

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Vývojová a buněčná biologie



Mgr. Barbora Šaňková

MECHANISMY VÝVOJE PŘEVODNÍHO SYSTÉMU SRDEČNÍHO U OBRATLOVCŮ

MECHANISMS OF CONDUCTION SYSTEM DEVELOPMENT IN VERTEBRATES

Disertační práce

Vedoucí práce: Prof. MUDr. David Sedmera, DSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 16.6.2016

Barbora Šaňková

Podpis

Identifikační záznam:

Šaňková, Barbora. *Mechanismy vývoje převodního systému srdečního u obratlovců.*

[*Mechanisms of conduction system development in vertebrates*]. Praha, 2016. 33 s., 4 příl.

Diserzační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav 1. LF UK 2008. Vedoucí práce Sedmera, David.

Poděkování:

Hlavní poděkování patří školiteli Davidovi Sedmerovi za odborné vedení. Nejvíce jsem vděčná za trpělivost a pochopení i pro jiné priority v životě PhD studenta. Dle jeho slov “paralelní vývojový project”, který představují mé dvě děti a která se nemalou mírou podílela na délce PhD studia, jsou také jeden z ceněných výstupů studia vývojové biologie.

Publikace, které jsou součástí této disertační práce, by nemohly vzniknout bez spolupráce s: Jiřím Benešem; Jakubem Machálkem; kolegy z Univerzity v Jaén-Angelem de la Rosa a Amelií Aranega; kolegyněmi z IBDM Univerzity Marseille Magali Theveniau - Ruissy a Lucile Micquerol, které navíc náleží velké díky za darování linie myši Cx40:GFP.

Dále bych chtěla poděkovat bývalým i současným spolupracovníkům z Laboratoře molekulární embryogeneze na Anatomickém ústavu za pomoc nejen s přípravou vzorků pro hodnocení morfologie: Michalovi Tůmovi, Markétě Pleschnerové, Evě Kluzákové, Marii Jindrákové a Aleně Kvasilové. Kolegyni Elišce Krejčí jsem vděčná hlavně za pomoc při genotypizacích transgenních myší. Jarmile Svatůňkové děkuji za pomoc při analýze dat z optického mapování a vždy vlídné slovo podpory. Bývalému a současnému přednostovi Anatomického ústavu Prof. Miloši Grimovi a Prof. Karlu Smetanovi bych také ráda poděkovala za rozumný dohled a nezbytné zázemí.

Nakonec chci poděkovat za podporu své rodině za duševní a materiální podporu.

Publikace, které jsou součástí disertační práce, byly částečně finančně podpořeny z prostředků Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy VZ 0021620806, AS CR AVOZ50450515, Grantové agentury České republiky 304/08/0615, 16 - 02972S a Univerzity Karlovy SVV-2015-260158.

Abstrakt

Soubor specializovaných buněk převodního srdečního systému tvoří a koordinovaně šíří elektrický vzruch v srdci. Změny ve vývoji převodního systému prokazatelně souvisí se vznikem arytmií, a proto je dobrá znalost vývojových mechanismů klinicky významná. Pro správný vývoj převodního systému jsou důležité geny pro gap junctions proteiny, iontové kanály, transkripční faktory či jiné molekuly zahrnuté v signalizačních kaskádách (endothelin, neuregulin). Kromě geneticky podmíněných faktorů se na vývoji převodního systému podílí i epigenetické faktory a vlivy prostředí. V této disertační práci se jednotlivé publikace věnují různým aspektům jinak komplexního vývoje převodního systému. Dalším pojátkem všech publikací je metodický přístup, kdy jsme pomocí optického mapování sledovali změny ve funkci převodního systému.

V první publikaci jsme pomocí orgánové *in vitro* kultivace kuřecích embryonálních srdcí studovali vliv mechanické pracovní zátěže (bez interference hemodynamického efektu) na vývoj převodního systému. Sérii experimentů jsme doplnili i o typ „záchranného“ experimentu, kdy jsme uměle vyvolali pracovní zátěž injekcí silikonového oleje do primitivní komory srdce ve stádiu srdeční kličky. Podařilo se nám prokázat, že mechanické zatížení myocytů je důležitý epigenetický faktor časného embryonálního vývoje.

V následujících publikacích jsme se zaměřili na studium vlivu absence konexinu 40 (Cx40) na vedení elektrické vzruchu u myši během embryonálního vývoje, kterému předcházela popis normálního vývoje převodního systému zaměřený na funkční aspekt. Absence gap junctions protein - Cx40 vede k snížení četnosti výskytu aktivního pravého Tawarova raménka v pozdní fázi embryonálního vývoje, z čehož vyvozujeme závěr, že v časnější fázi vývoje je funkce pravého Tawarova raménka nezávislá na Cx40. Aktivace síní při absenci Cx40 je od 12. embryonálního dne iniciována u většiny srdcí z ektopického místa v oušku pravé síně a dochází u takto aktivovaných síní k výraznému prodloužení aktivačního času. Rychlost vedení vzruchu je podmíněna Cx40 genotypem pouze v síních na rozdíl od komor, nejdelší čas nezbytný pro aktivaci síní je spojen s úplnou absencí Cx40.

Ve čtvrté publikaci jsme se věnovali funkční analýze linie myši s inhibovaným KvLQT1 proteinem, kde je fenotypový projev shodným se syndromem dlouhého QT intervalu. U transgenní linie byl zaznamenán výskyt bloku pravého Tawarova raménka u většiny ED18,5 srdcí a dále zpomalení vedení elektrického vzruchu v levé komoře.

Klíčová slova: převodní systém srdeční, konexin 40, optické mapování, blok pravého Tawarova raménka, způsob aktivace komor

Abstract

Group of specialized cells that form cardiac conduction system is responsible for generation and coordinated propagation of the electrical impulse in the heart. Changes in its development can be connected with arrhythmias; therefore, a good level of knowledge is necessary and relevant for basic science and clinical practice. For correct development of the conduction system are important genes coding gap junctions proteins, ion channels, transcription factors and other molecules involved in signaling cascades (endothelin, neuregulin). Development of conduction system is determined in addition to genetic factors also by epigenetics and environmental factors. This thesis with its individual papers on which it is based is addressing different aspects of conduction system development, which appears to be a complex process. Another feature which is linking all papers together, is the methodological approach enabling us to study function of the conduction system - optical mapping.

