

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv hormonů štítné žlázy na expresi různých podtypů  
těžkých řetězců myosinu

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Lenka Jourová</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Stanislav Pavelka, CSc.</b>
Pracoviště:	Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Praha

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Lenka Jourová

Děkuji doc. RNDr. Stanislavu Pavelkovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a připomínky v průběhu vypracování diplomové práce.

Dále také děkuji pracovníkům z oddělení Radiometrie Fyziologického ústavu AV ČR za přátelské prostředí, poskytnuté rady a cennou pomoc.

V neposlední řadě velmi děkuji svým rodičům a přátelům za podporu, pomoc, lásku a trpělivost.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Lenka Jourová
Název práce	Vliv hormonů štítné žlázy na expresi různých podtypů těžkých řetězců myosinu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Praha
Vedoucí práce	doc. RNDr. Stanislav Pavelka, CSc.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Thyreoidální hormony (TH) hrají důležitou roli pro růst a diferenciaci buňky, také představují jeden z hlavních endokrinních buněčných regulátorů. Na druhé straně může změna jejich hladiny u experimentálních zvířat vyvolávat patofyziologické změny, např. nežádoucí přestavbu srdeční a svalové tkáně spojenou se změnami exprese mnoha proteinů, které mohou vést až k selhání srdce. Předpokládá se, že RPO obecně může snižovat škodlivý vliv na funkci srdečního a kosterního svalstva. Hlavním cílem této práce bylo vyvolat hyperthyroidní a hypothyroidní stav u experimentálních potkanů, sloužících jako model nemocného organismu, stanovit změnu thyroïdního stavu pomocí celé řady anatomických a biochemických parametrů a analyzovat, zda podávání RPO může působit proti patofyziologickým změnám vyvolaným změnou thyroïdního stavu u potkanů.</p>
Klíčová slova	Thyreoidální hormony, Kosterní svalstvo, Těžké řetězce myosinu, Červený palmový olej
Počet stran	80
Počet příloh	0

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Lenka Jourová
Title	The influence of thyroid hormones on myosine heavy chains expression
Type of thesis	Master
Department	Institute of Physiology ASCR
Supervisor	Assoc. Prof. RNDr. Stanislav Pavelka, CSc.
The year of presentation	2012
Abstract	<p>Thyroid hormones (TH) play an important role in cell growth and differentiation, they also represent one of the major endocrine regulators of the cell. On the other hand, alterations of their levels in experimental animals can induce pathological changes including negative cardiac and muscular tissue remodelling connected with changes in expression of many proteins that can eventually lead to a heart failure. RPO is supposed to ameliorate negative noxious deterioration on cardiac and muscle function in general. The main goal of this work was to induce hyperthyroid and hypothyroid status of experimental rats as a "model of diseased organism", to determine this status using many anatomical and biochemical parameters and to analyze if RPO administration can ameliorate pathophysiological changes caused by alteration of thyroid status.</p>
Keywords	Thyroid hormone, Skeletal muscle, Myosine heavy chains isoforms, Red palm oil
Number of pages	80
Number of appendices	0

# OBSAH

ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....	8
TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1. Kosterní svalstvo .....	10
2.1.1. Svalová kontrakce .....	12
2.1.2. Isoformy těžkých řetězců myosinu a typy svalových vláken.....	13
2.1.3. Embryogeneze a diferenciacie svalových vláken.....	14
2.2. Thyreoidální hormony .....	14
2.2.1. Biosyntéza thyreoidálních hormonů .....	15
2.2.2. Regulace sekrece thyreoidálních hormonů .....	17
2.2.3. Metabolismus thyreoidálních hormonů .....	18
2.2.4. Biologické účinky thyreoidálních hormonů.....	19
2.3. Jaderné receptory a genová exprese .....	20
2.3.1. Receptory pro thyreoidální hormony .....	21
2.3.2. Vliv TH na diferenciaci fenotypu svalových vláken.....	23
2.4. Červený palmový olej .....	24
2.4.1. Nutriční význam palmového oleje .....	25
2.4.2. Účinky RPO .....	25
2.5. Mitochondriální glycerolfosfát dehydrogenasa.....	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1. Prostředky k realizaci.....	29
3.1.1. Speciální chemikálie a radiochemikálie.....	29
3.1.2. Přístroje .....	29
3.2. Metody .....	30
3.3. Farmakologické experimenty na potkanech.....	30
3.3.1. Změna thyroideálního stavu.....	30
3.3.2. Experiment RPO 11/3 .....	31
3.3.3. Odběr biologického materiálu.....	31
3.4. Stanovení koncentrace thyreoidálních hormonů v krevním séru .....	31
3.4.1. RIA stanovení koncentrace celkového T <sub>3</sub> a T <sub>4</sub> .....	32
3.4.2. Volné frakce.....	33
3.5. Příprava mitochondriálních frakcí jaterní tkáně.....	34
3.6. Stanovení enzymové aktivity GPDH .....	35
3.7. Stanovení koncentrace celkových proteinů bicinchoninovou metodou.....	36
3.8. Extrakce těžkých řetězců myosinu.....	38
3.9. Elektroforéza těžkých řetězců myosinu .....	39

3.10. Barvení stříbrem.....	41
4. VÝSLEDKY .....	43
4.1. Anatomické parametry .....	43
4.2. Stanovení koncentrace thyreoidálních hormonů v krevním séru.....	50
4.3. Stanovení celkového proteinu bicinchoninovou metodou v mitochondriálních frakcích jater .....	55
4.4. Stanovení specifické enzymové aktivity glycerol-3-fosfát dehydrogenasy.....	56
4.5. Exprese proteinových isoformů MyHC .....	62
4.5.1. Změny obsahu proteinových MyHC isoformů v SOL v závislosti na thyroideálním stavu.....	63
4.5.2. Změny obsahu proteinových isoformů MyHC v EDL v závislosti na thyroideálním stavu.....	64
5. DISKUSE.....	67
6. ZÁVĚR .....	71
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	73
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	79

## ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Thyreoidální hormony (TH), neboli hormony štítné žlázy, jsou jednoduché organické látky odvozené od jodovaných derivátů aminokyseliny L-tyrosinu. Jedním z důležitých cílových orgánů působení thyreoidálních hormonů je kosterní svalstvo. Kosterní svaly savců jsou rozmanité ve své struktuře, funkci i metabolismu. Různorodost je způsobena rozdílným zastoupením jednotlivých isoformů myofibrilárních proteinů v konkrétních svalectech. Expresí fenotypu svalových proteinů je dána kombinací vnitřních (genetických) i vnějších faktorů (typ inervace, mechanické a hormonální faktory). Fenotyp je určen procentuálním zastoupením jednotlivých typů svalových vláken a odpovídá fyziologickým požadavkům na funkci svalu. Změny thyreoidního stavu (tj. změna koncentrace kolujících TH) významně ovlivňují fenotyp svalových proteinů (Soukup and Jirmanová, 2000).

Ve zdravém organismu hrají TH bezpochyby pozitivní roli, ale když jsou ve vysoké koncentraci, nebo naopak jich je nedostatek, mohou tyto změny vést k patofyziologickým stavům organismu, např. až selhání funkce srdce. Poruchy funkce štítné žlázy u člověka přitom postihují zhruba 5-7% populace (Límanová, 2009). Předpokládá se, že podávání preparátů červeného palmového oleje (RPO) by mělo napomáhat k remodelaci a obnovení funkce kosterního i srdečního svalstva (Mitašíková et al., 2008; Bačová et al., 2010; Tribulová et al., 2010).

Cílem předkládané diplomové práce bylo modifikovat metodu pro elektroforetickou separaci isoformů těžkých řetězců myosinu (MyHC) a studovat vliv různých hladin thyreoidálních hormonů na jejich expresi v musculus soleus (SOL, lýtkový) a musculus extensor digitorum longus (EDL, natahovač prstů nohy) u laboratorního potkana. Pro charakterizaci navozených experimentálních stavů byla použita celá řada parametrů, u kterých se předpokládá jejich ovlivnění změnou thyreoidního stavu - změny některých anatomických parametrů, změny koncentrace celkového trijodthyroninu ( $tT_3$ ) a thyroxinu ( $tT_4$ ) a volných frakcí těchto hormonů v krevním séru, a také změny aktivity mitochondriálního flavoprotein dependentního enzymu glycerol-3-fosfát dehydrogenasy (GPDH). Hlavním cílem práce bylo analyzovat, jestli podávání RPO může zlepšit patofyziologické změny způsobené změnou hladiny thyreoidálních hormonů u laboratorních potkanů. Získané výsledky by



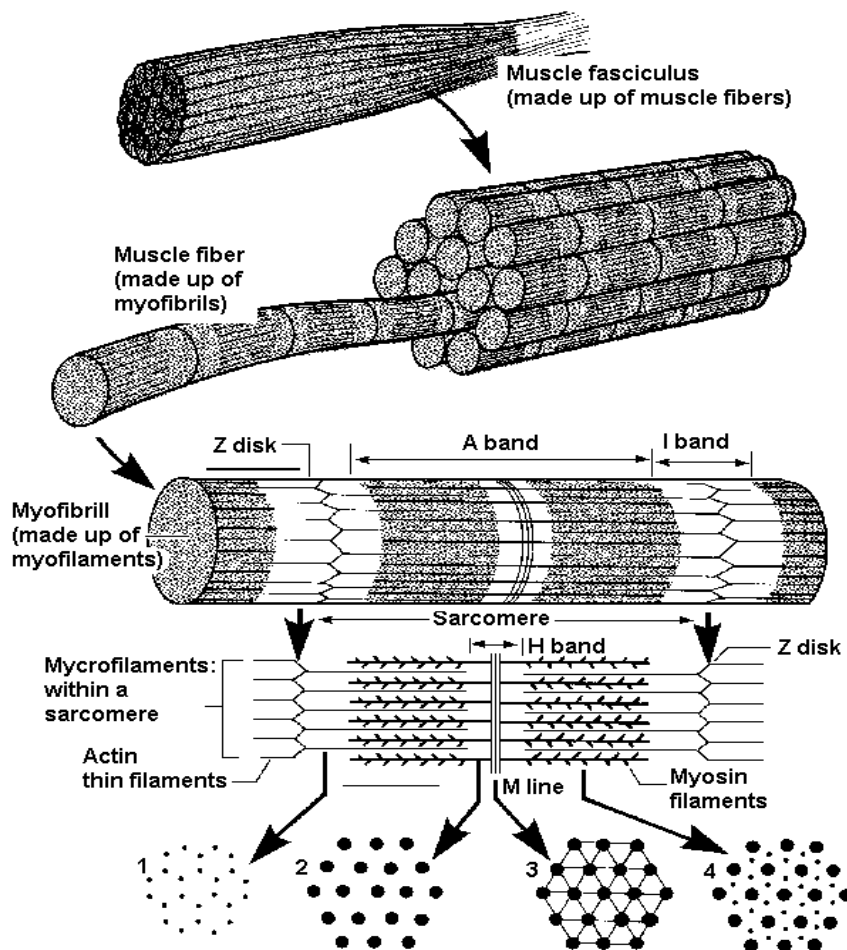
měly prokázat, zda zvolené parametry jsou vhodnými markery thyroidního stavu a jestli podávání RPO může pozitivně zasahovat do těchto změn.

Práce je součástí řešení grantového projektu GAČR reg. č. 304/08/0256 („Regulace svalového fenotypu za normálních, experimentálních a patologických stavů“), které probíhá na Fyziologickém ústavu AV ČR v Praze v letech 2008-2012.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 2.1. Kosterní svalstvo

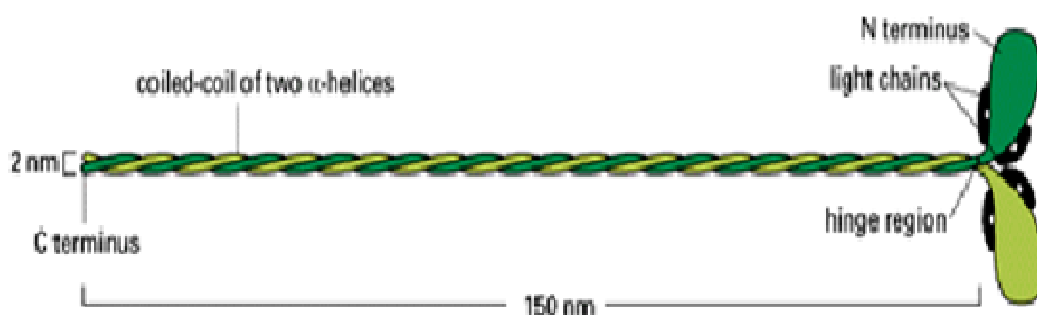
Kosterní svalstvo tvoří 36-40% tělesné hmotnosti a spolu s kostrou tvoří muskuloskeletální systém. Je to kontraktilní tkáň schopná reakce na podráždění. Jednou z jejich unikátních vlastností je vláknitá struktura (Obr. 1). Každý sval je tvořen z velmi dlouhých mnohojaderných svalových vláken, která v průměru měří 10-100  $\mu\text{m}$  a mohou být dlouhá až desítky centimetrů. Svalová vlákna jsou složená z myofibril obklopených sarkoplazmou. Myofibrily měří v průměru 1-2  $\mu\text{m}$  a tvoří je dva typy myofilament – tenká (průměr 7 nm, délka 1  $\mu\text{m}$ ) a tlustá (průměr 10-14 nm, délka 1,6  $\mu\text{m}$ ). Poměr tenkých a tlustých myofilament je 6:1.



Obr. 1: Struktura kosterního svalu.

Základní strukturní a funkční jednotkou svalového vlákna je sarkomera ohraničená na obou koncích Z-disky. Ve struktuře Z-disků jsou kolmo ukotvena hexagonálně uspořádaná tenká filamenta. Tlustá filamenta jsou uspořádána ve středu sarkomery paralelně s tenkými filamenti a osou buňky. Rozdílným uspořádáním myofilament vznikají na myofibrilách temnější anizotropní (A) a světlejší izotropní (I) proužky. A – proužky jsou rozděleny M linií a mají ještě vnitřní tzv. H – zónu, kde se nacházejí pouze tlustá filamenta. I – proužek je úsek od Z linie k začátku tlustých filament a je tvořen pouze tenkými filamenti. A i I proužky jsou uspořádány pravidelně v jedné rovině, svalové vlákno se pak jeví jako příčně prouhované (Kondrádová, 1993).

Tenká (aktinová) filamenta obsahují tři hlavní proteiny: aktin, tropomyosin a troponin. Základem jejich struktury je dvoušroubovice vláknitého F-aktinu, který vzniká polymerací globulárních monomerů G aktinu. Každá molekula G aktinu obsahuje jedno vazebné místo pro myosin. Každé vlákno F aktinu je zřetelně polarizováno. Kolem dvoušroubovice F aktinu se po obou stranách obtáčí tenké vláknité molekuly tropomyosinu. Tropomyosin je tenká molekula dlouhá 40 nm tvořená dvěma polypeptidovými řetězci, které jsou obtočené kolem sebe. Vlákno tropomyosinu nese vazebná místa pro proteinový komplex troponin, který je složen ze tří podjednotek – TnT, TnC, TnI. TnT váže celý komplex k tropomyosinu, TnC má schopnost vázat vápenaté ionty a TnI inhibuje interakci aktinu a myosinu. Poměr aktinu, tropomyosinu a troponinu v tenkých filamentech je 7:1:1.



**Obr 2.** *Struktura molekuly myosinu II.*

Tlustá myofilamenta kosterního svalu jsou tvořena molekulami myosinu II (Obr. 2). Myosin II je velký protein složený ze dvou identických těžkých řetězců (každý 200 kDa) a dvou párů lehkých řetězců (každý 20 kDa). Všechny těžké řetězce obsahují

globulární hlavu a dlouhé vzájemně se obtáčející polypeptidové řetězce. Globulární část myosinu obsahuje vazebné místo pro ATP, vykazuje ATPasovou aktivitu a má schopnost vázat aktin. V oblasti spojení globulární hlavy a dlouhých polypeptidových řetězců, tzv. „krčku“, je navázán jeden regulační a jeden esenciální lehký řetězec (Trojan, 2003).

### **2.1.1. Svalová kontrakce**

Myosin je prototyp tzv. molekulárního motorového proteinu, který je schopný konvertovat chemickou energii ve formě ATP na mechanickou energii vedoucí k pohybu. Typickým příkladem tohoto pohybu je svalová kontrakce. Při svalové kontrakci dochází k zasouvání tenkých myofilament mezi tlustá myofilamenta, přičemž nedochází k jejich zkracování. Základním krokem svalové kontrakce je interakce mezi aktinem a myosinem. Při nedostatečném množství vápenatých iontů v okolí myofilament jsou vazebná místa pro globulární část myosinových molekul na aktinových molekulách blokována troponin-tropomyosinovým komplexem. Po navázání vápenatých iontů na TnC podjednotku troponinu dojde k jeho konformační změně a zasunutí molekuly tropomyosinu hlouběji mezi molekuly F aktinu. Na globulárních podjednotkách G aktinu se odkryjí vazebná místa pro myosin a umožní se jeho interakce s aktinem. Globulární část myosinové molekuly je aktivována navázáním molekuly ATP a spojí se s G aktinem. Energie vzniklá rozštěpením ATP umožní ohnutí tyčinkové části molekuly myosinu a dislokaci jeho globulární části. Spolu s myosinem se posune i aktinové vlákno, které je stále pevně navázáno na globulární část molekuly myosinu. Po navázání nové molekuly ATP dojde k uvolnění vazby mezi aktinem a myosinem. Zasouvání aktinových myofilament mezi tlustá myofilamenta trvá, dokud nejsou odstraněny vápenaté ionty. Opakování stovek cyklů vznikání a zanikání vazby mezi aktinem a myosinem tvoří jednu svalovou kontrakci.

Svalová kontrakce je řízená eferentními motorickými neurony. Interakcí mezi terminálními úseky axonu eferentních motorických neuronů a vlákny příčně pruhované svalové tkáně vznikají kosterní myoneurální synapse – motorické ploténky. Základní motorická jednotka je tvořena eferentním neuronem, jeho axonem a všemi svalovými vlákny, které inervuje. Mohutnost kontrakce je dána počtem motorických jednotek, které v určitém svalu byly do kontrakce zapojeny. Zatímco jemnost pohybu svalu závisí na velikosti motorické jednotky.

### 2.1.2. Isoformy těžkých řetězců myosinu a typy svalových vláken

Protože kosterní svalstvo je extrémně heterogenní tkáň, složená z různého množství pomalých a rychlých svalových vláken a jejich podtypů, neexistují u živočichů navzájem úplně identické svaly. Velké množství typů a vysoce organizované uspořádání svalových vláken přispívá k strukturní, funkční a metabolické rozmanitosti kosterního svalstva (Pette and Staron, 1990). Heterogenita individuálních svalových vláken je kromě jiného dána rozdílným zastoupením isoform těžkých a lehkých řetězců myosinu. Nejpoužívanějším markerem pro rozdělení typů svalových vláken je obsah jednotlivých isoform těžkých řetězců myosinu (MyHC). Myosin existuje v mnoha tkáňově specifických isoformách, které jsou kódovány určitými skupinami genů. Nejznámější skupinou genů je vysoce konzervovaná rodina genů kódující MyHC isoformy (Leinwand et al., 1983). V kosterním svalstvu dospělých savců byly popsány čtyři MyHC isoformy, které jsou označovány 1, 2a, 2x/d, 2b. Podle jejich obsahu byly definovány 4 základní typy svalových vláken: jedno pomalé vlákno - typ 1 a tři rychlá vlákna, 2A, 2X/D a 2B uvedená v pořadí od nejpomalejšího k nejrychlejšímu podle hlavních MyHC isoform (Schiaffino and Reggiani, 1994). Pořadí čtyř hlavních MyHC isoform od nejpomalejší je následující: 1-2a-2d/x-2b. Syntéza každé isoformy je kódovaná vlastním genem.

Svalová vlákna můžeme podle složení rozdělit na čistá a hybridní. Zatímco čistá obsahují pouze jednu MyHC isoformu, hybridní svalová vlákna jsou charakteristická zastoupením dvěma a více MyHC isoform. Hybridní vlákna se rozdělují do podskupin podle převládající MyHC isoformy (Pette and Staron, 1990). Nejznámější jsou vlákna označovaná jako 1C a 2C složená z obou isoform 1 a 2a v různém poměru. Kosterní svaly tvoří směs čistých a hybridních svalových vláken. Ve vyvíjejících se a regenerujících se svalových vláknech jsou exprimovány embryonální a neonatální MyHC isoformy. Existují ještě další čtyři MyHC isoformy, které se vyskytují jen u některých druhů ve vysoce specializovaných svalech (např. extraokulární nebo žvýkácí svaly). Jsou to pomalá tonická, extraokulární, superrychlá a  $\alpha$ -srdeční MyHC isoformy (Soukup and Jirmanová, 2000).

Velmi tenká a bohatě kapilarizovaná pomalá vlákna obsahují MyHC typu 1. Využívají pomalý oxidační metabolismus, pomalu se unavují a jsou vhodnější pro stavbu svalů zajišťujících spíše statické, polohové funkce a pomalý pohyb. Pro výzkum se jako pomalý sval využívá musculus soleus (SOL, lýtkový).

Rychlé MyHC isoformy 2a, 2x/d a 2b jsou zastoupeny v rychle kontrahujících svalových vláknech, které využívají rychlý oxidační metabolismus. Jsou určené pro rychlé volní pohyby a jsou rychle unavitelné. Pro výzkum rychlých svalů se využívá musculus extensor digitorum longus (EDL, natahovač prstů nohy).

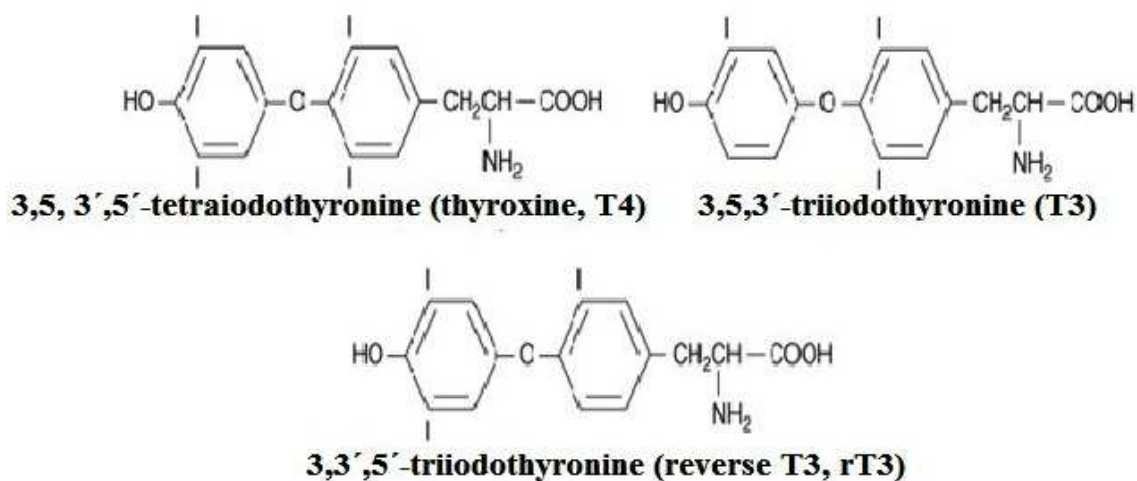
### **2.1.3. Embryogeneze a diferenciaci svalových vláken**

Při tvorbě kosterních svalů dochází k fúzi mnohojaderných myoblastů za vzniku myotubů, které jsou následně inervovány a dozrávají do diferenciovaných svalových vláken. Již v časném fetálním období se v myotubách diferencují myofibrily a koncem 3. měsíce i příčné žíhání. I v dospělosti přetrvává malá část myoblastů jako satelitové buňky, které mají vlastnosti kmenových buněk a uplatňují se při regeneraci svalových vláken.

Diferenciaci svalových vláken vyžaduje aktivaci exprese určitých genů, které indukují syntézu specifických typů svalových proteinů. Expresi fenotypu svalových proteinů je závislá na vnitřních vlivech (geneticky určený vývoj myoblastů) a vnějších vlivech jako jsou nervové, hormonální a mechanické faktory, včetně svalové aktivity. Fenotyp je určen procentuálním zastoupením jednotlivých typů svalových vláken. Bylo zjištěno, že fenotyp svalových proteinů je významně ovlivňován změnou koncentrace thyreoidálních hormonů (Soukup and Jirmanová, 2000).

