

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ANATOMICKÝ ÚSTAV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv hypoxie na embryonální vývoj
myokardu a koronárního řečiště**

Petra Křížová

Praha, 2007

Autor práce: Bc. Petra Křížová

Vedoucí práce: MUDr. Ondřej Naňka, Ph. D.

Oponent práce: doc. MUDr. David Sedmera, Ph. D.

Datum obhajoby: 28. 6. 2007

Grantová podpora: Práce byla podpořena výzkumným záměrem VZ 0021620806 (Miloš Grim) Ministerstva mládeže a tělovýchovy České republiky.

Diplomová práce byla vypracována v Anatomickém ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v roce 2006/2007.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré (i přejaté) informace budou řádně citovány.

V Praze dne 30. 5. 2007

Petra Krásová

Poděkování

Moje poděkování za nabídku se tímto tématem zabývat, za poskytnutí podkladů, za trpělivé vedení, množství praktických rad a za připomínky a čas, který věnoval mé práci, patří především vedoucímu mé diplomové práce MUDr. Ondřeji Naňkovi, Ph.D.

Dále můj dík patří Prof. MUDr. Miloši Grimovi, DrSc., a to za umožnění se práci v laboratoři věnovat, účastnit se vzdělávacích akcí potřebných k mé diplomové práci a za poskytnutí mnoha cenných informací. Rovněž celému kolektivu laboratoře, především Evě Kluzákové, Markétě Pleschnerové a Michalu Tůmovi, za veškerou pomoc a neobvykle příjemné pracovní prostředí.

Nakonec bych chtěla poděkovat mé rodině za tvorbu potřebného zázemí a za podporu při mém studiu.

Abstrakt

Člověk je, stejně jako všechny mnohobuněčné organismy, závislý na stálé dostupnosti kyslíku. Hypoxie představuje podnět, kterému se organismus musí přizpůsobovat již od nejranějšího vývoje. Základy jednotlivých částí krevního řečiště vznikají izolovaně a teprve druhotně se propojují v souvislý celek cévních trubic napojených na srdce. Hemodynamika se brzy uplatňuje jako jeden z faktorů vývoje cévního systému. Omezené proudění krve vede k regresi krevního řečiště, kdežto zvýšený průtok stimuluje jeho rozvoj, a to během vývoje i v dospělosti.

Naše studie měla ověřit, jak hypoxie ovlivňuje tvorbu koronárního řečiště a vývoj myokardu a vysvětlit letalitu embryí. Předchozí experimenty totiž za hypoxických podmínek prokazovaly dilataci srdečních komor a zvýšenou úmrtnost embryí se známkami srdečního selhání.

Jako experimentální model byla použita embrya japonské křepelky (*Coturnix coturnix japonica*). Vejce byla inkubována za hypoxických podmínek (16% O₂). Kontrolní skupina byla inkubována stejný čas v normoxických podmínkách (21% O₂). Vliv hypoxie byl hodnocen 5. - 9. den embryonálního vývoje. Koronární řečiště jsme znázorňovali nástřikem tuší. Proliferaci buněk v myokardu jsme sledovali značením pomocí BrdU. Pro histologickou analýzu jsme použili značení standartní barvení hematoxilinem a eosinem. K další analýze jsme použili imunohistochemický průkaz protilátkami proti sarkomerickému aktinu (marker kardiomyocytů) a/nebo aktinu hladké svaloviny. Jako marker tkáňové hypoxie byla použita Hypoxyprobe 1, která značí hypoxické okrsky. Cévní systém jsme znázorňovali v řezech protilátkou QH1, která je specifická pro endotelové buňky křepelky.

Vystavení křepelčích vajec hypoxickým podmínkám znamená snížení přežití. Nejdelší doba přežití u hypoxických embryí byla devět dnů. V srdcích embryí vyvíjejících se za normoxických podmínek jsou přítomné hypoxické okrsky tkáně. Tyto okrsky byly rozsáhlejší za experimentálních podmínek (16% O₂). Hypoxie dále navozovala zvýšenou kapilarizaci ve stěnách srdečních komor a v interventrikulárním septu. Vyvolávala rovněž zvýšenou trabekularizaci myokardu komor a jejich dilataci. Měření tloušťky komor jasně prokázalo jejich výrazné ztenčení (především komory levé) za hypoxických podmínek. Myokard je v této

embryonální periodě odkázán na difúzi kyslíku ze srdečních dutin, takže tyto nálezy mohou být vysvětleny jako kompenzační mechanismus ke zkrácení difúzní dráhy pro kyslík. Vlastní koronární cévy byly u hypoxických embryí vyvinuty nepravidelně a chudě a často jim chybělo napojení na aortu.

Naše nálezy tedy vysvětlují příčinu letálního účinku hypoxie tak, že hypoxie vede postupnou dilatací, ztenčením srdečních komor a nedostatečným napojením a organizací koronárního řečiště k srdečnímu selhání.

Abstract

Human, as all multicellular organisms, is dependant on oxygen availability. Hypoxia is a stimulus which must the organism adapt from early development. In prenatal life fundamentals of circulation originate separately and first than they interconnect in complete system of vessel tubes incorporating heart. Haemodynamic - as one of the factors - soon takes part in vessels system development. Restricted blood flow results in vascular bed regression; on the contrary higher flow promotes its development in prenatal life as well as in adulthood.

The aim of our study was to investigate the effect of hypoxia on coronary arterial tree formation and myocardial development and to explain embryonic lethality. Previous studies found ventricular dilatation and increased mortality with signs of heart failure.

We used quail embryos (*Coturnix coturnix japonica*). Eggs were incubated under hypoxic conditions (16% O₂). Controls were incubated in normal oxygen tension (21% O₂). The effect of hypoxia was analyzed 5 – 9 day of embryo development. Coronary system was visualized by injecting Indian ink. Proliferation was measured using BrdU labelling. For histological analysis we used standard haematoxylin and eosin labelling. For further analysis we used immunohistochemical staining with antibodies against sarcomeric actin (cardiomyocyte marker) and/or smooth muscle actin. As hypoxia marker we used Hypoxyprobe 1. We detected vascular system in section by staining with QH1 antibody (specific for quail endothelial cells).

Hypoxia reduced embryo survival versus controls. Maximal survival period in hypoxia was nine days. In the hearts of embryos developed in normoxic conditions there are present hypoxic areas of tissue. These areas enlarge under experimental conditions (16% O₂). Hypoxia increased capillarization in ventricular wall and in interventricular septum and increased myocardial trabecularization of ventricles and their dilatation. We found thinner ventricular wall (especially in the left ventricle) under hypoxic conditions. In this period myocardium relies on diffusion of oxygen from heart cavities and so these findings can be explained as a compensatory mechanism to minimize diffusion distance for oxygen. In hypoxic conditions coronary vessels are developed irregularly, often without connection to aorta.

Our findings demonstrate the cause of lethal effect of hypoxia. Ventricular wall thinning, coupled with insufficient coronary perfusion leads to dilatation and heart failure.

Obsah

Seznam použitých zkratk	12
1. Úvod	13
1.1 Vývoj myokardu a koronárních cév	14
1.1.1 Fylogenetické aspekty	14
1.1.2 Ontogenetické aspekty	15
1.2 Cévní zásobení srdce	18
1.2.1 Srdeční tepny u člověka	18
1.2.2 Srdeční žíly u člověka	19
1.2.3 Cévní zásobení srdce u ptáků	20
1.3 Mechanismus tvorby cév	24
1.4 Nejdůležitější angiogenní faktory a jejich receptory	26
1.5 Vliv hypoxie na vývoj myokardu	30
2. Cíle práce	33
3. Materiál a metodika	34
3.1 Časový rozvrh	34
3.2 Charakteristika modelového organismu	34
3.3 Podmínky inkubace a odběrů	34
3.4 Nástřík koronárního řečiště tuší	34
3.5 Fotodokumentace	35
3.6 Zpracování tkáně	35
3.7 Sledování proliferace	35
3.8 Znázornění tkáňové hypoxie	36
3.9 Znázornění cévního systému a jeho kvantifikace	37
3.10 Znázornění hladké svaloviny ve stěně cévy – SMA	37
3.11 Statistické zpracování dat	38
4. Výsledky	39
4.1 Úmrtnost embryí a makroskopické nálezy	39
4.2 Znázornění koronárního řečiště nástříkem tuší – ED9	40
4.3 Hypoxické tkáňové okrsky v myokardu za normoxických a hypoxických podmínek	42
4.4 Tloušťka stěny komor u embryí – ED5, 7, 9	44

4.5	Proliferace kardiomyocytů v srdeční komoře – ED6	47
4.6	Hustota kapilár v interventrikulárním septu a srdečních komorách – ED5, 7, 9.....	49
4.7	Průkaz SMA ve stěně koronárních cév.....	51
5.	Diskuze.....	55
6.	Závěry.....	59
7.	Literatura	60

Seznam použitých zkratk

a.	arteria
aa.	arteriae
AP	alkalická fosfatáza
BrdU	bromodeoxyuridin
DAB	diaminobenzidin
DMSO	dimethylsulfoxid
dx.	dexter, dextra
ED	embryonální den
Eph	ephrin
H+E	hematoxilin a eosin
FGF	fibroblast growth factor
HH	stádium dle Hamburgera a Hamiltona
HIF	hypoxia induced factor
Ig	immunoglobulin
LK	levá komora
LP	levá předsíň
PBS	phosphate buffer solution
PDGF	platelet derived growth factor
PEO	proepikardiální orgán
PFA	paraformaldehyd
PGF	placental growth factor
PK	pravá komora
PP	pravá předsíň
r.	ramus
sin.	sinister, sinistra
SD	směrodatná odchylka
SMA	smooth muscle actin
v.	vena
vv.	venae
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

1. Úvod

Vztah mezi organizmem a vnějším prostředím je značně složitý a o tom, zda se daný organismus dokáže vyrovnat s určitou změnou či nikoliv, rozhoduje celá řada okolností. Přizpůsobení se okolním podmínkám je důležité pro přežití organismu.

Člověk je, stejně jako všechny mnohobuněčné organismy, závislý na stálé dostupnosti kyslíku. Hypoxie představuje podnět, kterému se organismus musí přizpůsobovat již od nejranějšího vývoje. U srdce to platí tím spíše, že se jedná o první fungující orgán embrya. U kuřete začíná bít již během druhého dne embryonálního vývoje a u člověka je to již den osmnáctý.

Oblast vlivu hypoxie na embryonální vývoj začala být s rozvojem technického vybavení laboratoře a s rozšířením spektra metodických postupů velmi aktuálním tématem vývojové biologie i klinické medicíny. S novými objevy se vynořily i další otázky ohledně normálního a abnormálního vývoje srdce a koronárních cév a jejich funkce. Sledování vlivu hypoxie v jednotlivých stádiích embryonálního vývoje kuřete (v našem případě japonské křepelky - *Coturnix coturnix japonica*) přináší mnoho užitečných poznatků zvláště proto, že z obecného hlediska je srdci člověka (savce) podobné právě srdce ptáků.

Role tkáňové hypoxie byla rozsáhle studována především v souvislosti s tumorovou léčbou a ischemií, ale hypoxie hraje významnou roli i v normálním embryonálním vývoji – včetně kardiogeneze. Jakékoliv nové poznatky z průběhu vaskulogeneze, angiogeneze, arteriogeneze či remodelace a působení hypoxie v těchto kritických momentech vývoje srdce by mohly napomoci v léčbě některých onemocnění, kdy je růst nových cév podporován (např. po infarktu myokardu, při ateroskleróze) nebo naopak potlačován (např. u progresu maligního nádoru).

Základy jednotlivých částí systémového krevního řečiště vznikají izolovaně a teprve druhotně se propojují v souvislý celek cévních trubic napojených na srdce. Hemodynamika se brzy uplatňuje jako jeden z faktorů vývoje cévního systému. Omezené proudění krve vede k regresi krevního řečiště, kdežto zvýšený průtok stimuluje jeho rozvoj, a to během vývoje i v dospělosti.

1.1 Vývoj myokardu a koronárních cév

Vývoj myokardu a jeho krevního zásobení se v průběhu fylogenetického a ontogenetického vývoje zásadním způsobem mění.

1.1.1 Fylogenetické aspekty

Názory na fylogenetický vývoj srdce nejsou jednotné. Nejrozšířenější je představa, že existuje přímá vývojová linie od jednoduchého srdce živočichů studenokrevných (ryby, obojživelníci, plazi) až k živočichům teplokrevným (ptáci, savci); jejich srdce je nejdokonalejší a nejvýkonnější. Je však třeba konstatovat, že srdce některých studenokrevných živočichů (např. plazů) je velmi komplikované. V jednotlivých třídách poikilotermních živočichů existuje navíc mnohem větší variabilita než u ptáků a savců (Fejfar et al., 2002). Z obecného hlediska je srdci savců identické srdce ptáků. Je rozděleno ve dvě předsíně a dvě komory a vytváří nízkotlakou plicní a vysokotlakou systémovou cirkulaci.

Paralelně s vývojem srdce se vyvíjí i cévní systém. Z původních šesti aortálních oblouků, které časně ve fylogenezi spojovaly ventrální a dorzální aortu, mizí u kostnatých ryb dva páry. U obojživelníků zůstávají třetí aortální oblouky zachovány jako části karotid, pátý pak mizí. Šestý aortální oblouk je závislý na vývoji dýchání; již u jednodyšných ryb z něho vycházejí cévy ke vzdušnému měchýři. U vyšších obratlovců, kteří dýchají plicemi, slouží za základ pulmonálních artérií a tepenné dučeje. Ze čtvrtého páru aortálních oblouků je u ptáků zachován pouze pravý, u savců levý, jako základ definitivní aorty (Kruta, 1958).

Srdeční sval je v důsledku stoupajících funkčních nároků schopen značných adaptačních změn. Nejjednodušší mírou adaptace je hmotnost srdečního svalu. Nejmenší srdce v relativních hodnotách (hmotnost srdce/hmotnost těla) mají živočichové studenokrevní, největší pak ptáci a savci. Lze předpokládat, že se zde jako příčina uplatňují především dva faktory: vyšší metabolický obrat ve tkáních teplokrevných živočichů vyžaduje vyšší přívod kyslíku, a tím také větší práci srdce. Druhým důležitým faktorem je bezesporu míra svalové práce, zabezpečující pohyb živočicha. Tento faktor se nejvýznamněji uplatňuje u ptáků, kde zvláště významnou položku činí antigravitační práce, a u velkých savců, kde i pouhý pohyb z místa

při nezměněném antigravitačním úsilí představuje značné oběhové zatížení (Ošťádal et al., 2003). Létání vede u homoiotermních (savec x pták) ke zdvojnásobení relativní hmotnosti (Fejfar et al., 2002).

Enormní fylogenetické rozdíly ve velikosti srdce, jeho výkonu a spotřebě kyslíku jsou sledovány změnami ve způsobu jejího krevního zásobení. U pulzujících cév primitivních organismů, ale i u vyspělejšího, více uzavřeného srdce bezobratlých (např. měkkýšů nebo korýšů) se vaskularizace nevyskytuje. Ovšem větší množství hmoty myokardu je žádoucí a zde je srdeční svalovina organizována do spongiózní síťoviny trabekul. Takové uspořádání lze nalézt i u nižších obratlovců, zvláště u studenokrevných organismů s nízkým krevním tlakem. (Tota et al., 1983).

První koronární cévy se objevily u některých ryb před 500 milióny let a byly plně vyvinuty u ptáků o 350 miliónů let později. Jejich vývoj a větvení závisí na několika fylogenetických faktorech (Fejfar et al., 2002):

Po vývoji plic se odstup koronárních cév přesouvá z dorsální do ventrální aorty.

Časně ve fylogenezi leží srdce v krční krajině. Později migruje kaudálně až do hrudní pozice u vyšších obratlovců. Při svém kaudálním pohybu je srdce sledováno velkými cévami. To má za následek i snižování odstupu koronárních artérií.

U ryb koronární artérie odstupují z hypobrachiálních artérií a zásobují především bulbus arteriosus. U obojživelníků vycházejí koronární artérie z karotického rozdělení truncus arteriosus. Dělí se na dorzální a ventrální větve a zásobují truncus a bulbus arteriosus.

U plazů a savců odstupují koronární artérie nejbliže srdci; podíl extrakoronárního zásobení se nadále zmenšuje a jeho zastoupení je u různých druhů ptáků a savců různé (Fejfar et al., 2002).

1.1.2 Ontogenetické aspekty

Srdce se primárně vyvíjí v prostoru ventrálně od žaberních štěrbin (anteroventrální část embryonálního coelomu). V raných stádiích obratlovců je pouze část jednolitého coelomu a základ srdce je fixován závěsy, které



ze splanchnopleury coelomových dutin obou polovin těla (dorzální a ventrální mesocardium). Ventrální mesocardium brzy zaniká. Později v embryogenezi se však tato přední část coelomu izoluje od hlavního prostoru coelomu sekundárně vzniklým příčným septem. Vzniká tak poměrně malá část coelomové dutiny, která je dorzálně omezena žaberním aparátem, vzadu pak zmíněným septem. Srdce je tak uzavřeno do coelomového váčku, který se zakládá z původní somatopleury, splanchnopleury a septum transversum. Růst srdce způsobuje, že k němu stěny této dutiny v dospělém stavu těsně přiléhají; ze somatopleury a příčného septa pak vzniká pericard, ze splanchnopleury myocard (Roček, 2002).

