

Jasenska Kraljević, dr. med.
Zavod za integrativnu fiziologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Šoltanska 2, 21000 Split
Kontakt telefon: +385 91 542 8561
E-mail: jasenka.kraljevic@mefst.hr

Datum prijave: 23. srpnja 2013.

POVJERENSTVU ZA DOKTORATE

Predmet: OBRAZLOŽENJE TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

Naslov teme: „**Učinak aerobnog intervalnog treninga na patološko remodeliranje i mitohondrijsku disfunkciju u štakora s poslijefarktnim zatajenjem srca**“

Mentorica: Prof.dr.sc. Jasna Marinović, dr.med.
Zavod za integrativnu fiziologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Tel: 021 557 946
E-mail: jasna.marinovic@mefst.hr

UVOD

Kronično zatajenje srca nastaje kao posljedica strukturnih i funkcionalnih oštećenja srčanog mišića zbog kojih srce kao crpka više ne može zadovoljavati metaboličke potrebe tijela. Ovaj složeni klinički sindrom obilježen je promjenama na razini cijelog kardiovaskularnog sustava, skeletnog mišića i neurohormonalnog sustava (1;2). Jedan od najčešćih etioloških čimbenika za razvoj kroničnog zatajenja srca je infarkt miokarda, nakon kojeg dolazi do remodeliranja miokarda izvan područja zahvaćenog infarktom. U otprilike 20% bolesnika, te promjene dovode do razvoja kroničnog zatajenja srca. Istraživanja su pokazala da je nekoliko ključnih faktora odgovorno za poslijeinfarktno patološko remodeliranje u udaljenim regijama miokarda. Među najvažnijima se ističu povećana proizvodnja slobodnih kisikovih radikala, poremećaji u regulaciji kalcija i promjene energetskeg metabolizma u srčanim stanicama (3;4). Promjene energetskeg metabolizma odnose se na energetske manjak koji se očituje smanjenom količinom ATP-a, porastom ADP-a i oštećenim prometom energije putem kreatin-fosfokreatinskog sustava, a odgovorne su za razvoj kontraktilne disfunkcije miokarda (5).

U središtu energetskeg metabolizma srca nalaze se mitohondriji koji putem oksidativne fosforilacije osiguravaju oko 90% dnevnih potreba srčanog mišića za energijom. Zna se da kod kroničnog zatajenja srca mitohondriji prolaze kroz strukturno i funkcionalno remodeliranje koje uključuje promjenu njihove veličine te organizaciju kristi. Također dolazi do oštećenja oksidativne fosforilacije uz promjene supramolekularne strukture respiratornih kompleksa elektronskog transfernog lanca koje dovodi i do smanjenja njihove aktivnosti (6-9). Ipak, promjene u aktivnosti specifičnih kompleksa elektronskog lanca vrlo su heterogene i još uvijek nema konsenzusa o tome koja je od njih ključna točka tih promjena. Brojne studije su

pokazale da tjeļovjeŹba ima povoljan uĉinak na kroniĉno zatajenje srca, pa trenutne terapijske smjernice za lijeĉenje ovog stanja preporuĉuju neki oblik aerobne tjeļovjeŹbe za bolesnike sa stabilnim tijekom bolesti u NYHA kategorijama I, II i III. TjeļovjeŹba povoljno utjeĉe na kvalitetu Źivota bolesnika i smanjuje smrtnost oboljelih od kroniĉnog zatajenja srca djelujući protuupalno te izazivajuĉi pozitivne prilagodbe kardiovaskularnog i respiratornog sustava, skeletnog miŹiĉa i neurohormonalnog sustava (10;11). Tako je IstraŹivanje Wisloffa i suradnika pokazalo je da dugoroĉna aerobna tjeļovjeŹba u bolesnika s postinfarktnim kroniĉnim srĉanim zatajenjem dovodi do poboljšanja eĹekcijske frakcije lijeve klijetke, poveĉanja udarnog volumena i volumena na kraju sistole (12). Na razini srĉane stanice, tjeļovjeŹba ublaŹava patoloŹke promjene u regulaciji kalcija i poboljšava kontraktilnost (13;14). Ipak, joŹ se uvijek nedovoljno zna o uĉincima tjeļovjeŹbe na mitohondrijsku funkciju kod kroniĉnog zatajenja srca. Zbog toga je cilj predloŹene doktorske disertacije ispitati uĉinke aerobnog intervalnog treninga na mitohondrijsku funkciju u poslijefarktnom zatajenju srca i time omogućiti bolje razumijevanje mehanizama odgovornih za povoljne uĉinke tjeļovjeŹbe na kroniĉno zatajenje srca. S obzirom da su terapijske moguĉnosti kod pacijenata s kroniĉnim zatajenjem srca joŹ uvijek nedovoljno uĉinkovite i prognoza bolesti je loŹa, od iznimne su vaŹnosti istraŹivanja koja mogu doprinijeti razvoju novih terapijskih strategija s ciljem unapreĉenja kvalitete Źivota i preŹivljenja bolesnika s ovom boleŹu.