In the first publication we studied by the means of *in vitro* organ culture the impact of work load without interfering hemodynamics on the conduction system maturation in the chick embryonic heart. The phenotype observed during experiments was developmental regression of conduction system maturation together with changes in trabecular morphology. Experimental design was extended by a series of rescue experiments with artificial work load, which was achieved by injection of a droplet of silicon oil into primitive ventricle of the looped heart. Mechanical stretching of the cardiac myocytes is an important epigenetic factor in the early conduction system development.

The following publications were focused on Cx40 absence and its impact on function of conduction system. This analysis would not be possible without description of normal conduction system development in mouse from the physiological point of view. Absence of gap junctions protein - Cx40, which is expressed in the ventricular conduction system and atrial myocardium with the exception of the sinoatrial node, resulted in decrease of functional right bundle branch in the late developmental phase. Our conclusion is that in the earlier phase of development the function of right bundle branch is independent of Cx40. Activation of Cx40 - null atria is from the 12th embryonic day originating from an ectopic site localized in the right atrial appendage. Activation time is prolonged in the case of activation originating from ectopic site and is dependent on Cx40 genotype, with the longest activation time of both atria in complete Cx40 absence.

The last publication was dedicated to functional analysis of the mouse line with suppression of KvLQT1 protein with phenotype similar to long QT syndrome. Function of cardiac conduction system was disrupted; in late developmental phase right bundle branch block we observed together with left ventricular activation time prolongation.

Key words: cardiac conduction system, connexin 40, optical mapping, right bundle branch block, ventricular activation sequence

Seznam zkratk a vysvětlivky

AV	atrioventrikulární
Cx	konnexin
EAP	embryonální ptačí polypeptid
ECE	endothelin konvertující enzym
ET	endothelin
ED	embryonální den
Gln2	antigen z ganglion nodosum
GWAS	rozsáhlé genomové asociační studie
HCN	hyperpolarizací a cyklickými nukleotidy aktivovaný iontový kanál
HNK	lidský přirozený zabíječ (human natural killer)
I _{KS}	pomalá složka zpožděného vyrovnávacího toku iontů draslíku ven z buněk
LQTS	syndrom dlouhého intervalu QT
KLF	Krüppel - like factor
MinK	peptid modifikující I _{KS} tok iontů
NO	oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
PCR	polymerázová řetězová reakce
SA	sinoatriální
Tbx	T - box transkripční faktor
VCAM	cévní buněčná adhezní molekula

Názvy genů jsou psány kurzívou. Použití velkých či malých písmen u názvů genů je dáno organismem, jemuž geny náleží. U ptačích a lidských genů jsou všechna písmena velká. U myši je velké jen první písmeno a ostatní jsou malá.

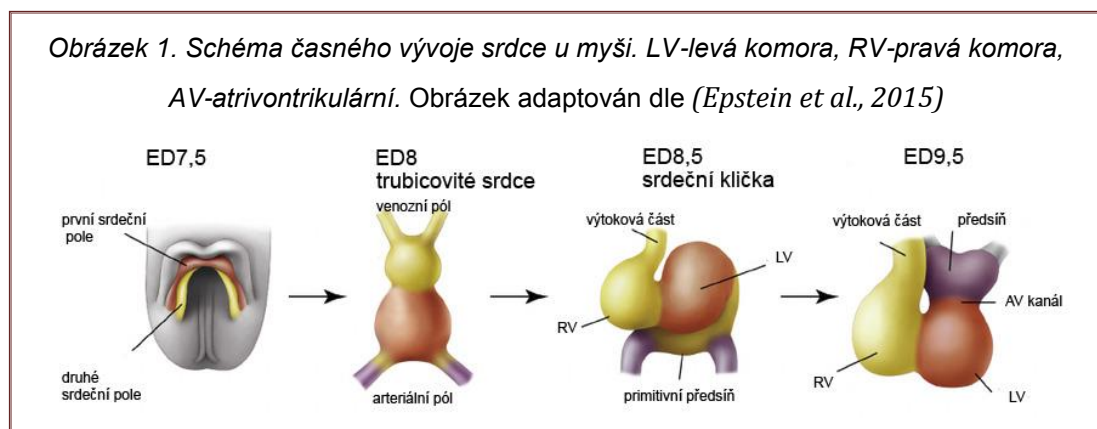
Obsah:

1. Literární úvod a přehled problematiky	7
1.1. Vývoj srdce.....	7
1.2. Převodní systém srdeční a jeho původ.....	8
1.3. Způsoby vedení elektrického vzruchu během vývoje.....	8
1.4. Vývoj převodního systému srdečního a epigenetické faktory.....	9
1.5. Konexiny a převodní systém srdeční.....	11
1.6. Optické mapování.....	15
1.7. Význam studia převodního systému srdečního a aplikace základního výzkumu..	17
2. Cíle a hypotézy	18
3. Komentované publikace	19
3.1. Vliv mechanické zátěže na časný vývoj převodního systému u kuřete.....	19
3.2. Normální vývoj komorového převodního systému a vliv absence Cx40 na vývoj komorového převodního systému.....	21
3.3. Význam Cx40 pro vedení elektrického vzruchu v síních během vývoje.....	23
3.4. Funkční inhibice proteinu KvLQT1 draslíkových kanálů a vliv na funkci komorového převodního systému.....	24
4. Závěry	27
5. Seznam použité literatury	29
6. Přílohy	34
6.1. Publikace 1	
6.2. Publikace 2	
6.3. Publikace 3	
6.4. Publikace 4	