Změny ve velikosti srdce jsou v průběhu ontogenetického vývoje teplokrevných živočichů doprovázeny formováním interventrikulárního septa spolu s postupnou přeměnou avaskulární spongiózní svaloviny, vyživované difúzí z komorových dutin, v kompaktní svalovinu, vyživovanou z koronárních artérií. Široké lakuny umožňující zásobení myocytů kyslíkem jsou tak nahrazovány bohatě větveným řečištěm koronárních cév (Tomanek, 1999), jejichž vývoj začíná už v časných stádiích, jakmile se srdce začne pokrývat epikardem (Tomanek, 2005).

Relativní hmotnost srdce po porodu klesá, naopak procento sušiny se zvětšuje. Srdce teplokrevných živočichů roste jak hypertofií (zvětšením), tak hyperplázií (zmnožením) svalových buněk. Proliferační schopnost myocytů však po narození rychle klesá, po tomto období je růst téměř výhradně hypertrofický; počet buněk se již nemění.

Rozvoj hypertrofie představuje jeden z hlavních mechanismů, umožňujících kompenzovat zvýšené pracovní nároky. Je přitom nutno si uvědomit, že pojem hypertrofie myokardu je možno používat jen tehdy, je-li zvětšení srdečního svalu vyvoláno v období, kdy myocyty již nejsou schopny se dělit. Pro adaptaci na zátěž, působící v časných fázích ontogenetického vývoje, kdy se uplatňuje i hyperplastický růst, se užívá termínu kardiomegalie (Ošťádal et al., 2003).

Tradiční popis vzniku koronárních cév vycházel z představy, že buňky, které se podílí na jejich tvorbě, jsou deriváty mesodermu podobně jako buňky myokardu a endokardu (DeHaan, 1965). Manasek (1969) však popisuje, že srdeční trubice je v počátečních fázích vývoje tvořena pouze myokardem a endokardem a epikard je extrakardiálního původu. V dalších studiích pak bylo zjištěno, že zdrojem buněk epikardu i budoucích koronárních cév je proepikardiální orgán

(PEO) (Viragh et al., 1993, Perez-Pomares, 1998). PEO je pouze přechodnou strukturou, která je tvořena jednovrstevným epitelem uspořádaným do hroznovitého tvaru. Během ED3 (HH17) dochází pak k migraci buněk na povrch srdce a k tvorbě primitivního epikardu (Manner, 1993, Gittenberger-de Groot et al., 1998, Mikawa et al., 1996). Buňky PEO postupně dosahují k srdci, prolifерují, migrují a následně pokrývají myokard jako souvislá vrstva. Experimentální odstranění PEO má pak za následek nepřítomnost epikardu (Manner, 1999).

Po kontaktu buněk PEO s povrchem myokardu dochází k jejich rozdělení na dvě vrstvy a formuje se tak epikard a výstelka dutiny perikardu (Nahirney et al., 2003). Záhy po vytvoření epikardu dochází k přeměně tohoto epitelu v mesenchym mechanismem epitelu-mesenchymové transformace (EMT) (Mikawa et al., 1996). Následně dochází k migraci mesenchymových buněk do subepikardového vaziva a do myokardu. Tato migrace je velmi masivní, protože ve výsledku je každý kardiomyocyt v kontaktu s nejméně jednou kapilárou. Po migraci dochází k diferenciaci mesenchymových buněk v endotel, hladkou svalovinu, pericyty a fibroblasty a mechanismem vaskulogeneze k tvorbě primárních cévních pletení (Dettman et al., 1998, Perez-Pomares, 1997). Primární pleteně jsou remodelovány mechanismy angiogeneze do kapilár, žil a koronárních tepen. Zajímavé je, že k této remodelaci dochází bez průtoku krve cévami, přestože napojení koronárních tepen na aortu se uskuteční relativně pozdě (Ratajska et al., 2003). Formování primitivních cév začíná především v subepikardových prostorech v oblasti sulcus atrioventricularis, kde se podějí přemění v pravou koronární tepnu a v ramus cirkumflexus levé koronární tepny. Z těchto cév pak odstupují drobnější větve mezi vrstvy myokardu, kde vytváří pravidelné síť (Bernanke et al., 2002).

Otázka napojení koronárních cév zůstává zatím ještě nezodpovězena. Jak dochází k navigaci koronárních cév k růstu k aortě a jak je řízeno vlastní napojení na aortu, je řízeno chemotakticky? Růstový konec koronární cévy musí penetrovat skrze tunica media aorty, proniknout endotelem a napojit se kontinuálně na lumen aorty (Velkey et al., 2001, Vrancken Peeters et al., 1997). Zpočátku dochází k invazi více kapilárních plexů do aorty, ale ve výsledku dojde k napojení pouze jedné tepny v pravém a levém sinus aortae, v těchto místech pak nacházíme podél cévy apoptotické buňky (Velkey et al., 2001) či zvýšenou expresi Fas ligandu (Eralp et al., 2005). Podobným způsobem dochází k napojení žil na sinus coronarius. Průtok krve pak v koronárních cévách vyvolá intenzivní remodelaci

včetně změny kalibru.

Poměrně složitá je také vzájemná interakce a regulace epikardu a myokardu. Některé studie prokazují, že k další proliferaci a diferenciaci myokardu jsou potřebná přítomnost mesenchymových buněk původem z epikardu (Perez-Pomares et al., 2002). Stejně tak Mikawa et al. (1996) prokázal, že vývoj koronárních cév je nutný k indukci převodního systému (Hyer et al., 1999).

1.2 Cévní zásobení srdce

1.2.1 Srdeční tepny u člověka

Tepenné zásobení stěn srdečních zajišťují arteria coronariae dextra a arteria coronariae sinistra. Obě tepny odstupují ze sinus aortae a kladou se do příslušného sulcus coronarius. Arteria coronariae dextra zásobuje diafragmatickou stěnu levé komory a horní zadní část komorového septa. Tato tepna zásobuje též celou pravou komoru a pravou předsíň. Arteria coronariae sinistra se krátce po odstupu dělí na ramus interventricularis anterior a ramus circumflexus. Ramus interventricularis anterior zásobuje největší část hmoty levé srdeční komory: její přední část a přední větší část mezikomorového septa. Ramus circumflexus probíhá na zadní stěně levé komory, zásobuje laterální a horní část levé komory a levou předsíň.

Arteria coronariae dextra odstupuje nad valva semilunaris dextra ze sinus aortae dexter a běží v sulcus coronarius mezi pravou předsíní a komorou směrem k margo acutus. V 84 % případů dosahuje pravá koronární tepna úrovně crux cordis a zde odstupuje ramus interventricularis posterior, dále větévka pro síňokomorový uzel a větve pro zadní diafragmatickou plochu levé komory. Ve zbývajících 16 % arteria coronariae dextra končí větévkou pro margo acutus a ramus interventricularis posterior je pokračováním ramus circumflexus a. coronariae sinistra.

Nejdůležitější větví a. coronariae dextra je r. interventricularis posterior, který zásobuje horní a zadní část septa. Asi v 70 % případů r. interventricularis posterior nedosahuje hrotu a hrotová část septa je pak zásobena z r. interventricularis anterior.

Arteria coronariae sinistra odstupuje nad valva semilunaris sinistra ze sinus aortae sinister. Kmen tepny je krátký, zpravidla délky asi 5 mm, a dělí se na r. interventricularis anterior a r. circumflexus. R. interventricularis anterior je nejdůležitější koronární tepnou. Probíhá v sulcus interventricularis anterior a její první a největší větví je r. diagonalis. Po odstupu této tepny odstupují téměř v pravém úhlu septální větve, které probíhají celým septem dozadu a šikmo dolů. Nejsilnější z nich je první septální větev, která je enormně důležitá pro zásobení septa okysličenou krví.

R. circumflexus vede doleva a dozadu v sulcus coronarius směrem ke crux cordis, dosáhne jej však asi jen v 16 %. Na úrovni margo obtusus odstupuje r. marginalis sinister, který zásobuje boční stěnu levé komory.

Anterolaterální papilární sval má cévní zásobení z r. interventricularis anterior i z r. circumflexus, posteromediální papilární sval z pravé koronární tepny.

Sinusový uzel je zásobován buď větévkou, která odstupuje z proximální části a. coronariae dextra, nebo větví r. circumflexus levé věnčité tepny. Atrioventrikulární uzel s přilehlou částí Hisova svazku zásobuje v 84 % pravá věnčitá tepna a v 16 % r. circumflexus. Větve pro síňokomorový uzel odstupují z periferní části těchto tepen.

Pravé raménko a přední svazek raménka levého jsou zásobovány r. interventricularis anterior. Zadní svazek levého raménka má cévní zásobení z pravé i levé věnčité tepny (Fejfar et al., 2002).

1.2.2 Srdeční žíly u člověka

Žilní krev z myokardu je odváděna třemi hlavními systémy: systém sinus coronarius a jeho přítoky, vv. cordis anteriores a vv. cordis minimae.

Sinus coronarius cordis je hlavní žílou srdce a odvádí ze stěny srdce asi 60 % krve. Leží na diafragmatiké ploše srdce v levé části sulcus coronarius. Je dlouhý 3 až 5 cm, směřuje doprava a ústí do pravé předsíně. Vzniká soutokem v. cordis magna, v. cordis media, v. cordis parva a v. obliqua atrii sinistri.

Vv. cordis anteriores jsou dvě až čtyři žíly, které sbírají krev z přední stěny pravé komory. Vyúsťují samostatně do pravé předsíně.

Vv. cordis minimae jsou četné drobné žilky, které ústí samostatnými

drobnými otvůrkami (foramina venarum minimarum) do srdečních dutin.

Vv. cordis anteriores a vv. cordis minimae odvádějí ze stěny srdce zbývající 40 % krve (Dokládál et al., 2003).

1.2.3 Cévní zásobení srdce u ptáků

Místa odstupů koronárních tepen jsou sinus aortae sinister a sinus dexter ventralis. Někdy může vystupovat ramus superficialis a. coronariae dextrae nebo jiné větve koronárních artérií ze sinus dorsalis.

U ptáků se a. coronaria dextra dělí na povrchovou větev (ramus superficialis) a na hlubokou větev (ramus profundus). Povrchová větev vydává větve pro pravou předsíň a pravou komoru. Hluboká větev je podstatně silnější, pobíhá v septum interventriculare a dělí se na dvě větve. Ty septum opouští a přecházejí do svaloviny levé komory. A. coronaria dextra zásobuje stěnu pravé předsíně, větší část septa, pravou komoru a část levé komory.

A. coronaria sinistra probíhá nejprve mezi truncus pulmonalis a levou předsíň a následně se dělí na povrchovou a hlubokou větev. Hluboká větev je opět silnější. A. coronaria sinistra zásobuje stěnu levé předsíně, částečně stěnu pravé předsíně, část septa a část levé i pravé komory. Anatomické uspořádání tepen viz na obr. 1.

Žilní krev je ze stěny srdce odváděna dvěma kmeny (v. cordis dorsalis a v. cordis sinistra) a větším počtem malých žil. Jsou uloženy subepikardiálně.

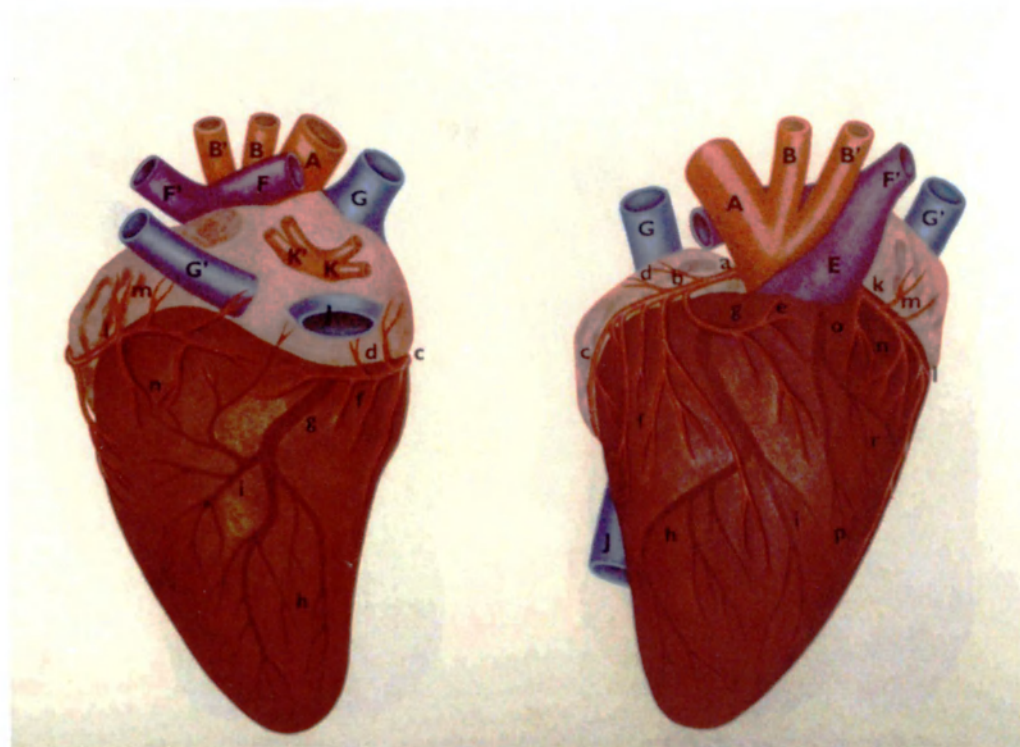
V. cordis dorsalis probíhá v sulcus interventricularis subsinuus a ústí do pravé předsíně těsně nad sulcus coronarius. Odvádí krev z oblasti hluboké větve a. coronaria dextra. U kuřete je nejsilnější ze všech srdečních žil. Intrakardiálně vyúsťují jednotlivé srdeční žíly samostatně. Srdce kuřete nemá sinus coronarius. Mezi hlavními kmeny chybí anastomózy, ale mezi jejich drobnými přítoky existují četné spojky.

V. cordalis sinistra probíhá od hrotu srdce po levé komoře, dostává se dorzálně od truncus pulmonalis a vstupuje do pravé předsíně naproti ústí v. cava caudalis. Odvádí krev z oblastí obou koronárních artérií. V některých případech je v. cordalis sinistra velmi krátká. V interventrikulární oblasti odvádí krev v. cordis circumflexa sinistra nebo vv. cordis ventrales. U kuřete je venózní krev odváděna

z bazální části septum interveniculare do v. cordis sinistra nebo do vv. cordis ventrales. Nejmenší srdeční žíly (vv. cordis minimae) odvádí žilní krev z myokardu přímo do srdečních dutin. Ústí těchto žil jsou četná v obou předsíních a pravé komoře, v levé komoře jsou časté méně. Anatomické uspořádání venózního systému viz na obr. 2.

Jak ptáci, tak savci (zde prezentováno srdce lidské) mají dvě koronární artérie vycházející z pravého a levého aortálního sinu. Nicméně jsou zde přítomny odlišnosti. Zatímco člověk má výrazný r. interventricularis anterior et posterior, u ptáků je vytvořena silná tepna v oblasti sulcus atrioventricularis a odtud vysílá spíše malé větve do předsíní a komor. Na druhou stranu je v ptačím srdci přítomná samostatná tepna zásobující septum (r. septalis), která u savců není vytvořena.

Rozdíly existují rovněž u žil. Ptáci nemají sinus coronarius, a naopak mají párovou v. cava superior (Bellairs et al., 2005).



a.

b.

A – aorta

B – truncus brachiocephalicus dexter

B' – truncus brachiocephalicus sinister

E – truncus pulmonalis

F – a. pulmonalis dextra

F' – a. pulmonalis sinistra

G – v. cava cranialis dextra

G' – v. cava cranialis sinistra

J – v. cava caudalis

K – v. pulmonalis dextra

K' – v. pulmonalis sinistra

a - i – a. coronaria dextra

b – r. superficialis

c – r. circumflexus

g – r. profundus

h – rr. ventriculares

i – rr. septales

k - r – a. coronaria sinistra

k – r. superficialis

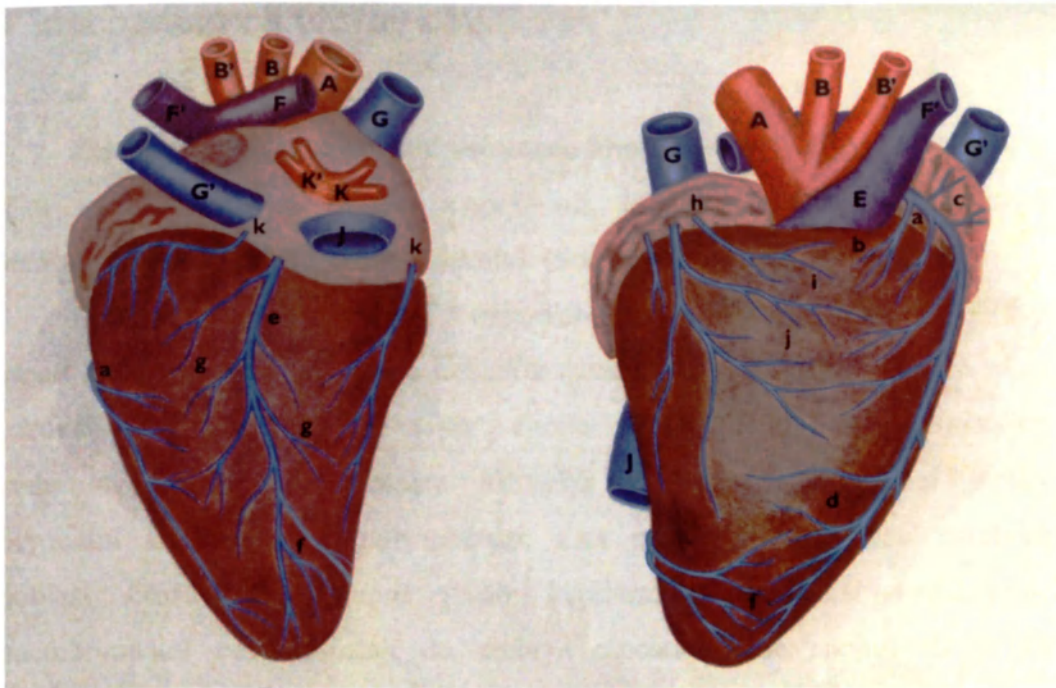
l – r. circumflexus

o – r. profundus

Obr. 1: Tepny ptačího srdce – kur domácí
(podle Komárka et al., 1982)

a. Ventrokraniální pohled

b. Dorzokaudální pohled



a.

b.