STRATEGIJA PRETRAŽIVANJA LITERATURE

Vezano uz rad na svojoj doktorskoj disertaciji, bazu biomedicinske literature PubMed sam pretraživala u više navrata, zadnji put 20. lipnja 2013. godine. Nisam koristila ograničenja za vrstu publikacije, a jezik publikacija sam ograničila na engleski. Tražila sam radove koji bilo gdje u tekstu sadrže neki od pojmova/složenica (ili njihov Mesh ekvivalent) „mitochondria“, u kombinaciji s pojmovima „heart failure“, „coronary artery disease“ „ischemic heart disease“ i „exercise training“. Takvih je referenci u PubMed-u bilo 3060. Pretraživački sam algoritam zatim ograničila na članke dostupne u cijelosti u kojima se ključne riječi pretraživanja pojavljuju u naslovu ili sažetku publikacije. Ograničenjem pretraživačkog algoritma nađeno je 279 publikacija. Naknadnim proučavanjem naslova ili sažetaka te vrste publikacija konačno sam uključila 73 reference. Najvažnijih 25 referenci navodim u pregledu literature, a ostatak, citiran u odgovarajućim kontekstima, navodim u dodatku literaturnog pregleda.

PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA

Nakon infarkta miokarda, srčani mišić izvan pogođenog područja prolazi kroz proces patološkog remodeliranja koji često u konačnici dovodi do kroničnog zatajenja srca. Ovaj proces pogađa razne dijelove srčane stanice, uključujući i mitohondrije (15-17). Budući da mitohondriji imaju središnju ulogu u energetske metabolizmu kardiomiocita, za pretpostaviti je da poremećaj njihove funkcije dovodi do daljnjeg pogoršanja srčane funkcije (18). Studije su pokazale da aerobna tjelovježba ima povoljne učinke kod pacijenata sa srčanim zatajenjem. Ustanovljeno je da tjelovježba zaustavlja napredovanje patološkog remodeliranja, a prema nekim studijama dovodi čak i do poboljšanja oštećene srčane funkcije (19;20). Ipak, još uvijek nisu poznati

učinci tjeleovježbe na mitohondrijsku funkciju u kardiomiocitima nakon infarkta miokarda.

HIPOTEZA

Hipoteza istraživanja je da aerobni intervalni trening kod životinja s postinfarktnim zatajenjem srca smanjuje patološko remodeliranje u srčanom mišiću i ublažava propadanje mitohondrijske funkcije. Navedena hipoteza će biti testirana kroz nekoliko jasno definiranih ciljeva.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U svrhu uspješnog testiranja postavljene hipoteze, istraživanje provedeno u sklopu predložene doktorske disertacije će biti podijeljeno na tri cilja:

Cilj 1: Korištenje prikladnog životinjskog modela

- a. Stvaranje pouzdanog životinjskog modela zatajenja srca na kojem će se vidjeti patološke promjene karakteristične za poslijeinfarktno remodeliranje
- b. Eksperimentalni model aerobne tjeleovježbe koji će imati mjerljive kardiovaskularne učinke u životinja s poslijeinfarktnim zatajenjem srca

Cilj 2: Ispitivanje učinka tjeleovježbe na srčanu morfologiju i funkcionalne parametre kod poslijeinfarktnog zatajenja srca

Cilj 3: Ispitivanje uloge mitohondrija u učincima koje tjeleovježba ima na patološko remodeliranje srca nakon infarkta miokarda

USTROJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanje predloženo u svrhu izrade ove doktorske disertacije se može klasificirati kao prospektivno eksperimentalno istraživanje. Na životinjskom modelu će se ispitati i usporediti učinci intervencije na testnu i kontrolnu skupinu. Kao eksperimentalne životinje će se koristiti štakori, dok će intervencija čiji će se učinci ispitivati biti tjelovježba. Svi dobiveni podaci će biti evaluirani i uspoređeni primjerenim statističkim testovima.