1. Literární úvod a přehled problematiky

1.1. Vývoj srdce

Srdce funguje jako pumpa zajišťující cirkulaci krve v těle, je to orgán, který je funkční již v raných fázích embryonálního vývoje. U kuřete začíná bít na druhém, u myši na osmém a u člověka na 22. dni embryonálního vývoje. Zdrojem kardiogenních buněk jsou buňky srdečního pole v laterálním splanchnickém mezodermu na levé i pravé straně, spojením polí vzniká buněčný útvar ve tvaru podkovy (**Obrázek 1.**). Primitivní trubcovité srdce je tvořeno populací buněk prvního srdečního pole (first heart field), které dává vzniknout budoucí levé komoře, atrioventrikulárnímu kanálu a části atrií. Pro zdárný vývoj ve čtyřdutinový orgán jsou nezbytné buňky druhého srdečního pole (second heart field), které se přidávají podél atriálního a venózního pólu srdce v období vzniku srdeční kličky a tvoří pravou komoru, část výtokového traktu a část síní. Součástí druhého srdečního pole jsou dvě subpopulace



označované jako přední srdeční pole (anterior heart field) a zadní srdeční pole (posterior heart field), z kterého se diferencuje proepikardiální orgán a dorzální výběžky mezenchymu (spina vestibuli), dříve považovány za extrakardiální buňky (van Wijk and van den Hoff, 2010). Jediná extrakardiální skupina buněk podílející se na stavbě srdce jsou buňky srdeční neurální lišty uplatňující se při inervaci srdce a dále při tvorbě a septaci výtokové části. První a druhé srdeční pole se nachází ve společné srdeční oblasti, kde lze vzájemně odlišit expresi specifických molekulárních „markerů“. Také je možné na tyto dvě populace buněk nahlížet jako na spolu více vzájemně související buňky, mezi nimiž hlavní rozdíl spočívá v období, kdy se během vývoje přidávají k srdci (Grim and Druga, 2016).

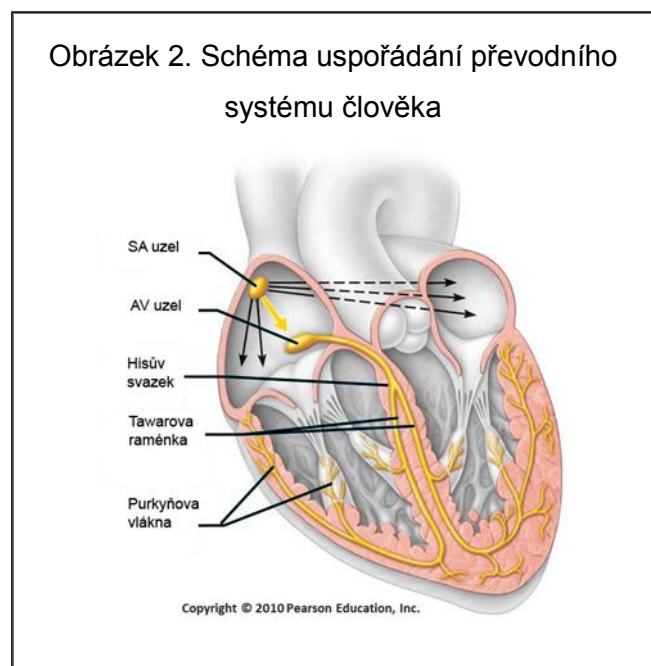
U stádia srdeční kličky lze identifikovat přechodové zóny, které lze spojit s vývojem převodního systému. Od pracovního myokardu se liší společnou genovou expresí Tbx3 (T-box transcription factor) (Hoogaars et al., 2004), MinK (peptid modifikující I_{K_S} tok iontů)

(Kondo et al., 2003), HNK - 1 (human natural killer) (Blom et al., 1999), podoplanin (Gittenberger-de Groot et al., 2007)), podle které lze sledovat jejich osud až do definitivně diferencovaného převodního systému. Přechodové zóny jsou tvořeny oblastí sinus venosus (dávající vzniknout sinoatriálnímu uzlu (SA uzel), atrioventrikulárním kanálem, primárním prstencem (dávající vzniknout Hisově svazku a Tawarovým raménkům) a výtokovou částí. Během dalšího vývoje se z části přechodové zóny stane převodní systém a z části pracovní myokard. Způsob, jakým vzniká převodní systém, není na principu diference, ale pravděpodobně spočívá spíše v zablokování genetického programu vedoucího ke změně v pracovní myokard.

1.2. Převodní systém srdeční a jeho původ

Převodní systém u dospělého jedince (**Obrázek 2**) je soubor specializovaných buněk srdce, který je uzpůsoben k autonomnímu vytváření elektrického vzruchu a jeho šíření jednotlivými částmi srdce. Podmiňuje rytmickou a koordinovanou činnost srdce.

Buňky převodního systému pochází z myogenních prekurzorových buněk, přestože exprimují geny typické pro neurální buňky nebo buňky neurální lišty (neurofilament, Gln2 (ganglion nodosum), HNK - 1, EAP - 300 (embryonal avian polypeptide) (Wessels et al., 1992; McCabe et al., 1995; Chuck and Watanabe, 1997)). Hypotéza neurálního původu převodního systému byla vyvrácena retrospektivní klonální analýzou progenitorových srdečních buněk u časného embryonálního stádia. Takto označená multipotentní prekurzorová buňka dala vzniknout jak buňkám převodního systému, tak buňkám pracovního myokardu (Gourdie et al., 1995; Miquerol et al., 2010). Buňky neurální lišty migrují podél arteriálního a venózního pólu do srdce a představují extrakardiální zdroj buněk během kardiogeneze. Autonomní nervový systém, který má chronotropní, dromotropní a inotropní účinek, a tak ovlivňuje srdeční frekvenci, rychlost vedení a srdeční výdej, je hlavně tvořen buňkami



neurální lišty. Mezi místa nahromadění nervové tkáně patří oblast SA a atrioventrikulárního uzlu (AV uzlu).

Elektrický impuls je vytvořen a koordinovaně šířen převodním systémem srdečním. Vzruch vzniká v SA uzlu, který se nachází v pravé síni v blízkosti vstupu horní duté žíly. Odtud se vzruch dále šíří rychle vedoucím myokardem síni až na hranici síní a komor, do AV uzlu. Elektrický vzruch je mezi SA a AV uzly veden rychleji než je rychlost vedení pracovním myokardem. Mezi uzly se popisují 3 preferenční internodální svazky, které nejsou jasně morfoloicky definované a v současné chvíli nejsou považovány za součást převodního systému. AV uzlu je pomalu vedoucí úsek převodního systému a společně s Hisovým svazkem představuje jediné elektricky vodivé spojení síní a komor, které jsou jinak vzájemně elektricky izolované srdečním skeletem. AV uzlu se podílí na vytvoření časového zpoždění ve vedení elektrického vzruchu, procesu nezbytného pro efektivní plnění komor krví při diastole.