## **2.2. Thyreoidální hormony**

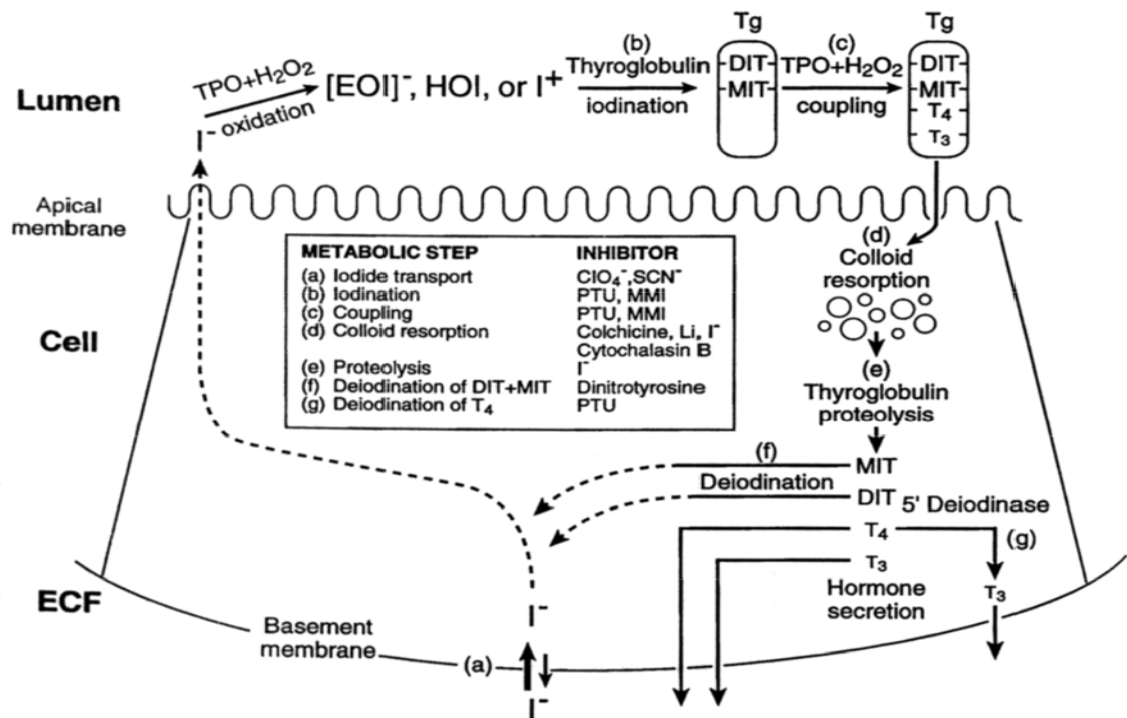
Thyreoidální hormony (TH) jsou jednoduché organické látky syntetizované štítnou žlázou. Z chemického hlediska jsou to jodované deriváty aminokyseliny L-tyrosinu (Obr. 3). Štítná žláza produkuje hlavně prohormon thyroxin, 3,3',5,5'-tetrajodthyronin (T<sub>4</sub>), který je prekursorem biologicky mnohem aktivnějšího 3,3',5-trijodthyroninu (T<sub>3</sub>). Většina, minimálně 80% procent cirkulujícího T<sub>3</sub>, však vzniká dejodací thyroxinu v periferních tkáních, zejména v játrech a ledvinách (Braverman and Utiger, 2005). Dejodací thyroxinu v periferních tkáních vzniká také přibližně ekvimolární množství biologicky neaktivního 3,3',5'-trijodthyroninu, označovaného jako reverzní trijodthyronin (rT<sub>3</sub>).



**Obr 3.:** *Struktura hormonů štítné žlázy.*

### 2.2.1. Biosyntéza thyreoidálních hormonů

K biosyntéze thyreoidálních hormonů (Obr. 4) dochází na povrchu buněčné membrány folikulárních buněk štítné žlázy. Pro syntézu TH je esenciálním prvkem jod. Různé formy jodu přijímaného v potravě jsou přeměňovány na jodid. Ten je aktivně transportován jodidovou pumpou proti elektrochemickému gradientu a akumulován v koloidu folikulů tvořených thyreocyty. Jodidová pumpa je Na<sup>+</sup>-I<sup>-</sup> kotransportní systém využívající iontové kanály tvořené integrálními membránovými proteiny. Zatímco dva sodíkové kationty putují z extracelulárního prostoru do thyreocytu po směru potenciálového gradientu, jeden jodidový anion je transportován proti jodidovému gradientu. Aktivní transport jodidu probíhá za spotřeby energie, kterou poskytuje Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. Některé anionty jako thiokyanát (SCN<sup>-</sup>) nebo perchlorát (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) inhibují jodidový transport. Jodid je v thyreocytech nejprve oxidován enzymem thyreoidální peroxidasou (TPO), přičemž akceptorem elektronů je peroxid vodíku. Vznikající jod se následně váže do polohy 3 tyrosylových zbytků vázaných v thyreoglobulinu.



**Obr. 4:** Schéma hlavních kroků při biosyntéze thyreoidálních hormonů (Braverman and Utiger, 2005).

Thyreoglobulin je protein složený ze dvou podjednotek. Jeho molekulová hmotnost je 660 kDa. Vzniká jako monomer v drsném endoplasmatickém retikulu thyreocytů. Spojením dvou podjednotek vzniká dimer, který je vylučován exocytosou do koloidu folikulů. V jedné molekule thyreoglobulinu je vázáno 123 tyrosylových zbytků, z nichž však pouze 6-8 je následně zabudováno do thyreoidálních hormonů. Navázáním jodu do polohy 3 tyrosylového zbytku vzniká monoiodotyrosin (MIT), který je dále jodován v poloze 5 za vzniku diiodotyrosinu (DIT). Kondenzací dvou molekul DIT vzniká  $\text{T}_4$  a odštěpuje se dehydroalaninový zbytek. Stejně jako oxidace jodidu a jodace tyrosinových zbytků, i tyto kondenzační reakce jsou katalyzovány TPO.  $\text{T}_3$  vzniká spojením jedné molekuly MIT a DIT, při opačném pořadí kondenzace se tvoří  $r\text{T}_3$ . Štítná žláza produkuje tedy 3 jodothyroniny přibližně v následujícím množství: thyroxin 90  $\mu\text{g}$  denně, trijodthyronin 5-8  $\mu\text{g}$  a reverzní trijodthyronin 1-2  $\mu\text{g}$ . Koloid s thyreoglobulinem a navázanými jodothyroniny je endocytosou vstřebáván do buněk, kde je rozrušen na kapénky, které následně splývají s lysosomy. Pro uvolnění  $\text{T}_3$  a  $\text{T}_4$  je nezbytné rozštěpení vazeb mezi thyreoglobulinem a jodothyroniny. Tyto vazby štěpí proteasy přítomné v lysosomech. Volné  $\text{T}_3$  a  $\text{T}_4$  jsou sekretovány do cytoplasmy a následně do krevního oběhu. Molekuly MIT a DIT, které nebyly zabudovány do TH,



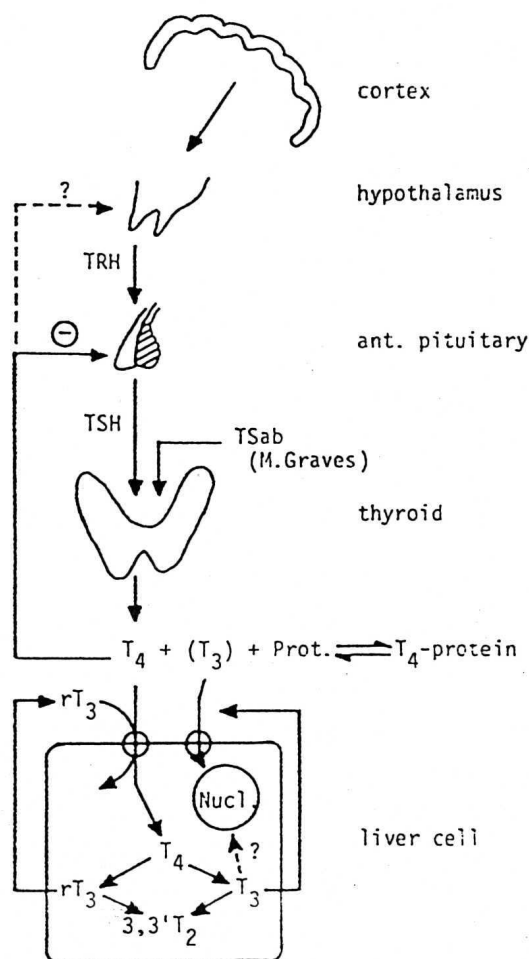
jsou enzymaticky dejodovány specifickou dejodasou a takto získaný jodid je znovu využit k syntéze TH.

Hypothyreosa (hypothyroidismus) je stav organismu, kdy dochází ke snížení produkce TH. Tento stav může vzniknout při nedostatečném přísunu jodu v potravě, při poruchách regulace biosyntézy TH a také při některých poruchách funkce štítné žlázy (např. z důvodu nedokonalého vyvinutí, ozáření nebo autoimunitního onemocnění). Hypothyroidismus se projevuje snižováním úrovně bazálního metabolismu a s tím spojenou sníženou produkcí tepla, zpomalením kostního růstu, přibíráním na váze, utlumením nervové činnosti a někdy i depresemi. Těžší formou hypothyreosy je myxedém, kdy se příznaky projevují ve zvýšené míře.

Naopak při nadbytku TH vzniká hyperthyreosa (hyperthyroidismus) projevující se zrychlením bazálního metabolismu, nadměrnou produkcí tepla, úbytkem tělesné hmotnosti, celkovou podrážděností a v některých případech vznikem strumy, např. Graves-Baseowova choroba (Braverman and Utiger, 2005).

### **2.2.2. Regulace sekrece thyreoidálních hormonů**

Stejně jako u většiny jiných endokrinních žláz je činnost štítné žlázy regulována vícestupňově, negativním zpětnovazebným mechanismem (Obr. 5). Hlavním regulátorem funkce štítné žlázy je hormon thyreotropin (TSH), který je tvořen v adenohipofýze. TSH je složený ze dvou podjednotek a váže se na specifické receptory na povrchu thyreocytů. Působením TSH se zvyšuje prokrvení štítné žlázy a syntéza  $T_3$  a  $T_4$ . TSH stimuluje také biosyntézu thyreoglobulinu, vychytávání a oxidaci jodidu a inkorporaci jodu do tyrosylových zbytků, kondenzaci jodotyrosinů a endocytosu koloidu. Nedostatek TH vede zpětnou vazbou ke zvýšení sekrece TSH a naopak. Sekrece TSH je dále stimulována thyreoliberinem (TRH) syntetizovaným tzv. TRH neurony, které se nacházejí v hypotalamu. Inhibitory sekrece TSH jsou somatostatin, dopamin nebo glukokortikoidy. Udržování thyreoidální sekrece závisí tedy na zpětnovazebných vztazích mezi TRH, TSH a thyreoidálními hormony.

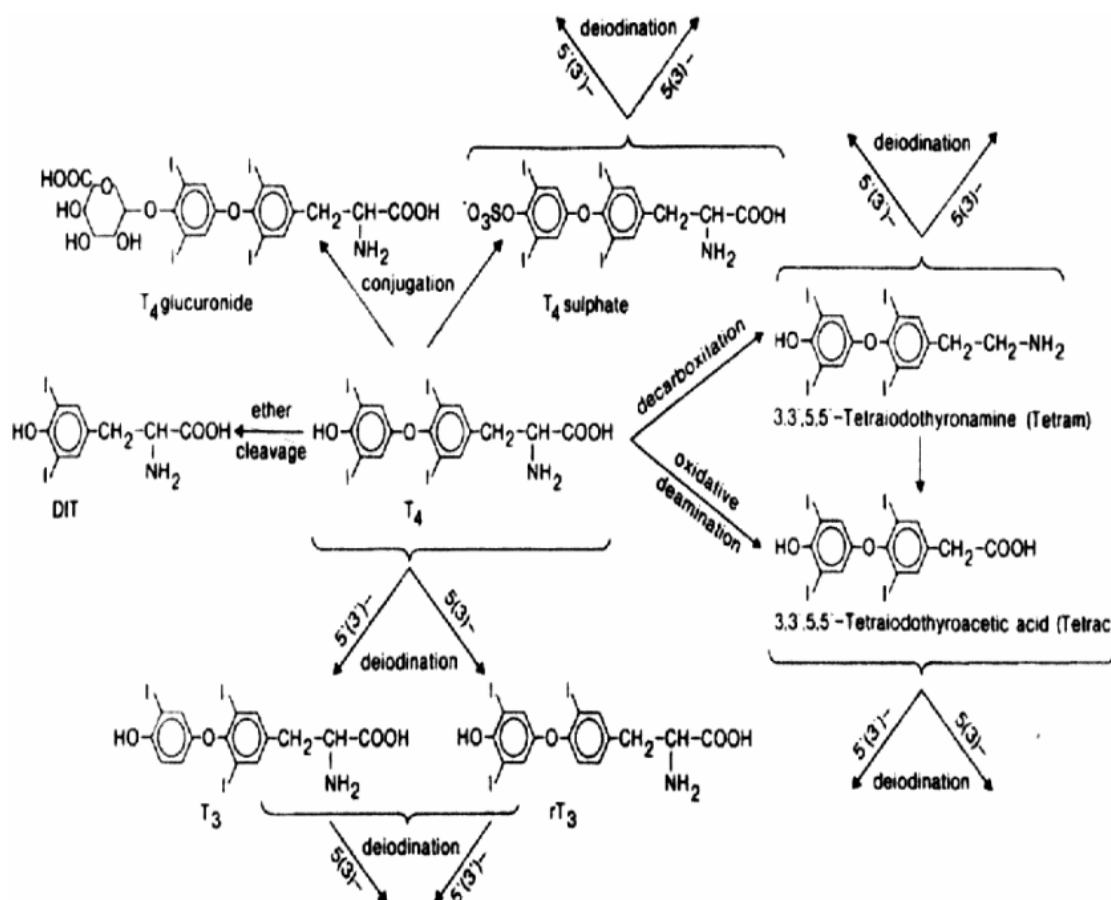


**Obr 5.:** Mechanismus zpětnovazebné regulace biosyntézy a působení TH.

### 2.2.3. Metabolismus thyreoidálních hormonů

V periferních tkáních podléhají TH celé řadě metabolických přeměn (Obr. 6). Nejdůležitější z nich jsou postupné dejodace katalyzované specifickou skupinou selenoproteinů - jodothyronin dejodasami. Dosud jsou známy tři isoenzymy dejodas, jodothyronin-5'-dejodasy typu 1 a 2 (D1 a D2, respektive) a jodothyronin-5-dejodasa typu 3 (D3). K dejodacím TH dochází v játrech, ledvinách, mozku, tukové tkáni a také v řadě dalších tkání, včetně hypofýzy a štítné žlázy. Monodejodací T<sub>4</sub> na vnějším fenolickém kruhu (outer ring deiodination = ORD) vzniká 80-85% biologicky aktivního T<sub>3</sub>. ORD probíhá za katalýzy D1 a D2. T<sub>4</sub> může být také dejodován na vnitřním tyrosylovém kruhu (inner ring deiodination = IRD) za katalýzy D3. Produktem této reakce je rT<sub>3</sub>. D3 také katalyzuje konverzi T<sub>3</sub> na 3,3'-dijodthyronin (3,3'-T<sub>2</sub>). Vzhledem k tomu, že rT<sub>3</sub> i 3,3'-T<sub>2</sub> jsou biologicky neaktivní, zastává enzym D3 v organismu

ochrannou funkci a chrání tkáň před škodlivými účinky nadbytku TH (Stárka, 1999).  $T_3$  a  $rT_3$  jsou dále konvertovány přes diiodthyroniny ( $T_2$ ) až na thyronin ( $T_0$ ).



**Obr. 6:** Metabolické přeměny thyreoidálních hormonů (Braverman and Utiger, 2005).

V játrech podléhají TH dalším metabolickým přeměnám, zejména konjugačním reakcím fenolového hydroxyly za vzniku příslušných sulfátů a glukuronidů. Glukuronidy vznikají reakcí jodothyroninů s kyselinou glukuronovou za katalýzy UDP-glukuronyltransferasou. Tato modifikace tyrosylového kruhu zvyšuje hydrofilitu TH a usnadňuje jejich vyloučení žlučí. K sulfataci TH dochází přenosem sulfátové skupiny z univerzálního donoru PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu) na fenolický hydroxyl za katalýzy jodothyronin sulfottransferasami. Sulfottransferasy jsou obsažené v cytoplasmatické frakci jater, ledvin, mozku a střeva. Sulfokonjugace zvyšuje hydrofilitu TH a napomáhá jejich ireverzibilní degradaci. Stejně jako všechny ostatní aminokyseliny podléhají TH také dekarboxylaci a oxidativní deaminaci.

#### 2.2.4. Biologické účinky thyreoidálních hormonů

Thyreoidální hormony hrají důležitou roli ve vývoji mnoha tkání a v regulaci celé řady fyziologických procesů. Účinky TH na buněčné úrovni lze rozdělit na krátkodobé a

dlouhodobé. Krátkodobé účinky trvají řádově jen minuty. Dochází při nich k přímé interakci TH se specifickými proteiny zejména v mitochondriích, ale také v cytoskeletu, plasmatické membráně nebo cytoplasmě. Dlouhodobé účinky se projevují řádově hodiny až dny. TH tvoří komplexy se specifickými jadernými receptory, které jsou schopné se vázat na DNA a ovlivňovat tak expresi genů a následně proteosyntézu.

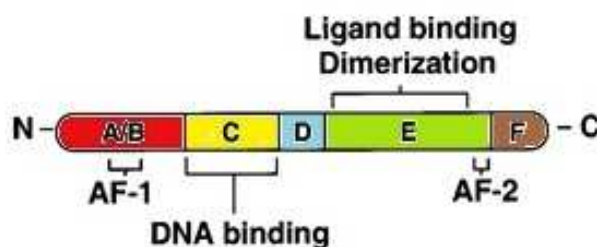
Hlavním účinkem TH na úrovni tkání a celého organismu je stimulace spotřeby kyslíku v metabolicky aktivních tkáních - tzv. kalorigenní účinek, spojený se zvýšenou produkcí tepla. Kalorigenní účinek TH je způsoben z části zvýšeným metabolismem mastných kyselin a vzrůstem aktivity membránové  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy. Tímto způsobem TH účinkují téměř ve všech metabolicky aktivních tkáních kromě mozku, pohlavních žláz, lymfatických uzlin, adenohipofýzy a sleziny.  $\text{T}_3$  i  $\text{T}_4$  jsou nezbytné pro správný průběh proteosyntézy, proto ovlivňují růst a vývoj. Účastní se také regulace metabolismu lipidů a zvyšují resorpci sacharidů ze střeva (Ganong, 2005). Celá řada biologických účinků TH je závislá především na koncentraci  $\text{T}_3$  v intracelulárním prostoru. TH významně ovlivňují vývoj mozku a jejich nedostatek v ranných stádiích ontogeneze vede k nevratným mentálním změnám až ke vzniku kretenismu. Ve většině těchto případů se jedná o hypothyreosu vzniklou nedostatečným příjmem jodu v potravě. Na centrální nervovou soustavu mají vliv TH i v dospělosti. Nadbytek TH zkracuje reakční dobu reflexů, nedostatek TH způsobuje motorickou rigiditu.

TH mají také nezastupitelnou roli při diferenciaci, růstu i novotvorbě kostí. Ve svalové tkáni TH působí na sodno-draselnou i kalciovou pumpu a také na rychlost svalové kontrakce. Ovlivňují také expresi genů pro MyHC v kosterním i srdečním svalu.

### **2.3. Jaderné receptory a genová exprese**

Účinky thyreoidálních hormonů jsou zprostředkovány vazbou na jejich receptory, které patří do rodiny jaderných hormonálních receptorů. Unikátní vlastností jaderných receptorů, oproti jiným třídám receptorů, je jejich schopnost se po navázání ligandu přímo vázat na DNA a regulovat expresi cílového genu. Nukleární receptory tedy fungují jako ligandem indukované transkripční faktory. Navázání ligandu na receptor způsobí jeho konformační změnu a aktivaci receptoru. Jaderné receptory mají zcela odlišnou strukturu než receptory membránové. Receptorové proteiny jsou složeny z několika domén, které vykonávají samostatně specifické funkce. Typický jaderný

receptor (Obr. 7) se skládá z velmi variabilní N-terminální oblasti (A/B), konzervované oblasti C s DNA-vazebnou doménou (DBD), spojovací oblasti D a konzervované E oblasti obsahující ligand-vázající doménu (LBD). Některé jaderné receptory obsahují také C-terminální oblast (F) se zatím neznámou funkcí. Součástí jaderných receptorů jsou rovněž oblasti zodpovědné za aktivaci transkripce. Jednou z nich je AF-1 doména, která je nezávislá na ligandu a nachází se v oblasti A/B. Druhou transkripčně aktivní doménou je AF-2, její lokalizace je v C-terminální oblasti ligand-vázající domény. Na rozdíl od AF-1, AF-2 striktně vyžaduje pro svou transkripční aktivitu vazbu ligandu na receptor a je nezbytná pro navázání koaktivátorů. C a E jsou nezbytné pro tvorbu dimerů (Aranda and Pascal, 2001).



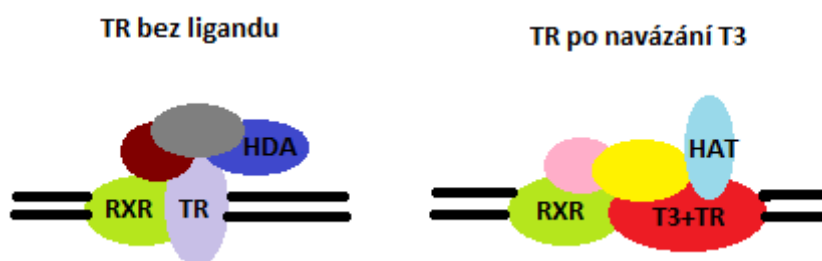
**Obr. 7:** *Struktura jaderného receptoru.*

### 2.3.1. Receptory pro thyreoidální hormony

Jaderné receptory byly rozděleny do 6 podskupin. Receptory pro thyreoidální hormony (TR), spolu s receptory pro kyselinu retinovou (RAR) a vitamin D (VDR), patří do první skupiny (Aranda and Pascal, 2001). U lidí jsou TR kódovány dvěma geny, THRA a THRB, lokalizovanými na chromosomu 17, respektive 3. Gen THRA kóduje tři proteinové isoformy TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 a TR $\alpha$ 3, které se liší svým karboxylovým koncem v důsledku alternativního sestříhu jejich mRNA (Lu and Cheng, 2010). TR $\alpha$ 1 váže T<sub>3</sub> a reguluje tak expresi cílového genu. T<sub>3</sub> však není schopen vytlačit represor z vazby na TR $\alpha$ 2 a TR $\alpha$ 3, exprese genu neproběhne a tím jsou potlačeny jeho účinky (Izumo and Mahdavi, 1988). THRB kóduje dvě proteinové isoformy, TR $\beta$ 1 a TR $\beta$ 2, lišící se N-terminálním koncem. Exprese těchto proteinových isoform se liší v odlišných tkáních a v průběhu ontogenetického vývoje, což přispívá ke komplexitě v regulaci biologických účinků thyreoidálních hormonů. TR $\alpha$ 1 je hojně exprimován v kosterním svalstvu, srdci a hnědé tukové tkáni, zatímco TR $\alpha$ 2 v mozku. Exprese TR $\beta$ 1 je nejvyšší v játrech, ledvinách a mozku. Nejvyšší výskyt TR $\beta$ 2 je v adenohipofýze a hypotalamu (Lu and Cheng, 2010).

Stejně jako ostatní jaderné receptory TR obsahují ligand-vázací doménu lokalizovanou na C-konci peptidu a DNA-vazebnou doménu umístěnou v centrální části receptoru. DNA-vazebná doména je nejvíce konzervovaná doména a umožňuje receptoru rozpoznat specifickou cílovou sekvenci na DNA. V případě TR tvoří strukturu DNA-vazebné domény dvě uspořádání, označované jako zinkové prsty. Dvě sady čtyř cysteinových zbytků tetrahedricky obklopují vždy jeden zinečnatý iont. Právě cysteinové zbytky jsou zodpovědné za vysokou afinitu domény k DNA. Jádro DBD je tvořeno dvěma  $\alpha$ -helixy. Jeden je rozpoznávací a váže se do velkého žlábků DNA. Druhý je orientován kolmo k prvnímu a spojuje jejich C-terminální konce. Je tedy zodpovědný za dimerizaci (Aranda and Pascal, 2001). Pomocí zinkových prstů se TR specificky váže na specifickou regulační sekvenci na DNA, tzv. thyroid hormone response element (TRE) a regulují tak transkripci cílového genu. S TRE interagují TR jako monomery, homodimery nebo heterodimery. TR tvoří heterodimery s více jadernými receptory, nejčastěji však s retinoidními receptory (RXR) (Lu and Cheng, 2010). V tomto případě RXR receptor neváže kyselinu 9-cis retinovou, ale výrazně zvyšuje vazbu TR na DNA (Ganong, 2005).

Aktivita TR je závislá na vazbě thyreoidálního hormonu. Bez navázání TH je na TR navázán korepresor a tím je snížena efektivita transkripce. Vazba hormonu na TR způsobí jeho konformační změnu a disociaci korepresoru. Poté se navážou na cílový promotor koaktivátorové komplexy, dojde k rozvolnění chromatinu a zvýšení transkripční aktivity (Obr. 8). Thyreoidální hormony tedy regulují transkripci tím, že přepínají receptor ze stavu transkripčního represoru do stavu transkripčního aktivátoru (Chin and Yen, 1997).  $T_3$  má mnohem větší afinitu k TR než  $T_4$ . Proto působí rychleji a je přibližně 5 krát účinnější. Reverzní  $T_3$  se na TR váže s ca. 1000 krát nižší afinitou než  $T_3$  a je tedy biologicky neaktivní.