A – aorta

B – truncus brachiocephalicus dexter

B' – truncus brachiocephalicus sinister

E – truncus pulmonalis

F – a. pulmonalis dextra

F' – a. pulmonalis sinistra

G – v. cava cranialis dextra

G' – v. cava cranialis sinistra

J – v. cava caudalis

K – v. pulmonalis dextra

K' – v. pulmonalis sinistra

a – v. cordis sinistra

e – v. cordis dorsalis

h – vv. cordis ventrales

k – vv. cordis

Obr. 2: Žíly ptačího srdce – kur domácí
(podle Komárka et al., 1982)

a. Ventrokranální pohled

b. Dorzokaudální pohled

1.3 Mechanismus tvorby cév

Základní stavební a funkční jednotkou krevních cév je endotelová buňka. Vzniká z prekursorových buněk, angioblastů, které se diferencují současně s krevními buňkami, které v cévách cirkulují (Sabin, 1920).

První základy cév se tvoří v extraembryonálních tkáních, které zajišťují transport látek a plynů nutných pro látkovou výměnu embrya. V mezodermu stěny žloutkového váčku, zárodečného stvolu a choria vznikají krevní ostrůvky (skupiny mezodermových buněk). V centru ostrůvků se nacházejí výchozí buňky embryonální křevetvorby, hemocytoblasty, a na periferii tvoří stěnu ostrůvků angioblasty. Ostrůvky se postupně vytvářejí kapilární pleteně a větší cévní kmeny. Extraembryonální cévy vrůstají do embrya a postupně se spojují s krevním řečištěm, které vzniká ve vlastním embryu.

Velké intraembryonální cévní kmeny vznikají splýváním angioblastů. Většina angioblastů se diferencuje v paraaxiálním mesodermu, ze kterého migrují do stěny trupu a do základů končetin (Noden, 1991). Samostatně se tvoří dvě podélné dorzální aorty, které později splývají a postupně prorůstají do kaudální části embrya a v hlavové části na ně navazují aortalní oblouky.

Nejranější stádium vývoje krevních cév spočívá v tvorbě a splývání krevních ostrůvků. V této fázi, označované jako vaskulogeneze, se primární cévy tvoří z angiogenních buněk, které dosud netvořily cévní stěnu.

Dále vznikají nové endotelové buňky převážně proliferací ze stávajících endotelových buněk, tedy z již existujících cév. Tato fáze tvorby krevního řečiště je označována termínem angiogeneze (Wada et al., 2003).

Vývoj koronárního řečiště rozdělit do tří kroků. Prvním z nich je vaskulogeneze, tj. diferenciací z endotelových prekursorových buněk (Hudlická et al., 1992, Tomanek, 1996), které pocházejí z epikardiálního mesotelu. Tyto multipotentní buňky vnikají do srdce a proliferací a splynutím tvoří primitivní cévní síť (Tomanek, 2006a). Vaskularizace ve vyvíjejícím se srdečním svalu je – podobně jako u jiných orgánů – regulována růstovými faktory (viz kap. 1.4), extracelulární matrix a mechanickými silami (Tomanek, 2002).

Ve druhém kroku je růst zajištěn tak, že nové endotelové buňky vznikají

převážně proliferací stávajících endotelových buněk a nové cévy vyrůstají z již existujících cév (pučením, sprouting). Tato fáze se nazývá angiogeneze. Kritickým bodem tohoto období je napojení této sítě na oběhový systém (což lze přirovnat k napojování potrubí), přičemž venózní konec se napojuje jako první, pak až konec arteriální. (Rychter et al., 1971, Vrancken Peeters et al. 1997). Dle Rychtera et al. (1971) lze o začátku procesu vaskularizace a kontinuálním růstu srdce hovořit od konce ED8, resp. od začátku ED9.

Poslední krok zahrnuje diferenciaci a vytváření arteriálních a venózních částí koronárního systému. To nastává po napojení na cirkulaci, což je pravděpodobně řízeno hemodynamickými parametry (tlak, průtok). V okamžiku, kdy se cévní trubice napojují na aortu, stávají se z nich koronární cévy.

Jedním z aspektů vývoje koronárních cév je fakt, že výchozí diferenciaci se děje bez proudící krve. Pruhy endotelových buněk lze nalézt na povrchu srdce a uvnitř trabekularizujícího myokardu. První z těchto cév jsou v subepikardiálním prostoru v sulcus atrioventricularis. Ty se následně diferencují na artérie r. circumflexus a a. coronariae dextra. Tyto cévy dávají na druhou stranu vzniknout menším subepikardiálním artériím, které vrůstají do vrstvy myokardu a do interventrikulárního septa, postupně až k apexu (Bernanke et al., 2002). Zajímavé je, že prekuzory buněk, které pochází z proepikardu, mají i schopnost se diferencovat v erytrocyty, tyto prekuzory se tedy chovají podobně jako hemangioblasty v krevních ostrůvcích. Výsledkem je, že i v nově tvořených cévách se pak nacházejí krevní elementy, jž nepocházejí z cirkulace (dosud totiž není vytvořený kontakt těchto cév s aortou) (Tomanek et al., 2006).

Intramyokardiální cévy jsou vytvořeny jako síť v pravidelných intervalech, které se udržují s tím, jak se myokardiální vrstva zesiluje (Wada et al., 2003).

Myokardiální kapilární síť se vyvíjí mezi ED6 a ED8. Následně se vytvoří funkční koronární cirkulace, což nastává ve stádiu ED8 – ED9 (Tomanek, 2006b).

Určitá míra hypoxie myokardu aktivuje faktory indukované hypoxií (HIF), které mohou hrát roli v organizaci velkých koronárních cév v sulcus atrioventricularis a interventricularis (Wikenheiser et al., 2006). To, jakým způsobem se u ptáků koronární síť napojuje na systémovou cirkulaci, zda se jedná o pohyb řízený chemotaxí či cestu „nejmenšího odporu“ však není příliš jasné. Nejprve putují proximální konce koronárních artérií k proximální části aorty. Výběžky vyvíjejících se koronárních cév prostupují tunica media aortae, prorážejí

endoteliálním povrchem a vytvářejí kontinuitu v lumen. Nejprve se několik koronárních cév přiblíží k levému a pravému aortálnímu sinu, ale pouze jedna z těchto artérií vybuduje pevný kontakt s oběma siny a vznikne tak pravá a levá koronární artérie (Vracken Peeters et al., 1997). Když se napojující koronární cévy přibližují k endoteliu aorty, v jejich okolí a v místě napojení na aortu lze nalézt apoptotické buňky (Velkey et al., 2001). Současně lze pozorovat spojení mezi vyvíjejícím se plexus venosus a pravou předsíní. Tyto cévy tvoří sinus coronarius a žíly (Wada et al., 2003).

Ontogenetický vývoj krevního zásobení srdečního svalu může být rozdělen do tří období:

- lakunární: do vývoje koronárních artérií je myokard výlučně spongiózní a je vyživován difúzí z komor;
- přechodné: od počátku vývoje koronárních artérií do ukončení jejich vývoje;
- koronární: v době, kdy vývoj koronárních cév je ukončován a myokard je zásoben téměř výlučně z koronárních artérií (Fejfar et al., 2002).

1.4 Nejdůležitější angiogenní faktory a jejich receptory

Jednotlivé kroky vývoje koronárního řečiště jsou regulovány množstvím růstových faktorů. Proliferace a diferenciací angiogenních buněk je řízena faktory z rodiny VEGF (vascular endothelial growth factors), která zahrnuje celkem 5 růstových faktorů, označovaných písmeny A-E (VEGF A – E), dále růstový faktor krevních destiček (PDGF) a placentární růstový faktor (PGF). Další skupinou signálních molekul jsou Angiopoetin 1- 4 a jeho receptory Tie 1 a 2, které se uplatňují v interakci endotelu a mezenchymu, a ephriny, které se podílejí na diferenciaci vývoje artérií a vén.

➤ Skupina faktorů rodiny VEGF (vascular endothelial growth factors, cévní endotelové růstové faktory):

VEGF patří mezi specifické cytokiny (třída cytokinů č. XI). U savců byly prokázány VEGF-A (nazývaný rovněž pouze VEGF), dále VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E (tzv. virální faktor).

Různé typy VEGF se svou úlohou překrývají při kontrole růstu nových

cév. VEGF receptory (tyrozinkinázový typ receptoru) přenáší signál k proliferaci endotelu, jeho migraci, organizaci do funkčních cév a přispívají k remodelaci cévního řečiště.

- VEGF A stimuluje endotelové buňky k degradaci extracelulární matrix, k migraci a diferenciaci a k formaci cév. Jeho exprese je stimulována hypoxií (působením faktoru HIF-1) a hypoglykemií.
- VEGF B se vyskytuje zejména v srdeční a kosterní svalovině (Forsythe et al., 1996).
- VEGF-A a VEGF-B jsou kritické pro časná stádium vaskulogeneze. VEGF-A však není kritické pouze pro rané stádium vaskulogeneze, ale rovněž pro pozdější stadium – pučení (Ferrara et al. 1996).
- VEGF C a D se vyskytují se převážně v endotelu lymfatických cév (Rui-Cheng , 2006).

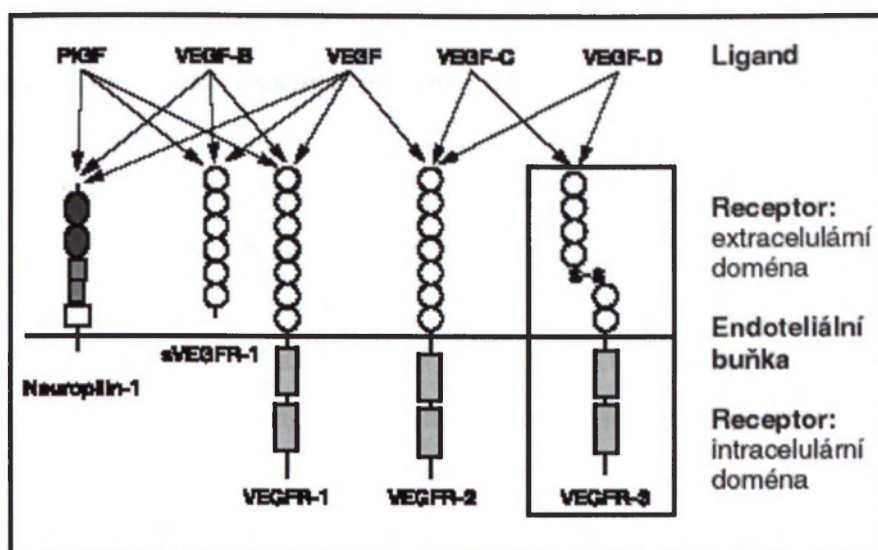
VEGF se mohou vázat na tři specifické tyrozinkinázové receptory: VEGF-R1, VEGF-R2 a VEGF-R3.

VEGF se váže především na VEGF receptor 2 (VEGFR 2, Flk-1 – označení téhož receptoru u myši, Quek1 – označení téhož receptoru u křepelky) (Flamme et al., 1995). VEGF-B, který interaguje především s receptorem VEGFR 1 (myší receptor Flt-1), se vyskytuje se především v srdeční a kosterní svalovině. Podílí se na regulaci degradace extracelulární matrix, buněčné adheze a migrace buněk. Faktory VEGF C a D ovlivňují zejména lymfatický endotel, který exprimuje jejich receptor VEGFR – 3 (myší receptor Flt 4, křepelčí receptor Quek2), a který je považován za jeden z markerů lymfatického endotelu. Exprese VEGF B-D však není, na rozdíl od VEGF, ovlivňována hypoxií (Tammela, 2005). Typy receptorů VEGF a jejich ligandy viz na obr. 3.

Nadexprese VEGF vyvolá změny uspořádání myokardu (zeslabení stěny, trabekularizaci komor), defekt septace a abnormální remodelaci výtokového traktu (Miquerol, 2000).

Do stejné rodiny patří i růstový faktor krevních destiček PDGF (platelet derived growth factor) a placentární růstový faktor (PGF). PDGF je mitogen, který se uplatňuje v pozdějších fázích angiogeneze. Stimuluje proliferaci fibroblastů,

tvorbu kolagenu a má význam pro formování lumen cévy (Klener, 2002).



Obr. 3: Typy receptorů VEGF a jejich ligandy
(podle Charnock-Jones, 2005)

➤ Skupina faktorů angiopoetinu 1 – 4 a jejich receptory Tie 1 a 2:

Angiopoetin 1 – 4 a jejich receptory Tie 1 a 2 se uplatňují v interakci endotelu a mezenchymu, ze kterého se postupně diferencují pericyty a hladké svalové buňky cévní stěny (Suri et al., 1996).

- Angiopoetin 1 se uplatňuje v pozdějších fázích novotvorby cév. Usnadňuje vzájemné kontakty endotelií a jejich vazbu k buněčné membráně a působí recruitment pericytů, stabilizujících nově vytvořenou cévu (Klener, 2002).
- Angiopoetin 2 je destabilizačním faktorem, který cévy uvádí do plastického stavu, kdy je vlivem VEGF umožněno pučení (sprouting) dalších nových cév (Tait et al., 2004). Byl popsán na základě své homologie s angiopoetinem 1 a na základě schopnosti interagovat s Tie 2.

➤ Ephriny a jejich tyrozinkinázové Eph receptory:

Ephriny jsou signální molekuly, které se vážou na tyrozinkinázové Eph

receptory. Již od časných stadií angiogeneze se endotelové buňky tepen a žil liší rozdílnou expresí ephrinů a jejich receptorů. Protože ephriny zůstávají zakotveny v cytoplazmatické membráně buněk, které je produkují, operují mezi buňkami, které jsou v kontaktu. Přitom je efekt vazby ligandu a receptoru obousměrný, neboť je aktivována nejen buňka nesoucí receptor, ale i buňka exprimující ephrin. Arteriální endotel exprimuje ephrin-B2 (ligand), kdežto venózní endotel exprimuje jeho receptor Eph-B4. Za selektivní propojování venózních a arteriálních konců kapilár při remodelaci primárního kapilárního řečiště během angiogeneze je zodpovědná komplementarita molekuly ephrin-B2 a Eph-B4. Lze předpokládat, že signalizace mezi arteriálním a venózním řečištěm prostřednictvím ephrinu-B2 a jeho receptoru řídí vývoj proporcionality mezi rozsahem arteriálního a venózního úseku kapilárního řečiště (Wang et al., 1998).

➤ Růstové faktory pro fibroblasty FGF (fibroblast growth factor)

FGF zahrnují skupinu dnes již celkem 23 faktorů. Pro vývoj myokardu je podstatný faktor FGF-2 (původně bazická forma FGF), kdy je známá jeho zvýšená exprese během embryonálního období v myokardu (Palow et al., 1991), a jeho inhibice pomocí oligonukleotidů vede ke snížení proliferace buněk myokardu (Sugi et al., 1993).

➤ Hypoxií indukované faktory (HIF 1 - 3)

Za klíčový faktor regulující zásobení tkání kyslíkem je považován transkripční faktor HIF-1. HIF-1 je složen z indukovatelné HIF-1 α podjednotky a trvale přítomné podjednotky HIF-1 β . Expese HIF-1 α exponenciálně vzrůstá s poklesem parciálního tlaku kyslíku, maximální expese HIF-1 α je při koncentraci kyslíku 0-1 % (Wenger et al., 1997). HIF-1 α protein je v přítomnosti kyslíku intenzivně degradován, a proto je za normálních podmínek jeho koncentrace nízká, kdežto za hypoxických podmínek k této degradaci nedochází (Salceda et al., 1997). HIF 1 se pak váže do oblasti promotoru celé řady genů a podstatně ovlivňuje:

- erytropoézu – erythropoetin, transferin, transferinový receptor, ceruloplasmin,
- angiogenezu – VEGF, transformující factor β 3, inhibitor 1 aktivátoru plasminogenu,
- vasomotoriku – α 1B adrenergní receptor, adrenomedullin, endotelin 1,

arteriální natriuretický peptid, endotelová NO syntáza,

- metabolismus ATP – glukózový transportér 1 a 3, hexokináza 1 a 2, enoláza 1, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, laktát dehydrogenáza A, fosfoglycerát kináza, aldoláza A a C,
- další metabolismus – karbonanhydráza 9, adenylátkináza 3, prolylhydroxyláza,
- buněčný cyklus – insulin-like growth factor, cyklin G2.