ISHOD ISTRAŽIVANJA

Na temelju prethodnih istraživanja, za očekivati je da će i naš model poslijefarktnog zatajenja srca u štakora pokazati patološke promjene karakteristične za poslijefarktno remodeliranje (21-24). Očekujemo da se aerobnim intervalnim treningom postignu mjerljivi kardiovaskularni učinci koji će se očitovati u promjenama srčane morfologije i funkcionalnih parametara u smislu poboljšanja (25). To znači da bi aerobni intervalni trening u štakora s poslijefarktnim zatajenjem srca trebao ublažiti patološko remodeliranje, sačuvati kontraktilnu funkciju lijevog ventrikula i smanjiti dilataciju komora. Također očekujemo oštećenje funkcije srčanih mitohondrija kod sedentarnih životinja sa srčanim zatajenjem, za koje vjerujemo da će biti značajno ublaženo kod životinja izloženih tjelovježbi.

METODE ISTRAŽIVANJA

ŠTAKORSKI MODEL ZATAJENJA SRCA

Kirurški postupak induciranja infarkta miokarda

Odrasle ženke Sprague-Dawley štakora (težine od 230 do 290 g) će biti anestezirane mješavinom ketamina i xylazina intramuskularno. Djelovanje anestezije će biti ispitano provjerom kornealnog refleksa i refleksa povlačenja šape. Nakon toga,

anestezirana će životinja biti intubirana i podvrgnuta kirurškom zahvatu kojim će se inducirati infarkt miokarda. Kroz transabdominalnu i transdijafragmalnu inciziju pristupit će se srcu životinje i zatim pod kontrolom mikroskopa neresorptivnim šavom podvezati lijeva koronarna arterija. Kontrolna skupina životinja, odnosno Sham skupina, će biti štakori jednake dobi i težine koji će proći jednaku kiruršku proceduru izuzev podvezivanja koronarne arterije.

Ehokardiografska procjena srčane funkcije

Za procjenu srčane funkcije štakora prije i poslije kirurškog postupka koristit će se transtorakalna ehokardiografija (Vivid 3, General Electric, Milwaukee, WI, USA) sa sondom od 12-MHz. Ehokardiografska procjena bit će učinjena prije kirurškog zahvata te u vremenskim razdobljima od 4 i 12 tjedana nakon kirurškog zahvata odnosno indukcije infarkta miokarda. Postupak će biti proveden nakon uvođenja štakora u anesteziju koristeći inhalacijski izofluran. Snimanje će se obaviti u dvije parasternalne dvodimenzionalne projekcije po kratkoj osi srca na razini papilarnih mišića, a mjerit će se promjer lijevog ventrikula u dijastoli i sistoli (LVDd i LVDs) te debljine prednje i stjenke srca u dijastoli i sistoli (AWTd i AWTsPWTd i PWTs). Iz navedenih će se parametara izračunati frakcijsko skraćenje lijevog ventrikula(FS%) prema slijedećoj formuli: $FS = [(LVDd - LVDs) / LVDd] \times 100$.

Prema ehokardiografskom mjerenju prije kirurškog zahvata procjenjivat će se eventualne promjene u ehokardiografskim parametrima nakon kirurškog zahvata. Četiri tjedna nakon kirurškog zahvata procijenit će se opsežnost induciranog infarkta (u operiranih štakora) te kontraktilna sposobnost srca prije nego što životinje uđu u slijedeću eksperimentalnu fazu. U nastavak studije biti će uključeni štakori s visokim stupnjem oštećenja srčane funkcije i razvijenim zatajenjem srca, što će se procijeniti

prema vrijednosti frakcijskog skraćenja lijevog ventrikula manjoj od 35% (FS<35%). Ovi su kriteriji uključanja odabrani koristeći već objavljene studije u kojima je napravljena korelacija između ehokardiografskih vrijednosti frakcijskog skraćenja i invazivno mjerenih vrijednosti tlakova unutar lijevog ventrikula kod zatajenja srca na istom životinjskom modelu. Na temelju navedenih kriterija uključanja, životinje s infarktom miokarda i poslijeinfačtnim zatajenjem srca bit će randomizirane u dvije skupine:

1. Trenirana skupina štakora s infarktom miokarda
2. Sedentarna skupina štakora s infarktom miokarda

Trenirana će skupina štakora biti podvrgnuta aerobnom intervalnom treningu tijekom 8 tjedana po unaprijed zadanom protokolu treninga (detaljno opisan u nastavku). Sedentarna skupina će tijekom istog razdoblja obavljati samo uobičajene dnevne aktivnosti u kavezu. Nakon završetka treninga odnosno sedentarnog razdoblja od 8 tjedana (12 tjedana nakon kirurškog zahvata) bit će ponovno napravljena ehokardiografska evaluacija srčane funkcije štakora nakon čega će sve životinje biti žrtvovane u slijedećih 3 do 6 dana. Sva će ehokardiografska mjerenja biti provedena bez prethodnog znanja o pripadnosti štakora pojedinoj eksperimentalnoj grupi kako bi se osigurala nepristranost u mjerenjima.

Konačno će se analizirati 3 eksperimentalne grupe štakora:

1. Trenirana skupina štakora s infarktom miokarda (IM-trenirani)
2. Sedentarna skupina štakora s infarktom miokarda (IM-sedentarni)
3. Kontrolna skupina štakora – Sham štakori

EKSPERIMENTALNE PROCEDURE ZA MJERENJE MITOHONDRIJSKE FUNKCIJE

Izolacija mitohondrija

Štakori će biti anestetizirani pomoću intramuskularne injekcije mješavine ketamina i xylazina (90 mg/kg and 8 mg/kg), a potom će im srca biti izvađena i pohranjena u izolacijsku otopinu na ledu. Mitohondriji će biti izolirani postupkom diferencijalnog centrifugiranja iz dijela lijevog ventrikula koji nije bio pogođen infarktnom, odnosno iz dijela koji će ostati nakon ekscizije ožiljno promijenjenog dijela srčanog mišića.

Mjerenje aktivnosti citrat sintaze

Enzimska aktivnost citrat sintaze mjerit će se spektrofotometrijski (412 nm, 25°C) iz preparata izoliranih mitohondrija koristeći komercijalno dostupan set Sigma-Aldrich (CS0720).

Mjerenje potrošnje kisika u mitohondrijima

Potrošnja kisika u mitohondrijima mjerit će se na 30°C koristeći Clarkovu elektrodu (Oxygraph, Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Takozvana Faza 2 respiracije će biti mjerena u prisutnosti piruvata i malata, substrata za kompleks I respiratornog lanca elektrona te sukcinata kao substrata za kompleks II respiratornog lanca. Respiracija će zatim biti mjerena uz stimulaciju ADP-om (250 $\mu\text{mol/l}$, State 3) kako bi mjerili Fazu 3 mitohondrijske respiracije(). Nakon što cijela količina dodanog ADP-a bude pretvorena u ATP, slijedi faza 4 respiracije.

Mjerenje proizvodnje ATP-a u mitohondrijima

Proizvodnja ATP-a u mitohondrijima će biti mjerena u prisutnosti različitih supstrata koristeći metodu kemiluminiscencije pomoću luciferina i luciferaze krijesnica (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, SAD).

Mjerenje aktivnosti kompleksa I respiratornog lanca elektrona (NADH: ubikvinon oksidoreduktaza)

Prethodno zamrznuti mitohondriji bit će odmrznuti i zatim solubilizirani na ledu s 1% količnom kiselinom u MSM/EDTA puferu. Enzimska aktivnost kompleksa I respiratornog lanca elektrona mjerit će se pomoću metode apsorbancije NADH-a u reakciji redukcije osjetljivoj na rotenon koristeći decilubikvinon kao primatelja. Reakcijska mješavina koja sadržava 20 µg/ml proteina mitohondrija bit će zagrijana na 30°C i potom prebačena u prthodno zagrijanu kivetu u spektrofotometar (DU 800, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Reakcija će biti pokrenuta dodatkom decilubikvinona (0.075 mmol/l) nakon čega će se mjeriti promjena u apsorbanciji NADH na 30°C (regulirano pomoću Peltier kontrole temperature) na 340 nm (ekstinkcijski koeficijent= $6.22 \text{ (mmol/l)}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Western blotting