**Obr. 8 :** Thyreoidální receptor v inaktivní formě a po navázání ligandu- $T_3$ .

### 2.3.2. Vliv TH na diferenciaci fenotypu svalových vláken

Je již dávno známé, že příčně pruhované svalstvo je privilegovanou cílovou tkání pro thyreoidální hormony (D'Albis and Butler-Brown, 1993). Účinky TH na diferenciaci fenotypu svalových vláken jsou zprostředkovány modulací exprese genů pro MyHC isoformy. Všeobecně se předpokládá, že exprese MyHC genů je primárně kontrolována na transkripční úrovni. Regulace exprese rodiny MyHC genů je vysoce komplexní. Stejně MyHC geny mohou být TH ovlivňovány v různých svalech odlišně. Důsledkem toho je např. různý obsah proteinových MyHC isoformem ve vyvíjejících se a v dospělých kosterních svalech (Fitzsimons et al., 1990).

Perinatální vývoj u savců je spojen se změnami koncentrace thyreoidálních hormonů v krevní plasmě. U embryí a novorozených potkanů je koncentrace  $T_3$  sotva detekovatelná. Během několika dní vzrůstá a koncem druhého týdne po narození dosahuje vrcholu. Následně koncentrace  $T_3$  mírně klesá, až se ustálí na konstantní hodnotě jako u dospělého potkana. Uvedené schéma změn koncentrace  $T_3$  bylo pozorováno u všech studovaných savců. Během vývoje dochází zároveň s růstem koncentrace  $T_3$  k postupnému potlačování exprese zárodečné a novorozenecké isoformy myosinu a k aktivaci exprese rychlé isoformy, běžné u dospělých jedinců (Bandman, 1985). U hyperthyroidních zvířat došlo k přechodu na expresi rychlé isoformy rychleji oproti zvířatům v hypothyroidním stavu (Butler-Browne et al., 1984). Na zvýšenou hladinu endogenních TH nebo experimentální navození hypo- nebo hyperthyroidního stavu během ontogenetického vývoje odpovídají všechny svaly určitého zvířete. Ne všechny svaly však reagují na změnu koncentrace TH stejně. Různé kosterní svaly totiž obsahují různé množství receptorů pro thyreoidální hormony a proto vykazují odlišnou citlivost k TH (d'Albis et al., 1990).

Thyreoidální hormony ovlivňují také expresi genů pro MyHC a zastoupení jednotlivých isoformem v kosterním svalstvu dospělých savců. Obecně platí, že hypothyroidní stav zvyšuje expresi pomalé MyHC isoformy 1 u kosterního i srdečního svalu a snižuje expresi genů rychlých MyHC isoformem MyHC 2a, 2x/d a 2b. Hyperthyroidní stav navozuje opačné změny (Caiozzo et al., 1992). Bylo také zjištěno, že pomalé svaly, jako je musculus soleus, reagují mnohem citlivěji na změny thyreoidního stavu než svaly rychlé (Fitzsimons et al., 1990).

## 2.4. Červený palmový olej

Červený palmový olej (red palm oil, RPO) vzniká extrakcí z oleje pocházejícího z mesokarpu plodu tropické rostliny *Elaeis guineensis* (palma olejná). Díky nově vyvinutým technologiím je během rafinace oleje zachováno více stopových prvků, vitaminů a karotenoidů. Právě vysoká koncentrace karotenoidů způsobuje charakteristické červené zbarvení RPO (Bester et al., 2010). Palmový olej obsahuje shodné množství nasycených (SFA) a nenasycených mastných kyselin. Z celkového množství SFA (51%) je nejhojněji zastoupena kyselina palmitová (44%), zbylých 7% tvoří kyselina myristová a stearová. Vysoký podíl kyseliny palmitové odlišuje palmový olej od všech ostatních olejů (Edem, 2002). Mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) jsou zastoupeny z 39%, z toho nejhojněji kyselina olejová. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) tvoří 10% všech mastných kyselin v palmovém oleji a hlavním zástupcem je kyselina linolová. RPO má podobné složení mastných kyselin jako palmový olej, s 51% SFA, 38% MUFA a 11% PUFA. Hlavními aktivními složkami RPO jsou PUFA z řady n-3 (číslovka označuje pořadí první dvojné vazby) – kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina dokosaheptaenová (DHA), které jsou pro lidský organismus esenciální. Klinické studie prokázaly, že podávání n-3 PUFA snižuje výskyt kardiovaskulárních onemocnění, mají protektivní účinky proti srdečním arytmiím a snižují krevní tlak. Antiaritmické protektivní účinky byly prokázány také na zvířecích modelech (Tribulová et al., 2010; Mitašíková et al., 2008; Bačová et al., 2011). Kromě mastných kyselin je v RPO obsaženo velké množství stopových prvků. Hojně jsou zastoupeny také karotenoidy, hlavně  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten, v menším množství jsou přítomné  $\gamma$ -karoten, lykopen a xantofyly. RPO je unikátní pro vysoký obsah vitamínu E (560-1000 ppm), z toho tokoferoly představují 18-22%, zatímco tokotrienoly 78-82%. To činí z RPO olej s nejvyšším obsahem tokotrienolů ze všech rostlinných olejů (Bester et al., 2010). Nejhojněji zastoupeným tokotrienolem v RPO je  $\gamma$ -tokotrienol, který je účinným antioxidantem. RPO obsahuje také skvalen, fytosterol a koenzym Q10. Shodné zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin, přítomnost značného množství  $\beta$ -karotenu (provitaminu A) a vitamínu E společně s minimálním obsahem linolové (2-11%) a linolenové (0,1-0,2%) kyseliny činí z červeného palmového oleje oxidativně nejstabilnější dietní olej na světě (Edem, 2002).

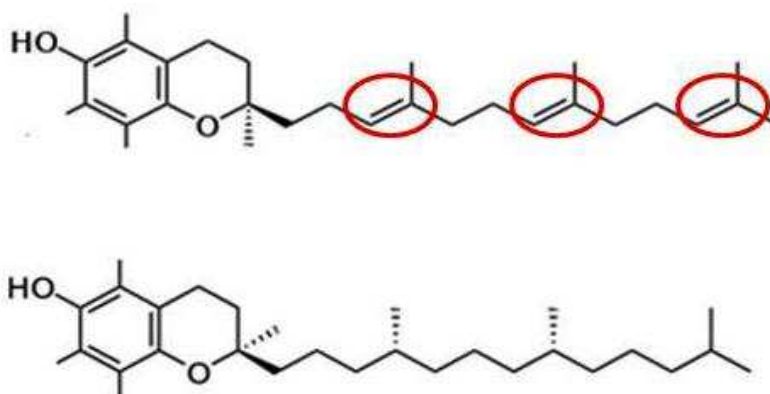


### 2.4.1. Nutriční význam palmového oleje

90% produkce palmového oleje je po celém světě využíváno pro potravinářské účely. Červený palmový olej je nejbohatším zdrojem karotenoidů v potravě. Karotenoidy společně s vitamínem E a kyselinou askorbovou jsou členy biologického systému antioxidantů. Konvertují vysoce reaktivní radikály a volné peroxidové radikály na méně aktivní látky a tím brání buňky před oxidativním poškozením. Kromě poskytnutí vysoké energie je RPO také přírodním zdrojem  $\beta$ -karotenu, který může být konvertován na vitamin A. RPO je tedy účinný v prevenci komplikací způsobených nedostatkem vitamínu A, který je nutný pro tvorbu zrakového pigmentu rhodopsinu, pro správný vývoj a růst a je důležitý také při syntéze sexuálních steroidních hormonů. Rovněž je nezbytný pro vývoj a diferenciaci buněčného epitelu, regulaci buněčného dělení a zlepšení imunitní odpovědi (Edem, 2002).

### 2.4.2. Účinky RPO

Zdraví prospěšné účinky červeného palmového oleje jsou spojené hlavně s vysokým obsahem vitamínu E. Vitamin E je souhrné pojmenování pro skupinu přírodních látek, mezi něž patří čtyři isoformy ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) tokoferolu a čtyři isoformy tokotrienolu. Studie zabývající se účinky vitamínu E na zdraví prokázaly významnější roli tokotrienolů v porovnání s tokoferoly. Na rozdíl od tokoferolů mají tokotrienoly ve své struktuře isoprenoidní farnesylový řetězec s třemi dvojnými vazbami (Obr. 9). Díky tomu mohou snadněji procházet do buněk a plnit metabolické funkce mnohem efektivněji než tokoferoly.



**Obr. 9:** *Struktura tokoferolu (dole) a tokotrienolu. Červenými kroužky jsou vyznačeny tři dvojně vazby ve struktuře tokotrienolů. Díky nim mají tokotrienoly výraznější fyziologický účinek oproti tokoferolům.*

Nejvýznamnější prospěšné účinky tokotrienolů na zdraví se týkají jejich vlivu na imunitní odpověď, rakovinu a reprodukci. Mají také kardioprotektivní účinky a snižují tak riziko vzniku některých kardiovaskulárních onemocnění. Nedávné studie ukázaly, že tyto protektivní účinky jsou spojené se schopností tokotrienolů stabilizovat proteasomy, které mohou být poškozené při ischemických chorobách srdečních (Das et al., 2008). Tokotrienoly jsou také přírodní antioxidanty, šestkrát účinnější než tokoferoly (Bester et al., 2010). Mají schopnost eliminovat volné radikály a chránit tak buněčné membrány před lipidovou peroxidací.

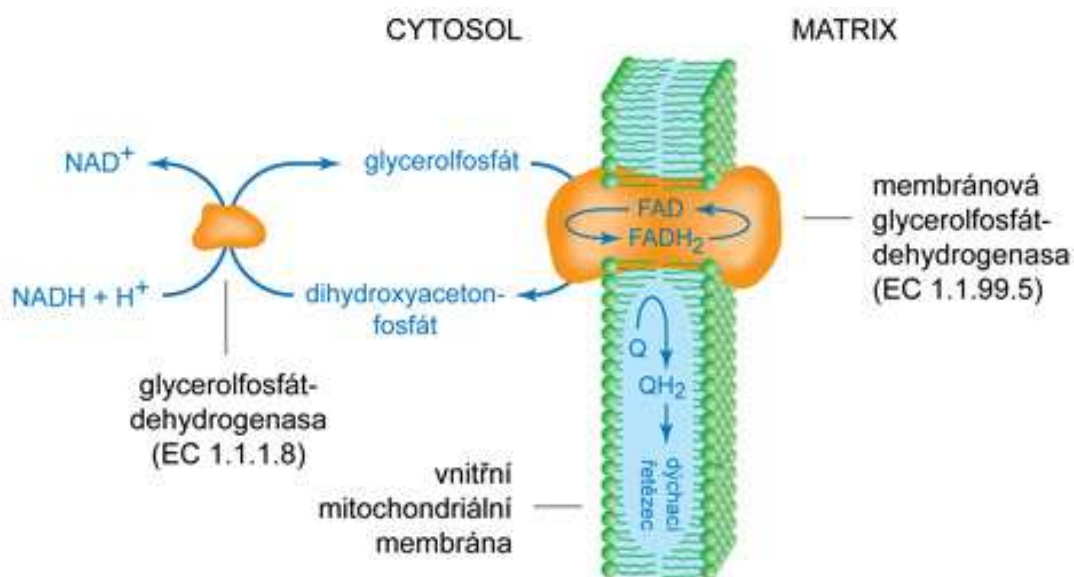
Jednou z hlavních příčin úmrtí ve většině zemí jsou kardiovaskulární onemocnění (CVD). Souvislost mezi obsahem tuků v dietě a CVD budí zájem o červený palmový olej. Pozornost je upřena hlavně na vliv RPO na profil sérových lipidů. Nasycené mastné kyseliny byly identifikovány jako hlavní dietní příčiny aterosklerózy. Ateroskleróza je charakteristická ukládáním esterů cholesterolu a ostatních tuků (včetně triacylglycerolů) v pojivové tkáni arteriálních stěn. Ze sérových lipidů je nejvíce sledován právě cholesterol ve vztahu ke zvýšení hladiny sérových tuků a výskytu ischemické choroby srdeční (ICHS) a aterosklerózy. Hypcholesterolemický efekt poly- (PUFA) a mononenasycených mastných kyselin (MUFA) oproti nasyceným mastným kyselinám (SFA) byl pozorován u zvířat i u člověka. Konzumace SFA vede také ke zvýšení krevního tlaku, zatímco tuky obsahující PUFA a MUFA mají opačný efekt. MUFA a PUFA relaxují krevní cévy a vyvolávají zvýšenou produkci vazodilatačních prostaglandinů PGF1 a PGI2, které mají antihypertenzní účinek (Edem, 2002).

## **2.5. Mitochondriální glycerolfosfát dehydrogenasa**

Pro stanovení thyroideálního stavu (koncentrace thyreoidálních hormonů) ve tkáních se využívá stanovení aktivity enzymů (t.j. množství příslušných proteinů), u nichž je exprese kódujících genů citlivá na změnu koncentrace thyreoidálních hormonů, tzv. marker enzymy. Jedním z nich je flavoprotein dependentní enzym mitochondriální glycerolfosfát dehydrogenasa (mt GPDH). mt GPDH odpovídá na změny koncentrace TH vysoce specificky (Ruegamer, 1965) a pomocí stanovení její aktivity lze charakterizovat hyper- i hypothyroidní stav.

Glycerolfosfát dehydrogenasa (GPDH) je enzymem energetického metabolismu a v buňkách se vyskytuje ve dvou isoformách. Tyto isoformy se liší molekulovou hmotností, koenzymem a především citlivostí vůči změnám thyroideálního stavu.

Cytosolová GPDH (glycerol-3-fosfát: NAD<sup>+</sup> oxidoreduktasa) má relativní molekulovou hmotnosti 37 kDa. Katalyzuje redukci dihydroxyaceton fosfátu na glycerol-3-fosfát za přítomnosti koenzymu NADH, který se oxiduje na NAD<sup>+</sup>. Exprese genů pro cytosolovou GPDH není ovlivněna změnou hladiny TH. Druhá isoforma se nazývá mitochondriální GPDH (glycerol-3-fosfát: FAD<sup>+</sup> oxidoreduktasa) a má relativní molekulovou hmotnost 80 kDa. Je to flavoprotein dependentní enzym kódovaný v jádře a lokalizovaný na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány. Katalyzuje transport elektronů ze substrátu na ubiquinonový cyklus v respiračním řetězci. Jeho enzymová aktivita v játrech, kosterním a srdečním svalstvu savců je významně ovlivňována thyreoidálními hormony. Enzymová aktivita mt GPDH je proto považována za spolehlivý marker změn thyreoidního stavu (Dümmeler et al., 1996).



**Obr. 10:** Glycerolfosfátový člunek a jeho zapojení do dýchacího řetězce.

Stanovení enzymové aktivity mt GPDH jako markeru změn thyreoidního stavu se využívá již od 60. let. Dříve se jednalo hlavně o nepřímá fotometrická stanovení. V současné době se využívá také přímých metod, které kvantifikují množství mRNA příslušné mt GPDH. Mezi přímé metody patří např. Northern blotting nebo kvantitativní RT-PCR. V roce 1996 zjistili autoři Dümmeler et al., pomocí zmíněných metod, že po podání T<sub>3</sub> laboratorním potkanům se zvýšila v játrech tvorba mRNA pro mt GPDH 10-15krát. Odpověď na podání T<sub>3</sub> se dostavila už po 4-6 hodinách. V menší míře došlo ke zvýšení koncentrace mRNA pro mt GPDH také v srdci a ledvinách. Ze všech

mitochondriálních proteinů kodovaných v jádře se nejdříve dostavuje odpověď právě mt GPDH.

Od 60. až do 80. let se hojně používalo fotometrické stanovení aktivity mt GPDH využívající systému dvou umělých akceptorů elektronů PMS (fenazin methosulfát) a INT (2-*p*-jodofenyl-3-*p*-nitrofenyl-5-fenyltetrazolium chlorid). INT přijímá elektrony od PMS a mění se v barevný produkt jodoformazan, jehož absorbance se měří při 500 nm. PMS uvolňuje elektrony vlivem světla. Tato metoda je však zatížena systematickou chybou. Alternativou je metoda popsaná Gardnerem (1974) a Okamura et al. (1981), kdy se jako umělý akceptor používá pouze INT. Absorbance se měří opět při 500 nm. Citlivost této metody je však mnohem menší. V roce 1965 prováděli Lee and Lardy měření enzymové aktivity mt GPDH v souvislosti se srovnáním vlivu různých hladin  $T_3$  v rámci jednotlivých orgánů a mezi orgány. Zjistili, že nejcitlivější na změny koncentrace  $T_3$  je mt GPDH v játrech, a poté v srdci, ledvinách, kosterních svalech, bránici, slinných žlázách a pankreatu. V mozku, plicích, slezině, lymfatických uzlinách, brzlíku a pohlavních orgánech není aktivita mt GPDH závislá na koncentraci  $T_3$ . Další alternativou je využití části respiračního řetězce, kdy se fotometricky stanovuje redukce cytochromu c. Mt GPDH předává elektrony na FAD, který je tak redukován na  $FADH_2$ . Elektrony jsou přeneseny na ubichinon přes cytochrom c-reduktasu a redukují cytochrom c. Redukovaný cytochrom c má jiné absorpční spektrum než jeho oxidovaná forma.

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Prostředky k realizaci

#### 3.1.1. Speciální chemikálie a radiochemikálie

Většina používaných chemikálií byla od firmy Sigma-Aldrich nebo C. Roth. Inhibitory proteas (PIC, PMSF) pocházely od firmy Sigma-Aldrich, kyselina bicinchoninová (BCA) od firmy Fluka a běžné anorganické sloučeniny od firmy Lachema. Chemikálie používané pro stanovení enzymové aktivity GPDH byly v nejvyšší dostupné čistotě (p.a.). Jako substrát byl použit glycerol-3-fosfát, indikátorem pro měření aktivity byl cytochrom c a pro zablokování cytochromoxidasy, posledního článku respiračního řetězce, sloužil NaCN. Červený palmový olej (RPO) byl darem od profesora Van Rooyena (South Africa).

Pro radioimunoanalytické stanovení koncentrace jodothyroninů v séru byly použity komerční RIA kity pro stanovení celkového thyroxinu ( $tT_4$ , #1447) a trijodthyroninu ( $tT_3$ , #1699) v lidském séru od firmy IMMUNOTECH (Beckman Coulter company, Praha). Od firmy MP Biomedicals (USA) byly použity preparáty radioaktivně značených  $^{125}\text{I}$ -jodothyroninů: L-[3',5'- $^{125}\text{I}$ ]-thyroxin, L-[3'- $^{125}\text{I}$ ]-3,3',5'-trijodthyronin a L-[5'- $^{125}\text{I}$ ]-3,3',5'-trijodthyronin ( $rT_3$ ). Všechny ostatní používané běžné chemikálie a rozpouštědla byly nejvyšší dostupné čistoty (p.a.).

#### 3.1.2. Přístroje

Kromě běžného laboratorního zařízení, jako jsou například váhy, homogenizátory, automatické mikropipety, mikrozkuhavky, apod. byly potřebné i velmi nákladné přístroje, dostupné na hlavním řešitelském pracovišti na Fyziologickém ústavu AV ČR v Praze. Pro přípravu mitochondriální a mikrosomové frakce se využívaly chlazená centrifuga Janetzki K23 s výkyvným rotorem se 4 držáky celkem pro 16 kyvet o objemu 15 ml, chlazená centrifuga Janetzki K24 s úhlovým rotorem pro 12 kyvet o objemu 10 ml a chlazená vakuová ultracentrifuga Sorvall RC M100 s rotorem AT4, umožňující centrifugovat malá množství vzorku při  $> 100\,000$  g.

Pro měření enzymové aktivity mt GPDH v mitochondriálních frakcích jater byl použit spektrofotometr UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu), který byl připojen k počítači

a řízen programem UV Probe. Tento spektrofotometr byl použit i pro stanovení celkových bílkovin pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou.

Pro měření radioaktivity  $^{125}\text{I}$  při radioimunoanalytickém stanovení celkového  $\text{T}_3$  a  $\text{T}_4$  byl použit vícedetektorový gama-počítač Packard Cobra II nebo gama-počítač Packard Minaxi 5000.

Elektroforegramy získané při stanovení jednotlivých proteinových MyHC isoformem byly oskanované s využitím laserového scanneru LAS-1000. Pomocí speciálního softwaru AIDA (Raytest, Německo) bylo vyhodnoceno a stanoveno procentuelní zastoupení jednotlivých MyHC isoformem. Program rozlišuje  $2^{16}$  odstínů zčernání a umožňuje tak velmi přesnou kvantifikaci jednotlivých skvrn na gelu.

## 3.2. Metody

V následujících odstavcích jsou popsány všechny metody použité při stanovení a vyhodnocení výsledků experimentální části práce.

## 3.3. Farmakologické experimenty na potkanech

Na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky v Praze (FGÚ - AV ČR) byly provedeny tři rozsáhlé experimenty (RPO 11/1, RPO 11/2 a RPO 11/3) na laboratorních potkanech, u kterých byl experimentálně navozen hypothyroidní nebo hyperthyroidní stav. Kromě navození změny thyroïdního stavu byl laboratorním potkanům podáván také červený palmový olej (RPO). Experimenty byly prováděny podle vnitřních směrnic FGÚ-AVČR, odvozených ze zákona na ochranu zvířat proti týrání (246/1992 Sb). Pro experimenty byli použiti laboratorní potkani získaní ze zvěřince FGÚ - AV ČR.

### 3.3.1. Změna thyroïdního stavu

**Hypothyroidní stav (HY)** byl vyvolán podáváním 0,05% roztoku methimazolu (2-merkapt-1-methylimidazol, Sigma) v pitné vodě každý den a tak udržován po celou dobu experimentálního období.

**Hyperthyroidní stav (TH)** byl navozen a udržován po celou dobu experimentu podáváním roztoku sodné soli L-thyroxinu ( $\text{T}_4$ ) (Sigma, ca. 16.7  $\mu\text{g}/100$  g tělesné hmotnosti) a 3, 3',5-triiodo-L-thyronin ( $\text{T}_3$ ) (Sigma, 3.3  $\mu\text{g}/100$  g tělesné hmotnosti) v pitné vodě každý den. Koncentrace  $\text{T}_4$  a  $\text{T}_3$  v roztoku byla upravována každý druhý den

tak, aby zvířata po celé experimentální období dostávala stejné množství thyreoidálních hormonů na 100 g jejich tělesné váhy (podle toho jak se měnila jejich hmotnost).

Potkani v **euthyroidním (EU) stavu** byly samci drženi na standardní dietě bez aplikace jakýchkoliv farmak, pocházející ze stejného vrhu jako experimentální zvířata.

### **RPO**

Experimentálním zvířatům byl také podáván RPO v dávkách 800mg/kg tělesné hmotnosti každý den během celého experimentálního období. Pro snazší aplikaci byl RPO (ve ztuhlém stavu) podáván potkanům na piškotech.

### **3.3.2. Experiment RPO 11/3**

V experimentální části diplomové práce uvádím pro ilustraci jen výsledky z experimentu RPO 11/3. 30 samců laboratorního potkana bylo rozděleno do 6 skupin podle podávaných farmak (přehled v **Tab. 2** ve výsledkové části). Při zahájení farmakologického experimentu byli potkani 2 měsíce staří. Zvířata byla chována při teplotě 23 °C s pravidelným světelným režimem 12/12 hodin (světlo 6.00 -18.00 h.). Byla jim podávána standardní peletovaná dieta (Sniff) a napájeni byli vodovodní vodou napáječkami. Experiment trval po dobu sedmi týdnů.

### **3.3.3. Odběr biologického materiálu**

Po ukončení experimentu byli potkani zabiti, uvedením do hluboké éterové narkózy a přestřižením jugulární žíly. Zvířata byla vykrváčena a krev byla sbírána v maximálním dosažitelném množství. Krev se nechala koagulovat po dobu 20 minut při laboratorní teplotě a poté byla stočena v chlazené centrifuze při 2000 rpm. Získané krevní sérum bylo uloženo před analýzou při -20°C. Od každého zvířete byly také vypreparovány orgány pro měření anatomických parametrů - štítná žláza (GT), srdce (H), játra (L) a řada dalších. Z jater byly následně vyizolovány mitochondrie (Rauchová et al., 2011), ostatní tkáně byly rychle zamraženy v kapalném dusíku a před dalším zpracováním byly uloženy při -80°C v hlubokomrazícím boxu.

## **3.4. Stanovení koncentrace thyreoidálních hormonů v krevním séru**

Koncentrace thyreoidálních hormonů v krevním séru potkanů byla stanovena pomocí radioimunoanalýzy (RIA). RIA jsou izotopové imunochemické metody

založené na kompetici mezi radioaktivně značeným antigenem a stanovovaným neznačeným antigenem o vazebná místa na monoklonální protilátce. Po dosažení rovnováhy se odseparuje volný antigen od antigenu vázaného protilátkou a určí se aktivita jedné nebo obou frakcí.  $^{125}\text{I}$ -značený antigen vyzařuje snadno a přesně kvantifikovatelné nízkoenergetické gama záření. Obsah analytu ve vzorku se určí z kalibrační závislosti.

### **3.4.1. RIA stanovení koncentrace celkového $T_3$ a $T_4$**

Stanovení celkových koncentrací TH ( $tT_3$ , resp.  $tT_4$ ) ve vzorcích krevních sér bylo provedeno pomocí komerčních souprav od firmy IMMUNOTECH (Beckman Coulter company), které jsou určeny pro stanovení hormonů v lidských sérech; s dostatečnou přesností lze však tyto soupravy využít i pro stanovení v sérech laboratorních potkanů. Fyziologické hodnoty koncentrace thyreoidálních hormonů (u lidí) se u euthyroidních jedinců pohybují v rozmezí 1,2-2,8 nmol/l pro  $tT_3$ , 60-160 nmol/l pro  $tT_4$ .