U řady buněk je regulace HIF-1 α uskutečňována na úrovni transkripce, v některých případech je HIF-1 α regulován posttranslačně (Wang et al., 1995).

HIF-1 α je v přítomnosti kyslíku intenzivně degradován, a proto je za normálních podmínek jeho hladina nízká, kdežto za hypoxických podmínek k této degradaci nedochází. Degradace se děje prostřednictvím E3 ubiquitin ligázového komplexu, kde jako komponenta rozeznávající substrát slouží VHL protein. Substrátem je právě HIF-1 α protein, který je ubiquitinylován a následně degradován proteazomem. V případě mutace VHL genu a nefunkčnosti jím kódovaného VHL proteinu dochází ke zvýšení hladiny HIF-1 α a následně celého HIF-1 a zvýšené expresi regulovaných genů (erythropoetin, VEGF) (Krieg et al., 1998).

HIF 2 je komplexem podjednotky HIF-2 α , jejíž exprese je také navozena hypoxií, a podjednotky HIF-1 β . Iniciuje transkripci receptorů VEGFR 2 a Tie 2 a expresi VEGF (Ema et al., 1997).

1.5 Vliv hypoxie na vývoj myokardu

V průběhu ontogenetického vývoje prochází srdce velkými změnami, od avaskulární spongiózní svaloviny, která je vyživována difúzí z komorových dutin, ke kompaktní svalovině, která je vyživována z koronárních artérií (Tomanek, 1999).

Myokard představuje rytmicky pracující sval, který stále vykonává značnou práci. Energeticky náročné je zvláště vytváření tlakového gradientu v cirkulaci, energetický výdej však také značně závisí na srdeční frekvenci a na rychlosti kontrakce. Spotřeba kyslíku myokardem je u člověka v klidu asi 12 % z celkové bazální spotřeby kyslíku. Největší intenzita spotřeby kyslíku je

v myokardu levé komory, a to v subendokardiální vrstvě (121 ml/kg tkáně/min). Intenzita spotřeby kyslíku myokardem pravé komory je rovna jen 65 % intenzity zjištěné v myokardu levé komory. Intenzita spotřeby kyslíku v septu se blíží hodnotám v myokardu levé komory. Průtok krve myokardem je ve vztahu k intenzitě spotřeby kyslíku malý. Aby byla zabezpečena dostatečná dodávka kyslíku myokardem, musí proto docházet k relativně velké extrakci kyslíku z protékající krve. Průměrná arterio-venózní diference v obsahu kyslíku krve protékající myokardem se pohybuje kolem 133 ml/l krve. To představuje extrakci asi 65 % kyslíku z protékající krve, což je více než dvojnásobná extrakce v porovnání s extrakcí průměrnou. Přestože je průtok krve myokardem během systoly omezován zevními faktory ve formě stlačení cév, je zvýšení průtoku krve myokardem prakticky jediným možným způsobem, jak se může zvýšit dodávka kyslíku do této oblasti (Nečas, 1982).

V každém orgánu existují okrsky s různými parciálními tlaky kyslíku. Existence tohoto rozdílu je zdrojem difúze kyslíku, a je tedy nezbytná (Meuer et al., 1987). V této souvislosti je třeba uvést, že podmínkou funkčního oxidativního metabolismu mitochondrií je minimální hodnota tlaku 0.133 kPa = 1mmHg (Chance et al., 1962).

Obecně je přijímáno, že hypoxie hraje klíčovou roli v indukci angiogenních molekul v nádorových buňkách v důsledku rostoucích metabolických nároků zvětšujícího se nádoru (Folkman et al., 1971). Jedním z prvních takto popsaných angiogenních faktorů bylo právě VEGF (Shweiki et al., 1992). U hypoxického myokardu je exprese VEGF vyšší (zejména v ED6) než u normoxického, a to hlavně v komorách. Hypoxie vyvolává zvýšenou trabekularizaci myokardu komor, což může fungovat jako adaptační mechanismus zkracující difúzní vzdálenost (Naňka, 2005). Myokard je tak odkázán na difúzi kyslíku ze srdečních dutin, protože cévní řečiště se na srdce napojuje až devátý den (Tomanek, 2006b). Právě tento den však dle Naňky (2005) dochází k úmrtí embryí.

Podle Sharma et al. (2006) mění chronická hypoxie kardiovaskulární funkci a strukturu, a nevyvinutý myokard je tak považován za méně citlivý na hypoxii než myokard již dokonale vyvinutý.

Chronická hypoxie snižuje životnost a celkovou hmotnost embrya. Rouwet et al. (2002) uvádí u hypoxických embryí zvýšení mortality o 33 % a 11 % redukci hmotnosti vůči normoxickým embryím. Systolický tlak levé komory byl

u hypoxických embryí o 22 % nižší a poměr hmotnosti srdce ku hmotnosti těla byl o 14 % vyšší než u embryí normoxických. Jeho práce ukazuje, že mírná hypoxie vyvolává změny ve struktuře a funkci srdce a cév a narušuje hemodynamickou regulaci. Studoval vliv hypoxie na hmotu levé komory a jeho měření ukazují, že šířka stěny byla u hypoxických a normoxických embryí bílých leghornek (stádium HH43/44) srovnatelná, stejně tak i její plocha. Naproti tomu šířka septa byla u hypoxických embryí snižena. Tato data ukazují, že hypoxie je spojena s narušením funkce srdeční kontrakce se současnou hypertrofií srdce (Rouwet et al., 2002).

Na základě práce Sugishita et al. (2004), kde je popsán vliv hypoxie na remodelaci výtokového traktu srdce lze považovat hypoxii za morfogenetický faktor.

Vzhledem k předběžným nálezům na srdci a koronárním řečišti jsme se rozhodli ověřit zda chybný vývoj koronárního řečiště a jeho napojení není příčinou úmrtí embryí.

2. Cíle práce

Cílem studia vlivu hypoxie na vývoj embryonálního myokardu a jeho cévního řečiště bylo zjistit, zda a jak se uplatňuje tkáňová hypoxie jako faktor ovlivňující tvorbu koronárního řečiště a jak hypoxie ovlivňuje vlastní vývoj myokardu.

Na začátku našich pokusů jsme si stanovili následující otázky:

1. Jak reaguje embryonální myokard na mírnou hypoxii? Mění se jeho struktura?
2. Mění se pod vlivem hypoxie proliferační aktivita myokardu?
3. Je hypoxií ovlivněna tvorba kapilárního a koronárního řečiště a jeho spojení s aortou?

3. Materiál a metodika

3.1 Časový rozvrh

Měření probíhalo od měsíce října 2006 do května 2007 v Anatomickém ústavu 1. LF UK, U Nemocnice 3 v Praze 2.

3.2 Charakteristika modelového organismu

Pro experimentální model byla použita embrya japonské křepelky (*Coturnix coturnix japonica*), která pochází z chovu Výzkumného ústavu živočišné výroby v Uhřetěvsi.

3.3 Podmínky inkubace a odběrů

Vejce jsme inkubovali prvních 48 hodin v normoxických podmínkách (21% O₂), poté jsme je přemístili do inkubátoru s řízenou atmosférou (Heraeus B5060), kde jsme vejce inkubovali za hypoxických podmínek (16% O₂).

Kontrolní skupina byla inkubována stejný čas v normoxických podmínkách. Efekt hypoxie byl hodnocen 5. - 9. den embryonálního vývoje (stádium HH27 až HH37 dle Hamburgera a Hamiltona, 1951). Pro histologické zpracování vzorků myokardu jsme odebírali srdce z normoxických a hypoxických embryí ED5 - 9.

3.4 Nástřík koronárního řečiště tuší

Koronární řečiště jsme u embryí znázorňovali nástříkem tuší v ED8 a ED9. Na embryu vyjmutém z vejce jsme si vytvořili přístup k srdci a skleněnou kapilárou jsme aplikovali do levé komory tuš (Indian Ink, Pelikan, 1:10). Ihned po nástříku tuše do levé komory dojde k náplni koronárního řečiště, což lze dobře kontrolovat

pod preparačním mikroskopem. Po jedné minutě jsme srdce vypreparovali a fixovali pro následné histologické zpracování roztokem dle Serry (60% etanol, 30% formaldehyd, 10% kyselina octová) (Serra, 1946).

3.5 Fotodokumentace

Vypreparovaná srdce jsme fotografovali pod vodní hladinou digitální kamerou Olympus DP 70 v binokulárním preparačním mikroskopu Olympus SZX12. Obrázky byly archivovány a zpracovány v programu Cell P, Olympus.

Mikroskopické řezy byly studovány v mikroskopu Olympus BX51 a kamerou Olympus DP 70.

Pro dokumentační účely byl pořízen videozáznam nástřiku koronárního řečiště stejnou kamerou pod binokulární lupou.

3.6 Zpracování tkáně

Zpracování tkáně zahrnovalo proces dehydratace a převedení do parafinu, poté krájení na rotačním mikrotomu (zn. Leica) na řezy (10 μ m) a napínání na skla pokrytá poly-L-lysinem.

Dalším krokem bylo barvení hematoxylinem a eosinem. Při barvení jsou jádra buněk modrá (hematoxylin) a cytoplazma růžová (eosin) (Vacek, 1988).

3.7 Sledování proliferace

Proliferaci jsme sledovali značením pomocí BrdU. Roztok BrdU jsme aplikovali po otevření vejce přímo na chorioalantoidní membránu (c – 50 μ g/kg). Vejce pak byla inkubována dalších 120 minut. Následoval odběr a fixace roztokem směsí DMSO/methanol/k. octová (Dent's solution) a zpracování pro 5 μ m parafinové řezy. Dalším krokem bylo odparafinování, praní v PBS, částečná denaturace DNA a blokace endogenní peroxidázy 0,3% H₂O₂ v metanolu. Primární protilátku anti-BrdU (Dako, N0744) jsme použili v koncentraci 1:20 (4°C, přes

noc).

Pro histologickou analýzu jsme použili trojí značení – sarkomerický aktin (SMA, 1:1000 Sigma) jako marker kardiomyocytů, BrdU (1:1000, BD Bioscience) jako marker proliferujících jader v S-fázi a DRAQ 5 (1:1000, Biostatus Limited, UK) jako jaderné barvení. Dvojí značení je umožněno proto, že jako protilátka pro BrdU slouží IgG a pro sarkomerický aktin je jí IgM. Díky tomu se mezi specifickými protilátkami nevyskytuje zkřížená reaktivita.

Takto obarvené řezy (sarkomerický aktin, BrdU, DRAQ 5) byly hodnoceny na fluorescenčním mikroskopu. Proliferaci jsme sledovali ve vybraných reprezentativních úsecích myokardu z oblasti levé a pravé komory. V mikroskopickém obrazu jsme definovali oblast zahrnující pouze myokard, bez endokardu a epikardu. Každé značení bylo vyfotografováno samostatně a následně byl získán složený obraz. Následně jsme pak v Adobe Photoshop 7.0 počítali množství značených a neznačených myocytů, značené a neznačené nemyocyty v definovaných oblastech. Plocha pak byla změřena pomocí softwaru ImageJ (NIH Image 1.62) a výsledky byly dále zpracovány (počet proliferujících buněk v jednotlivých populacích vztažené na plochu/objem).

3.8 Znázornění tkáňové hypoxie

Marker tkáňové hypoxie (Hypoxyprobe 1, Natural Pharmacia International, Inc., Research Triangle Park, North Carolina), pimonidazol hydrochlorid, jsme aplikovali do v. omphalomesenterica v ED6 a ED8 v dávce 30 $\mu\text{g}/100$ mg embrya). Vejce pak byla dále inkubována 60 minut, následoval odběr a rychlá fixace ve 4% PFA. Pimonidazol hydrochlorid byl detekován v parafinových řezech monoklonální protilátkou Hypoxyprobe 1 (1:50). Jako sekundární protilátku jsme použili Goat antimouse AP (Sigma) v ředění 1:300.

3.9 Znázornění cévního systému a jeho kvantifikace

Cévní systém jsme znázorňovali v řezech protilátkou QH1, která je specifická pro endotelové buňky křepečky (mouse monoclonal antibody QH1; Hybridoma Bank, University Iowa; Pardanaud, 1987). Pro reakci v 8 μm parafínových řezech byla použita standardní peroxidázová technika. Po blokaci endogenní peroxidázy, byla aplikována primární protilátka QH1-Ab v koncentraci 1:3000 (90 min, při pokojové teplotě). Sekundární protilátka značená peroxidázou byla použita v ředění 1:150 (90 min, při pokojové teplotě). Jako barevný substrát byl použit DAB. Řezy byly dobarveny hematoxylinem. Počet kapilár byl sledován ve vybraných oblastech ze stěny levé a pravé komory a interventrikulárního septa. Byla použita projekce přes mřížku 10x10 μm (software Cell P, Olympus, funkce Measure-Grid) a spočten počet průsečíku s QH1 pozitivními buňkami (včetně lumen cév). Počet kapilár byl vyjádřen jako poměr k QH1 negativním buňkám (kardiomyocyty). Na stejných řezech byla měřena tloušťka stěny pravé a levé komory s využitím softwaru Cell P, Olympus.

3.10 Znázornění hladké svaloviny ve stěně cévy – SMA

Ačkoliv jsme ke znázornění cévního systému použili protilátku QH1, která specificky barví endotel krevních cév, doplnili jsme ještě značení pomocí SMA (aktin hladké svaloviny), abychom získali přehled o podílu hladké svaloviny ve větších cévních kmenech. K reakci byla použita celá srdce získaná standardním odběrem fixována roztokem dle Serry. Po 24 hodinové fixaci následovalo praní v PBS (3x30min) a blokace nespecifických vazeb. Jako primární protilátka byla použita alfa-SMA Ab, Sigma, v ředění 1:500 při pokojové teplotě po dobu 24 hodin.

Po opakovaném praní v PBS následovala inkubace se sekundární protilátkou GaM-TRITC IgG, Jackson Lab., v ředění 1:100 po dobu 4 hodin. Po ukončení inkubace následovalo opětovné praní v PBS a fixace v 70 % ethanolu. Tyto vzorky pak byly prohlíženy a fotografovány podobně jako předchozí pod binokulární lupou.

3.11 Statistické zpracování dat

Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm SD (směrodatná odchylka). Pro porovnání výsledných hodnot vzájemně mezi skupinami byl použit dvou-výběrový *t*-test. Statistická analýza dat byla provedena v programu Microsoft Excel; *p*-hodnota menší nebo rovna 0,05 byla považována za statisticky významnou.

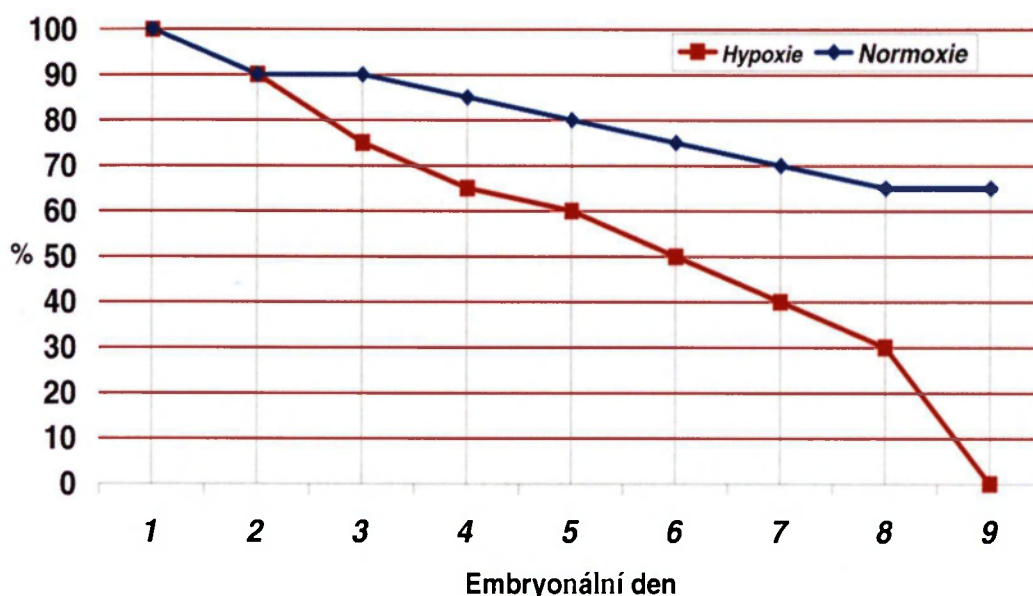
4. Výsledky

4.1 Úmrtnost embryí a makroskopické nálezy

Vystavení křepelčích vajec hypoxickým podmínkám (16% O₂) namísto podmínkám normoxickým (21% O₂) znamená pro hypoxická embrya snížení přežití. V popsaných podmínkách přežilo 48 hodin hypoxie 75 % embryí a 96 hodin přežilo 60 % embryí. Další embrya umírají osmý a devátý embryonální den. Nejdelší doba přežití byla 9 dnů (viz graf č. 1).