Z AV uzlu je vzruch veden nejprve Hisovým svazkem a poté Tawarovými raménky až do distálních větví Purkyňových vláken, které aktivují komorový pracovní myokard. Pravé Tawarovo raménko je přímým pokračováním Hisova svazku, zatímco levé raménko netvoří celistvý svazek, ale souvislou vrstvu vláken. Rozdílná morfologie ramének pravděpodobně souvisí se zvýšenou citlivostí pravého raménka k blokům ve vedení elektrického vzruchu u různých linií transgenních myší (kapitola 3.2. a 3.4.) a také u člověka (Bashore, 2007). My se domníváme, že jednou z příčin této situace by mohl být rozdílný vývojový původ levého a pravého Tawarova raménka (první respektive druhé srdeční pole). Silnější svazky komorového převodního systému jsou elektricky izolovány od okolního myokardu, zatímco periferní Purkyňova vlákna vyskytující se převážně v hrotu srdce jsou elektricky propojena s pracovním myokardem. Z tohoto uspořádání vyplývá způsob aktivace transmuralně od endokardu, přes myokard, do epikardu a také aktivace komorového myokardu od apexu směrem k bázi srdce, kde se nachází velké výtokové cévy, a tak je zvýšena efektivnost vypuzení krve.

1.3. Způsoby vedení elektrického vzruchu během vývoje

Jednotlivé části převodního systému jsou během vývoje postupně funkčně zapojeny v pořadí korelujícím s morfogenetickým vývojem. Z primitivního trubicovitého srdce se postupně stává čtyřdutinový orgán a současně se diferencuje převodní systém. Morfogenetická posloupnost je evolučně konzervována u kuřete, myši i člověka (Gourdie et al., 2003). U primitivního tubulárního srdce lze ve vtokové části identifikovat první funkční část převodního systému - pacemaker, šíření vzruchu je zde pomalé, izotropické a od vtokové

části směrem k výtokové části (Kamino, 1991). Pro stádium tubulárního srdce je charakteristická nízká míra mezibuněčného propojení, funkční fenotyp jako u buněk uzlů, kde celý myokard srdeční trubice má schopnost generovat elektrický vzruch (de Jong et al., 1992).

Během procesu, kdy vzniká srdeční klička, se ve specifických oblastech aktivuje genetický program pro pracovní myokard. V těchto oblastech, jejichž expanzí vznikají síně a komory, se zvýší rychlost proliferace, dojde k expresi genů nezbytných pro vedení vzruchu, jako jsou konexin 40 a 43 (Cx40, Cx43), sodíkový kanál Snc5a, a rychlost vedení vzruchu se zvýší. Rychle vedoucí oblasti jsou ohraničeny oblastmi, které si zachovávají primitivní pomalu vedoucí fenotyp (výtoková část, atrioventrikulární kanál, sinus venosus). Komorová aktivační posloupnost odpovídá směru toku krve a bývá interpretována jako aktivace od srdeční báze k apexu. Překvapivě tato aktivační sekvence nebyla nalezena u myši (Rentschler et al., 2001; Rentschler et al., 2002) ani králíka (Rothenberg et al., 2005). Pomalu vedoucí segmenty srdeční kličky odpovídají přechodovým zónám.

Jako poslední část srdečního převodního systému se diferencuje komorový převodní systém, jehož funkční zapojení je doprovázeno změnou aktivační sekvence z primitivní aktivace od báze k apexu ke zralé posloupnosti opačným směrem. Zralá aktivační sekvence je mimo jiné podmíněna elektrickou izolací síní a komor srdečním skeletem. Změna aktivační sekvence u kuřete nastává v období septace komor srdce (Chuck et al., 1997; Reckova et al., 2003), zatímco u myši se objevuje dříve, než je septace dokončena (Rentschler et al., 2001). U myši je prvním aktivačním způsobem, který se objevuje jen dočasně během vývoje, aktivace cestou takzvaného primárního prstence, s prvním aktivovaným místem v oblasti vznikajícího mezikomorového septa (kapitola 3.2.). V období změny aktivačního způsobu od báze k apexu se i u kuřete objevuje tento dočasný způsob aktivace (kapitola 3.1.).

Po vytvoření srdeční kličky jsou identifikovatelné dorzoventrálně uspořádané tenké výběžky myokardu směrem do lumen srdce - trabekuly. Stimulus pro diferenciaci trabekul je pravděpodobně dán maximálním stresem v oblasti velkého srdečního zakřivení a velmi pokročilou diferenciací buněk ve vrstvě buněk přiléhající lumen srdce (Thompson et al., 2003). Trabekuly zvyšují povrch a oxygenaci myokardu, což umožní nárůst objemu myokardu v období před zásobením pomocí věnčitých tepen. Dále jsou trabekuly důležité pro zvýšení kontraktility (Chalice and Viragh, 1973), rozčlenění proudící krve před septací (Hogers et al., 1995) a koordinaci komorového vedení (de Jong et al., 1992). Vývoj trabekul citlivě reaguje na hemodynamické zatížení, při orgánové kultivaci *in vitro* byla trabekulární vrstva výrazně ztenčena a při sérii záchranných experimentů s mechanickou zátěží byla situace normalizována (kapitola 3.1.). Při optickém mapování povrchu endokardu, kterému

předcházelo rozstřížení komor srdce kuřecích embryí, bylo prokázáno preferenční radiální vedení vzruchu trabekulami (Reckova et al., 2003).

V období septace komor a diferenciací koronární cirkulace dochází k procesu kompaktizace trabekul, kdy část trabekulární hmoty přilehající k vnější vrstvě komorového myokardu přispívá k nárůstu kompaktní vrstvy. Absence trabekul či porucha jejich kompaktizace vedou k odumření zárodku již během embryonálního vývoje (Gassmann et al., 1995; Meyer and Birchmeier, 1995) nebo v lokalizované formě u dospělých lidí ke vzniku kardiomyopatie (Jenni et al., 1999). Trabekuly dávají během embryonálního vývoje vzniknout Purkyňovým vláknům.