Součástí soupravy byly zkumavky potažené příslušnou monoklonální protilátkou,  $^{125}\text{I}$ -značený tracer (značený  $T_3$ , resp.  $T_4$ ), kontrolní séra a standardní roztoky. Pro stanovení celkových koncentrací je nutné vytěsnit TH z vazby na specifické transportní plazmatické bílkoviny, proto je v roztoku traceru obsažena kyselina  $\alpha$ -naftalensulfonová.

### **Pracovní postup**

Rozmrazené vzorky krevních sér byly důkladně promíchány na vortexu a krátce odstředěny na mikrocentrifuze. Vzorky spolu se standardy a kontrolními séry byly dle návodu napipetovány na dno zkumavky potažené protilátkou. Celkového tyroxinu je v séru přibližně osmdesátkrát více než celkového trijodthyroninu. Následně byl do zkumavek přidán tracer. Směs se inkubovala za intenzivního třepání při laboratorní teplotě. Analyt soutěží během inkubace s tracerem o vazebná místa omezeného množství protilátky vázané na zkumavce. Po inkubaci byla provedena separace vázaného antigenu od nenavázané frakce odsátím roztoku zbylého traceru a složek vzorku ze zkumavky. Poté bylo provedeno měření aktivity, která je nepřímo úměrná množství analytu ve vzorku.

Pro měření radioaktivity vázaných frakcí TH byl použit  $\gamma$ -čítač Packard Cobra 5000 s pěti identickými scintilačními detektory. Scintilační detektor převádí ionizující



záření na elektrické impulsy dvoustupňovým procesem. Ionizující záření dopadá na detektor (monokrystal NaI aktivovaný 1% Tl) a způsobuje uvolnění elektronů. Elektrony se pohybují krystalem a způsobují excitaci desítek atomů. Atomy v excitovaném stavu přecházejí zpět na svou základní energetickou hladinu a přitom dochází k emisi světla, které dopadá na světlocitlivou katodu (fotodiodu). Dopadající fotony způsobují uvolnění fotoelektronů, které dopadají na dynodu a vyrážejí z ní sekundární elektrony. Tímto způsobem je signál amplifikován. Vyhodnocení kalibrační závislosti a poté odečtení koncentrace analytu ve vzorku je prováděno zabudovaným počítačovým programem (Pavelka, 2012).

### **3.4.2. Volné frakce**

Stanovení volných frakcí TH ( $fT_3$ , resp.  $fT_4$ ) je založeno na stejném základním principu – radioaktivně značená je protilátka a zkumavky jsou potažené analogem analytu ( $T_3$ , resp.  $T_4$ ). Ke stanovení volných frakcí bylo použito komerčních setů firmy IMMUNOTECH (Beckman Coulter company), které jsou určeny pro stanovení volných frakcí TH v lidském séru. Fyziologické hodnoty (u lidí), stanovené tímto setem měřením hladiny volných TH u euthyroidních jedinců, se pohybují v rozmezí 2,5-5,8 pmol/l pro  $fT_3$  a 11,5-23 pmol/l pro  $fT_4$ .

#### **Volná frakce $T_3$**

Komerční set pro stanovení volné frakce  $T_3$  obsahoval zkumavky potažené analogem 3,5,3'-trijodo-L-thyroninu, monoklonální protilátka proti  $T_3$  značnou  $^{125}I$ , lyofilizovaná kontrolní séra a standardní roztoky. Vzorek (standard nebo kontrolní sérum) byl v množství uvedeném v návodu pipetován na dno zkumavky, potažené analogem  $T_3$ , a následně k němu byla přidána monoklonální značená protilátka. Během inkubace probíhala kompetice mezi volným  $T_3$  ve vzorku a ligandem. Po skončení doby inkubace byl obsah zkumavky odsán a následně byla změřena navázaná aktivita, která je nepřímo úměrná množství analytu ve vzorku.

#### **Volná frakce $T_4$**

Stanovení volné frakce  $T_4$  bylo založeno na složitějším principu. Do systému je zapojen další amplifikující systém – biotin-avidin. Vitamín biotin může být snadno konjugován k řadě biomolekul, včetně protilátek a avidin má k molekule biotinu

vysokou afinitu. Komerční set obsahoval zkumavky potažené avidinem, biotinylovaný ligand (analog  $T_4$ ), monoklonální protilátku proti  $T_4$  značenou radionuklidem  $^{125}I$  (tracer), standardní roztoky a lyofilizovaná kontrolní séra. Nejdříve byl na dno zkumavky potažené avidinem napipetován dle návodu vzorek (standard, kontrolní sérum), a následně k němu byl přidán tracer a biotinylovaný ligand. Během inkubace došlo ke kompetici mezi volným  $T_4$  ve vzorku a ligandem o vazebná místa na protilátce. Protilátka, která byla vázaná na ligand, se navázala na stěnu zkumavky, protože je ligand biotinylován. Po inkubaci byl odsán obsah zkumavky a následně byla změřena vázaná aktivita, která je nepřímo úměrná množství analytu ve vzorku.

### **3.5. Příprava mitochondriálních frakcí jaterní tkáně**

Pro stanovení enzymové aktivity mitochondriální GPDH bylo třeba připravit z jaterní tkáně mitochondriální frakce (Rauchová et al., 2011).

#### **Zásobní roztoky**

PIC (Protease inhibitor cocktail, Sigma P2714) – směs inhibitorů proteas (Bestatin, Leupeptin, Aprotinin a AEBSF)

100 mM PMSF v isopropanolu (fenylmethylsulfonylfluorid) - inhibitor serinových proteas

250 mM sacharosa

500 mM Tris-HCl pufr, pH=7,2

100 mM EDTA, pH=7,2

#### **Izolační médium STE pro přípravu homogenátů tkání**

250 mM sacharosa

10 mM Tris-HCl pufr, pH 7,2

1 mM EDTA, pH 7,2

0,2 mM PMSF (5  $\mu$ l do 1 ml alikvotu)

PIC (2  $\mu$ l do 1 ml alikvotu)

(**97d** sacharosa+**2d** Tris pH 7,2+**1d** EDTA) – do 1ml alikvotu přidat 2  $\mu$ l PIC a 5  $\mu$ l PMSF (těsně před použitím!)

## Pracovní postup

Nejprve bylo připraveno izolační STE médium smícháním zásobních roztoků sacharosy, Tris-HCl a EDTA v poměru 97:2:1. Těsně před použitím bylo k médiu přidáno na 1 ml jeho alikvotu 2  $\mu$ l PIC a 5  $\mu$ l PMSF. Připravené STE médium, stejně jako homogenizátor a kyvety, byly stále uchovávány v korýtku s ledem. Na digitálních vahách bylo odváženo 750 mg jaterní tkáň, odvážený vzorek byl přenesen do homogenizátoru a bylo přidáno 3 ml STE média. Homogenizace probíhala v homogenizátoru typu teflon-sklo s motorovým pohonem. Poté následovala frakční centrifugace:

1. centrifugace homogenátu pro oddělení nukleární frakce (sediment), centrifuga Janetzki K23, 10 min./2000 rpm/4 °C
2. centrifugace supernatantu pro oddělení mitochondriální frakce (sediment), centrifuga Janetzki K24, 10 min./12000 rpm/4 °C

Sedimenty z 2. centrifugace se resuspendovaly asi v  $\frac{1}{2}$  původního objemu STE média. Suspenze se krátce zhomogenizovala. Homogenáty se přelily do PP kyvet a provedla se recentrifugace 5 min./13000 rpm (cca 15000 g) při 4 °C, aby se odstranily mikrosomy, glykogen a další buněčné složky.

Sedimenty přečištěných mitochondriálních frakcí se resuspendovaly v ca. 1 - 2 ml STE média, přenesly do 2 ml zkumavek označených **mt**. Z každé zkumavky se odebral alikvot přesně 20  $\mu$ l do 1,5 ml zkumavky označené **prot./mt** pro stanovení celkového množství proteinu. Mt frakce a alikvoty byly uschovány v hlubokomrazicích boxech při teplotě -80°C.

### 3.6. Stanovení enzymové aktivity GPDH

Aktivita GPDH byla stanovena spektrofotometricky v mitochondriální frakci zhomogenizované jaterní tkáň. Registrovala se změna absorbance v čase při vlnové délce  $\lambda=550$  nm při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Měření enzymové aktivity GPDH v mitochondriálních frakcích jater se provádělo na spektrofotometru UV-1700 PharmaSpec od výrobce Shimadzu řízeným z PC programem UV Probe.

### Zásobní roztoky

pufir 10mM Tris/ 50mM KCl/ 1mM EDTA, pH 7,4

100 mM NaCN

2 mM cytochrom c (v pufiru)

500 mM glycerol-3-fosfát

### **Pracovní postup**

Do skleněné kyvety se napipetoval pufir, NaCN, cytochrom c a vzorek mitochondriální jaterní tkáně podle **Tab. 1**. Reakce se nastartovala přidavkem 25  $\mu$ l glycerol-3-fosfátu a ihned se spustila registrace změn absorbance při 550 nm po dobu 300-400 s.

**Tab. 1** Inkubační roztok při stanovení enzymové aktivity GPDH (v 1 ml skleněné kyvetě)

<b>Roztok</b>	<b>Konečná koncentrace</b>
430 $\mu$ l 0,1 M pufir	/
10 $\mu$ l 0,1 M NaCN	2 mM
25 $\mu$ l 2 mM cytochrom c	0,1 mM
10 $\mu$ l vzorek mt (50-100 $\mu$ g proteinu)	0,1-0,2 mg ml <sup>-1</sup>
25 $\mu$ l 0,5 M glycerol-3-fosfát (start)	25 mM

### **3.7. Stanovení koncentrace celkových proteinů bicinchoninovou metodou**

Pro stanovení celkového obsahu proteinů v jednotlivých frakcích zhomogenizovaných tkání byla použita bicinchoninová metoda (Smith et al., 1985). Tato metoda je modifikací klasické Lowryho metody stanovení celkových proteinů. Měďnaté ionty reagují s proteiny v alkalickém prostředí a katalyzují oxidaci hydroxylové skupiny tyrosylových zbytků ve stanovovaných proteinech. Zároveň jsou měďnaté ionty redukovány na ionty měďné, které následně interagují s kyselinou bicinchoninovou (BCA; kyselina 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová). BCA tvoří s měďnými ionty intenzivně purpurově zbarvený komplex. Je velmi stabilní se stálým zbarvením a absorbuje při vlnové délce 562 nm. K měření intenzity zbarvení se tedy využívá fotometrické stanovení. Optimální hodnota pH pro tuto reakci je 11,25. Tato

metoda umožňuje stanovení mikrogramových množství proteinů ve velmi zředěných roztocích. Výhodou je také dlouhodobá stabilita reakčních roztoků.

### **Reakční činidla**

#### **Roztok A**

1% vodný roztok BCA - Na<sub>2</sub> (Fluka # 14339)

2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O

0,16% K, Na vínan

0,4% NaOH

0,95% NaHCO<sub>3</sub>

Na **pH 11,25** byl roztok upraven přidáním koncentrovaného NaOH nebo pevného NaHCO<sub>3</sub> dle potřeby.

#### **Roztok B**

4% CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O

Roztoky A a B byly smíchány těsně před použitím v poměru 50:1. Tím vznikla reakční směs intenzivně zeleného zbarvení.

### **Pracovní postup**

Před samotným stanovením celkového obsahu proteinu ve vzorcích bylo nutné změřit kalibrační závislost. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 1 mg/ml. BSA byl napipetován do mikrozkušavek v množství 1-10 µg v konečném objemu 15 µl. Do všech mikrozkušavek bylo přidáno 300 µl reakční směsi a vzniklé roztoky byly inkubovány po dobu 30 minut v termostatu (suchém bloku) vyhřátém na 37°C. Po ukončení inkubace byla reakce zastavena přesunutím mikrozkušavek do polystyrenového korýtka s ledem. Ihned byla změřena absorbance roztoků při vlnové délce 562 nm a sestrojena kalibrační křivka.

Koncentrace bílkovin ve frakcích homogenátů jednotlivých tkání byla stanovena obdobně. Vzorky byly nejprve předředěny destilovanou vodou podle typu tkáně nebo buněčné frakce. Optimální ředění bylo stanoveno experimentálně tak, aby množství proteinu v reakční směsi nabývalo hodnot v rozmezí kalibrační křivky. Vlastní stanovení koncentrace proteinu ve vzorcích se provádělo v triplicátech, při třech různých konečných ředěních. Do každé mikrozkušavky bylo nanášeno 15 µl naředěné suspenze a přidáno 300 µl reakční směsi připravené smícháním roztoku A a B.

Následovala 30 minutová inkubace při 37°C ve vyhřívaném suchém bloku. Po uplynutí 30 minut byla reakce zastavena přenesením mikroskopických zkumavek do ledu. Bezprostředně poté byla změřena absorbance světla o vlnové délce 562 nm na spektrofotometru PharmaSpec UV 1700 (Shimadzu). Hodnoty koncentrace celkových proteinů obsažených ve vzorku byly odečteny z předem připravené kalibrační křivky.

### **3.8. Extrakce těžkých řetězců myosinu**

Z pomalého lýtkového svalu (musculus soleus, SOL) a rychlého svalu natahovače prstů nohy (extensor digitorum longus, EDL) experimentálních zvířat byly extrahovány těžké řetězce myosinu.

#### **Zásobní roztoky**

1 M NaCl  
0,2 M EGTA, pH 7,0  
0,1 M Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, pH 8,4  
0,25 M DTT  
0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O  
100% glycerol

#### **Promývací pufr (WB – washing b.)**

4,4 mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
4,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O  
20 mM NaCl  
1 mM EGTA pH 7,0

#### **Extrakční pufr (EB – extraction b.)**

5 mM EGTA, pH 7,0  
1 mM DTT  
0,1 mM pyrofosforečnan sodný, pH 8,4

#### **Pracovní postup**

Do předem připravených zkumavek o objemu 1 ml bylo přesně naváženo 50 mg zmrazeného svalu a zkumavky byly umístěny do nádoby s ledem. Do každé zkumavky bylo přidáno 250 µl promývacího pufru (WB) a pomocí malých ostrých nůžek byly svaly přímo na ledu homogenizovány. Rozstříhané svaly byly důkladně zcentrifugovány na stolní centrifuze umístěné v chladové místnosti (4°C). Centrifugace probíhala 5 minut při 12 000 rpm. Supernatant byl odstraněn a do každé zkumavky bylo přidáno trojnásobné množství původního množství naváženého svalu (150 µl) extrakčního pufru a důkladně rozmícháno kopístkou. Takto připravené vzorky byly umístěny do nádoby s ledem na třepačku. Extrakce těžkých řetězců myosinu (MyHC) probíhala po dobu 30 minut při 120 kmitech za minutu. Mezitím byly připraveny nově označené zkumavky na supernatant a vzorek pro elektroforézu. Po uplynutí 30 minut byly vzorky opět centrifugovány v chladové místnosti po dobu 10 minut při 12 000 rpm. Dále byl

supernatant přenesen do nově označených zkumavek a k němu přidáno stejné množství 87% glycerolu. Obsah zkumavek byl důkladně zvortexován a odebrán alikvot 5  $\mu$ l na elektroforézu. Vzorky byly promíchány a zamrazeny.

### **3.9. Elektroforéza těžkých řetězců myosinu**

V experimentální části mé diplomové práce byly děleny isoformy těžkých řetězců myosinu pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Metoda byla modifikací provedení podle Tallmadge a Roy (1993), ale vzhledem k tomu, že se jednalo o separaci velkých a velmi podobných proteinů, probíhala elektroforéza po dobu cca 20 hodin při 4°C, aby došlo k úplnému a správnému rozdělení isoform.

#### **Zásobní roztoky**

30% Akrylamid-Bisakrylamid  
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8  
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8  
1M glycin  
100 mM EDTA, pH 7,0  
10% SDS (dodecylsulfát sodný)  
10% Peroxosíran amonný  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

#### **Vnitřní elektrodotový pufr**

150 mM glycin  
0,1 M Tris-baze  
0,1 % SDS

#### **Vnější elektrodotový pufr**

Vnitřní elektrodotový pufr a destilovaná voda (1:1)

#### **Předřed'ovací pufr (PP)**

70 mM Tris-HCl, pH 6,8  
20% glycerol

#### **Vzorkový pufr (VP)**

125 mM Tris-HCl, pH 6,8  
20% glycerol  
1 mM EDTA pH 7,0  
5% SDS  
0,1% bromofenol blue  
5%  $\beta$ -merkptoethanol

Detergent SDS ve vzorkovém pufru způsobuje denaturaci a poskytuje proteinům negativní náboj, Tris-HCl udržuje vhodné pH. Glycerol má vyšší specifickou hmotnost a zajišťuje tak klesnutí vzorku ke dnu jamky v gelu. Pro sledování průběhu elektroforézy se užívá modré barvivo bromfenol blue.

## Složení gelů

Pro SDS-PAGE byly použity dva gely, které byly vytvořeny polymerací akrylamidu a N',N'-mehtylenbisakrylamidu. Gely se liší svojí hustotou, což je dáno stupněm zesíťení. Koncentrační (stacking) gel byl použit pro dosažení nerozmazaných proužků ve výsledku. V separačním (separating) gelu se již proteiny dělily na základě své molekulové hmotnosti. Složení obou gelů je uvedeno v následující tabulce (**Tab. 2**).

**Tab. 2:** Složení separačního a koncentračního gelu

Výchozí roztoky	Separating gel		Stacking gel	
Výchozí koncentrace	ml	Finální koncentrace	ml	Finální koncentrace
30% Acrylamid(A)-bisakrylamid(B) (50:1)	2,667	8% A + 0,16% B	0,667	4% A + 0,08% B
100% Glycerol	3,74	37,40%	1,87	37,40%
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	1,333	0,2M	-	-
Tris-HCl 0,5M, pH 8,8	-	-	0,7	70 mM
1M Glycin	1	0,1 M	-	-
100mM EDTA (pH 7,0)	-	-	0,2	4 mM
10% SDS	0,4	0,40%	0,2	0,40%
dest. H <sub>2</sub> O	0,754	-	1,307	-
10% Peroxosíran amonný	0,1	0,10%	0,05	0,10%
TEMED	0,006	0,06%	0,006	0,12%

## Pracovní postup

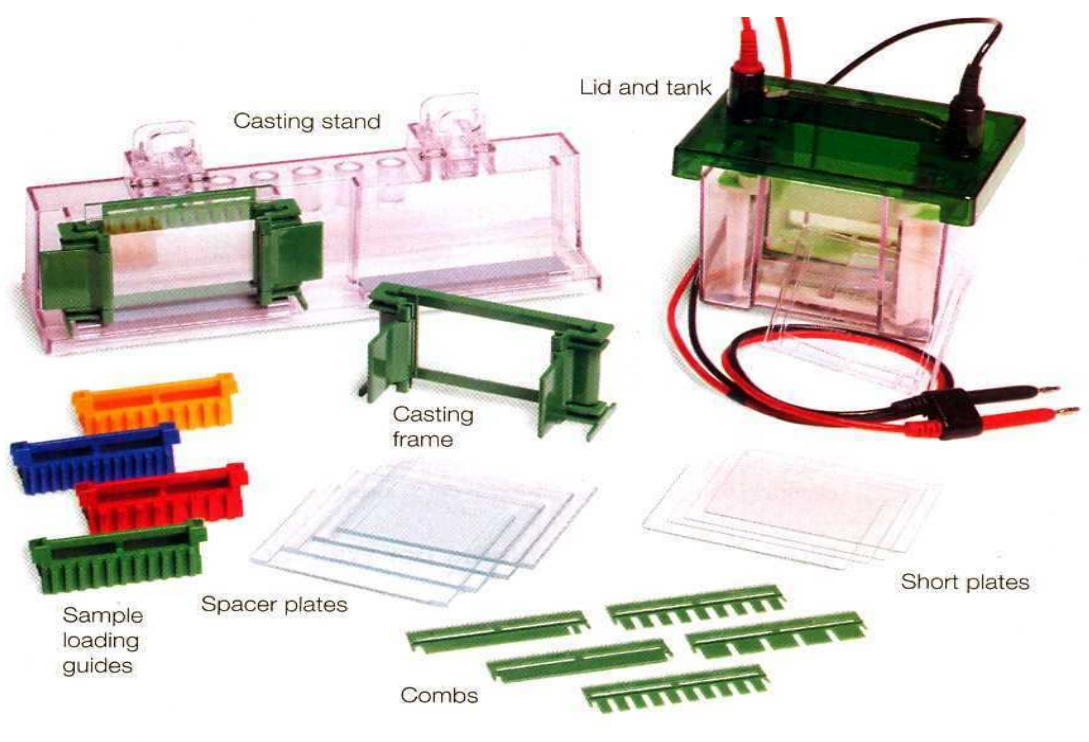
Nejdříve byly složeny formy na gely a podle **Tab. 2** namíchány roztoky. Mezi skla byla nalita směs pro separační gel a po zpolymerování (ztuhnutí gelu) byl vytvořený gel převrstven směsí pro koncentrační gel, do které byl následně vložen „hřebínek“ pro vytvoření jamek. Předem připravené vzorky (extrakty na elektroforézu) byly naředěny předředovacím pufrům na koncentraci celkových proteinů 1 mg/ml. Předředěné vzorky byly dále smíchány se vzorkovým pufrům v poměru 1:4 (1 díl vzorku s PP a 4 díly VP). Vzorky v důkladně označených zkumavkách s propíchnutými víčky byly zvortexovány a 3 minuty povařeny na vodní lázni. Takto připravené vzorky byly v množství 5  $\mu$ l dále nanášeny do jamek gelu. Nanášení bylo prováděno co nejpresněji a následně byly vzorky opatrně převrstveny vnitřním elektrodovým pufrům. Gely byly vloženy do



nádob na elektroforézu a řádně utěsněny. Mezi gely byl nalit vnitřní elektrodotový pufr a zevně do nádoby byl nalit vnější elektrodotový pufr tak, aby se vyrovnaly hladiny obou pufrů. Oba pufrы byly vychlazené na 4°C včetně vody potřebné na přípravu vnějšího elektrodotového pufru. Celá soustava elektroforézy byla přesunuta do chladové místnosti (3-5°C).

Elektroforéza probíhala za těchto podmínek:

Při napětí 45V	30 minut
Při napětí 100V	19 hodin
Při napětí 150V	1 hodinu



**Obr. 11:** *Souprava Mini PROTEAN 3 od firmy Bio-Rad.*

### 3.10. Barvení stříbrem

Po rozdělení jednotlivých isoform těžkých řetězců myosinu (MyHC) elektroforézou byly pro jejich identifikaci získané elektroforegramy barveny metodou barvení stříbrem (Blum et al., 1987).

### **Zásobní roztoky**

50% ethanol

0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O

formaldehyd

### **Fixační roztok**

45% methanol

10% kyselina octová

0,018% formaldehyd

### **Barvicí roztok**

0,2% AgNO<sub>3</sub>

0,027% formaldehyd

### **Vyvíjecí roztok**

2,9% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

0,0004% Na-thiosulfát

0,18% formaldehyd

redestilovaná voda

### **Stop roztok**

45% methanol

10% kyselina octová

redestilovaná voda

### **Pracovní postup**

Rozdělené proteinové isoformy v gelu byly nejdříve zafixovány ve fixačním roztoku (podle potřeby může fixace trvat 1 hodinu až několik dní). Fixace probíhala na třepačce při pokojové teplotě. Po fixaci byly elektroforegramy promyty 3x po 20 minutách ethanolem. Následovalo promívání 2x30 sekund 0,02% Na-thiosulfátem. Dále byly elektroforegramy promývány 3x20 sekund redestilovanou vodou pro odstranění 0,02% Na-thiosulfátu. Formaldehyd do barvicího roztoku byl přidán těsně před vlastním barvením. Jednotlivé proteiny na gelu byly barveny v barvicím roztoku po dobu 20 minut ve tmě za pomalého třepání. Po obarvení následovalo promývání redestilovanou vodou, 3x po 20 sekundách. Taktéž do vyvíjecího roztoku byl přidán formaldehyd až těsně před použitím. Vyvíjení probíhalo tak dlouho, dokud nebyly vidět tmavé pruhy. Poté následovalo rychlé promytí vodou po dobu několika sekund. Reakce byla zastavena stop roztokem. Doba vyvíjení nesměla trvat příliš dlouho, jinak docházelo k rozmývání proužků proteinů a následně k obtížnému vyhodnocování elektroforegramů a identifikaci proteinů.

Obarvené elektroforegramy byly následně oskanovány s využitím přístroje LAS-1000, pomocí softwaru AIDA byly vyhodnoceny a bylo stanoveno procentuelní zastoupení jednotlivých MyHC isoformem.

## 4. VÝSLEDKY

Navození různého thyroïdního stavu u experimentálních zvířat a vliv podávání RPO byly dokumentovány měřením změn parametrů, u nichž se předpokládá, že budou ovlivněny změnou thyroïdního stavu. Měřenými hodnotami byly změny některých anatomických parametrů, změny koncentrace celkového trijodthyroninu ( $tT_3$ ) a thyroxinu ( $tT_4$ ) a volného trijodthyroninu ( $fT_3$ ) a thyroxinu ( $fT_4$ ) v krevním séru, a dále změny aktivity mitochondriálního flavoprotein dependentního enzymu glycerol-3-fosfát dehydrogenasy (mt GPDH).