Normoxická embrya přežila prvních 48 hodin v 90 %, 96 hodin v 80%. Nejvyšší úmrtnost byla dosažena osmého dne embryonálního vývoje (35 %), dále se však již nezvyšovala (viz graf č. 1).

Uhynulá embrya nevykazovala žádné zřetelné malformace, byla však edematózní, často se známkami rozsáhlého krvácení či hematomů v podkoží.



Graf č. 1: Přežívání křepelčích embryí za normoxických (21% O₂) a hypoxických (16% O₂) podmínek.

4.2 Znázornění koronárního řečiště nástřikem tuší – ED9

Při nástřiku tuší přes levou komoru srdeční se u normoxických embryí rychle plní koronární řečiště, s určitým zpožděním je zřetelná tuš i v žilním systému srdce. Toto je vidět i při malém zvětšení. U nástřiků hypoxických embryí nebylo plnění koronárního řečiště pod preparační lupou zřetelné.

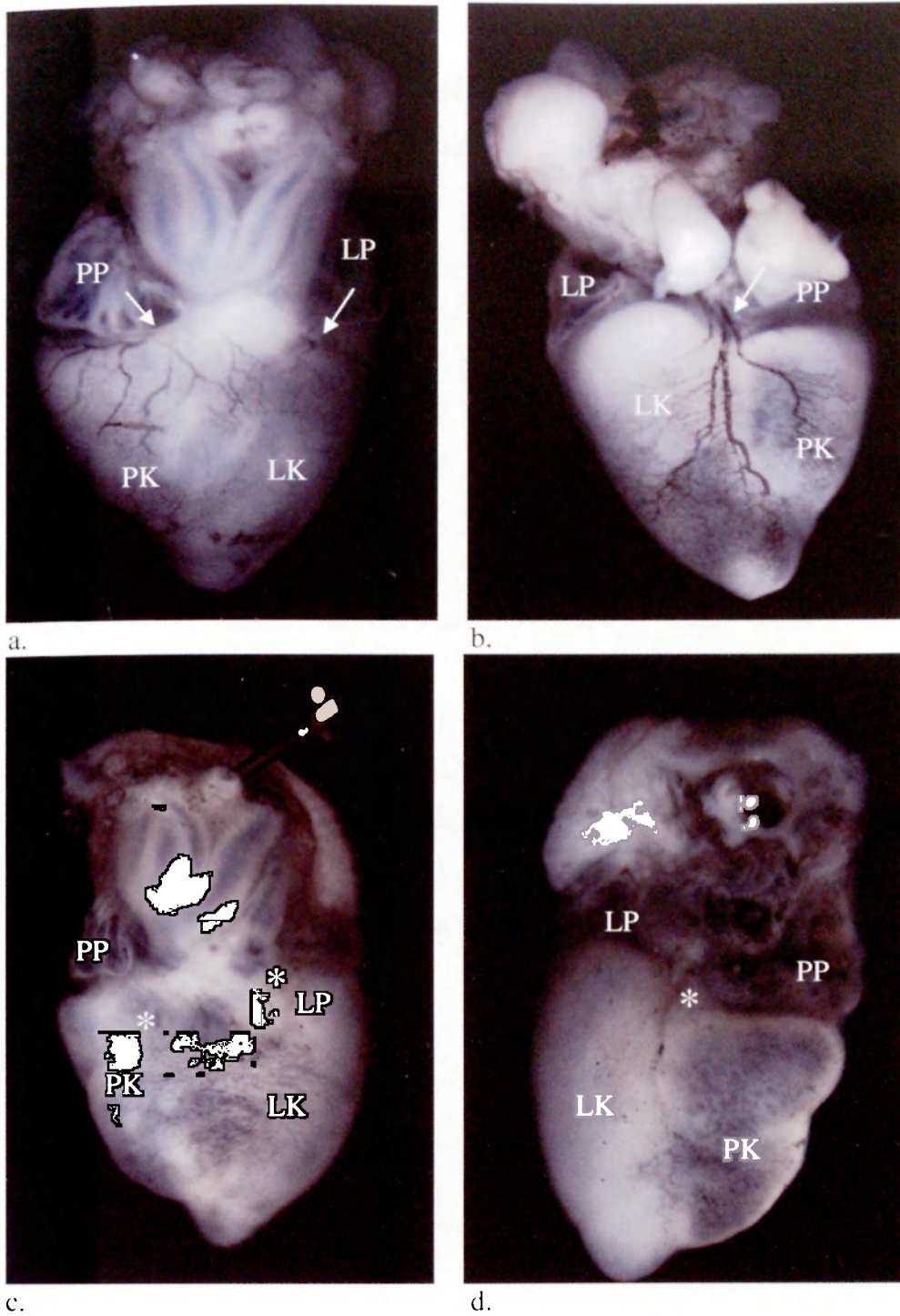
Na fotografickém zobrazení nástřiku srdce tuší u normoxických embryí ve stádiu ED8 lze pozorovat formující se bohatě se větvící pleteně, které směřují k aortě.

Další den, ve stadiu ED9, lze již vidět zřetelně vytvořené silnější kmeny koronárních cév a jejich bohaté větvení na přední i zadní ploše srdce. U normoxické skupiny byly vždy přítomné dva hlavní kmeny (a. coronaria dx. et sin.). Na zadní ploše srdce je po nástřiku zřetelná náplň tuší i v srdečních žilách.

Nálezy ve skupině embryí inkubovaných za hypoxických podmínek jsou odlišné.

Během ED8 jsme za hypoxických podmínek našli pouze podstatně slabší pleteně než za podmínek normoxie. V části případů tyto pleteně směřovaly k aortě ve stejném směru tak jako budoucí a. coronaria dx. et sin.

V průběhu ED9 pouze ve 20 % procentech jsou vytvořeny oba hlavní kmeny koronárních tepen stejně tak jako za normoxických podmínek. Ve 40 % případů byla vytvořena pouze jen jedna koronární tepna, častěji pravá. Na druhé straně byly přítomny pouze nepravidelné nebo žádné pleteně. Ve zbylých případech (40 %) byla vytvořena pouze nepravidelná síť kapilár, především v oblasti komor, a není jasně vytvořený kmen, který by spojoval toto velmi nepravidelné řečiště s aortou (viz obr. 4.).



Obr. 4: Znázornění koronárního řečiště nástřikem tuší – ED9.

a. Normoxické srdce, pohled zředu. Šipky označují dva pravidelné cévní kmene směřující k aortě.

b. Normoxické srdce, pohled zepředu. Šipkou jsou označeny zřetelné kapilární pleteně a retrográdně naplněné žilní kmene směřující k pravé předsíni.

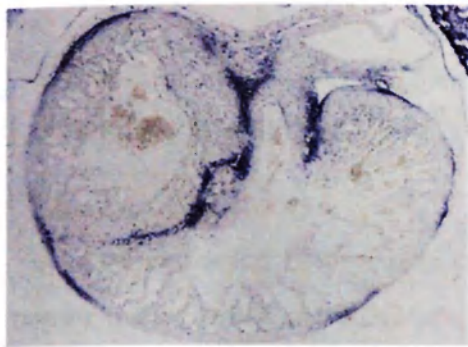
c. Hypoxické srdce, pohled zředu. Není vytvořený žádný hlavní kmen, přítomny jsou pouze chabé nepravidelné pleteně. * označují chybějící cévní kmene.

d. Hypoxické srdce, pohled zepředu. Nejsou zřetelné žádné cévy, pouze se slabě plní část žilního řečiště. * označuje chybějící cévní kmen.

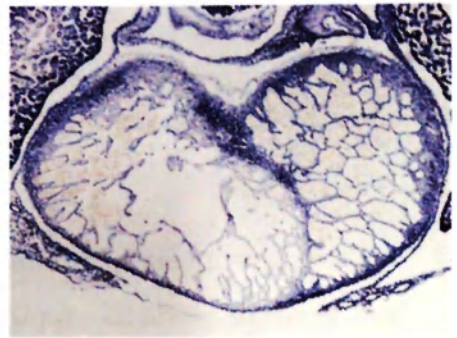
4.3 Hypoxické tkáňové okrsky v myokardu za normoxických a hypoxických podmínek

Hypoxyprobe detekuje tkáňové okrsky v nichž je tenze kyslíku menší než 1.31kPa (Raleigh JA et al.,1998). Nízká intenzita signálu byla v ED6 a ED8 patrná téměř ve všech tkáních embrya. Odpovídá to nízkým hodnotám pO_2 , které v embryonálních tkáních přímo změřil Meuer et al. (1987). Vyšší intenzita signálu a tedy vyšší stupeň hypoxie byl v ED6 patrný v základech v myokardu (viz obr. 5). Hypoxické okrsky tkáně byly patrné, především pak v interventrikulárním septu, v malém rozsahu i v kompaktní vrstvě myokardu. Během ED8 jsme nacházeli hypoxické okrsky opět v interventrikulárním septu a ve větším rozsahu ve srovnání s ED6 ve stěně myokardu (viz obr. 5).

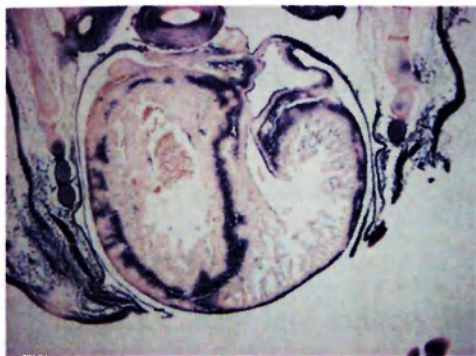
Intenzita signálu v okrcích tkáňové hypoxie znázorněného pomocí Hypoxyprobe v experimentální skupině embryí byla výraznější a okrsky byly větší. Během ED6 jsme našli hypoxické okrsky opět v interventrikulárním septu a v kompaktní vrstvě obou komor (viz obr. 5). V průběhu ED8 byly nalezeny navíc hypoxické okrsky i v trabekulární části myokardu.



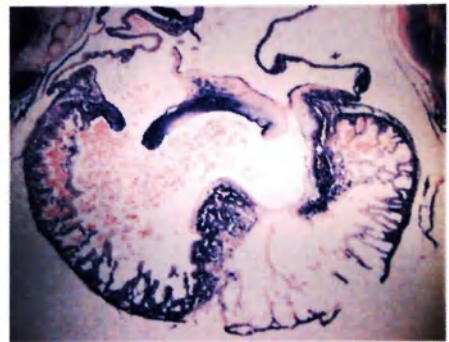
a.



b.



c.



d.

Obr. 5: Transverzální řez komorami při značení Hypoxyprobe

- a. Normoxické embryo ED6 – tkáňová hypoxie je patrná především v interventrikulárním septu, ojediněle ve stěně komor.
- b. Hypoxické embryo ED6 – hypoxické okrsky jsou rozsáhlejší, jsou přítomné v kompaktní vrstvě myokardu.
- c. Normoxické embryo ED8 – hypoxické okrsky jsou přítomné opět v interventrikulárním septu a v kompaktní stěně komor.
- d. Hypoxické embryo ED8 – hypoxické okrsky jsou přítomné v trabekulární vrstvě myokardu.

4.4 Tloušťka stěny komor u embryí – ED5, 7, 9

Tloušťku kompaktní vrstvy stěn pravé i levé komory jsme měřili u embryí ED5, ED7 a ED9 (viz graf č. 2).

Normoxická embrya

U normoxických embryí byla naměřena tloušťka kompaktní vrstvy stěny levé komory u ED5 průměrně 103,3 μm , u ED7 již 170 μm . Znamená to, že za dva dny se tloušťka stěny levé komory zvětšila o téměř 65 %. U ED9 tloušťka stěny levé komory dosahovala u normoxických embryí průměrně 275,5 μm , tedy zvětšila se o 62 %.

Hodnota tloušťky stěny pravé komory byla u ED5 průměrně 50 μm a u ED7 70 μm . V tomto případě hodnota za dva dny vzrostla o 40 %. O dva dny později (ED9) byla tato hodnota 137,7 μm , tedy o 96,7 % vyšší.

Hypoxická embrya

Tloušťka stěny levé komory je u hypoxického srdce ED5 40 μm a ED7 86,7 μm . Její tloušťka tedy za dva dny vzrostla o 117 %. Ve stádiu ED9 byla hodnota tloušťky 156,5 μm , tedy o více než 80 % vyšší.

U stěny pravé komory byla hodnota tloušťky u embryí ED5 průměrně 30 μm a v ED7 36,7 μm . Hodnota zde za dva dny vzrostla o 22,3 %. V ED9 byla tloušťka stěny 73,8 μm , tedy o 101 % vyšší za dva dny.

Dalším nálezem u hypoxické skupiny je zvýšená trabekularizace spongiózní vrstvy myokardu a dilatace komor.

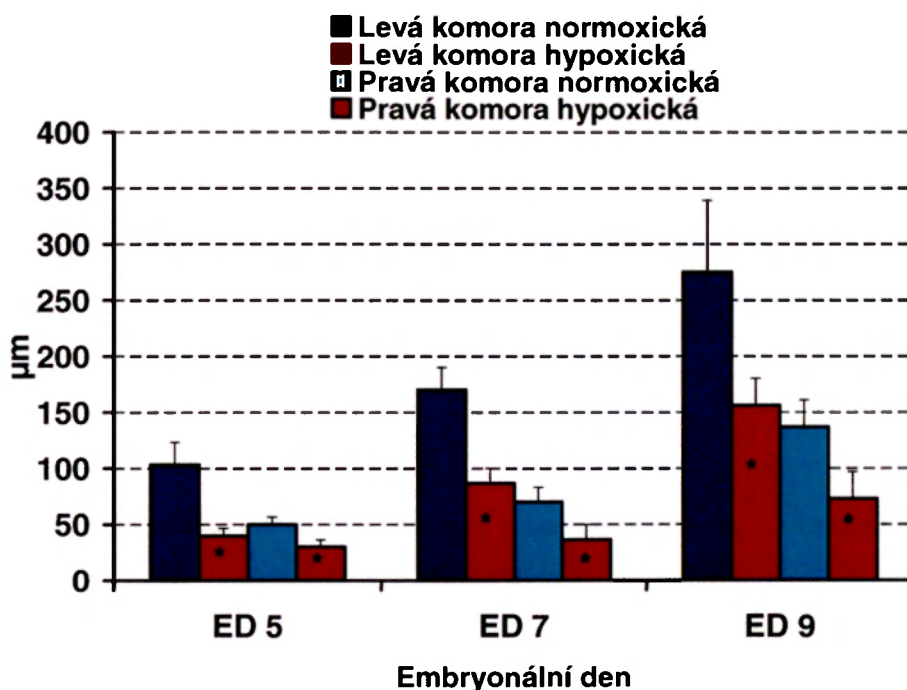
Srovnání normoxických a hypoxických embryí

Tloušťka stěny komor je u normoxických embryí větší než u hypoxických embryí. Zatímco tloušťka stěny levé komory je u normoxických srdcí ED5 průměrně 103,3 μm , u hypoxických srdcí to činí 40 μm . Znamená to, že u normoxických embryí je tlouška stěny levé komory 2,6krát větší než u embryí hypoxických ($p < 0,05$). Srovnání tloušťky levé komory u normoxického a hypoxického embrya ED5 viz na obr. 6. V ED7 jsou tyto rozměry 170 μm a 87 μm , což je pro normoxické srdce téměř dvojnásobná tloušťka oproti srdci hypoxickému ($p < 0,05$). Srovnání tloušťky levé komory u normoxického a hypoxického embrya ED7 viz na obr. 7. V ED9 je tloušťka stěny levé komory

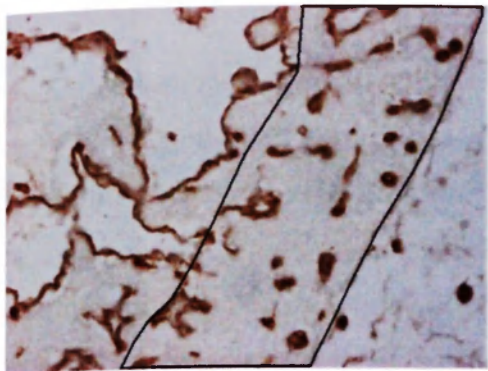
u normoxických embryí 275,5 μm , u hypoxických 156,5 μm , tedy u normoxických embryí je stěna 1,8krát silnější ($p < 0,05$).

U stěny pravé komory to platí podobně. V ED5 je stěna normoxického srdce (průměrně 50 μm) 1,7krát silnější než u srdcí hypoxických (30 μm) ($p < 0,05$). V ED7 je tloušťka stěny pravé komory u normoxických srdcí průměrně 70 μm a u srdcí hypoxických 36,7 μm , což svědčí pro normoxické embrya o téměř dvojnásobnou tloušťku oproti embryím hypoxickým ($p < 0,05$). U ED9 je stěna srdečních komor normoxických embryí 137,7 μm silná, u hypoxických 73,8 μm . Stěna komor u normoxických embryí je zde 1,9krát silnější ($p < 0,05$) než u komor embryí hypoxických.

