, 2003.