### 4.1. Anatomické parametry

Z anatomických parametrů byla měřena absolutní hmotnost potkanů, absolutní a relativní hmotnosti srdce a štítné žlázy v závislosti na thyroïdním stavu. Relativní hmotnosti srdce a štítné žlázy byly měřeny jako podíl absolutní hmotnosti srdce (štítné žlázy) v miligramech a celkové hmotnosti těla potkana v gramech (mg/g).

V **Tab. 3** je přehledně popsáno navržení farmakologického experimentu RPO 11/3. Experimentální zvířata jsou v tabulce rozdělena do 6 skupin podle jejich farmakologického ovlivnění. Jsou zde zaznamenány absolutní hmotnosti těla, štítné žlázy a srdce, relativní hmotnosti štítné žlázy a srdce a také průměrné hodnoty těchto parametrů ve skupinách zvířat. Již z průměrných hodnot anatomických parametrů v **Tab. 3** lze vidět výrazné změny ve skupinách s různým thyroïdním stavem. Změny anatomických parametrů v závislosti na vlivu thyreoidálních hormonů společně s vlivem RPO jsou graficky znázorněny v následujících grafech.

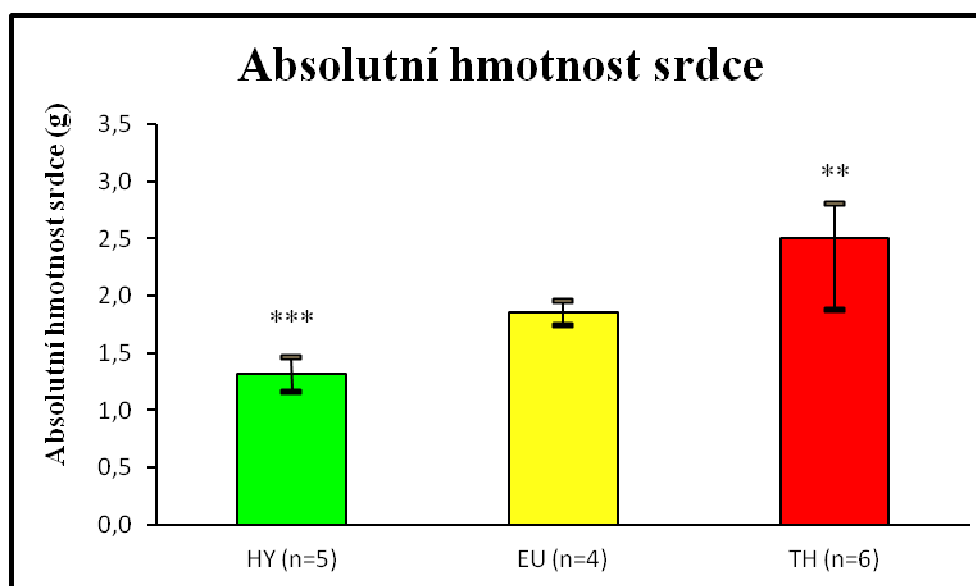
**Tab. 3: Přehledný popis uspořádání farmakologického experimentu RPO 11/3.**

Zleva: Farmakologické ovlivnění a číslo skupiny, číslo zvířete a vzorku, hmotnost těla (BW), absolutní hmotnost štítné žlázy (Abs. GTW) a její průměrná hodnota ve skupině, relativní hmotnost štítné žlázy (Rel. GTW) a její průměrná hodnota ve skupině, absolutní hmotnost srdce (Abs. HW) a její průměrná hodnota a relativní hmotnost srdce (Rel. HW) a její průměrná hodnota ve skupině.

USPOŘÁDÁNÍ FARMAKOLOGICKÉHO EXPERIMENTU RPO 11/3											
Skupina	#zvířete	č. v.	BW (g)	Abs. GTW (mg)	Průměr	Rel. GTW (mg/g)	Průměr	Abs. HW (g)	Průměr	Rel. HW (g)	Průměr
EU	I	5907	1	468	40	37	0,085	0,08	1,86	1,85	3,97
		5908	2	502	45		0,090		1,96		3,90
		5909	21	445	26		0,058		1,84		4,13
		5910	22	407	38		0,093		1,75		4,29
EU+RPO	II	5911	11	448	14	22	0,031	0,04	1,87	1,95	4,18
		5912	12	523	23		0,044		1,88		3,59
		5913	25	510	15		0,029		1,78		3,50
		5914	26	553	37		0,067		2,28		4,12
HY	III	5915	3	386	50	52	0,130	0,13	1,29	1,32	3,34
		5916	4	413	50		0,121		1,32		3,20
		5917	27	396	60		0,152		1,46		3,69
		5918	28	410	62		0,151		1,16		2,83
		5919	13	354	37		0,105		1,38		3,89
HY+RPO	IV	5920	7	490	74	58	0,151	0,13	1,56	1,48	3,19
		5921	8	470	56		0,119		1,42		3,02
		5922	29	420	53		0,126		1,35		3,21
		5923	30	441	68		0,154		1,28		2,91
		5924	20	407	37		0,091		1,77		4,35
TH	V	5925	5	460	18	22	0,039	0,05	1,88	2,5	4,09
		5926	6	488	22		0,045		2,81		5,76
		5927	14	540	30		0,056		2,66		4,92
		5928	15	494	26		0,053		2,63		5,33
		5929	23	435	19		0,044		2,46		5,66
		5930	24	490	16		0,033		2,55		5,21
TH+RPO	VI	5931	9	491	20	28	0,041	0,060	2,25	2,4	4,57
		5932	10	460	11		0,024		2,66		5,79
		5933	16	500	20		0,040		2,04		4,07
		5934	17	500	28		0,056		2,36		4,72
		5935	18	427	66		0,155		2,55		5,96
		5936	19	550	25		0,046		2,56		4,65

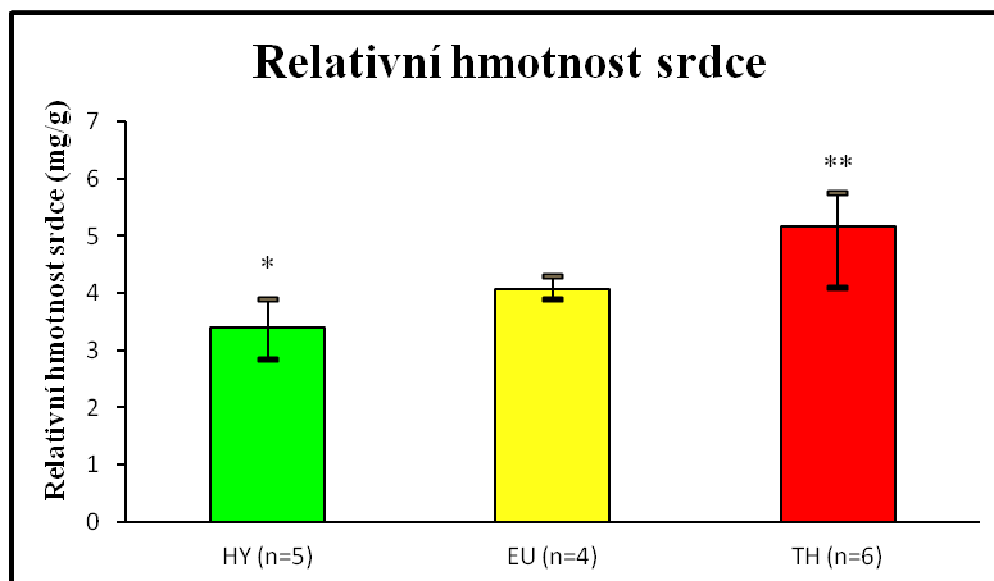
Z **Tab. 3** lze vyčíst, že hmotnosti těla se signifikantně nelišily mezi EU, HY a TH potkany. Ani podávání RPO nemělo na tělesnou hmotnost potkanů výrazný vliv.

Thyreoidální hormony působí zrychlení srdeční činnosti, čímž je ovlivněna i velikost srdce. Proto byla post mortem srdce vážena a absolutní a relativní hmotnosti srdce použity jako marker thyroideálního stavu. V **Grafech 1 a 2** jsou zaznamenány absolutní a relativní hmotnosti srdce potkanů ve skupinách s různým farmakologickým ovlivněním.



**Graf 1:** Porovnání absolutní hmotnosti srdce u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů. Statistická významnost: \*\* $p < 0,01$  a \*\*\* $p < 0,001$  signifikantní rozdíly HY nebo TH proti EU potkanům.

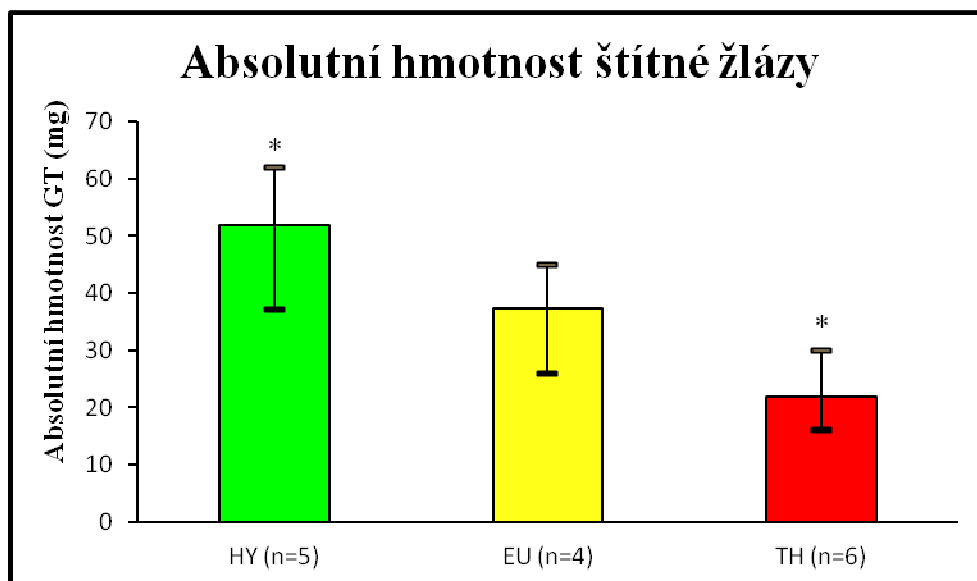
V **Grafu 1** vidíme, že u potkanů, kterým byla podávána kombinace  $T_3$  a  $T_4$  (TH) došlo k výraznému zvýšení absolutní hmotnosti srdce (o 35%) oproti kontrolním zvířatům v euthyroidním (EU) stavu. Naopak u potkanů, kterým byl podáván methimazol (HY) poklesla absolutní hmotnost srdce oproti kontrolním zvířatům o 29%.



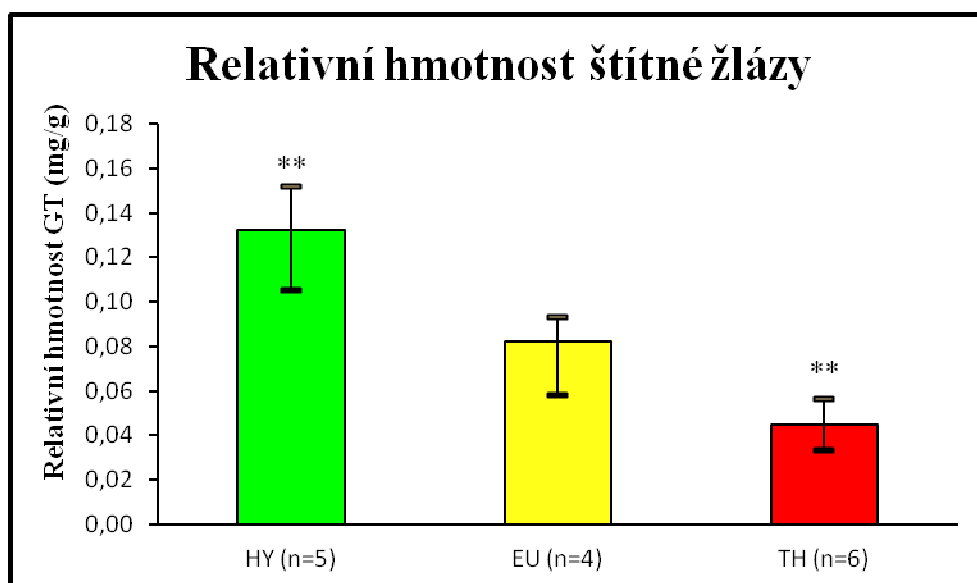
**Graf 2:** Porovnání relativní hmotnosti srdce u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů. Statistická významnost: \* $p < 0,05$  a \*\* $p < 0,01$  signifikantní rozdíly HY nebo TH proti EU potkanům.

Výsledky stanovení relativní hmotnosti srdce z **Grafu 2** korelují s předchozími výsledky měření absolutní hmotnosti srdce. U TH jedinců byla relativní hmotnost srdce zvýšena o 26% a o 17% snížena u HY jedinců v porovnání s EU skupinou.

Kromě kardiovaskulárního systému je chronickou změnou thyroidního stavu ovlivňována také štítná žláza. Absolutní a relativní hmotnosti štítné žlázy proto sloužily jako další anatomické parametry citlivé na změnu koncentrace thyreoidálních hormonů (**Grafy 3 a 4**).



**Graf 3:** Porovnání absolutní hmotnosti štítné žlázy u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů.



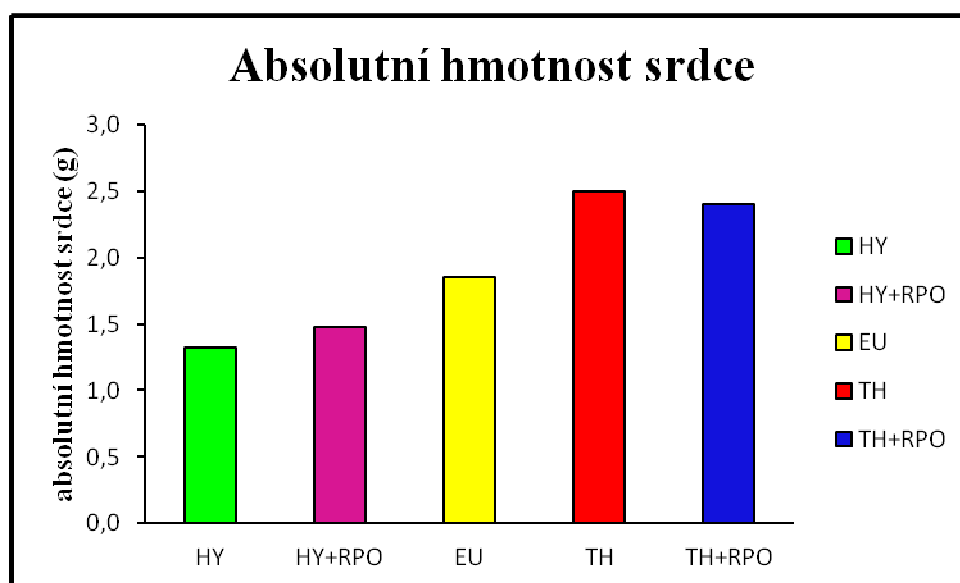
**Graf 4:** Porovnání relativní hmotnosti štítné žlázy u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů. Statistická významnost: \* $p < 0,05$  a \*\* $p < 0,01$  signifikantní rozdíl HY nebo TH proti EU potkanům.

Hodnoty v **Grafu 3** a **4** znázorňují absolutní a relativní hmotnosti štítné žlázy v jednotlivých skupinách podle farmakologického ovlivnění. Výrazný nárůst absolutní i relativní hmotnosti byl zaznamenán u štítné žlázy HY zvířat, kdy absolutní hmotnost byla zvýšená o 40% a relativní hmotnost dokonce o 61%. U TH zvířat došlo naopak k poklesu absolutní hmotnosti o 41% a relativní hmotnosti štítné žlázy o 46% v porovnání s kontrolními zvířaty v EU stavu.

## Vliv RPO v kombinaci se změnou thyroidního stavu na anatomické parametry

Hormony štítné žlázy hrají nepochybně ve zdravém organismu pozitivní roli, ale když jsou v příliš vysoké nebo naopak příliš nízké koncentraci, mohou vyvolávat různé patofyziologické stavy kosterního a srdečního svalstva. Např. přestavby těchto tkání spojené se změnami exprese mnoha proteinů, které mohou eventuelně vést až k úplnému selhání srdeční činnosti. Bylo zjištěno, že RPO může být užitečný v léčbě selhání srdce a k prevenci před negativní přestavbou srdeční tkáně (Mitašíková et al., 2008).

Cílem mé práce bylo, kromě stanovení vlivu změněného thyroidního stavu na anatomické parametry, také analyzovat možný protektivní efekt RPO na tyto změny jednotlivých anatomických parametrů u hyperthyroidních a hypothyroidních potkanů. V **Grafech 5 a 6** jsou kromě skupin potkanů se změněným thyroidním stavem uvedeny také skupiny hyper- a hypothyroidních potkanů, kterým byl současně podáván RPO.

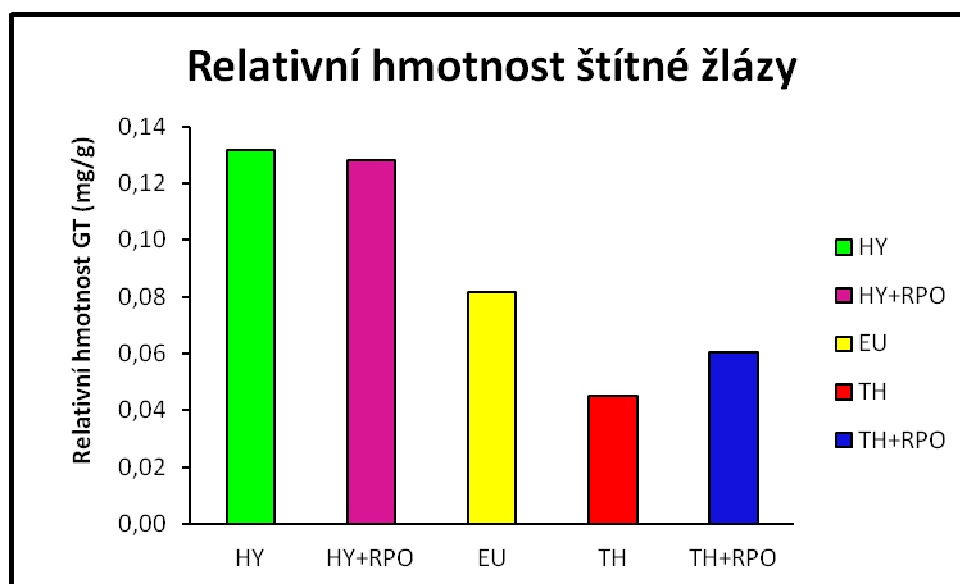


**Graf 5:** Porovnání absolutní hmotnosti srdce u eu- (EU), hypo- (HY), hyperthyroidních (TH), hypothyroidních potkanů krmených RPO (HY+RPO) a hyperthyroidních potkanů krmených RPO (TH+RPO)

**Graf 5** znázorňuje hodnoty absolutní hmotnosti srdce ve skupinách se změněným thyroidním stavem a ve skupinách, kde byl kromě změněného thyroidního stavu podáván také RPO oproti zvířatům v euthyroidním stavu (EU). Z grafu je zřejmé, že RPO potlačuje změny vyvolané alterací thyroidního stavu, resp. potlačuje účinky



thyreoidálních hormonů. U hyperthyroidních zvířat (TH) dochází v případě absolutní hmotnosti srdce vlivem RPO k jejímu snížení a přiblížení hodnot k hodnotám kontrolních zvířat (EU). I u zvířat, kterým byl podáváním methimazolu navozen hypothyroidní stav dochází působením RPO k přiblížení hodnot absolutní hmotnosti srdce k hodnotám kontrolních zvířat v euthyroidním stavu oproti skupině, které byl podáván jen methimazol (HY).

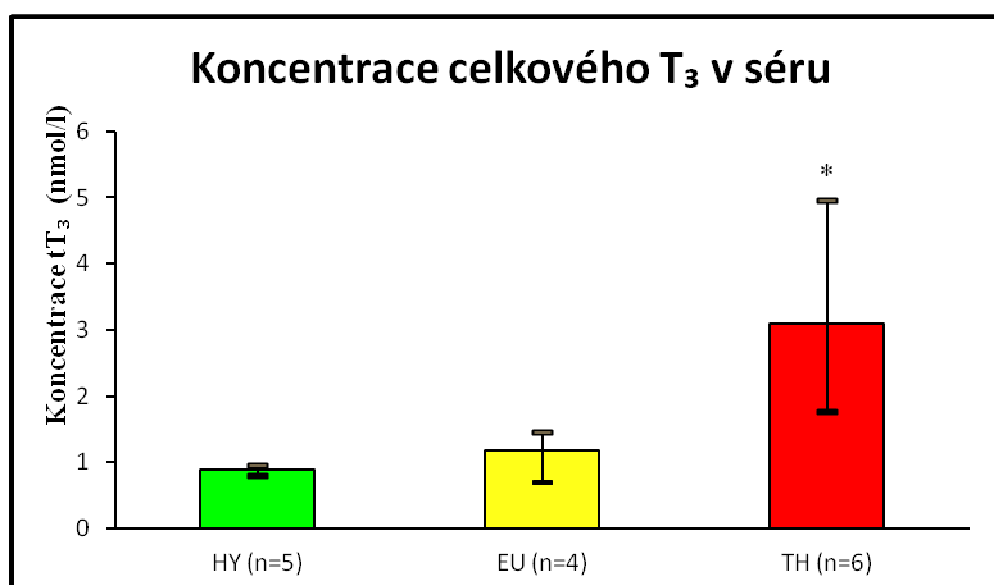


**Graf 6:** Porovnání relativní hmotnosti štítné žlázy u eu- (EU), hypo- (HY), hyperthyroidních (TH), hypothyroidních potkanů krměných RPO (HY+RPO) a hyperthyroidních potkanů krměných RPO (TH+RPO)

Také z **Grafu 6** lze vyčíst pozitivní vliv RPO na potlačení změn thyreoidního stavu, tentokrát dokumentované na hodnotách relativní hmotnosti štítné žlázy jednotlivých experimentálních skupin. Ve skupině hyperthyroidních zvířat, kterým byl podáván RPO (TH+RPO) došlo ke zvýšení relativní hmotnosti štítné žlázy a přiblížení tak k hodnotám kontrolní skupiny (EU) oproti hyperthyroidním zvířatům bez podávání RPO (TH). Mírný posun k hodnotám kontrolních zvířat lze pozorovat i u skupiny hypothyroidních zvířat s aplikací RPO oproti hypothyroidním zvířatům (HY).

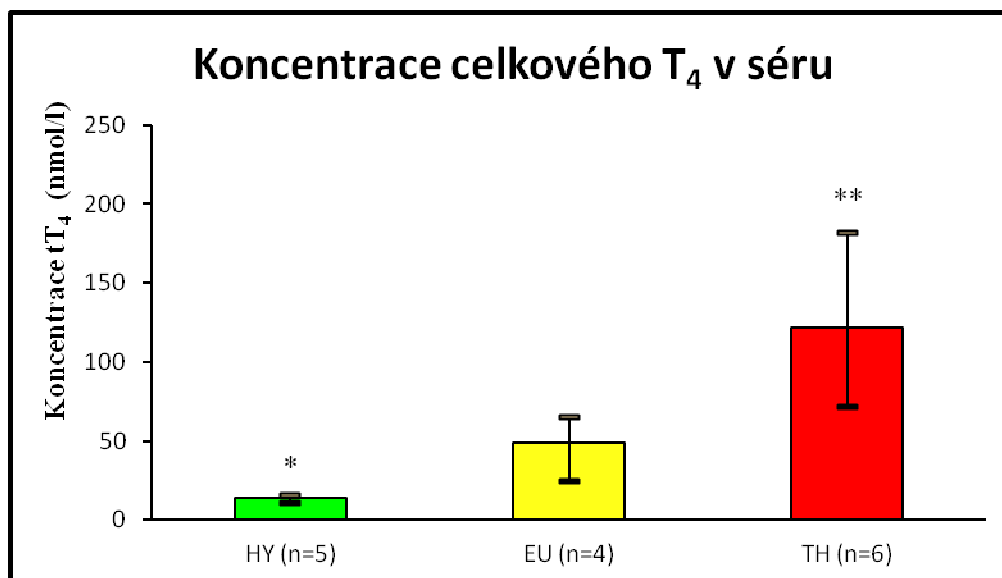
## 4.2. Stanovení koncentrace thyreoidálních hormonů v krevním séru

Jelikož cílem mé práce bylo sledování vlivu TH na expresi těžkých řetězců myosinu, bylo také nezbytné určit koncentrace TH v krevním séru. Tato stanovení jsou první volbou pro zjištění thyroideálního stavu jedince. Bylo zvoleno stanovení nejen celkové koncentrace TH v krevním séru (**Grafy 7 a 8**), ale v laboratoři bylo nově zavedeno i stanovení koncentrace volných frakcí TH. Ty daleko lépe a výrazněji vypovídají o reálné dostupnosti TH tkáním a jsou lepším odrazem thyroideálního stavu jedince (viz **Grafy 9 a 10**).