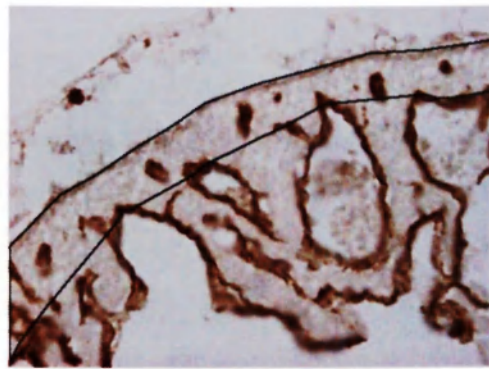
Obecně lze shrnout, že za hypoxických podmínek nacházíme tenčí stěnu komor, rozdíl v tloušťce stěny je výraznější v levé komoře ve všech sledovaných stádiích. Ve všech sledovaných stádiích dochází též k růstu tloušťky stěny komor, tento růst však byl za hypoxických podmínek podstatně menší. Tyto změny jsou dále doprovázeny zvýšenou trabekularizací spongiózní vrstvy myokardu a dilatací komor. Tyto nálezy mohou být známkou srdečního selhání.



Graf č. 2: Tloušťka stěn srdečních komor křepelčích embryí za normoxických (21% O_2) a hypoxických (16% O_2) podmínek - ED5, ED7 a ED9.

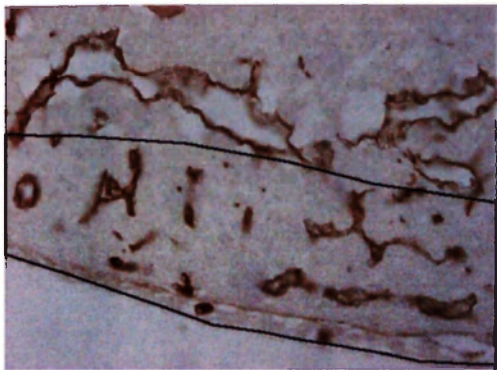


a.

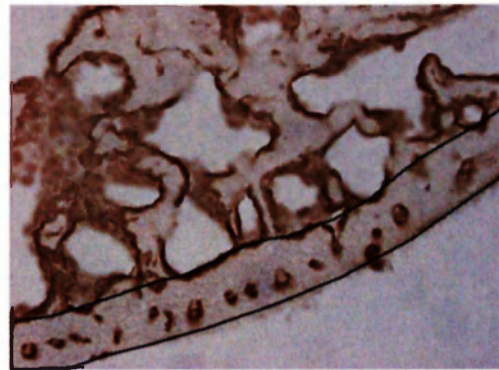


b.

Obr. 6: Srovnání tloušťky levé komory u normoxického (a.) a hypoxického (b.) embrya ED5. Na řezech je patrný rozdíl v tloušťce stěny a zvýšená trabekularizace u hypoxických embryí. Kapiláry označeny QH1 protilátkou, tyto řezy byly použity jednak ke měření tloušťky stěny a jednak k hodnocení počtu kapilár (černě označena hranice výběru odpovídající vrstvě kompaktního myokardu).



a.



b.

Obr. 7: Srovnání tloušťky levé komory u normoxického (a.) a hypoxického (b.) embrya ED7. Na řezech je patrný rozdíl v tloušťce stěny a zvýšená trabekularizace u hypoxických embryí. Kapiláry označeny QH1 protilátkou, tyto řezy byly použity jednak ke měření tloušťky stěny a jednak k hodnocení počtu kapilár (černě označena hranice výběru odpovídající vrstvě kompaktního myokardu).

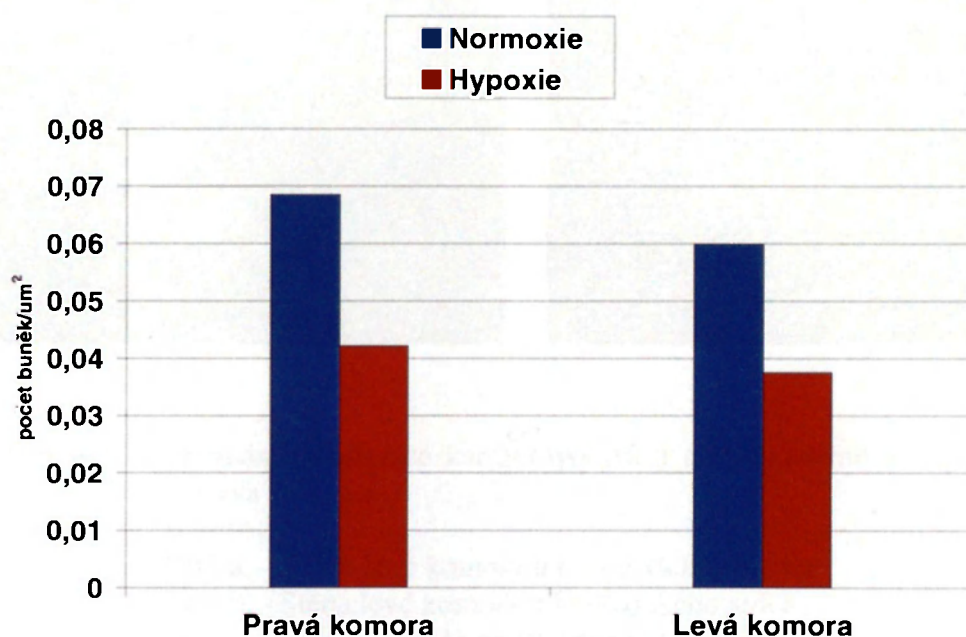
4.5 Proliferace kardiomyocytů v srdeční komoře – ED6

Proliferační aktivita byla sledována v kompaktní vrstvě myokardu ve stěně pravé i levé komory ED6 po aplikaci BrdU. Po prvním zhodnocení výsledků detekce proliferace, kdy jsme značili proliferující buňky BrdU, kardiomyocyty protilátkou proti sarkomerickému aktinu a jádra barvili pomocí DRAQ5, a chtěli od sebe odlišit proliferující populaci kardiomyocytů a „ne-myocytů“, jsme zjistili, že počet proliferujících „ne-myocytů“ je nepatrný a že námi detekovaná proliferace odpovídá kardiomyocytům. Proto jsme se v dalším hodnocení rozhodli vyjadřovat počet všech proliferujících buněk na jednotku plochy a považovat je za kardiomyocyty.

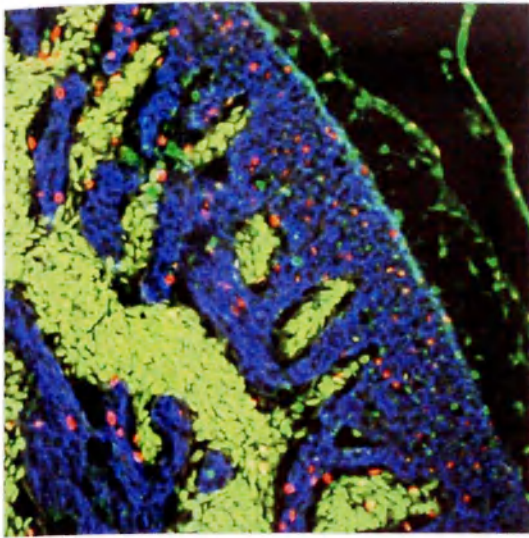
Průměrný počet proliferujících kardiomyocytů značených sarkomerickým aktinem na jednotku plochy (μm^2) levé komory byl u hypoxických srdcí 0,037 (SD = 0,02), tedy nižší než u normoxických (0,059, SD = 0,01).

Výsledky spočtené pro pravou komoru byly u hypoxických srdcí 0,042 (SD = 0,02) a u normoxických srdcí 0,068 (SD = 0,001).

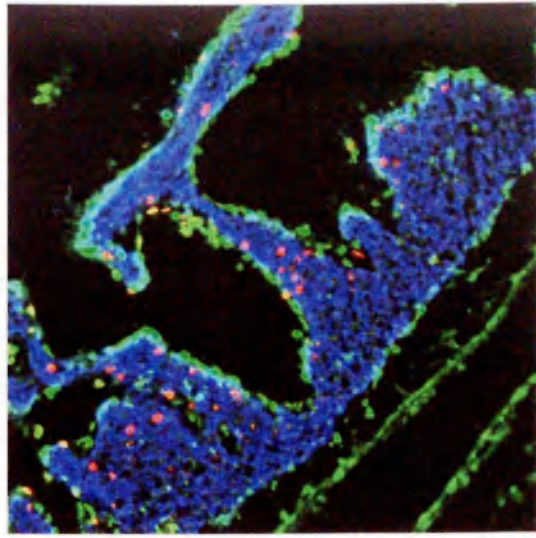
Proliferace kardiomyocytů byla tedy jak v levé, tak v pravé komoře u hypoxických embryí prokazatelně nižší než u embryí normoxických (viz graf č. 3 a obr. 8).



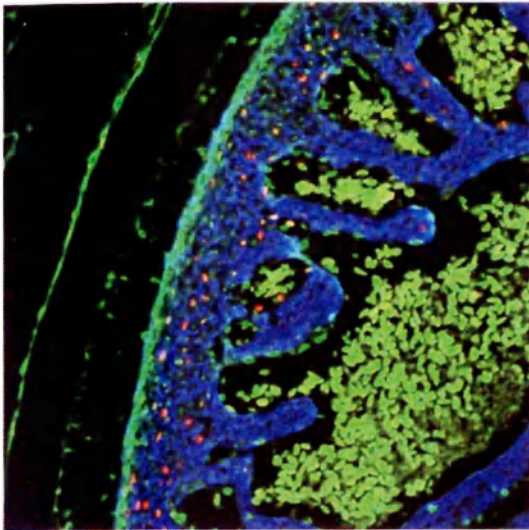
Graf č. 3: Proliferace kardiomyocytů srdečních komor křepelčích embryí za normoxických (21% O_2) a hypoxických (16% O_2) podmínek - ED6.



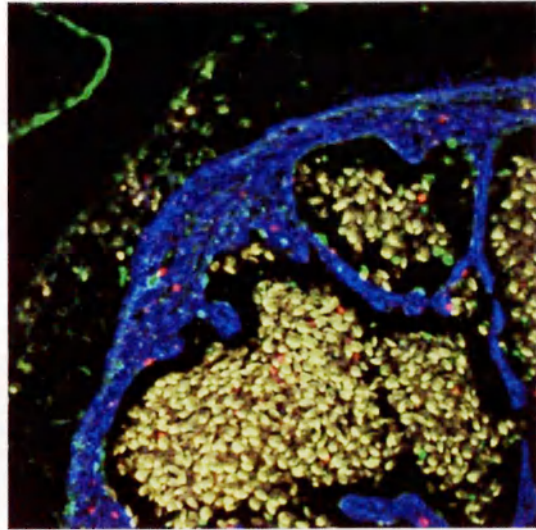
a.



b.



c.



d.

Obr. 8: Srovnání proliferace kardiomyocytů u normoxického a hypoxického embrya ED6

Obr. a. – Stěna levé komory u normoxického srdce

Obr. b. – Stěna levé komory u hypoxického srdce

Obr. c. – Stěna pravé komory u normoxického srdce

Obr. d. – Stěna pravé komory u hypoxického srdce

4.6 Hustota kapilár v interventrikulárním septu a srdečních komorách – ED5, 7, 9

Počet kapilár byl vyjadřován jako poměr QH1 pozitivních buněk (endotelové buňky) k QH1 negativním buňkám (kardiomyocyty).

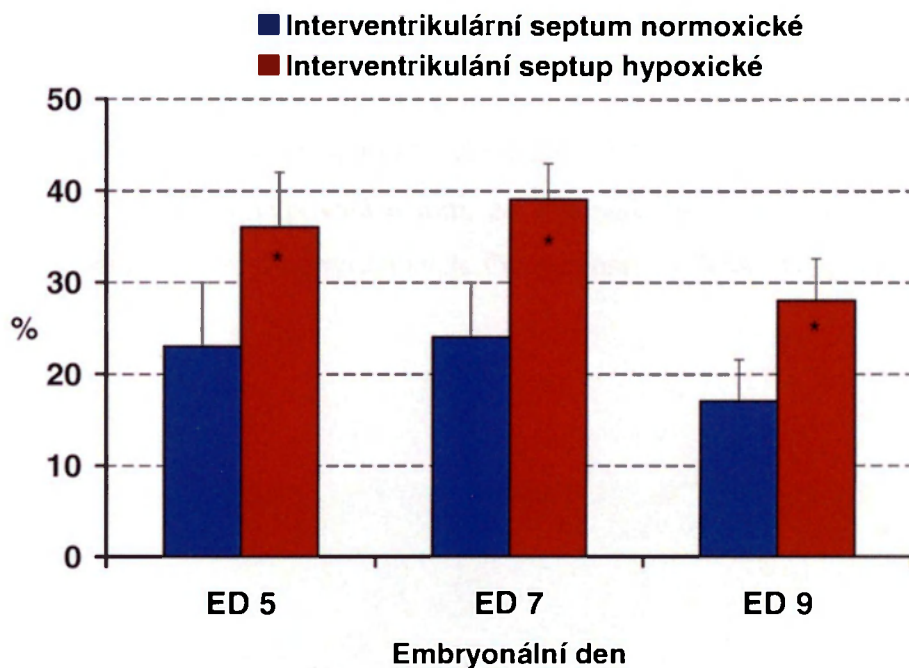
Interventrikulární septum

V oblasti interventrikulárního septa u embryí ED5 tvořily QH1 pozitivní buňky u normoxických embryí 23,3 % (SD = 7,2), u hypoxických embryí 34,5 % (SD = 5,5) z celkového počtu buněk ($p < 0,05$).

U ED7 bylo toto procento u normoxických embryí 24,4 % (SD = 6,3) a u hypoxických embryí 38,8 % (SD = 3,9).

U ED9 bylo výsledné procento 17,4 % (SD = 4,6) u normoxických embryí, u hypoxických embryí 28,4 % (SD = 4,6).

U ED5 byl rozdíl vaskularizace interventrikulárního septa hypoxických a normoxických srdcí 11 % ($p < 0,05$), u ED7 byl rozdíl 14,4 % ($p < 0,05$) a u ED9 opět 11% ($p < 0,05$). Z výsledku je patrné, že u hypoxických embryí je vaskularizace zřetelně vyvinutější. Pro srovnání výsledků viz graf č. 4.



Graf č. 4: Hustota kapilární sítě v interventrikulárním septu za normoxických (21% O₂) a hypoxických (16% O₂) podmínkách - ED5, ED7 a ED9.

Levá komora

V oblasti levé komory jsme u ED5 naměřili u normoxických embryí 20,6 % (SD = 4,05), u hypoxických embryí 23,6 % (SD = 6,04) ($p = 0,29$).

U ED7 bylo toto procento u normoxických embryí 19,8 % (SD = 7,3) a u hypoxických embryí 33,6 % (SD = 3,4) ($p < 0,05$).

U ED9 bylo výsledné procento u normoxických embryí 19,9 % (SD = 4,2) a u hypoxických embryí 33,9 % (SD = 6,9) ($p < 0,05$).

U ED5 byl rozdíl vaskularizace levé komory hypoxických a normoxických srdcí 3% ($p = 0,29$), u ED7 byl rozdíl 13,8 % ($p < 0,05$) a u ED9 tvořil rozdíl 14% ($p < 0,05$). Z výsledku je patrné, že u hypoxických embryí je vaskularizace levé komory vyvinutější.

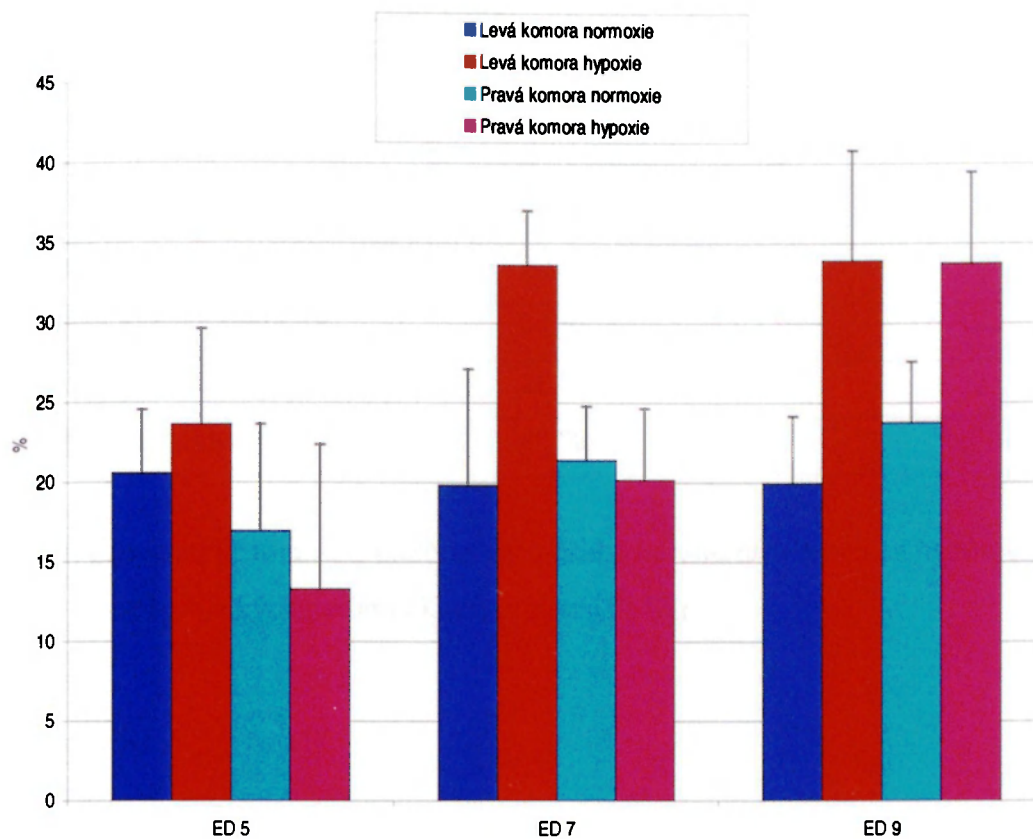
Pravá komora

V oblasti pravé komory jsme ve u ED5 naměřili u normoxických embryí 16,9 % (SD = 6,8), u hypoxických embryí 13,3 % (SD = 9,1) ($p = 0,42$).