Tkivo lijevog ventrikula će biti homogenizirano u modificiranom RIPA puferu uz dodatak proteaznih i fosfataznih inhibitora i koristeći Ultra-Turrax T25 (Proteini homogenata srca bit će zatim razdvojeni na SDS-PAGE 12% (postotnom) gelu. Nakon elektroforeze i transfera, nitrocelulozna membrana bit će inkubirana s protutijelima protiv citrat sintaze (ab96600, Abcam, Cambridge, UK), atrijskog

natriuretskog polipeptida (AB2232, Merck Millipore, Darmstadt, Germany), peroksisomskim proliferatorom-aktiviran receptor- γ koaktivatora-1 α (PGC-1 α), (ST1202, Merck Millipore) i koktelom protutijela na strukturne komponente četiriju od pet mitohondrijskih respiratornih kompleksa (Mitoprofile Total OXPHOS antibody cocktail MS601, MitoSciences, Eugene, OR, USA) Nakon inkubacije s adekvatnim sekundarnim protutijelom i supstratom za kemiluminiscenciju (Supersignal West Pico, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, SAD) blotovi će biti vizualizirani i snimljeni koristeći Chemidoc slikovni sustav (Bio-Rad). β -aktin će služiti kao kontrola (load kontrola). Analizom gustoće linija na snimkama usporedit će se trenirana sa sedentarnom skupinom štakora s infarktom miokarda (normalizirano prema uzorku standarda i kontroli punjenja - loadanja) koristeći Image Lab 3.0 software, a zatim će se rezultati izraziti na Sham skupinu.

Mjerenje oksidacije proteina

Karbonilacija proteina mjerit će se pomoću OxyBlot kita za detekciju oksidacije proteina (S7150, Merck Millipore) prema uputama proizvođača.

Statistički postupci

Svi dobiveni podaci će biti prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom. Razlike između trenirane i sedentarne skupine štakora s infarktom miokarda te kontrolne skupine štakora – Sham štakori bit će testirane Kruskal-Wallis testom uz *a posteriori* usporedbu Mann-Whitney testom. Razlike u ehokardiografskim parametrima između štakora s infarktom miokarda i kontrolne skupine štakora – Sham 4 tjedna nakon kirurškog zahvata testirat će se Mann-Whitney testom za nezavisne uzorke. Razlike u ehokardiografskim parametrima 4 i

12 tjedana nakon kirurškog zahvata unutar iste grupe bit će ispitana Wilcoxonovim testom za uparene uzorke. Statistička analiza svih podataka će se napraviti koristeći aplikaciju MedCalc (Mariakerke, Belgium) uz vrijednost $P < 0,05$ kao granicu statističke značajnosti.

ORGANIZACIJA ISTRAŽIVANJA

Istraživanje će se provesti u Laboratoriju za staničnu fiziologiju Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu i Department of Circulation and Medical Imaging, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norveška. Pristupnica će samostalno obaviti planirane eksperimente uz pomoć mentorice prof.dr.sc. Jasne Marinović, istraživača sa Zavoda za integrativnu fiziologiju i tehničkog osoblja. Eksperimente u Norveškoj će koordinirati, uz pristupnicu, prof.dr.sc. Ulrik Wisloff. U radu s eksperimentalnim životinjama tehničku podršku će nam pružiti Nastamba za eksperimentalne životinje Sveučilišta u Splitu. U svrhu kontrole kvalitete i pouzdanosti analize i interpretacije dobivenih podataka, sve aspekte istraživanja će nadgledati mentorica, prof.dr.sc. Jasna Marinović.

ULOGA PRISTUPNICE U ISTRAŽIVANJU

Pristupnica je sudjelovala u formiranju hipoteze, dizajniranju eksperimenata i definiranju metodologije predloženog istraživanja. Pristupnica će savladati sve eksperimentalne tehnike i planirane će eksperimente, uključujući izradu eksperimentalnog životinjskog modela koji će se koristiti u ovoj studiji, izvoditi samostalno. Nakon završenih eksperimenata, radit će na statističkoj obradi i interpretaciji prikupljenih podataka. Također će sudjelovati u pisanju znanstvenog članka (znanstvenih članaka) i drugih publikacija koje će proizaći iz ove studije. Uz

navedeno, planirano je da pristupnica prezentira dobivene podatke na međunarodnom znanstvenom skupu, gdje će imati priliku raspraviti značaj svog rada s drugim istraživačima koji se bave sličnom problematikom.