Na histologické úrovni je pro převodní systém charakteristický zvýšený výskyt glykogenu a snížený počet myofibril v porovnání s pracovním myokardem (Ryu et al., 2009). Morfologické odlišení převodního systému, zvláště distálních částí, je problematické a během vývoje téměř nereálné. Univerzální marker převodního systému, který by označil všechny části převodního systému, neexistuje. Častým jevem je měnící se exprese markerů během vývoje. Velmi vhodným modelovým organizmem pro studium převodního systému se jeví transgenní myš s genem pro zelený fluorescenční protein vloženým za promotor genu pro konexin 40, Cx40:GFP myš, kde lze vizualizovat komorový převodní systém. Při studiu různých linií transgenních myší, které mají změněnou expresi genů s potenciálem ovlivnit vývoj převodního systému, se často pro účely morfologické analýzy převádí studované myši linie na Cx40:GFP pozadí (kapitola 3.4.). Správné interpretaci funkční analýzy za použití optického mapování u takových myších linií předchází popis situace u Cx40 heterozygotů, kde je funkce převodního srdečního systému srovnatelná s normálními kontrolami typu „wild type“ (kapitola 3.2.).

1.4. Vývoj převodního systému srdečního a epigenetické faktory

Existuje stále mnoho neobjasněných otázek týkajících se vlivu epigenetických faktorů na vývoj převodního systému. Vrozená srdeční onemocnění podmíněná jen jedním genem (například Fallotova tetralogie) mají i přesto velkou fenotypovou variabilitu, která je podmíněna geneticky, ale i epigenetickými faktory (Schroder et al., 2002). Jedním z epigenetických faktorů, který způsobuje vrozené kardiovaskulární malformace, jsou abnormality v toku krve a hemodynamiky.

Pomocí podvazu cév žloutkového váčku u kuřecích embryí byl prokázán vzájemný vliv dvou faktorů: vlastních pohybů stěny srdce při kontrakci srdeční svaloviny, kdy dochází k mechanickým změnám ve tvaru jednotlivých myocytů, a hemodynamickému efektu krve

působící na stěnu cév nebo vnitřní vrstvu stěny srdce (Poelmann et al., 2008). V důsledku působení obou faktorů dochází k růstu takzvaného „shear stress“ na přilehlé endotelie cév a endokard. Extracelulární efekt proudící krve aktivuje mnoho biochemických a molekulárních kaskád a do jisté míry neznámým mechanismem dochází k převodu mechanického signálu na chemický. Změny tohoto typu stresu ovlivní nárůst cytoplazmatických iontů vápníku v endoteliích a následně se uvolní vasodilatátor NO (oxid dusnatý). Dále má „shear stress“ vliv na změnu exprese genů jako KLF2 (Krúppel - like factor - 2), NOS - 3 (Endothelial nitric oxide synthase 3) a ET - 1 (Endothelin - 1) (Groenendijk et al., 2005). Částečně se na přenosu signálu podílí cilie vyskytující se na endoteliích v místech s nízkým a oscilatorním tokem krve, svou roli v transdukcii signálu mají změny tvaru buněk a cytoskeletu (Poelmann et al., 2008).

Další *in vivo* metodický přístup prováděný na kuřecích embryích zahrnuje zvýšení hemodynamické zátěže podvazem výtokové části srdce - konotrunku, nebo snížení zátěže částečným podvazem levé síně. Pomocí optického mapování byla doložena korelace intenzity hemodynamické zátěže a zralosti komorového převodního systému projevující se načasováním konverze komorové aktivační sekvence z nezralé ve zralou (Reckova et al., 2003; Chuck et al., 2004; Sedmera et al., 2004). Reakcí na podvaz konotrunku bylo urychlení nástupu zralé aktivační sekvence od apexu k bázi během vývoje a změny v myoarchitektuře zahrnující mírnou dilataci komor, zesílení kompaktní vrstvy myokardu a změněnou spiralizaci trabekul v levé komoře. Naopak důsledkem podvazu levé síně a snížení hemodynamické zátěže bylo zpoždění zralé aktivační sekvence, přesměrování krve z levé poloviny srdce do pravé a následná hypoplazie levé části srdce společně s kompenzačním vývojem pravé poloviny (Sedmera et al., 1999; Reckova et al., 2003). Dalším důsledkem podvazu konotrunku je expanze exprese enzymu ECE1 (Endothelin konvertující enzym 1), důležitého pro syntézu endothelinu 1 a diferenciaci myocytů v buňky Purkyňových vláken, a související nárůst exprese CX40 značící Purkyňovy vlákna (Hall et al., 2004). Opačný výsledek, tj. snížení mRNA pro CX40 a ECE, nastal po snížení hemodynamické zátěže (Sedmera et al., 2004).

Součástí disertační práce je studie, kdy po orgánové kultivaci kuřecích embryonálních srdcí následovala analýza funkčnosti převodního systému za použití optického mapování (kapitola 3.1.). Simulací pracovního zatížení pomocí injekce kapky silikonu do komory srdce bez hemodynamického zatížení bylo umožněno studovat vliv prostého mechanického napínání myocytů a hemodynamického „shear stress“ odděleně, což není možné u výše zmíněných studií *in vivo*. V podobné sérii *in vitro* kultivačních experimentů na myších embryích byly u většiny srdcí pozorovány pravidelné kontrakce myokardu během kultivace,

ale zároveň se potvrdila vyšší citlivost a velmi nízká míra funkčnosti převodního systému během optického mapování po předcházející kultivaci v porovnání s kuřecími embryi. Tyto experimenty odhalily u myších embryí poměrně častý výskyt úplného atrioventrikulárního bloku (36% na ED11,5) se současným výskytem ektopické aktivace v oblasti výtokové části, kdy docházelo ke zpětné aktivaci komorového myokardu (Vostarek et al., 2014).