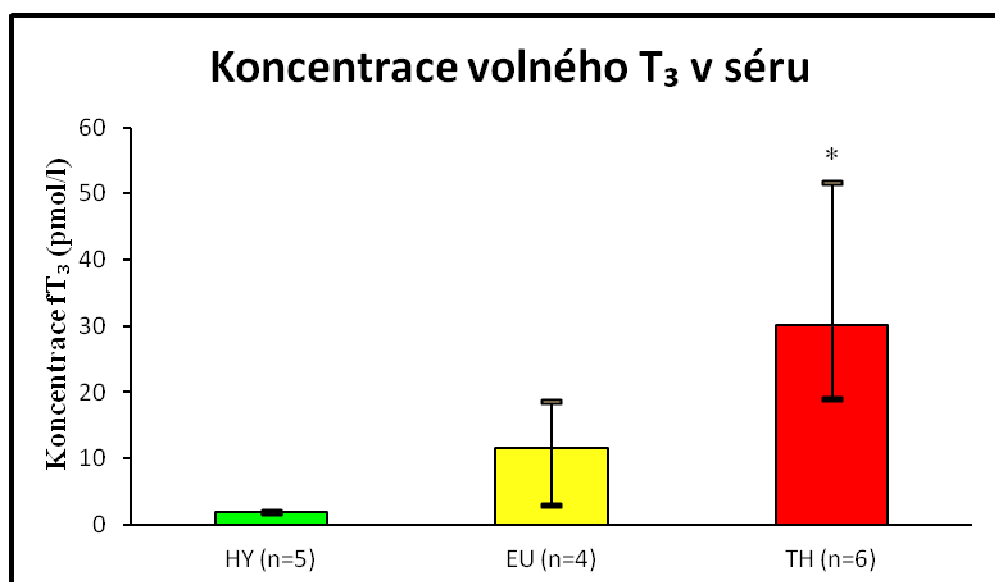
**Graf 7:** Porovnání koncentrace celkového trijodthyroninu (tT<sub>3</sub>) v krevním séru u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů. Statistická významnost: \*p<0,05 signifikantní rozdíly HY nebo TH proti EU potkanům.

V **Grafu 7** vidíme, že hodnoty sérové koncentrace tT<sub>3</sub> jsou u kontrolní skupiny v rozmezí fyziologických hodnot (na spodní hranici). U TH potkanů se zvýšila sérová koncentrace tT<sub>3</sub> přibližně 2,5 krát oproti kontrolní skupině zvířat. Naopak u skupiny HY došlo ke snížení sérové koncentrace tT<sub>3</sub> o jednu čtvrtinu oproti kontrolní skupině.



**Graf 8:** Porovnání koncentrace celkového thyroxinu (tT<sub>4</sub>) v krevním séru u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů.

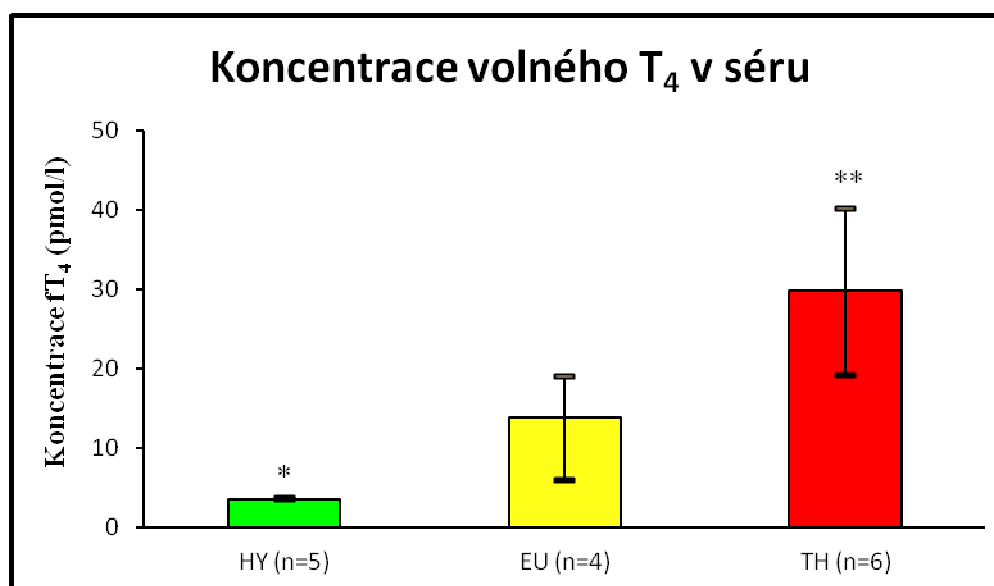
V **Grafu 8** je znázorněna závislost sérové koncentrace celkového thyroxinu (tT<sub>4</sub>) na farmakologickém ovlivnění. Stejně jako v případě tT<sub>3</sub> i koncentrace tT<sub>4</sub> vzrostla u TH skupiny přibližně 2,5 krát oproti kontrolní skupině. Koncentrace tT<sub>4</sub> u kontrolní skupiny ovšem leží pod hranicí fyziologického rozmezí. V porovnání s tT<sub>3</sub> vyvoval hypothyroidní stav výraznější snížení hladiny tT<sub>4</sub> (o 72%) oproti kontrolní skupině.



**Graf 9:** Porovnání koncentrace volného trijodthyroninu (fT<sub>3</sub>) v krevním séru u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů. Statistická významnost: \*p<0,05 a \*\*p<0,01 signifikantní rozdíly HY nebo TH proti EU potkanům.

V **Grafu 9** je znázorněna koncentrace volného trijodthyroninu (fT<sub>3</sub>) v krevním séru v závislosti na thyroideálním stavu zvířat. Koncentrace fT<sub>3</sub> u kontrolní skupiny leží mimo fyziologické rozmezí. Stejně jako v případě tT<sub>3</sub> a tT<sub>4</sub> došlo ke zvýšení koncentrace fT<sub>3</sub> přibližně 2,5 krát u TH skupiny v porovnání s kontrolní skupinou. Výrazná změna koncentrace fT<sub>3</sub> byla zaznamenána u hypothyroidních zvířat, kdy oproti kontrolní skupině došlo k poklesu o 84%.

Změnu sérové koncentrace volného thyroxinu (fT<sub>4</sub>) působením TH vidíme v **Grafu 10**.

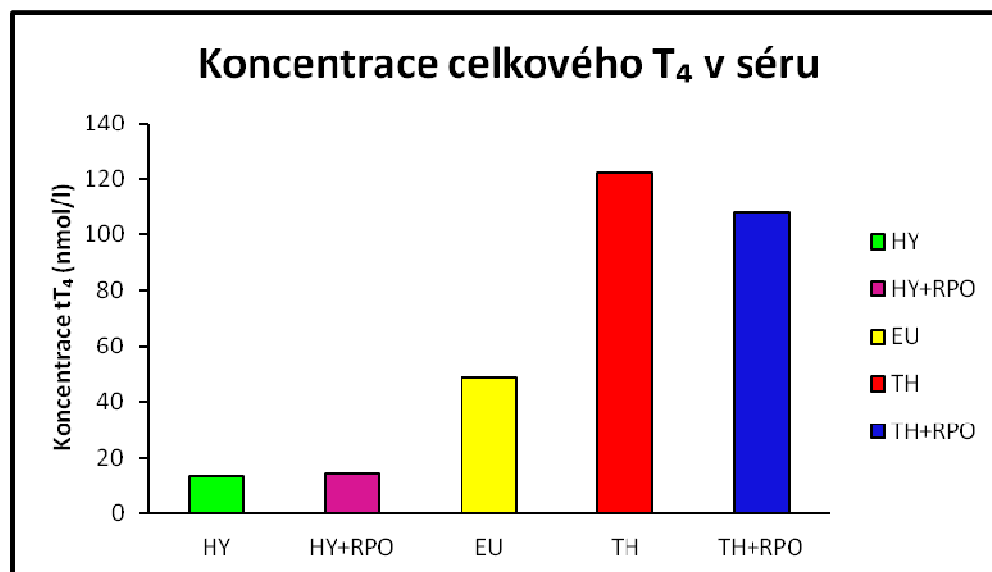


**Graf 10:** Porovnání koncentrace volného thyroxinu (fT<sub>4</sub>) v krevním séru u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů. Statistická významnost: \*p<0,05 a \*\*p<0,01 signifikantní rozdíly HY nebo TH proti EU potkanům.

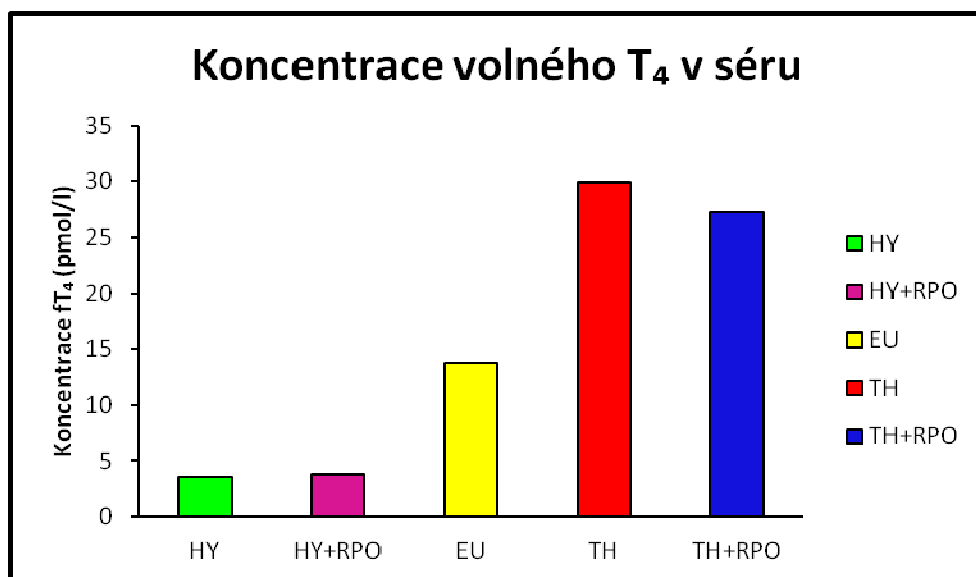
Hodnoty sérové koncentrace fT<sub>4</sub> se u kontrolní skupiny zvířat pohybují v rozmezí fyziologických hodnot (blíže ke spodní hranici). U HY potkanů se snížila koncentrace fT<sub>4</sub> o 74%, zatímco u TH potkanů vzrostla koncentrace fT<sub>4</sub> o 161% v porovnání s kontrolní skupinou.

#### **Vliv RPO v kombinaci se změnou thyroideálního stavu na biochemické parametry**

Stejně jako u anatomických parametrů, byl pozorován vliv RPO také na koncentraci celkových a volných frakcí TH. Grafické znázornění výsledků je uvedeno v **Grafech 11 a 12**.



**Graf 11:** Porovnání koncentrace celkového thyroxinu (tT<sub>4</sub>) v krevním séru u eu- (EU), hypo- (HY), hyperthyroidních (TH), hypothyroidních potkanů krměných RPO (HY+RPO) a hyperthyroidních potkanů krměných RPO (TH+RPO)



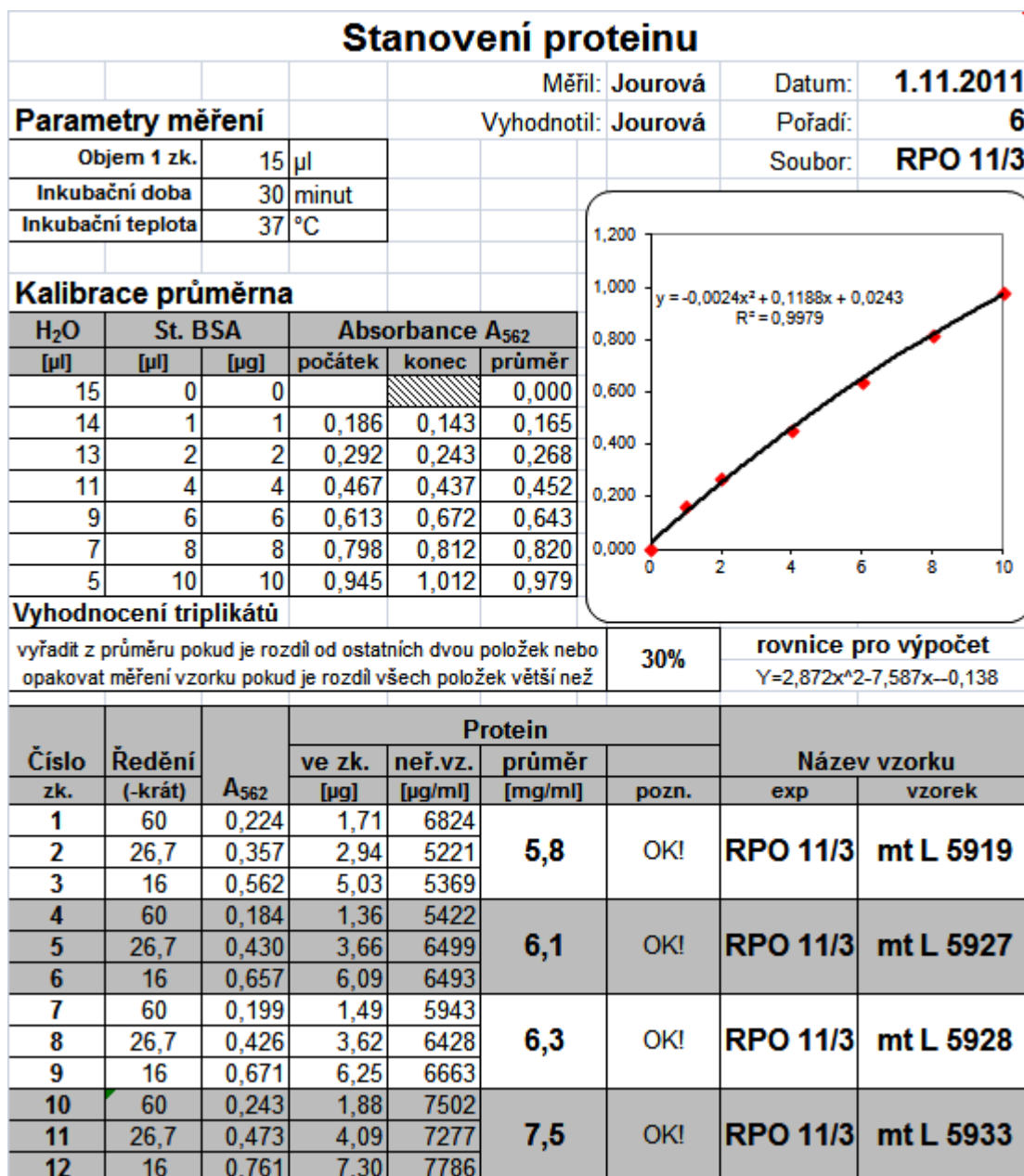
**Graf 12:** Porovnání koncentrace volného thyroxinu (fT<sub>4</sub>) v krevním séru u eu- (EU), hypo- (HY), hyperthyroidních (TH), hypothyroidních potkanů krměných RPO (HY+RPO) a hyperthyroidních potkanů krměných RPO (TH+RPO)

Výsledky z **Grafů 11** a **12** ukazují, že u skupiny hyperthyroidních potkanů s přidáváním RPO (TH+RPO) v dietě došlo k viditelnému snížení koncentrace tT<sub>4</sub> a fT<sub>4</sub> oproti hyperthyroidním potkanům, kterým RPO nebyl podáván (TH). U skupiny zvířat

v hypothyroidním stavu nebyla změna koncentrace  $tT_4$  a  $fT_4$  vlivem podávání RPO výrazná. Tyto výsledky, stejně jako výsledky z **Grafů 5 a 6**, ukazují, že RPO potlačuje účinky TH.

### 4.3. Stanovení celkového proteinu bicinchoninovou metodou v mitochondriálních frakcích jater

Stanovení celkového proteinu bylo nutné pro výpočet specifické enzymové aktivity mt GPDH. Obsah celkové bílkoviny v jednotlivých frakcích byl stanoven fotometricky bicinchoninovou metodou a vyhodnocen pomocí předem nadefinované šablony (Obr. 12).



Obr. 12 : Šablona vyhodnocení stanovení celkové bílkoviny v mitochondriálních frakcích jater u potkanů číslo 5919, 5927, 5928, 5933 bicinchoninovou metodou.

#### 4.4. Stanovení specifické enzymové aktivity glycerol-3-fosfát dehydrogenasy

Mitochondriální glycerolfosfát dehydrogenasa (mt GPDH) odpovídá na změny koncentrace TH vysoce specificky (Ruegamer, 1965) a pomocí stanovení její aktivity lze charakterizovat hyper- i hypothyroidní stav.

Specifická enzymová aktivita mt GPDH byla měřena na spektrofotometru Shimadzu UV-1700 PharmaSpec napojeném na počítač a řízeném programem UV-Probe. K vyhodnocení měření byla použita funkce Operations – Main Table, kde bylo možné vybrat intervaly, ve kterých se sledovala změna absorbance v čase. Výsledek byl uveden v miliabsorbancích za minutu ( $\Delta A_{550}/\text{min}$ ). Aktivita GPDH byla stanovena spektrofotometricky jako rychlost redukce cytochromu c, katalyzovaná mitochondriální frakcí ve vzorku při nadbytku substrátu glycerol-3-fosfátu (t.j. stanovovala se glycerol-3-fosfát: cytochrom c oxidoreduktáza). Měřila se změna absorbance při vlnové délce  $\lambda=550$  nm při laboratorní teplotě po dobu 3 minut. Molární absorpční koeficient redukované formy cytochromu c je  $\varepsilon=19\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

Výpočet: Specifická enzymová aktivita - [nmol cyt c/min/mg prot]

$$\Delta n [\text{nmol}] = \Delta c [\text{mol/l}] \cdot V [\text{l}] \cdot 10^9$$

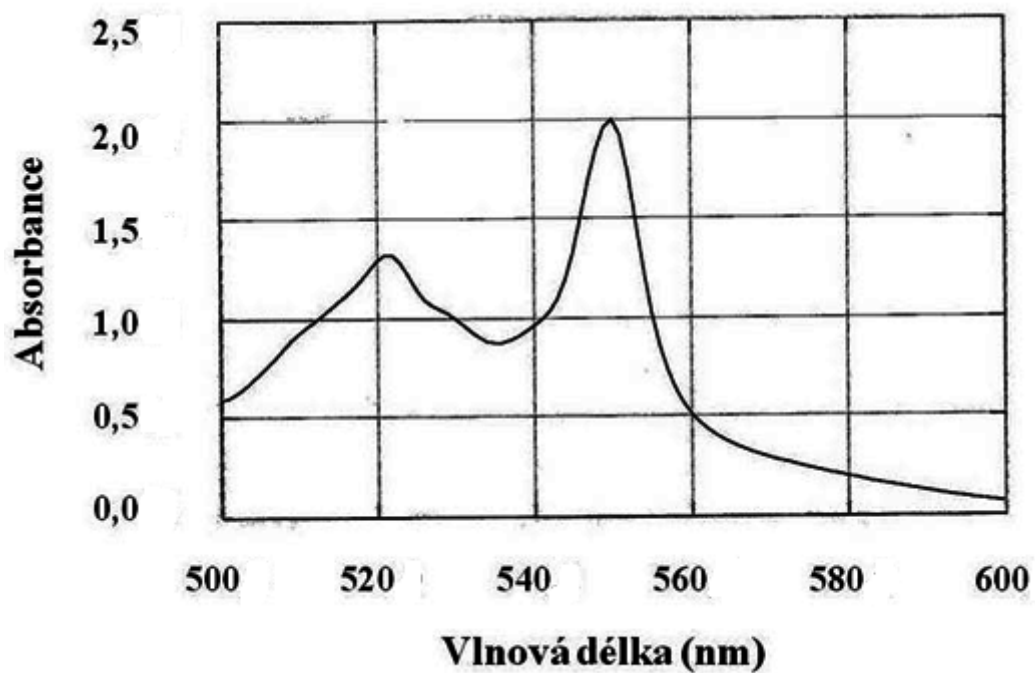
$$\Delta A_{550} = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot l \Rightarrow \Delta c = \frac{\Delta A_{550}}{\varepsilon \cdot l}; \Delta c [\text{mol/l}] = \frac{\Delta A_{550}/\text{min}}{19000 [\text{l/mol/cm}] \cdot 1 [\text{cm}]}$$

$$\Delta n [\text{nmol}] = \frac{\Delta A_{550}/\text{min} \cdot 10^9 \cdot 5 \cdot 10^{-4}}{19000}$$

$$\text{specifická aktivita} = \frac{\Delta A_{550}/\text{min} \cdot 26,316}{\text{mg prot/zk}} = \frac{\Delta m A_{550}/\text{min} \cdot 26,316}{\mu\text{g prot/zk}}$$

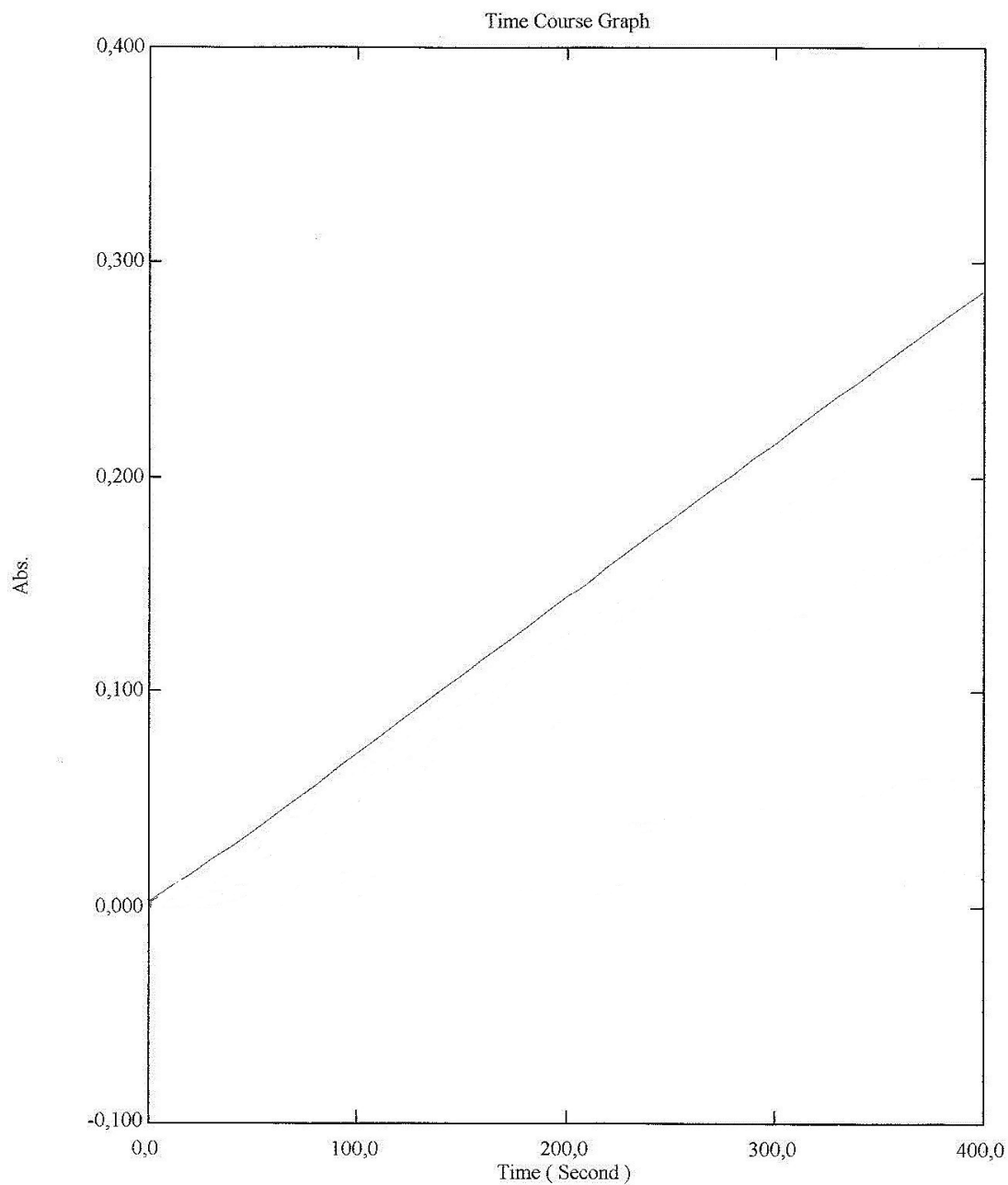
V **Grafu 13** je uvedeno absorpční spektrum redukováného cytochromu c změřené pomocí spektrofotometru Shimadzu UV 1700 PharmaSpec.