U ED7 se toto procento zvýšilo u normoxických embryí na 21,4 % (SD = 3,4) a u hypoxických embryí na 20,1 % (SD = 4,6).

U ED9 tvořilo výsledné procento u normoxických embryí 23,8 % (SD = 3,9) a u hypoxických embryí 33,7 % (SD = 5,8). V tomto případě však byly údaje pro velmi tenkou stěnu hůře získatelné a bylo těžké odlišit, co je spongiózní a co kompaktní vrstva.

U ED5 byl rozdíl vaskularizace pravé komory hypoxických a normoxických srdcí 3,6 % ($p = 0,42$), u ED7 byl rozdíl 1,3 % ($p = 0,56$), u ED9 ale 9,9 % ($p < 0,05$). Výsledek vypovídá o tom, že v případě pravé komory je vaskularizace více vyvinutá u embryí normoxických. Pro srovnání výsledků viz graf č. 5.



Graf č. 5: Hustota kapilární sítě ve stěně srdečních komor za normoxických (21% O₂) a hypoxických (16% O₂) podmínek - ED5, ED7 a ED9.

4.7 Průkaz SMA ve stěně koronárních cév

Během ED8 v normoxických podmínkách nejsou ještě formovány dva hlavní kmene koronárních tepen, je zřetelná pozitivita pouze ve formě jemných pletených na přední ploše srdce, které směřují k aortě jak z pravé, tak z levé strany (viz obr. 9a.).

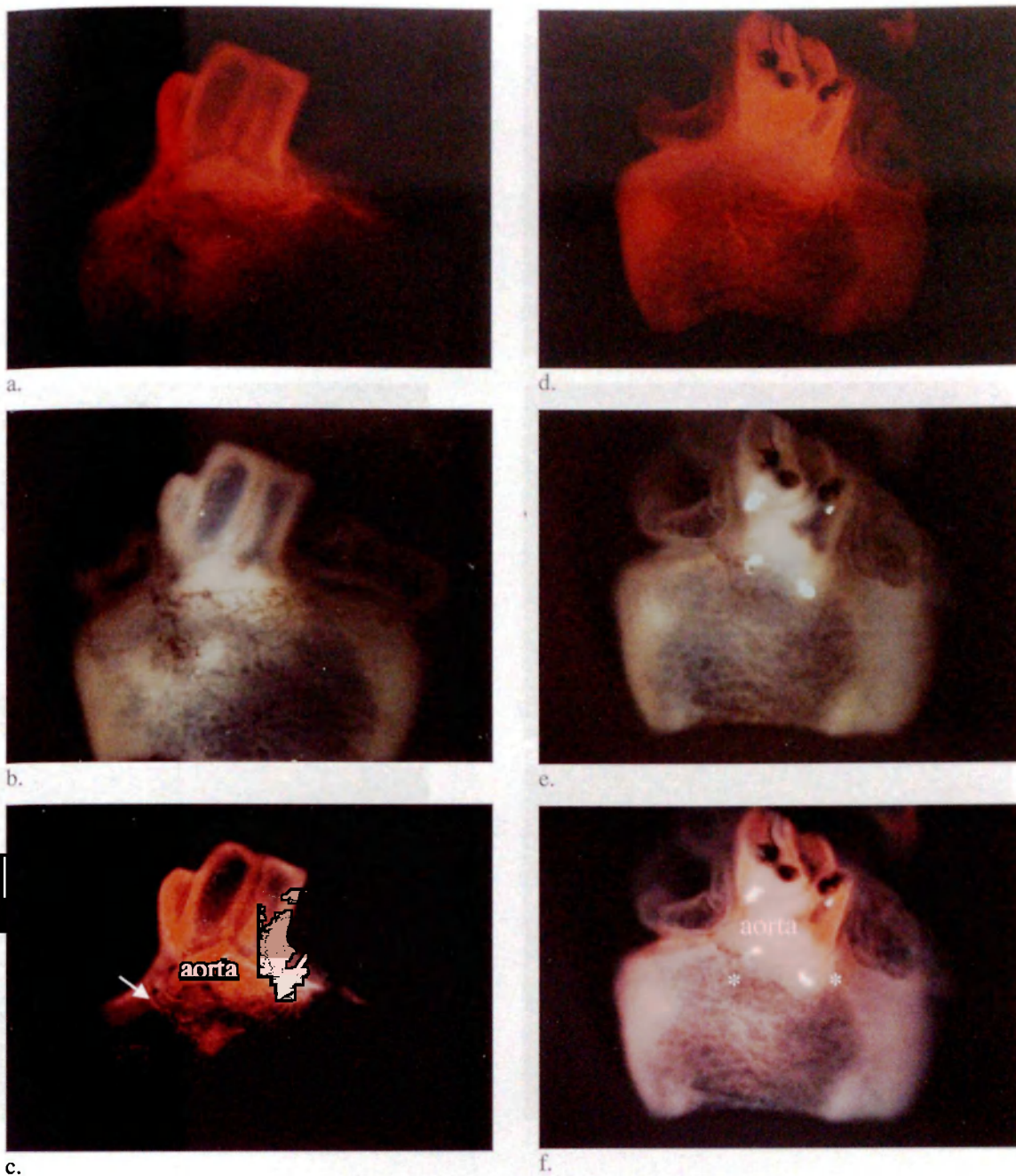
Za hypoxických podmínek během ED8 jsou kapilární pleteně zřetelně chudší (viz obr. 9d.).

Při průkazu SMA během ED9 jsou za normoxických podmínek zřetelné již dva hlavní kmene (viz obr. 10a.), pozitivita je přítomna především v proximálních úsecích koronárních tepen. Za hypoxických podmínek jsme našli dva SMA pozitivní kmene koronárních tepen vytvořené pouze ve 20 %. V ostatních případech

byla vytvořena jen jedna koronární tepna či nepravidelné pleteně (viz tab. 1 a obr. 10d.)

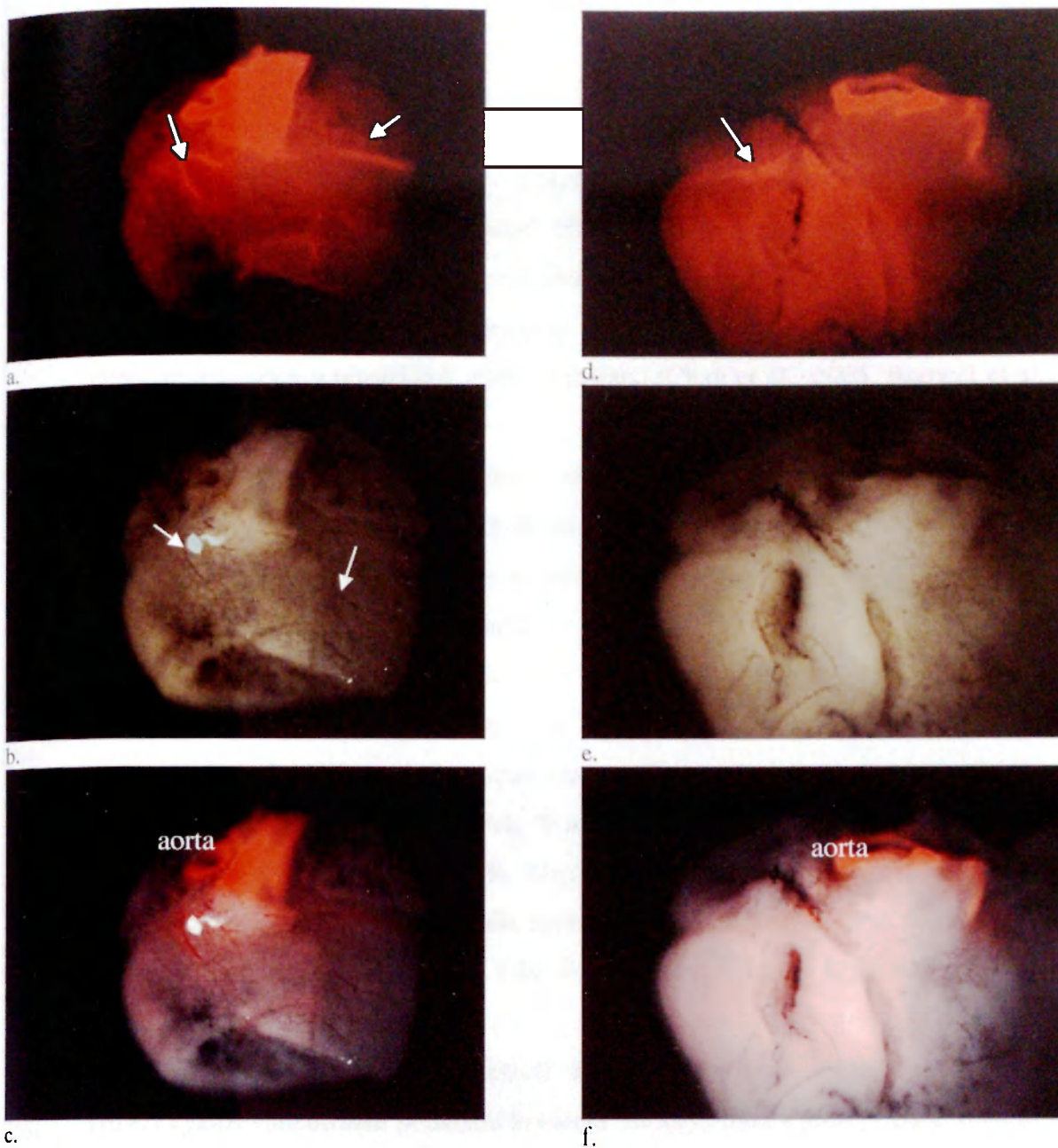
	16% O₂	21% O₂
Obě cévy pravidelně	20 %	100 %
Jen a. coronaria dx.	30 %	
Jen a. coronaria sin.	10 %	
Nepravidelné pleteně	40 %	

Tab. 1: Srovnání přítomnosti proximálních úseků koronárních tepen za hypoxických a normoxických podmínek (při průkazu SMA)



Obr. 9: Znázornění hladké svaloviny ve stěně cév u ED8 pomocí SMA
(a. - c. - normoxické srdce, d. - f. - hypoxické srdce)

- a. průkaz SMA – SMA pozitivita je přítomna především v aortě a v truncus pulmonalis a jsou zřetelné dvě formující se pleteně,
- b. nástřík tuší - zřetelně se vyvíjející pleteně na přední ploše srdce,
- c. složený obraz z předchozích – zřetelné pleteně směřující k aortě jsou označeny šipkami,
- d. průkaz SMA – SMA pozitivita je přítomna opět především v aortě a v truncus pulmonalis a jen velmi slabě ve slabé pleteni,
- e. nástřík tuší - jen velmi slabě vytvořená pleteně na přední ploše srdce,
- f. složený obraz z předchozích - pleteně (*) jsou výrazně slabší a chudší než v kontrolní skupině.



Obr. 10: Znázornění hladké svaloviny ve stěně cévy u ED9 pomocí SMA
(a. - c. - normoxické srdce, d. - f. - hypoxické srdce)

- a. průkaz SMA – SMA pozitivita je přítomna v proximálních úsecích dvou pravidelně vytvořených tepen (šipky),
- b. nástřík tuší - zřetelně se vyvíjející pleteně na přední ploše srdce, formují se dva kmene směřující k aortě (šipky),
- e. složený obraz z předchozích – jasný průkaz SMA v proximálních úsecích koronárních tepen, tuš naopak dobře zviditelňuje periferní větvení.
- d. průkaz SMA – je vytvořen proximální úsek pouze pravé koronární tepny (šipka), levá tepna chybí,
- e. nástřík tuší - chabě vyvinuté pleteně na přední ploše srdce,
- f. složený obraz z předchozích – slabá SMA pozitivita v proximálním úseku pravé koronární tepny, nástřík prokazuje slabé a chudé periferní větvení.

5. Diskuze

Hypoxie je v časných stádiích vývoje zárodku fyziologickým mechanismem, který orientuje cévy k proliferačním centřům a umožňuje tak další diferenciaci a správný vývoj orgánů. Na druhou stranu je hypoxie spojována s vývojovými komplikacemi (se zvýšenou mortalitou plodu, se sníženou porodní hmotností, s vývinem kardiovaskulárních anomálií a dysfunkcí) a je považována za negativní faktor v pozdějších stádiích gestace (Chan et al., 2005, Rouwet et al., 2002).

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv hypoxie na embryonální vývoj myokardu a koronárních cév u křepelčích embryí. Hodnocení těchto vlivů je však obtížné, protože na vývoji embrya se podílí mnoho dalších faktorů a komorbidit spojených s jinými tělními soustavami.

Vystavení křepelčích vajec vlivu hypoxie (16% O₂) znamená pro embrya snížení přežití. To udává i Rouwet et al. (2002), který prováděl měření u embryí bílých leghornek (HH43/44) a zaznamenal o 33% vyšší úmrtnost u hypoxických embryí než u embryí normoxických. V našem případě přežilo 48 hodin hypoxie 75 % embryí a 96 hodin jen 60 %. Nejdelší doba přežití byla devět dnů, žádná embrya v hypoxickém prostředí déle nepřežila. Normoxická embrya naproti tomu přežila 48 hodin v 90 %, 96 hodin v 80 % a osmý den v 65 %. Další dny již u nich úmrtnost zaznamenána nebyla.

Dle Naňky (2005) nepřeživší hypoxická embrya japonských křepelek (ED9) vykazovala difúzní podkožní krvácení. Embrya byla v jeho případě větší než kontrolní (normoxická). Rouwet et al. (2002) udává ve své studii 11 % redukci hmotnosti a poměr hmotnosti srdce ku hmotnosti těla o 14 % vyšší u hypoxických embryí než u embryí normoxických.

My jsme u uhynulých hypoxických embryí (ED9) nezaznamenali žádné zřetelné makroskopické malformace, byla však edematózní, často se známkami rozsáhlého krvácení či hematomů v podkoží.

Mírná hypoxie vyvolává změny ve struktuře a funkci srdce a konárních cév, a narušuje tak hemodynamickou regulaci. Dle Naňky (2005) byla u hypoxických embryí stěna myokardu tenčí než v kontrolní skupině. Rouwet et al. (2002) naopak ve své studii ukazuje, že šířka stěny byla u hypoxických a normoxických embryí bílých leghornek (stádium HH43/44) srovnatelná. Naproti

tomu šířka septa byla v jeho případě u hypoxických embryí menší. V našem měření jsme zaznamenali tloušťku stěny myokardu u hypoxických embryí menší než u embryí normoxických. Tlouška stěny levé komory byla v ED5 u normoxických embryí 2,6krát větší než u embryí hypoxických a v ED7 byly tyto rozměry 170 μm a 87 μm , což je pro normoxické srdce téměř dvojnásobná tloušťka oproti srdci hypoxickému. V ED9 byla tloušťka stěny levé komory u normoxických embryí 275,5 μm , u hypoxických 156,5 μm , tedy u normoxických embryí je 1,8krát silnější.

U stěny pravé komory to platilo podobně. Ve stádiu ED5 byla tloušťka stěny normoxických srdcí (průměrně 50 μm) 1,7krát silnější než u srdcí hypoxických (30 μm). V ED7 byla tloušťka stěny pravé komory u normoxických srdcí průměrně 70 μm a u srdcí hypoxických 36,7 μm , což svědčí pro normoxické embrya o téměř dvojnásobnou tloušťku oproti embryím hypoxickým. V ED9 byla stěna srdečních komor normoxických embryí 137,7 μm silná, u hypoxických 73,8 μm . Stěna komor u normoxických embryí je zde 1,9krát silnější než u komor embryí hypoxických. Zajímavý je fakt, že mezi ED7 a ED9 dochází i za hypoxický podmínek k prudkému ztluštění stěny pravé komory, toto ztluštění však lze vysvětlit mechanismem kompaktizace trabekul (Rycher a Ošťádal, 1971). Tomuto výraznému ztluštění kompenzatorně odpovídá i výrazný vzestup kapilarizace ve stěně pravé komory mezi ED7 a ED9.