Mezi další epigenetické faktory ovlivňující vývoj kardiovaskulárního systému patří hypoxie. Během embryonálního vývoje dochází u savců zcela přirozeně ke kratším periodám hypoxie až anoxie, na které jsou savci poměrně dobře adaptovaní, ale i přesto může docházet k výskytu různých vývojových defektů (redukce končetin, malformace srdce a obličeje (Webster and Abela, 2007)). V oblastech myokardu, kde je vrstva buněk relativně silná, je vyšší míra hypoxie (atrioventrikulární kanál, mezikomorová přepážka, výtoková část, kompaktní stěna levé komory). Tyto oblasti jsou zároveň místy, kde dochází k diferenciaci převodního systému (Wikenheiser et al., 2006). Při experimentálním snížení parciálního tlaku kyslíku během vývoje došlo k zvýraznění míry hypoxie v těchto oblastech společně se zvýšenou mírou trabekularizace ve tkáni levé komory. Efektivnost difuze je pravděpodobně vysvětlením pro zaznamenanou výraznější trabekularizaci levé komory. Embryonální angiogeneze reaguje na množství kyslíku v prostředí. Při inkubaci zárodků křepelky za hypoxických podmínek byly zaznamenány abnormality koronárních cév, zvýšená kapilární hustota v oblasti mezikomorové přepážky a ztenčení stěn srdce, hlavně levé komory (Nanka et al., 2008). U transgenních myší s defektním genem pro VCAM – 1 (Vascular cell adhesion molecule) souvisí deficit koronárního cévního zásobení se snížením tloušťky kompaktní stěny komorového myokardu a embryonální letalitou (Kwee et al., 1995; Wessels and Sedmera, 2003). Vzájemná korelace oblastí výskytu hypoxie a diferenciaci převodního systému je otázkou a výzvou pro budoucí výzkum.

Faktorem, který ovlivňuje kinetiku iontových kanálů a srdeční funkci u embryonálního srdce, je teplota. Pro studium vlivu teploty na vývoj a funkci srdce je kuřecí embryo častý modelový organizmus. Kuřecí embryo relativně dobře toleruje výkyvy teplot během inkubace, ale jen v rozsahu 33 - 40 °C. Dlouhodobá hypotermie a hypertermie má teratogenní až letální efekt (Peterka et al., 1996), při hypotermii se objevuje srdeční hypertrofie (Boehm et al., 1987). S teplotou se mění přímo úměrně srdeční frekvence, dále hypertermie snižuje tok iontů vápníku a má prokazatelný vliv na SA uzel a vede až k blokům ve vedení vzruchu (Vostarek et al., 2016).

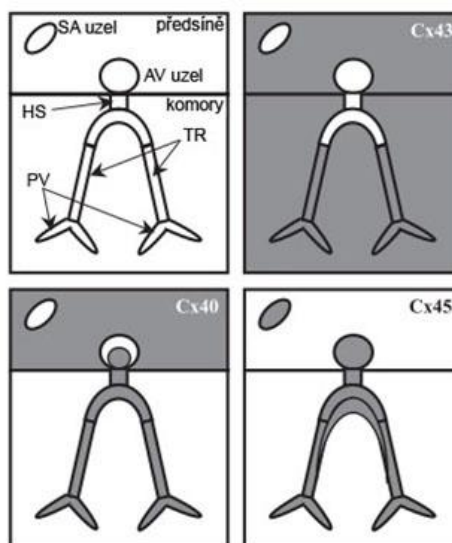
1.5. Konexiny a převodní systém srdeční

Myocyty jsou vzájemně propojeny tak, že si mohou vyměňovat ionty, metabolity a signální molekuly pomocí mezibuněčných spojení typu gap junctions. Myocyty propojené pomocí gap junctions mají nízký elektrický odpor a tvoří jeden funkční celek - syncytium, které umožňuje rychlé a koordinované šíření elektrického vzruchu. Kompletní kanál je tvořen dvěma hexamerními strukturami - konexony, tvořenými 6 proteinovými subjednotkami - konexiny. Změny v expresi konexinů mohou vést k abnormálnímu vedení vzruchu a arytmiím (Jongsma and Wilders, 2000).

V myokardu se nachází tyto hlavní konexiny: Cx40, Cx43, Cx45, Cx30 a Cx30,2 (**Obrázek 3**, shrnuto v (Jongbloed et al., 2008)). Konexin rychle vedoucích srdečních tkání a síní je Cx40. V pomaleji vedoucím pracovním myokardu a distálních částech komorového převodního systému je exprimován Cx43. Jeho absence vede ke zpomalení vedení vzruchu a zvýšené náchylnosti ke vzniku arytmií v pozdějších embryonálních stádiích (Vaidya et al., 2001). Cx45 se během vývoje nachází v primitivním trubcovitém srdci, pro které je charakteristické pomalé šíření vzruchu. Postupně se jeho exprese omezuje a u dospělého je exprese hlavně v pomalu vedoucích SA a AV uzlech, a dále i v komorovém převodním systému. U myši s vyřazeným genem pro Cx45 dochází ke vzniku bloků ve vedení vzruchu a nejpozději na ED10 k letálnímu srdečnímu selhání (Nishii et al., 2003). U dospělých myši se Cx30,2 vyskytuje převážně k AV a SA uzlech a Hisově svazku (Kreuzberg et al., 2005). Cx30 má expresi v části SA uzlu (Gros et al., 2010). Exprese jednotlivých konexinů se vzájemně liší v prostoru a čase nejen během embryonálního vývoje, ale i v dospělosti. Podobná exprese konexinů, jen s minimálními rozdíly, je u většiny savců (Miquerol et al., 2003).

Cx40 je u dospělců přítomen v myokardu síní, AV uzlu a komorovém převodním systému. Během embryonálního vývoje je rozsah exprese Cx40 v komorách širší v porovnání s dospělci. U myši se začíná objevovat exprese na ED9,5 v primitivní síní a

Obrázek 3. Exprese jednotlivých konexinů v srdci dospělého jedince. Exprese znázorněna šedou barvou. TR - Tawarova raménka, HS - Hisův svazek, PV - Purkyňova vlákna. Obrázek adaptován dle Gros et al. 2010.



komoře. Během embryonálního vývoje dochází k postupnému omezení exprese Cx40 v komorách jen na komorový převodní systém (Miquerol et al., 2003).