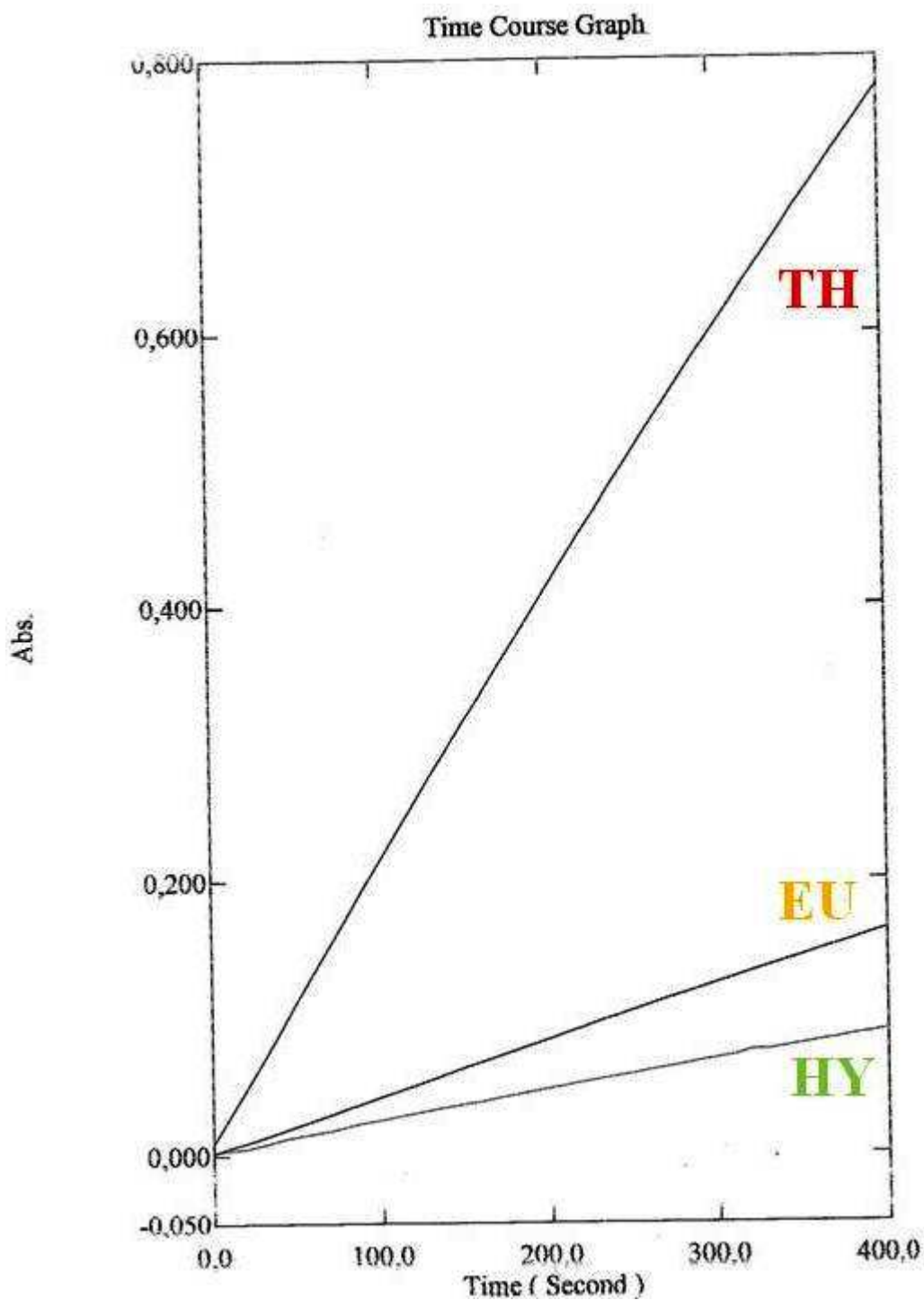
**Graf 13:** Absorpční spektrum redukované formy cytochromu c

**Grafy 14 a 15** jsou originální záznamy (ze spektrofotometru Shimadzu UV 1700, PharmaSpec) časového průběhu enzymové reakce mt GPDH v prvních 400 sekundách v případě vybraných vzorků mitochondriální frakce jater. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru UV-Probe.



**Graf 14:** Záznam změny absorbance v čase při fotometrickém stanovení enzymové aktivity GPDH v mt frakci jater hyperthyroidního (#5926, TH) potkana

**Graf 14** uvádí záznam změny absorbance v čase v případě vzorku mt frakce jater TH potkana, z něhož je patrný výrazný lineární dlouhodobý nárůst absorbance ( $\Delta A_{550}/\text{min}$ ).

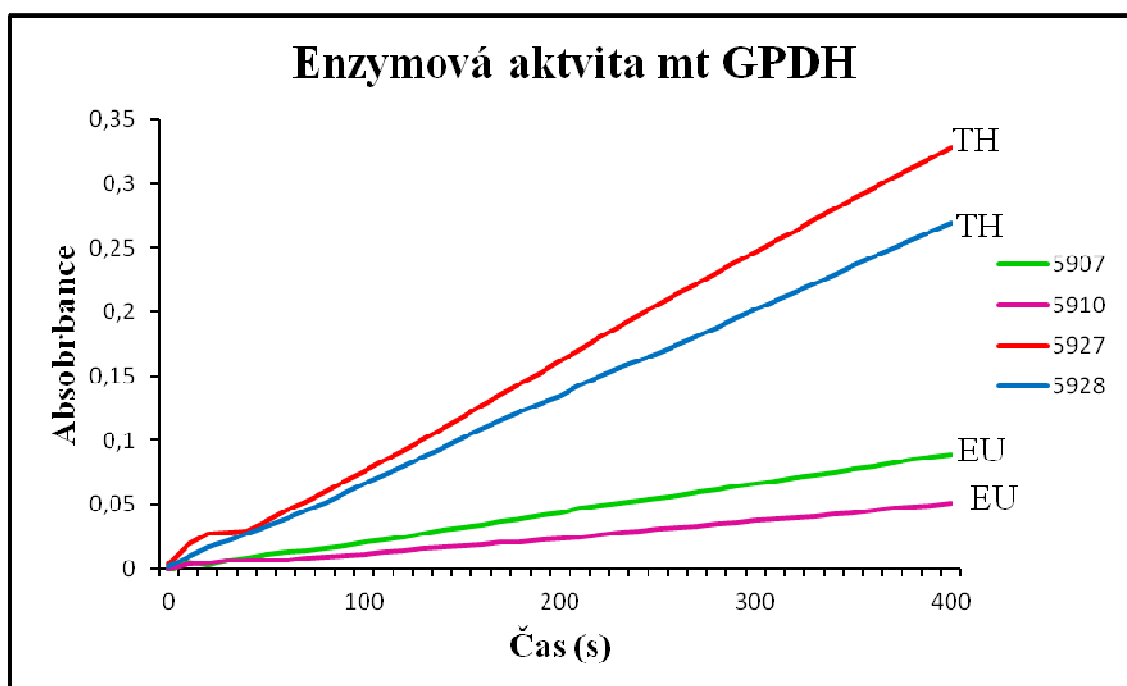


**Graf 15:** Záznam změny absorbance v čase při fotometrickém stanovení enzymové aktivity GPDH v mt frakci jater euthyroidního (#5910, EU), hyperthyroidního (#5927, TH) a hypothyroidního (#5916, HY) potkana

Z **Grafu 15** je patrný výrazný nárůst  $\Delta A_{550}/\text{min}$  v případě vzorku jater potkana, kterému byla podávána kombinace  $T_3$  a  $T_4$  (TH) oproti kontrolnímu zvířeti na standardní dietě (EU), což potvrzuje hyperthyroidní stav zvířete. Naopak u potkana, kterému byl

během experimentu podávání methimazol (HY), došlo ke zpomalení nárůstu  $\Delta A_{550}/\text{min}$  v porovnání se zvířaty v euthyroidním stavu (EU), z čehož lze usuzovat na hypothyroidní stav potkana. Z grafu je zřejmé, že měření enzymové aktivity mt GPDH je možno jednoznačně prokázat hyperthyroidní stav. Lze prokázat i hypothyroidní stav, ale výsledky nejsou tak jednoznačné, jako u hyperthyroidního stavu.

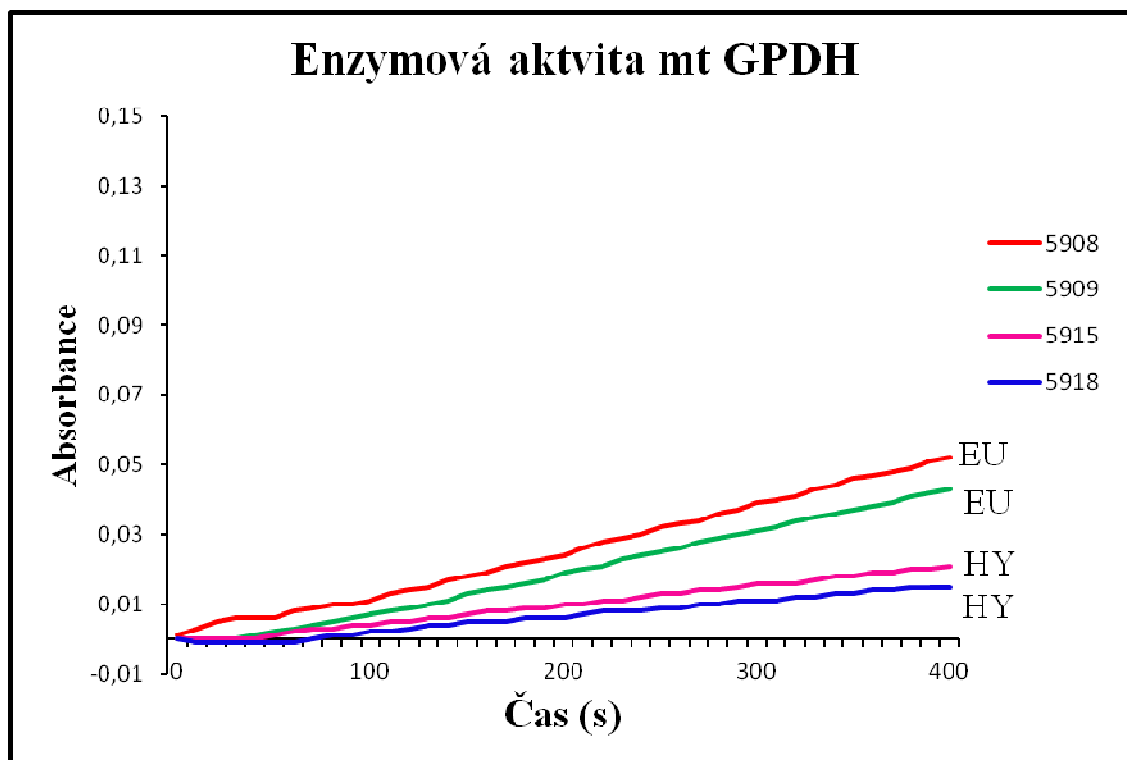
**Grafy 16 a 17** uvádí výsledky měření enzymové aktivity mt GPDH u skupin EU, TH a HY potkanů. Měření byla rovněž prováděna pomocí spektrofotometru Shimadzu UV 1700 PharmaSpec a programu UV Probe, ale záznamy byly dále upraveny pomocí programu Microsoft Excel.



**Graf 16:** Záznam změny absorbance v čase při fotometrickém stanovení enzymové aktivity GPDH v mitochondriální frakci jater hyperthyroidních (TH) a euthyroidních (EU) potkanů.

Z **Grafu 16** vyplývá, že u kontrolních zvířat krmených standardní dietou (EU) je nárůst  $\Delta A_{550}/\text{min}$  poměrně malý. Naopak u zvířat, kterým byla podávána kombinace thyreoidálních hormonů (TH) je patrný značný nárůst  $\Delta A_{550}/\text{min}$ , což potvrzuje hyperthyroidní stav těchto potkanů.

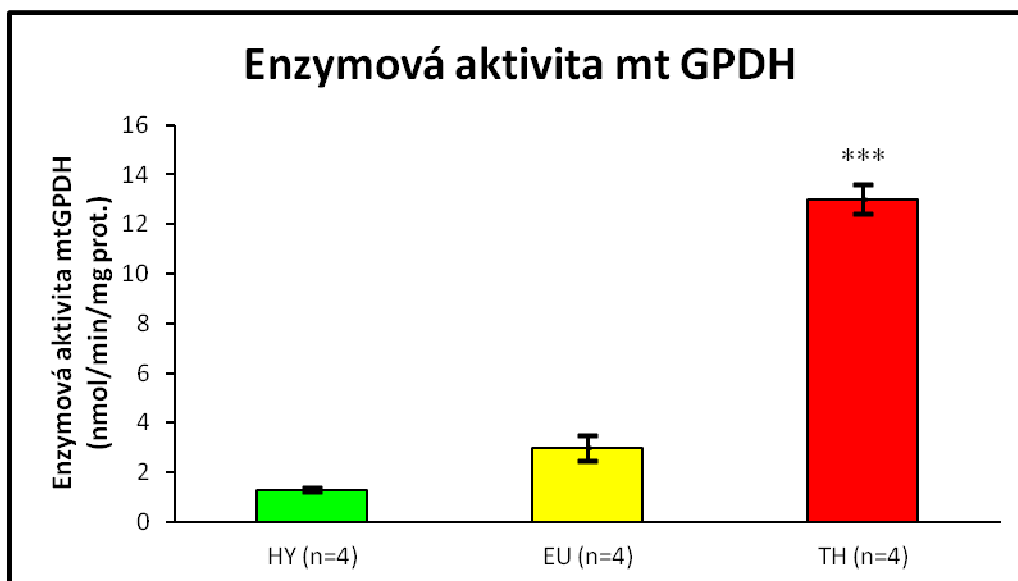
Stanovení enzymové aktivity mt GPDH bylo prováděno také ve vzorcích mt frakcí jater potkanů, kterým byl během experimentu podáván methimazol a tak měl být navozen a udržován hypothyroidní stav (HY) těchto zvířat. Příklad výsledků těchto měření ukazuje **Graf 17**. Je třeba si všimnout rozdílných jednotek na ose y (t.j. rozmezí hodnot, ve kterých se pohybují změny absorbance v čase) oproti **Grafu 16**.



**Graf 17:** Záznam změny absorbance v čase při fotometrickém stanovení enzymové aktivity GPDH v mt frakci jater hypothyroidních (HY) a euthyroidních (EU) potkanů.

V **Grafu 17** je patrný pokles rychlosti nárůstu  $\Delta A_{550}/\text{min}$  v případě vzorků jater potkanů krměných methimazolem (HY) oproti kontrolním zvířatům v euthyroidním stavu (EU), z čehož lze usuzovat na hypothyroidní stav těchto zvířat.

Pro sériová stanovení enzymové aktivity GPDH v mitochondriálních frakcích jater byly vybrány vzorky ze skupin euthyroidních (EU), hypothyroidních (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů. Výsledky měření jsou uvedeny v **Grafu 18**.



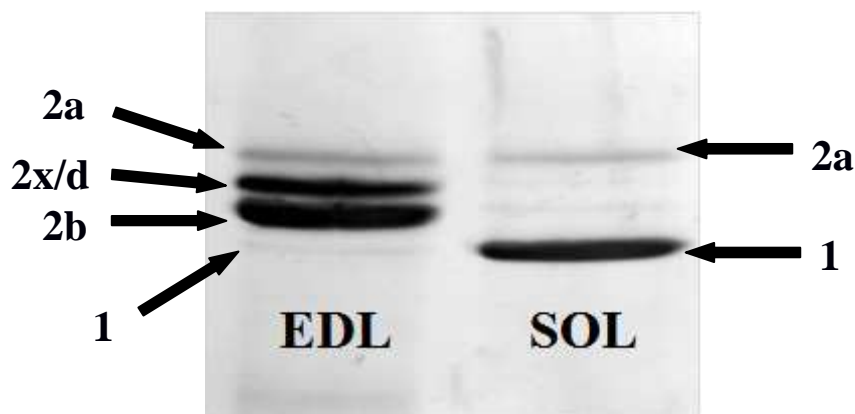
**Graf 18:** Porovnání enzymové aktivity mt GPDH u eu- (EU), hypo- (HY) a hyperthyroidních (TH) potkanů. Statistická významnost: \*\*\* $p < 0,001$  signifikantní rozdíly TH proti EU potkanům.

Z **Grafu 18** je zřejmé, že změny thyroideálního stavu vedly k signifikantním změnám enzymové aktivity mt GPDH. V porovnání s EU potkany podávání methimazolu způsobilo u HY potkanů pokles aktivity mt GPDH více než o 50%, zatímco u TH potkanů byla aktivita zvýšená o 433%.

#### 4.5. Exprese proteinových isoform MyHC

Ve shodě s předchozími literárními údaji byl v mé práci pozorován vliv změněného thyroideálního stavu potkanů na expresi proteinových isoform MyHC v jejich kosterních svalech. Získané elektroforegramy byly oskanovány a vyhodnoceny s použitím počítačového softwaru AIDA.

Bez ohledu na thyroideální stav byly v SOL experimentálních dospělých potkanů pomocí SDS-PAGE detekovány pouze pomalá isoforma MyHC 1 a rychlá isoforma 2a, zatímco v EDL dospělých potkanů byly identifikovány všechny čtyři hlavní proteinové isoformy MyHC 1, 2a, 2x/d a 2b (Obr. 13).

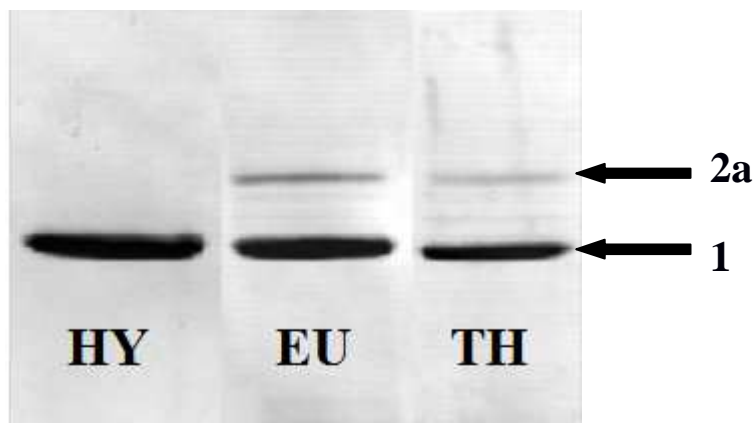


**Obr. 13:** *Elektroforetické rozdělení proteinových isoform MyHC 1, 2a, 2x/d a 2b v SOL a EDL u euthyroidního potkana #5907.*

V SOL dospělého euthyroidního potkana je zastoupena téměř výhradně pomalá isoforma MyHC 1 a malé množství rychlé isoformy 2a. EDL potkana v euthyroidním stavu obsahuje nejvíce nejrychlejší isoformy 2b (téměř 50 %), dále jsou zastoupeny také rychlé isoformy 2x/d a 2a. Pomalá isoforma 1 je v EDL detekovatelná, ale jen v nepatrném množství

#### **4.5.1. Změny obsahu proteinových MyHC isoform v SOL v závislosti na thyroidním stavu**

Zastoupení jednotlivých MyHC isoform v pomalém svalu SOL bylo stanoveno také u experimentálních zvířat s navozeným hyperthyroidním a hypothyroidním stavem. Na **Obr. 14** je vidět elektroforetická separace MyHC isoform u hyperthyroidního a hypothyroidního potkana v porovnání se zvířetem v euthyroidním stavu.

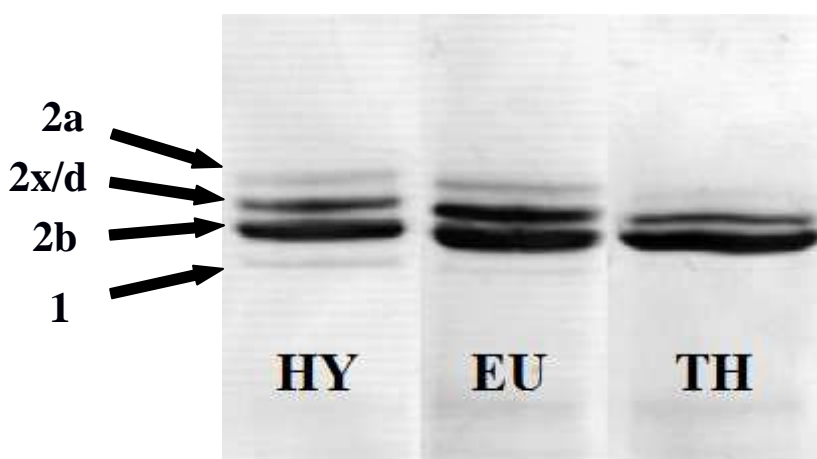


**Obr. 14:** Elektroforetické rozdělení proteinových isoform MyHC 1 a 2a v SOL hypothyroidního (#5916, HY), euthyroidního (#5909, EU) a hyperthyroidního (#5927, TH) potkana.

V SOL hypothyroidních potkanů došlo k nárůstu pomalé MyHC isoformy 1 a poklesu obsahu rychlé MyHC isoformy 2a, zatímco hyperthyroidní stav byl spojen s nárůstem obsahu rychlé isoformy MyHC 2a a snížení obsahu isoformy MyHC 1 oproti euthyroidnímu stavu.

#### 4.5.2. Změny obsahu proteinových isoform MyHC v EDL v závislosti na thyroidním stavu

Stejně jako u SOL bylo stanoveno zastoupení MyHC isoform u hyperthyroidních, hypothyroidních a euthyroidních potkanů také u rychlého svalu EDL (Obr. 15).

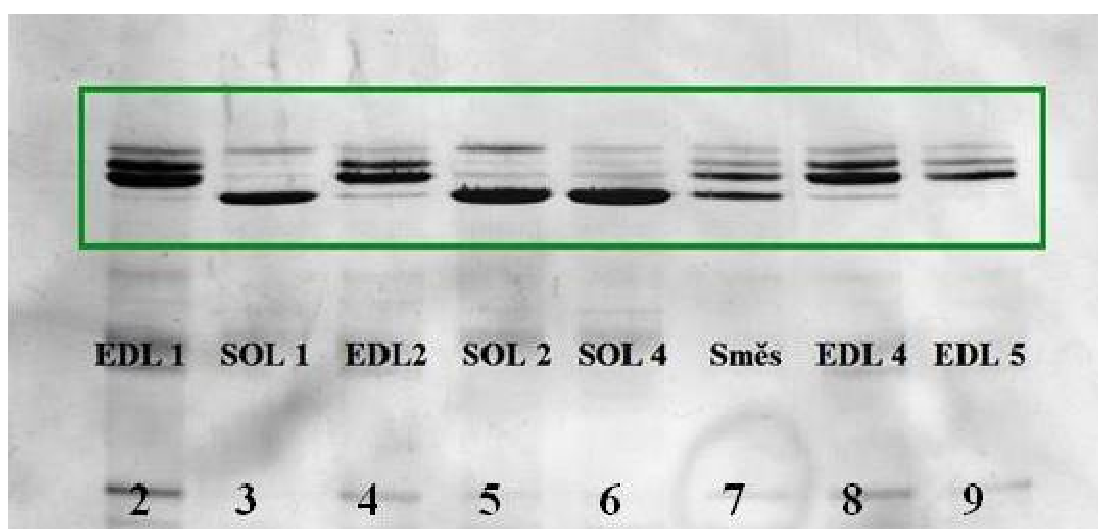


**Obr. 15:** Elektroforetické rozdělení proteinových isoform MyHC 1, 2a, 2x/d a 2b v EDL hypothyroidního (#5917, HY), euthyroidního (#5908, EU) a hyperthyroidního (#5926, TH) potkana.



Hyperthyroidní stav vedl u EDL k snížení obsahu MyHC isoformy 2a a pomalé isoformy MyHC 1, jejíž obsah byl snížen zhruba o polovinu oproti euthyroidnímu stavu. Došlo naopak k nárůstu obsahu „nejrychlejší“ isoformy MyHC 2b. U EDL zvířat s indukovaným hypothyroidním stavem byly pozorovány přesně opačné změny, probíhala tedy transformace fenotypu ve směru MyHC 2b→ MyHC 2x/d→MyHC 2a→MyHC 1

**Obr. 16** je oskanovaný elektroforegram 8 vzorků kosterních svalů SOL a EDL po rozdělení MyHC isoformem.



**Obr. 16:** Oskanovaný elektroforegram po rozdělení MyHC isoformem pomocí SDS-PAGE a barvení stříbrem. Rámečkem je označena oblast, kde se nacházejí rozdělené MyHC isoformy. Pod rámečkem jsou popsány dráhy 2-9, které odpovídají tabulce Tab. 4.

Zastoupení jednotlivých isoformem se vyjádří podle vzorce:

$$\%MyHC\ x = 100 \times \frac{\text{plocha MyHC } x \text{ int. zč.}}{\sum \text{všech ploch MyHC } x \text{ int. zč.}}$$

(x = libovolná forma MyHC; int. zč. = intenzita zčernání)

Výsledky vyhodnocení elektroforegramů (kvantifikace isoformem MyHC), získané s použitím programu AIDA, jsou přehledně shrnuty do tabulky (Tab. 4) s uvedením označení vzorku, typu svalových vláken a procentuelním zastoupením jednotlivých MyHC isoformem.