Výše uvedené výsledky odpovídají fotografickému zobrazení koronárního řečiště nástřikem tuší. U normoxických embryí ve stádiu ED8 bylo možné pozorovat formující se bohatě se větvící pleteně, které směřují k aortě a ve stádiu ED9 bylo již vidět zřetelně vytvořené silnější kmene koronárních cév a jejich bohaté větvení na přední i zadní ploše srdce. Na zadní ploše srdce byla po nástřiku zřetelná náplň tuší i v srdečních žilách. U hypoxických srdcí byly v ED8 přítomny pouze chabé nepravidelné pleteně bez vytvoření hlavního kmene. Ty se vytvořily v ED9 pouze u 20 %, ve 40 % se kmen vůbec nevytvořil, spojení s aortou tedy chybělo. Normální vývoj proximálních úseků koronárních tepen u japonské křepelky popisuje například Ando et al. (2004). Podle něj jsou přítomné již od ED6 pruhy endotelových buněk směřujících k aortě a postupně prorůstající do jejího lumen. Jsou přítomné i oblasti tzv. nekoronárního sinu. Během ED9 tyto pleteně splývají do dvou kmenů, nadbytečné a dystopické zanikají. Naše nálezy během ED8 a ED9 v normoxických podmínkách jsou s tímto v souladu, pomocí nástřiku tuší jsme prokázali zprvu slabší a rozvětvené pleteně, které postupně jsou v kontaktu, později

pak již formované kmeny koronárních tepen.

Thompson (2003) uvádí, že hypoxie zvyšuje vaskularizaci a růst koronárních cév a dává jí též do souvislosti s hypertrofií srdečních komor. Tomu odpovídá i naše měření, ve kterém jsme prokázali větší hustotu kapilár u hypoxických embryí jak v interventrikulárním septu, tak v srdečních komorách. S naším měřením souhlasí i výsledky Tomanka et al. (1999), který, stejně jako my, určuje jako místo nejvyšší vaskularizace interventrikulární septum. Zvýšená míra tkáňové hypoxie prohlubuje efekt signální kaskády HIF-VEGF, což se projeví zvýšenou hustotou kapilár ve srovnání s normoxickou skupinou (Jargiello et al., 1983).

V hypoxických embryích byla v naší studii stěna myokardu tenčí než v kontrolní skupině a hypoxie byla prokazatelná v celém její rozsahu. To představuje rozdíl proti kontrolní skupině, kde hypoxické okrsky byly pouze v interventrikulárním septu a povrchních vrstvách myokardu. Naše nálezy hypoxických okrsků v interventrikulárním septu odpovídají také místům nejvyšší vaskularizace v srdci u normoxické křepelky (Tomanek et al., 1999). Podobné hypoxické okrsky jsou přítomné i v ranějších stadiích (Naňka, 2006). Sugishita (2004) dokonce hypoxii přičítá morfogenetickou roli, tak jak ji prokázal v oblasti výtokového traktu srdce.

Dalším nápadným projevem prohloubené hypoxie byla výrazně zvýšená trabekularizace komorového myokardu. Tato zvýšená trabekularizace myokardu komor může představovat adaptační mechanismus na hypoxii, který zkracuje difúzní vzdálenost pro kyslík z krve v komorách. Zvýšená trabekularizace myokardu byla pozorována u křepelky po aplikaci VEGF (Feucht et al., 1997) a u myších embryí s uměle zvýšenou hladinou VEGF (Miquerol et al., 2000). Mechanismus vzniku trabekularizace není uspokojivě vysvětlen. Feucht et al. (1997) soudí, že je podmíněna zvýšenou proliferací buněk endokardu vyvolanou VEGF. Zdá se tedy, že pro normální diferenciaci a morfogenezu je nutné určité, přesně vymezené rozmezí exprese VEGF, která je řízena hypoxií.

Při průkazu SMA aktivity se nám podařilo prokázat u hypoxických srdcí zřetelně chudší pleteně, což odpovídá problematickému napojení koronárního řečiště na aortu. Erarp et al. (2005), který sledoval vliv hypoxie u kuřecích embryí, rovněž prokázal ve své studii chybné napojení koronárních cév na aortu. Naproti tomu bylo u embryí možné najít hluboké trabekuly. Nalezl jen velmi chudou

koronární síť bez přítomnosti hladké svaloviny. Dle Vrancken Peeters et al. (1997) je SMA aktivita důkazem napojení na aortu, protože znamená adaptaci cévní stěny na vyšší tlak daný průtokem po napojení na systémové řečiště. Nenapojené cévy SMA aktivitu nemají. My jsme tento fakt využili jako další průkaz v kombinaci s nástřikem koronárního řečiště. Tato kombinace pak spolehlivě vypovídá jednak o přítomnosti tepen a za další právě o jejich kontaktu s aortou. Vylučuje tak možnost náplně cév při nástřiku tuší z dutin srdce. Přítomnost krevních elementů v koronárních cévách nelze považovat za průkaz napojení koronárních cév na aortu, protože jejich přítomnost v dosud nenapojeném řečišti je možná díky samostatně probíhající diferenciaci z hemoblastů pocházejících z buněk proepikardiálního orgánu (Tomanek et al., 2006).

Naše nálezy vysvětlují příčinu letálního účinku hypoxie tak, že hypoxie vede postupnou dilatací, ztenčením srdečních komor a nedostatečným napojením a organizací koronárního řečiště k srdečnímu selhání.

6. Závěry

1. Embrya japonské křepelky inkubovaná za hypoxických podmínek (16% O₂) umírají devátý den embryonálního vývoje.

2. V srdcích embryí vyvíjejících se za normoxických podmínek jsou přítomné hypoxické okrsky tkáně, tyto okrsky se zvětšují za hypoxických podmínek.

3. Hypoxie vede ke zvýšené kapilarizaci myokardu díky zvýšené aktivitě signální kaskády hypoxie-HIF-VEGF-angiogeneze.

4. Hypoxie vede ke ztenčení myokardu komor a jeho zvýšené trabekularizaci a následně dilataci komor.

5. Během ED9 dochází za normoxických podmínek k napojení cévního řečiště myokardu na systémovou cirkulaci, u hypoxických embryí toto napojení je nedokonalé a koronární cévy jsou vytvořené nepravidelně.

6. Příčinou smrti je srdeční selhání způsobené dilatací srdečních komor a nedostatečnou koronární cirkulací.

7. Literatura

BELLAIRS, R., OSMOND, M. The atlas of chick development. 2. vyd., London: Elsevier, Academic Press, 2005, 45 – 58.

BERNANKE, D.H., VELKEY, J. M. Development of the coronary blood supply: changing concepts and current ideas. *Anat Rec*, 2002, 269: 198 – 208.

DEHAAN, R. L. Morphogenesis of the vertebrate heart. New York: Holt, Rinehart & Winston Inc., 1965, 377 – 419.

DETTMAN, R.W., DENETCLAW, W. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol*, 1998, 193, 169 – 181.

DOKLÁDAL, M., PÁČ, L. Anatomie člověka II. (Splanchnologie a cévní systém). 2. přeprac. vyd., Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2003, 136.

EMA, M., TAYA, S. A novel bHLH–PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94, 4273 – 4278.

ERALP, I., LIE-VENEMA, H. Coronary Artery and Orifice Development Is Associated With Proper Timing of Epicardial Outgrowth and Correlated Fas Ligand Associated Apoptosis Patterns. *Circ Res.*, 2005, 96, 526 – 534.

FEJFAR, Z., PŘEROVSKÝ, I., Klinická fyziologie krevního oběhu. 3., přeprac. a rozš. vyd., Praha: Galén, 2002, 361.

FERRARA, N., CARVER – MOORE K. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 1996, 380, 439 – 442.

FLAMME, I., RISAU, W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 1992, Oct., 116 (2), 435 – 439.

FOLKMAN, J., MERIER, E. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 1971, 133, 257 – 288.

FORSYTHE, J. A., JIANG, B. H. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 1996, Sep, 16 (9), 4604 – 4613.

GITTENBERGER - DE GROOT, A. C., VRANCKEN PEETERS, M. P. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res.*, 1998, 82, 1043 – 1052.

HAMBURGER, V., HAMILTON, H. L. A series of normal stages in development of the chick embryo. *J Morphol*, 1951, 88, 49 – 92.

HYER, J., JOHANSEN, M. Introduction of Purkinje fiber differentiation by coronary arterialization., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 13214 – 13218.

HUDLICKÁ, O., BROWN, M. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev*, 1992, 72, 369 – 417.

HUTCINS, G. M., KESSLER – HANNA, A. Development of the coronary arteries in the embryonic human heart. *Circulation*, 1988, 77, 1250 – 1257.

CHAN, T., BURGGREN, W. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*). *Respir Physiol NeuroBiol*, 2005, 145, 251 – 263.

CHANCE, B., COHEN, P. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science*, 1962, 137, 499 – 508.

CHARNOCK-JONES, D. S. Vascular endothelial growth factors (VEGFs), their receptors and their inhibitors. *Celltransmission*, 2005, 21, 1 - 5.

JARGIELLO, D. M., CAPLAN, A. I. The establishment of vascular-derived microenvironments in the developing chick wing. *Dev Biol*, 1983, 97, 364 - 374.

JIANG, B. H., SEMENZA, G. L. Hypoxia inducible factor 1 levels vary exponentially over physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*, 1996, 271, C1172 - C1180.

KLENER, P. Angiogeneze a nádorová onemocnění. *Remedia*, 2002, 12, 2 – 8.

KOMÁREK, V., MALINOVSKÝ, L. Anatomia avium domesticarum et embryologia galli. 1. vyd., Bratislava: Priroda, 1982, 91.

KRIEG, M., MARTI, H. H. Coexpression of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in nervous system tumors associated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Blood*, 1998, 92, 3388 – 93.

KRUTA, V. Několik pohledů na srovnávací fyziologii srdce a oběhu krevního. Praha: *Szdn*, Babákova sb. 8, 1958.

MANASEK, F. J. Embryonic development of the heart, II: formation of the epicardium. *J Embryol Exp Morphol.* ,1969, 22, 333 – 348.

MANNER, J. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec*,1999, 255, 212 – 226.

MANNER, J. Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anat Embryol (Berl)*. 1993, 187, 281 – 289.

MEUER, H. J., BAUMANN, R. Oxygen Supply of Early Chick embryo in Normoxia and Hypoxia., *J Exp Zoology*, 1987, Suppl 1, 203 – 207.

MIKAWA, T., GOURDIE, R. G. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 1996, 174, 221 – 232.

MIQUEROL, L., LANGILLE, B. L. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*. 2000, Sep, 127(18), 3941 - 3946.

NAHIRNEY, P. C., MIKAWA, T. Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos. *Dev Dyn*, 2003, 227, 511 – 523.

NAŇKA, O. Význam hypoxie pro vývoj embryonálního krevního řečiště, dizertační práce z oboru biologie a patologie buňky. Praha: Anatomický ústav 1. LFUK, 2005

NAŇKA, O., Valášek, P. Experimental hypoxia and embryonic angiogenesis. *Dev Dyn*., 2006, Jan 27, 235(3), 723 – 733.

NEČAS, E. Patofyziologie zásobování organismu a jeho tkání kyslíkem. 1. vyd., Praha: Avicenum, 1982, 258.

NODEN, D. M. Origins and patterning of avian outflow tract endocardium. *Development*, 1991, Apr, 111(4), 867 - 76.

OBRUČNÍK, M., MALÍNSKÝ, J. The early stages of ventricular wall of the human embryonic heart as seen in the electron microscope. *Folia Morphol*, 1972, 20, 49 – 51.

OŠŤÁDAL, B., VÍZEK, M. Patologická fyziologie srdce a cév. 1. vyd., Praha: Karolinum, 2003, 169.

OŠŤÁDAL, B., PELOUCH, V. Structural and biochemical remodelling in catecholamin-induced cardiomyopathy: comparative and ontogenetic aspects. *Mol Cell Biochem*, 1995, 147, 83 – 88.

PARLOW, M. H., BOLENDER, D. L. Localization of bFGF-like proteins as punctuate inclusions in the pre-septation myocardium of the chicken embryo. *Dev Biol*, 1991, 146, 139 – 47.

PEETERS, M., GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. The Development of the Coronary Vessels and Their Differentiation Into Arteries and Veins in the Embryonic Quail Heart. *Dev Dyn*, 1997, 208, 338 – 348.

PEREZ-POMARES, J. M., MACIAS, D. The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study. *Dev Biol*, 1998, 200, 57 – 68.

PEREZ-POMARES, J. M., MACIAS, D. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn*, 1997, 210, 96 – 105.

RALEIGH, J. A., CALKINS-ADAMS, D. P. Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker. *Cancer Res*, 1998, 58, 3765 – 3768.

RATAJSKA, A., CISZEK, B. Embryonic development of coronary vasculature in rats: corrosion casting studies. *Anat Rec*, 2003, 270A, 109 – 116.

ROČEK, Z. Obecná morfologie živočichů [online]. Praha: KZ UK, 2002, s. 7 – 32. URL:<<http://rocek.gli.cas.cz/Courses/Microsoft%20Word%20-%20Morfologie3.pdf>> [cit. 2007-05-01].

ROUWET, E. V., TINTU, A. N. Hypoxia Induces Aortic Hypertrophic Growth, Left Ventricular Dysfunction, and Sympathetic Hyperinnervation of Peripheral Arteries in the Chick Embryo. *Circulation*, 2002, 105, 2791 – 2796.

RUI-CHENG, J. I. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25, 677 – 694.

RYCHTER Y., OŠŤÁDAL B. Mechanism of the development of the coronary arteries in chick embryo. *Folia Morphol*, 1971, 19, 113 – 124.

SABIN, F., Studies on the origin of the blood vessels and of chick during the second day of incubation. *Carnegie Inst. Contr. Embryol.*, 1920, 9, 215 – 262.

SALCEDA, S., CARO, J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, 1997, 272, 22642 – 22647.

SEDMERA, D., WATANABE, M. Growing the Coronary Tree: The Quail Saga. *Anat Rec*, 2006, Part A 288A, 933 – 935.

SEDMERA, D., RECKOVA, M., Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in the zebrafish and *Xenopus* heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284, H1152 - H1160.

SERRA, J. Histochemical tests for protein and amino acids: The characterisation of basic protein. *Stain Technol*, 1946, 21, 5 – 18.

SHARMA, KS, LUCITTI, J. Impact of Hypoxia on Early Chick Embryo Growth and Cardiovascular Function. *Pediatric Research*, 2006, 59 (1), 116 – 20.

SHWEIKI, D., ITIN, A. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992, 359, 843 – 5.

SUGI, Y., SASSE, J. Inhibition of precardiac mesoderm cell proliferation by antisense oligodeoxynucleotide complementary to fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *Dev Biol*, 1993, 157, 28 – 37.

SUGISHITA, Y., WATANABE, M. Role of myocardial hypoxia in the remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract. *Dev Biol*, 2004, 267, 294 – 308.

SURI, C., JONES, P. F. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 1996, Dec, 87(7), 1171 - 80.

ŠIMÍČKOVÁ, M., DUBSKÁ, L. Angiogeneze a anti-angiogenní terapie u nádorových onemocnění se zaměřením na cirkulující vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). *Klinická onkologie*, 4/2006, r. 19, Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, ISSN 0862 – 495 X.

TAIT, C. R., JONES, P. F. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol*. 2004, Sep, 204 (1), 1 – 10.

TAMMELA, T., ENHOLM, B. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*, 2005, 65, 550 – 563.

THOMPSON, L. P. Effects of chronic hypoxia on fetal coronary responses. *High Alt Med Biol.*, 2003, 4(2), 215 - 224.

TOMANEK, R. J. Formation of the coronary vasculature: a brief review. *Cardiovasc Res*, 1996, 31, E46 - E51.

TOMANEK, R. J. Vascularization of the heart during prenatal and perinatal growth. *Adv Org Biol*, 1999, 7, 111 – 128.

TOMANEK, R. J. Formation of the coronary vasculature during development. *Angiogenesis*, 2005, 8, 273 – 284.

TOMANEK, R. J., ISHII, Y. VEGF family members regulate myocardial tubulogenesis and coronary artery formation in the embryo. *Circ Res*, 2006a, 98, 947 – 953.

TOMANEK, R. J., HANSEN, H. Vascular Patterning of the Quial Coronary System During Development. *Anat Rec*, 2006b, Part A 288A, 989 – 999.

TOMANEK, R. J. Assembly of the Vasculature and its Regulation. Birkhauser – Boston, 2002, kap. 7. Vasular Development of the Heart, Tomanek RJ, Yue X, s. 59 – 75.

TOTA, B., CIMINI, V. Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranch and teleost fish. *Am J Anat*, 1983, 167, 15 – 32.

VACEK, Z., *Histologie a histologická technika pro zdravotnické školy*, 1. vyd., Praha: Avicenum, 1988.

VELKEY, J. M., BERNANKE, D. H. Apoptosis during coronary artery orifice development in the chick embryo. *Anat Rec*, 2001, 262, 310 – 317.

VIRAGH, S., GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol (Berl)*, 1993, 188, 381 – 393.

VRANCKEN PEETERS, M. P., GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. The development of the coronary vessels and their differentiation into arteries and veins in the embryonic quail heart. *Dev Dyn*, 1997, 208, 338 – 348.

WADA, A. M., WILLET, S. G. Coronary Vessel Development – A Unique Form of Vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23, 2138 – 2145.

WANG, G. L., JIANG, B. H. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helixloop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 5510 – 5514.

WANG, H., CHEN Z. F. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 1998, 93, 741 – 753.

WENGER, R. H., GASSMANN, M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor 1. *Biol Chem*, 1997, 378, 609 – 616.

WIKENHEISER, J., DOUGHMAN, Y. Q. Differential levels of tissue hypoxia in the development chicken heart. *Dev Dyn*, 2006, 235, 115 – 123.