Předpokládá se, že mutace Cx40 genu u myši mohou vést ke zvýšené citlivosti k fibrilacím síní (Simon et al., 1998; Hagendorff et al., 1999), ale přesný mechanismus vlivu Cx40 respektive jeho změněné exprese na vznik arytmií (arytmogenezi) není zdaleka objasněn. U transgenních myši s absencí Cx40 bylo zaznamenáno široké spektrum abnormalit ve vedení elektrického vzruchu: prodloužení intra - atriálního vedení (Hagendorff et al., 1999), atrioventrikulární blok prvního stupně, prodloužené vedení v Hisově svazku (Vanderbrink et al., 2000), blok pravého Tawarova raménka, změny QRS komplexu na elektrokardiogramech či zpomalené vedení v levém Tawarově raménku (Simon et al., 1998; van Rijen et al., 2001). Studie zabývající se vztahem mezi arytmiemi a Cx40 mají různorodé výsledky. U člověka jsou polymorfismus genu pro CX40 (Hauer et al., 2006), zvýšená exprese CX40 (Dupont et al., 2001; Polontchouk et al., 2001) nebo „nonsense“ mutace CX40 genu (Yang et al., 2010) spojovány se zvýšenou pravděpodobností vzniku fibrilací síní. Rychlost šíření vzruchu se liší mezi levou a pravou síní u kontrolních myši, jak u dospělců, tak i u embryí počínaje ED15,5. Tato heterogenita mezi síněmi mizí u heterozygotů a homozygotů s absencí Cx40. Dle Leaf et al. (2008) je vznik elektrického vzruchu v SA uzlu závislý na Cx40 počínaje ED15,5, kdy byla většina srdcí s absencí Cx40 aktivována z různých ektopických míst v síních. V naší studii jsme prokázali, že ektopická aktivace atrií převládá již na ED12,5 (kapitola 3.3.).

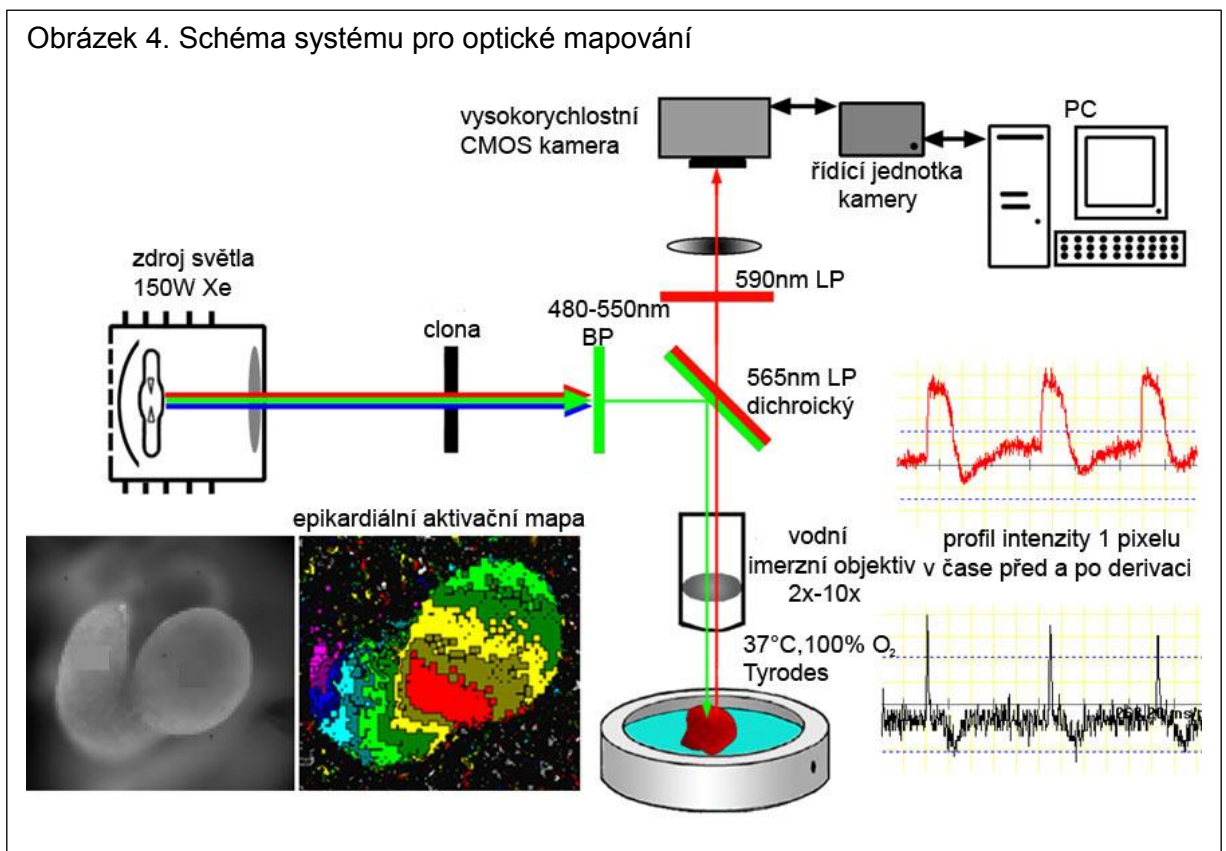
1.6. Optické mapování

Funkci převodního systému srdečního během vývoje lze velmi dobře studovat pomocí vysokorychlostního optického mapování (Sedmera et al., 2005). Optické mapování je metoda, na které jsou založeny 3 články této disertační práce a v poslední publikaci data z optického mapování přispívají k popisu myšního modelu pro syndrom dlouhého QT intervalu.

Princip metody (**Obrázek 4**) je založen na použití potenciometrického barviva vázajícího se na buněčné membrány a reagujícího v závislosti na rozdílu potenciálu uvnitř a vně buněk změnou svých optických vlastností, fluorescence. Přesný mechanismus reakce na změnu napětí není znám. Pravděpodobně souvisí s excitací vyvolanou relokací elektrického náboje podél gradientu elektrického pole nebo s elektrickým polem vyvolanou reorientací barviva na plasmatické membráně (Efimov et al., 2004). Optické mapování umožňuje studium funkce převodního systému už u velmi raných embryonálních stádií (myš ED9,5),

kdy je přímé měření mikroelektrodami obtížně proveditelné vzhledem k velikosti embryí, a to díky použití systému virtuálních (optických) elektrod.