OČEKIVANI ZNANSTVENI DOPRINOS

Istraživanja predložena u sklopu izrade ove doktorske disertacije bi trebala doprinijeti našem znanju o patofiziologiji vrlo česte kliničke problematike i sugerirati nove terapijske mogućnosti. U zadnjih je desetak godina postalo jasno da tjelovježba nije kontraindicirana kod pacijenata sa srčanim zatajenjem, već naprotiv ima povoljne učinke. Međutim, istraživači su dosad razjasnili tek mali dio zaštitnog mehanizma tjelovježbe. Također, uloga mitohondrija u progresiji srčanog zatajenja još nije potpuno rasvijetljena, dok je utjecaj tjelovježbe na mitohondrije u bolesnom miokardu još umnogome nepoznat. Stoga je glavni je cilj predložene studije utvrditi kako tjelovježba djeluje na srčanu funkciju kod poslijefarktnog zatajenja srca te koja je uloga mitohondrija u tim procesima. Ispitivanje mitohondrijske funkcije u patološkom remodeliranju kod poslijefarktnog zatajenja srca te učinak tjelovježbe na mitohondrijske parametre će pridonijeti znanju o staničnim mehanizmima koji sudjeluju u tim procesima. Bolje razumijevanje tih procesa dugoročno će pomoći u provođenju dodatnih istraživanja, a s ciljem razvoja boljih metoda prevencije i liječenja bolesnika s poslijefarktnim zatajenjem srca.

ETIČKA NAČELA

Studija je provedena prema Direktivi 2010/63/EU Europskog parlamenta te odobrena od Povjerenstva za zaštitu životinja Republike Hrvatske i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Prilozi:

1. Preslika potvrdnice Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Splitu
2. Preslika Rješenja Uprave za veterinarstvo Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH

LITERATURA

1. Jhund PS, McMurray JJ. Heart failure after acute myocardial infarction: a lost battle in the war on heart failure? *Circulation* 2008;**118**:2019-2021.
2. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007;**356**:1140-1151.
3. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**301**:H2181-2190.
4. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta* 2011;**1813**:1360-1372.
5. Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W *et al.* Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997;**96**:2190-2196.
6. Ong SB, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2010;**88**:16-29.
7. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schreppe A, Amorim PA, Schoepe M *et al.* Proteomic remodeling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 2010;**85**:376-384.
8. Lemieux H, Semsroth S, Antretter H, Hofer D, Gnaiger E. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;**43**:1729-1738.
9. Rosca MG, Hoppel CL. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. *J Bioenerg Biomembr* 2009;**41**:107-112.
10. Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN *et al.* Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing

myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol* 2002;**40**:2174-2181.

11. Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V *et al.* Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 1996;**94**:1894-1901.
12. Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum O, Haram PM *et al.* Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation* 2007;**115**:3086-3094.
13. Belardinelli R, Georgiou D, Cianci G, Purcaro A. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation* 1999;**99**:1173-1182.
14. Crimi E, Ignarro LJ, Cacciatore F, Napoli C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2009;**6**:292-300.
15. Li J, Sinoway AN, Gao Z, Maile MD, Pu M, Sinoway LI. Muscle mechanoreflex and metaboreflex responses after myocardial infarction in rats. *Circulation* 2004;**110**:3049-3054.
16. Sanbe A, Tanonaka K, Hanaoka Y, Katoh T, Takeo S. Regional energy metabolism of failing hearts following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1993;**25**:995-1013.
17. Migrino RQ, Zhu X, Morker M, Brahmabhatt T, Bright M, Zhao M. Myocardial dysfunction in the periinfarct and remote regions following anterior infarction in rats quantified by 2D radial strain echocardiography: an observational cohort study. *Cardiovasc Ultrasound* 2008;**6**:17.

18. Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:2361-2367.
19. Haykowsky MJ, Liang Y, Pechter D, Jones LW, McAlister FA, Clark AM. A meta-analysis of the effect of exercise training on left ventricular remodeling in heart failure patients: the benefit depends on the type of training performed. *J Am Coll Cardiol* 2007;**49**:2329-2336.
20. Gielen S, Schuler G, Hambrecht R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 2001;**103**:E1-6.
21. Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:162-174.
22. Stolen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E *et al.* Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res* 2009;**105**:527-536.
23. de Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM *et al.* Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res* 2007;**100**:1079-1088.
24. Kemi OJ, Hoydal MA, Macquaide N, Haram PM, Koch LG, Britton SL *et al.* The effect of exercise training on transverse tubules in normal, remodeled, and reverse remodeled hearts. *J Cell Physiol* 2011;**226**:2235-2243.

25. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;**14**:753-760.