**Tab. 4:** Kvantitativní vyhodnocení elektroforegramu uvedeného na Obr. 16

Dráha	Vzorek	Obsah skvrn			
		#	Typ	Integrál	%
2	EDL 1	1	2a	1528870	11,2
		2	2x/d	4 583 241	33
		3	2b	7 496 278	55
		4	1	109778,4	0,8
		5	BG	0	0
			<b>Total</b>	13718166	<b>100</b>
3	SOL 1	6	2a	816114,4	12
		7	2x/d	91 861	1
		8	2b	159 034	2
		9	1	6 047 320	85
		10	BG	0	0
			<b>Total</b>	7114329	<b>100</b>
4	EDL 2	11	2a	613901,6	6,5
		12	2x/d	2133950	22,7
		13	2b	6211105	66,1
		14	1	444601	4,7
		15	BG	0	0
			<b>Total</b>	9403557	<b>100</b>
5	SOL 2	16	2a	1585556	14,8
		17	2x/d	206538,2	1,9
		18	2b	507217	4,7
		19	1	8410119	78,6
		20	BG	0	0
			<b>Total</b>	10709430	<b>100</b>
6	SOL 4	21	2a	543579	5,5
		22	2x/d	344636,1	3,5
		23	2b	928701,3	9,4
		24	1	8043363	81,6
		25	BG	0	0
			<b>Total</b>	9860280	<b>100</b>
8	EDL 4	31	2a	685061,9	7
		32	2x/d	3 001 994	30
		33	2b	6 045 125	60
		34	1	282 250	3
		35	BG	0	0
			<b>Total</b>	10014432	<b>100</b>
9	EDL 5	36	2a	869379,4	13
		37	2x/d	2015110	30,6
		38	2b	3580279	54,4
		39	1	111 590	2
		40	BG	0	0
			<b>Total</b>	6576359	<b>100</b>

## 5. DISKUSE

### Markery thyroidního stavu – anatomické parametry

Jedním z cílů práce bylo experimentálně navodit hyperthyroidní a hypothyroidní stav a tuto změnu thyroidního stavu potvrdit vhodnými parametry, u kterých se předpokládá, že budou touto změnou ovlivněny. Protože thyreoidální hormony výrazně ovlivňují štítnou žlázu a kardiovaskulární systém (Rauchová et al., 2004), sledovala jsem změny hmotnosti srdce a štítné žlázy u potkanů, u nichž byl experimentálně navozen hyperthyroidní nebo hypothyroidní stav v porovnání s potkany v euthyroidním stavu. Hypothyroidní potkani vykazovali významně nižší relativní a absolutní hmotnost srdce a současně vyšší relativní a absolutní hmotnost štítné žlázy v porovnání s kontrolními potkany. Naopak hyperthyroidní stav vedl k opačným změnám relativní a absolutní hmotnosti srdce a štítné žlázy oproti euthyroidnímu stavu. Získaná data pro absolutní a relativní hmotnosti srdce a štítných žláz potkanů při různém thyroidním stavu (**Tab. 2**) jsou ve shodě s výsledky předcházejících experimentů (Rauchová et al., 2011; Rauchová et al., 2004; Soukup et al., 2001).

Vzhledem k možnému využití RPO při léčbě selhání funkce srdce a k prevenci před negativní přestavbou srdeční tkáně (Mitašíková et al., 2008) jsem sledovala také jeho vliv na anatomické parametry ovlivňované thyroidním stavem (**Grafy 5 a 6**). Cílem nebylo kvantifikovat působení RPO, ale analyzovat zda má na působení TH pozitivní vliv. Z **Grafů 5 a 6** je zřejmé, že RPO potlačuje účinky TH, což je v souladu s výsledky pilotních studií, které uvádějí pozitivní účinky RPO na patofyziologické změny způsobené vlivem TH (Mitašíková et al., 2008; Bačová et al., 2010; Tribulová et al., 2010).

### Biochemické parametry

Dalším sledovaným parametrem thyroidního stavu bylo stanovení celkové koncentrace TH v krevním séru (**Grafy 7 a 8**). Sérová koncentrace  $tT_3$  a  $tT_4$  u TH potkanů vzrostla přibližně 2,5 krát, zatímco u HY potkanů došlo k poklesu sérová koncentrace  $tT_3$  a  $tT_4$  o 25%, resp. o 72% v porovnání s EU skupinou. Vzhledem k tomu, že byla TH skupině zvířat podávána kombinace  $T_3$  a  $T_4$ , jsou tyto výsledky ve shodě s předchozími experimenty (Rauchová et al., 2004; Soukup et al., 2001).

V laboratoři bylo nově zavedeno i stanovení koncentrace volných frakcí TH. Ty daleko lépe a výrazněji vypovídají o reálné dostupnosti TH tkáním a jsou lepším odrazem thyrooidního stavu jedince (viz **Grafy 9 a 10**). U TH zvířat vzrostla koncentrace  $fT_3$  i  $fT_4$  v krevním séru o 161%, zatímco HY stav vyvolal výrazné snížení koncentrace  $fT_3$  (o 84%) a  $fT_4$  (o 74%) v krevním séru v porovnání s kontrolní skupinou.

Také výsledky měření vlivu RPO na koncentraci  $tT_4$  a  $fT_4$  v krevním séru (**Grafy 11 a 12**) potvrzují pozitivní účinky RPO na potlačení vlivu TH. U skupiny hyperthyroidních potkanů s přidáváním RPO (TH+RPO) v dietě došlo k viditelnému snížení koncentrace  $tT_4$  a  $fT_4$  oproti hyperthyroidním potkanům, kterým RPO nebyl podáván (TH).

### **Stanovení enzymové aktivity GPDH**

Protože je známo, že thyreoidální hormony mají výrazný vliv na aktivitu mt GPDH v různých savčích orgánech, jako jsou játra a kosterní nebo srdeční svaly (Lee and Lardy, 1965; Dümmler et al., 1996), byla enzymová aktivita jaterní mt GPDH zvolena jako další marker pro potvrzení změny thyrooidního stavu. Pro měření enzymové aktivity mt GPDH jsem vybrala soubory vzorků jaterní tkáně samců potkana, kterým byl podáván buď methimazol (HY), nebo kombinace  $T_3$  a  $T_4$ , a vzorky kontrolních zvířat bez podávání jakýchkoliv farmak (EU). Z výsledků měření (**Graf 18**) vyplývá, že podávání jak methimazolu, tak i kombinace  $T_3$  a  $T_4$  vedlo k signifikantním změnám enzymové aktivity mt GPDH. U TH potkanů došlo k zvýšení enzymové aktivity mt GPDH o 433%, zatímco HY stav vedl ke snížení aktivity více jak o 50%. Výsledky měření enzymové aktivity jsou ve shodě s předešlými experimenty (Rauchová et al., 2011; Rauchová et al., 2004).

Měřením hmotnosti těla, absolutních a relativních hmotností srdce a štítné žlázy, koncentrace celkového trijodthyroninu ( $tT_3$ ) a thyroxinu ( $tT_4$ ), volného trijodthyroninu ( $fT_3$ ) a thyroxinu ( $fT_4$ ) v krevním séru a enzymové aktivity mt GPDH bylo potvrzeno, že všechny tyto zvolené parametry jsou vhodnými a spolehlivými markery pro stanovení thyrooidního stavu potkanů. Nejcitlivějším markerem změny thyrooidního stavu je enzymová aktivita mt GPDH.

Na změnu thyrooidního stavu reagují samci i samice potkana, samice ale reagují na změnu hladiny thyreoidálních hormonů citlivěji (Novák et al., 2010; Rauchová et al., 2011). Větší citlivost samic na účinky TH oproti samcům lze vysvětlit protektivními

účinky testosteronu proti thyreotoxikóze, zatímco estrogen rozvoj onemocnění podporuje. Je zajímavé, že poruchy funkce štítné žlázy u člověka postihují zhruba 5-7% populace, ale poměr postižených žen a mužů je 6-8:1 (Límanová, 2011). V mé diplomové práci jsem použila pro ilustraci výsledky experimentu RPO 11/3, v němž byli použiti jen samci potkana.

### **Elektroforetická separace proteinových MyHC isoform**

Pomocí SDS-PAGE a barvení stříbrem jsem stanovovala zastoupení jednotlivých isoform těžkých řetězců myosinu (MyHC) ve specifických typech kosterních svalů. Nejdříve bylo nutné upravit metodu SDS-PAGE (Tallmadge and Roy, 1993), aby došlo k úplnému a správnému rozdělení velmi podobných proteinů - MyHC isoform. Experimentálně bylo zjištěno, že elektroforéza musí probíhat po dobu cca 20 hodin při 4°C, aby došlo k správnému rozdělení MyHC isoform. V pomalém svalu SOL jsem ve shodě s literaturou (Fitzimons et al., 1990; Caiozzo et al., 1998; Schiaffino and Reggiani, 1994; Pette and Staron, 2000) detekovala pouze pomalou isoformu MyHC 1 a rychlou isoformu 2a, zatímco v EDL potkanů byly zastoupeny všechny čtyři hlavní proteinové isoformy MyHC 1, 2a, 2x/d a 2b (**Obr. 13**).

### **Vliv thyroideálního stavu na expresi MyHC isoform**

Dále jsem sledovala remodelaci tkáně lýtkového svalu (SOL) a svalu natahovače prstů nohy (EDL) – zastoupení jednotlivých proteinových isoform těžkých řetězců myosinu v závislosti na thyroideálním stavu potkanů. V SOL hypothyroideálních potkanů došlo k nárůstu pomalé MyHC isoformy 1 a k poklesu obsahu rychlé MyHC isoformy 2a, zatímco hyperthyroideální stav byl spojen s přesně opačnými změnami.

U rychlého svalu EDL vedl TH stav k snížení obsahu isoformy MyHC 2a a výraznému snížení pomalé isoformy MyHC 1. Naopak došlo k nárůstu obsahu isoformy MyHC 2b. HY stav u rychlých svalů indukoval transformaci fenotypu ve směru MyHC 2b → MyHC 2x/d → MyHC 2a → MyHC 1. Výsledky vlivu thyroideálního stavu na expresi proteinových isoform MyHC v SOL i EDL odpovídají předchozím experimentům (Fitzimons et al., 1990; Caiozzo et al., 1992; D'Albis a Butler Browne, 1993; Soukup a Jirmanová, 2000; Soukup et al., 2002; Vadászová et al., 2006a; Vadászová et al., 2006b).

Z výsledků vlivu thyroideálního stavu na zastoupení jednotlivých MyHC isoform v SOL a EDL (**Obr. 14 a 15**) lze vyčíst, že HY stav už jen nepatrně zpomalil už tak „pomalý“ sval SOL a naopak, že TH stav jen málo urychlil „rychlý“ EDL. Tato

skutečnost potvrzuje, že vnější faktory (v mém případě TH) ovlivňují fenotyp svalových vláken jen v rozsahu geneticky determinovaných adaptačních možností svalových vláken (Bandman, 1985; D'Albis and Butler-Browne, 1993; Pette and Staron, 1997).

Tyto výsledky jednoznačně potvrzují, že kosterní svalstvo je významným cílovým orgánem thyreoidálních hormonů, které výrazně přispívají k průběhu diferenciaci fenotypu kosterních svalů.

## 6. ZÁVĚR

Cílem práce bylo experimentálně navodit hyperthyroidní a hypothyroidní stav u potkanů, jako model patofyziologického stavu organismu, a měřením celé řady parametrů definovat dosaženou změnu thyroideálního stavu. Jako parametry, u kterých se předpokládalo, že budou ovlivněny změnou thyroideálního stavu, jsem zvolila jednak změny některých anatomických parametrů (absolutní a relativní hmotnosti srdce a štítné žlázy), jednak změny biochemických parametrů - koncentrace celkového trijodthyroninu ( $tT_3$ ) a thyroxinu ( $tT_4$ ) a volného trijodthyroninu ( $fT_3$ ) a thyroxinu ( $fT_4$ ) v krevním séru, a také změny aktivity mitochondriálního flavoprotein dependentního enzymu glycerol-3-fosfát dehydrogenasy (mt GPDH). Dalším cílem bylo sledovat vliv thyroideálního stavu na remodelaci tkáně lýtkového svalu (SOL) a svalu natahovače prstů nohy (EDL) – zastoupení jednotlivých proteinových isoformů těžkých řetězců myosinu (MyHC) v těchto kosterních svalech. A dále analyzovat, jestli může podávání preparátu červeného palmového oleje (RPO) v dietě pozitivně zasahovat do těchto změn, jak se očekávalo, ale zatím nebylo prokázáno.

- Provedla jsem několik farmakologických experimentů *in vivo* na laboratorních potkanech, kterým byla po vždy dobu 7 týdnů kontinuálně podávána buď kombinace thyroideálních hormonů nebo methimazol, bez nebo s přidavkem RPO. Na konci experimentálního období byli potkani utraceni a byly z nich odebrány vzorky krve a tkání, které byly následně zpracovány pro izolaci frakcí.
- U experimentálních zvířat se podařilo navodit hypo- a hyperthyroidní stav a definovat ho celou řadou parametrů. Zvolené parametry, u kterých se předpokládalo, že jejich hodnoty budou ovlivněny účinky thyroideálních hormonů, byly potvrzeny jako vhodné a spolehlivé markery thyroideálního stavu.
- Modifikovanou metodou (s použitím spektrofotometru Shimadzu UV-1700 PharmaSpec napojeném na počítač a řízeném programem UV-Probe) jsem stanovila enzymovou aktivitu mt GPDH v sériích vzorků mitochondriálních frakcí jater, připravených ze skupin zvířat s různým farmakologickým ovlivněním. Potvrdila jsem, že mt GPDH velice citlivě reaguje na změny

koncentrace thyreoidálních hormonů. U TH potkanů došlo k zvýšení enzymové aktivity mt GPDH v průměru o 433%, zatímco HY stav vedl ke snížení aktivity více jak o 50% ve srovnání se skupinou euthyroidních (EU) potkanů.

- Upravila jsem stávající metodu SDS-PAGE pro separaci a správnou detekci jednotlivých isoform těžkých řetězců myosinu. V pomalém svalu SOL byla takto detekována pouze pomalá isoforma MyHC 1 a rychlá isoforma 2a, zatímco v EDL potkanů byly zastoupeny všechny čtyři hlavní proteinové isoformy MyHC 1, 2a, 2x/d a 2b.
- V SOL HY potkanů došlo k nárůstu pomalé MyHC isoformy 1 a k poklesu obsahu rychlé MyHC isoformy 2a, zatímco hyperthyroidní stav byl spojen s přesně opačnými změnami. U rychlého svalu EDL vedl TH stav k snížení obsahu isoformy MyHC 2a a výraznému snížení pomalé isoformy MyHC 1. Naopak došlo k nárůstu obsahu isoformy MyHC 2b. HY stav u rychlých svalů indukoval transformaci fenotypu ve směru MyHC 2b → MyHC 2x/d → MyHC 2a → MyHC 1. Výsledky stanovení vlivu thyroideálního stavu na expresi proteinových isoform MyHC v SOL i EDL jsou v souladu s výsledky již dříve na pracovišti dosaženými.
- Z výsledků měření anatomických i biochemických parametrů vyplývá, že RPO potlačuje účinky TH. To potvrzuje možnost využití RPO při léčbě selhání srdeční činnosti, a také jeho protektivní vliv na nežádoucí přestavbu srdečního a kosterního svalstva.



## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Aranda A., Pascual A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**, 1269-1304
2. Bačová B., Radošinská J., Soukup T., Tribulová N. (2011) Effect of omega-3 fatty acids diet on myocardial connexin-43 expression in Lewis rats with altered thyroid status. *Physiol Res* **60**, 25
3. Bandman E. (1985) Myosin isoenzyme transitions in muscle development, maturation, and disease. *Int Rev Cytol* **97**, 97-131
4. Bester D., Esterhuyse A. J., Truter E. J., Van Rooyen J. (2010) Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutrition Research Reviews* **23(2)**, 334-48
5. Blum H., Beier H., Gross H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99
6. Braverman L. E., Utiger R. D. (2005) *Werner and Ingbar's The Thyroid: a fundamental and clinical text*, 9th Edition., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0-7817-5047-4
7. Butler-Browne G., Barbet J. P., Thornell L-E. (1990) Myosin heavy and light chain expression during human skeletal muscle development and precocious muscle maturation induced by thyroid hormone. *Anat Embryol* **181**, 513-522
8. Butler-Browne G. S., Herlicoviez D., Whalen R. G. (1984) Effect of hypothyroidism on myosin isozyme transitions in developing rat muscle. *FEBS Lett* **166**, 71-75

9. Caiozzo V. J., Baker M. J., Baldwin K. M. (1998) Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol* **85**, 2237–2248
10. Caiozzo V. J., Herrick R. E., Baldwin K. M. (1992) Response of slow and fast muscle to hypothyroidism: maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am J Physiol* **263**, 86-94
11. Chin W. W., Yen P. M. (1997) Molecular mechanism of nuclear thyroid hormone action. In: *Contemporary Endocrinology: Ceseases of the Thyroid*, LE BRAVERMAN (ed), Humana Press, Totowa, pp 1-15
12. d’Albis A., Butler-Browne G. (1993) The hormonal control of myosin isoform expression in skeletal muscle of mammals: a review. *Basic Appl Myol* **3**, 7-16
13. d’Albis A., Chanoine C., Janmot C., Mira J. C., Couteaux R. (1990) Muscle-specific response to toroid hormone of myosin isoform transitions during rat postnatal development. *Eur J Biochem* **193**, 155-161
14. Das S., Lekli I., Das M., Szabo G., Varadi J., Juhasz B., Bak I., Nesaretam K., Tosaki A., Powell S. R., Das D. K. (2008) Cardioprotection with palm oil tocotrienols: comparision of different isomers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, 970–978
15. Dümmler K., Miller S., Seitz H. J. (1996) Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *Biochem J* **317**, 913-918
16. Edem D. O. (2002) Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* **57**, 319–341

17. Fauteck S. P., Kandarian S. C. (1995) Sensitive detection of myosin heavy chain composition in skeletal muscle under different loading conditions. *Am J Physiol* **268**, 419–424
18. Fitzsimons D. P., Herrick R. E., Baldwin K. M. (1990) Isomyosin distribution in rodent muscles: effects of altered thyroid state. *J Appl Physiol* **69**, 321–327
19. Ganong F. W. (2005) *Přehled lékařské fyziologie*. Galén, Praha, s. 890
20. Gardner R. S. (1974) A sensitive colorimetric assay for mitochondrial  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase. *Anal Biochem* **59**, 272-276
21. Hamalainen N., Pette D. (1995) Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. *Microsc Res Tech* **30**, 381–389
22. Hughes S. M., Blau H. M. (1992) Muscle fibre pattern is independent of cell lineage in postnatal rodent development. *Cell* **68**, 659-671
23. Izumo S., Mahdavi V. (1988) Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature* **334**, 539-542
24. Konrádová V. (1993) *Poznámky k přednáškám z histologie*. Jinočany: H & H, s. 328
25. Lee Y. P., Lardy H. A. (1965) Influence of thyroid hormones on L- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J Biol Chem* **240**, 1427-1436
26. Leinwand L. A., Saez L., McNally E., Nadal-Ginard B. (1983) Isolation and characterization of human myosin heavy chain genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 3716–3720

27. Límanová Z. (2009) The thyroid gland-running the show blind the scenes. *Cas Lek Ces* **148**, 83-85
28. Lu Ch., Cheng S. Y. (2010) Thyroid hormone receptors regulate adipogenesis and carcinogenesis via crosstalk signaling with peroxisome proliferator-activated receptors. *Journal of Molecular Endocrinology* **44**, 143-154
29. Mitašiková M., Šmidová S., Mascaliová A., Knezl V., Dlugošová K., Okruhlicová L., Weismann P., Tribulová N. (2008) Aged male and female spontaneously hypertensive rats benefit from n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation. *Physiol Res* **57**, 39-48
30. Novák P., Zachařová G., Soukup T. (2010) Individual, age and sex differences in fiber type composition of slow and fast muscles of adult Lewis rats: comparison with other rat strains. *Physiol Res* **59**, 783-801
31. Okamura K., Taurog A., Krulich L. (1981) Hypothyroidism in severely iodine-deficient rats. *Endocrinology* **109**, 464-468
32. Pavelka S. (2012) Use of  $^{82}\text{Br}$  and  $^{131}\text{I}$  radionuclides in studies of goitrogenic effects of exogenous bromide. *J Radioanal Nucl Chem* **29**, 379–383
33. Pette D., Staron R. S. (1990) Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **116**, 1–76
34. Pette D., Staron R. S. (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* **170**, 143–223
35. Pette D., Staron R. S. (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique* **50**, 500–509
36. Rauchová H., Mráček T., Novák P., Vokurková M., Soukup T. (2011) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase expression and oxygen consumption in liver

mitochondria of female and male rats with chronic alteration of thyroid status. *Horm Metab Res* **43**, 43-47

37. Rauchová H., Zachařová G., Soukup T. (2004) Influence of chronically altered thyroid status on the activity of liver mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in female inbred Lewis rats. *Horm Metab Res* **36**, 286-290
38. Ruegamer W. R., Newman G. H., Richert D. A., Westerfeld W. W. (1965) Specificity of the glycerolphosphate dehydrogenase and malic enzyme response to thyroxine. *Endocrinology* **77**, 707-715
39. Schiaffino S., Reggiani C. (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* **77**, 493-501
40. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H. et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Bioch.* **150**, 76-85
41. Soukup T., Jirmanová I. (2000) Regulation of myosin expression in developing and regenerating extrafusal and intrafusal muscle fibers with special emphasis on the role of thyroid hormones. *Physiol Res* **49**, 617-633
42. Soukup T., Zachařová G., Smerdu V., Jirmanová I. (2001) Body, heart, thyroid gland and skeletal muscle weight changes in rats with altered thyroid status. *Physiol Res* **50**, 619-626
43. Soukup T., Zachařová G., Smerdu V., Vadászová A. (2002) Muscle fibre types in rats with altered thyroid status. *Physiol Res* **51**, 42
44. Stárka L. a kol. (1999) *Aktuální endokrinologie*. Praha, Maxdorf-Jessenius, s.r.o.
45. Stephenson G. M. M. (2006) Diversity and plasticity of vertebrate skeletal muscle: Insight from hybrid fibres. *Braz J Morphol Sci* **23(2)**, 187-194

46. Tallmadge R. J., Roy R. R. (1993) Electrophoretic separation on the rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* **75**, 2337-2340
47. Tribulová N., Knezl V., Shainberg A., Seki S., Soukup T. (2010) Thyroid hormones and cardiac arrhythmias. *Vascular Pharmacology* **52(3-4)**, 102–112
48. Trojan, S. a kol. (2003) *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4. přeprac. a dopl. Praha. Grada
49. Vadászová A., Hudecová S., Križanová O., Soukup T. (2006a) Levels of myosin heavy chain mRNA transcripts and content of protein isoforms in the slow soleus muscle of 7-month-old rats with altered thyroid status. *Physiol Res* **55**, 221- 225
50. Vadászová A., Hudecová S., Križanová O., Soukup T. (2006b) Levels of myosin heavy chain mRNA transcripts and protein isoforms in the fast extensor digitorum longus muscle of 7-month-old rats with chronic thyroid status alterations. *Physiol Res* **55**, 707-710
51. Vadászová A., Zachařová G., Macháčová K., Jirmanová I., Soukup T. (2004) Influence of thyroid status on the differentiation of slow and fast muscle phenotypes. *Physiol Res* **53** (Suppl. 1), 57-61
52. Vadászová-Soukup A., Soukup T. (2007) Dual role of thyroid hormones in rat soleus muscle MyHC isoform expression. *Physiol Res* **56**, 833-836
53. Weiss A., Schiaffino S., Leinwand L. A. (1999) Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *J Mol Biol* **290**, 61–75
54. Zachařová G., Smerdu V., Semelová V., Mráčková K., Macháčová K., Soukup T. (2002) Muscle fibre cross-sectional area and thyroid status. *Physiol Res* **51**, 52

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS	adenosin-5'-fosfosulfát
B	mozek
BCA	kyselina bichinoninová (kyselina 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová)
BSA	hovězí sérový albumin
CVD	kardiovaskulární onemocnění (cardiovascular diseases)
cyt	cytosolová frakce
D1	jodothyronin dejodasa typu 1
D2	jodothyronin dejodasa typu 2
D3	jodothyronin dejodasa typu 3
DBD	DNA-vazebná doména (DNA binding domain)
dieta ST	standardní laboratorní dieta
DIT	3,5-dijodtyrosin
DTT	1,4-dithiotreitol
EDL	natahovač prstů nohy (musculus extensor digitorum longus )
fT <sub>3(4)</sub>	volná frakce T <sub>3(4)</sub>
GPDH	glycerol-3-fosfát dehydrogenasa
GT	štítná žláza (glandula thyroidea)
H	srdce (heart)
ICHS	ischemická choroba srdeční
INT	2- <i>p</i> -jodofenyl-3- <i>p</i> -nitrofenyl-5-fenyltetrazolium chlorid
IRD	dejodace na vnitřním kruhu (inner ring deiodination)
K	ledviny (kidney)
L	játra (liver)
LBD	ligand-vázající doména (ligand binding domain)
M	sval (muscle)
MIT	3-monojodtyrosin
MMI	1-methyl-2-merkptoimidazol, methimazol
ms	mikrosomová frakce
mt GPDH	mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenasa
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acids)
MyHC	těžké řetězce myosinu (myosin heavy chains)

ORD	dejodace na vnějším kruhu (outer ring deiodination )
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PIC	protease inhibitor cocktail, směs inhibitorů proteas
PMS	fenazin methosulfát
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid, inhibitor proteas
post-mt sup	postmitochondriální supernatanty
PTU	6-n-propyl-2-thiouracil
PUFA	polynenasyčené mastné kyseliny (angl. polyunsaturated fatty acids)
RIA	radioimunoanalýza
RAR	receptory pro kyselinu retinovou
RPO	červený palmový olej (red palm oil)
rT <sub>3</sub>	reversní 3,3',5'-trijodthyronin
RXR	retinoidní receptory
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SD	směrodatná odchylka
SFA	nasyčené mastné kyseliny (saturated fatty acids)
SOL	lýtkový sval (musculus soleus)
T <sub>0</sub>	thyronin
T <sub>2</sub>	3,3'-dijodthyronin
T <sub>3</sub>	3,5,3'-trijodthyronin
T <sub>4</sub>	3,5,3',5'-tetrajodthyronin, thyroxin
TPO	thyreoidální peroxidasa
TR	receptory pro thyreoidální hormony
TRE	thyroid response element
TRH	thyreotropin uvolňující hormon
TSH	thyreotropin (hypofyzární thyroideu stimulující hormon)
tT <sub>3(4)</sub>	celková frakce tT <sub>3(4)</sub>
VDR	receptory pro vitamin D