Optické mapování poskytuje *in vivo* fyziologické údaje - epikardiální aktivační mapy, vznikající analýzou dat z optického mapování a beroucí v úvahu časoprostorovou osu. Z aktivační mapy mohou být vyhodnocena první aktivovaná místa na epikardiálním povrchu a směr vedení elektrického vzruchu. Dohromady tvoří vzor komorové aktivační sekvence, jenž slouží jako ukazatel zralosti převodního systému. Dalším parametrem, který lze hodnotit z aktivačních map, je rychlost šíření elektrického impulzu myokardem.



1.7. Význam studia převodního systému srdečního a aplikace základního výzkumu

Pochopení signalizace důležité pro vývoj převodního systému srdečního je přínosné nejen pro lékaře zabývající se klinickou praxí, ale také vědce studující srdeční onemocnění v dospělosti. Arytmie představují skupinu kardiovaskulárních onemocnění, která významně souvisí se změnami při vzniku a šíření elektrického vzruchu převodním systémem srdečním.

Arytmie vznikají z mnoha důvodů, mezi než patří kongenitální onemocnění srdce, genetické mutace, stárnutí a vlivy prostředí. Místa vzniku arytmií nejsou v srdeční tkáni lokalizována zcela náhodně. Častá místa ektopické aktivace jsou umístěna například u vstupu dutých žil, sinus coronarius, plicních žil, nebo v místech chirurgických zásahů či infarktu.

Dle genomových asociačních studií (GWAS) pro arytmiie a změny v intervalech elektrokardiogramů byly identifikovány dvě skupiny potenciálně predispozičních genů. Jsou to geny kódující iontové kanály jako na příklad *KCNE1*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *SCN5A*, *SCN10A* a také geny důležité pro vývoj kardiovaskulárního systému: *HAND1*, *HEY2*, *NKX2-5*, *PITX2*, *TBX3*, *TBX5*, *TBX20* (shrnuto v (Rentschler and Jay, 2014)). Ke vzniku arytmii dochází v důsledku působení epigenetických nebo genetických faktorů nebo kombinací obojího. Je známo, že během patologických stavů dochází k reaktivaci vývojového genového programu, kdy je genová exprese podobná expresi během embryonálního vývoje (Kang, 2006).

Příkladem aplikace, podmíněné dobrou znalostí genové exprese a regulace během vývoje převodního systému, může být přeprogramování cardiomyocytů *in situ* na SA uzel a nahrazení umělého kardiostimulátoru tímto biologickým pacemakerem. Tato myšlenka je podpořena studií, v které se podařilo přeprogramovat komorové myocyty *in vivo* u dospělého morčete pomocí Tbx18 transdukce na indukovaný SA uzel (Kapoor et al., 2013).

Další potenciální aplikací je výroba umělého myokardu pomocí *in vitro* technik tkáňového inženýrství. Úspěch implantace *in vivo* je podmíněn vyřešením elektrického napojení (Jackman et al., 2015).

2. Hypotézy a cíle práce

Hypotézy

Cílem disertační práce bylo komplexně přispět k porozumění mechanismů podílejících se na vývoji převodního systému u obratlovců. Vycházeli jsme ze znalosti, že vyvíjející se převodní systém je citlivý k epigenetickým změnám, zejména citlivost ke změně a míra změny jsou ovlivněny vnějšími vlivy prostředí, mezi které se řadí i hemodynamické faktory. První hypotéza predikuje, že se bez normálního mechanického zatížení, které je podmíněno krevním oběhem, nebude převodní systém srdeční normálně vyvíjet.

V další fázi výzkumu nás zajímalo, zda bude mít absence Cx 40, hlavního konexinu síní a komorového převodního systému, vliv na funkčnost převodního systému a na rychle vedoucí tkáň síní. Předpokládáme, že Cx 40 bude nezbytný během vývoje a že bez něj dojde ke zmožení vedení vzruchu.

Mutace v genech kódujících proteiny, které mají souvislost s vývojem převodního systému, jako jsou proteiny iontových kanálů, gap junctions proteiny, transkripční faktory či jiné proteiny signálních kaskád se podílí na vzniku arytmií, případně na dalších změnách ve vedení vzruchu. Třetí hypotéza této disertační práce předpokládá, že se během vývoje myši s funkční inhibicí KvLQT1 proteinu, který se podílí na stavbě draslíkových kanálů, zpomalí nitrokomorové vedení vzruchu.

Cíle práce

Zhodnotit vliv mechanického zatížení v raném vývoji převodního systému kuřete

Popsat normální vývoj převodního systému u myši pomocí optického mapování

Analyzovat vliv absence Cx40 na iniciaci, způsob a rychlost vedení vzruchu v komorách a síních

U transgenní linie myši α -MHC-KvLQT1-iso2-T7, s fenotypem shodným se syndromem dlouhého QT intervalu, zhodnotit funkci komorového převodního systému

3. Komentáře k publikacím

Jednotlivé publikace jsou prezentovány v pořadí, které je dané tematicky. V komentáři jsou krátce shrnuty výsledky a diskuse. Cíle, metody a souhrn všech závěrů jsou uvedeny samostatně.

3.1. Vliv mechanické zátěže na časný vývoj převodního systému u kuřete

Sankova B, Machalek J, Sedmera D. 2010. Effects of mechanical loading on early conduction system differentiation in the chick. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 May;298(5):H1571 - 6.

Proudící krev působí na okolní tkáň komplexním způsobem. Mezi hlavní síly, které zprostředkují tento efekt, se řadí tlak působící na stěnu cév podmíněný tlakem krve („oscilatory stress“), zátěž plynoucí z mechanického napínání buněk stěny cévy při reakci na změny tlaku a vlastní třecí síla proudící krve („shear stress“). Hemodynamické změny jsou nedílnou součástí procesu kardiogeneze, podílí se přetvoření trubicovitého srdce ve čtyřdutinový orgán (Lindsey et al., 2014). Abnormální změny toku krve souvisí s některými vrozenými srdečními vadami. Pro většinu vrozených poruch je charakteristické, že není známa jejich přesná etiologie. Nejčastěji jsou studie věnované úloze hemodynamiky v embryonálním vývoji založeny na mechanickém zásahu *in vivo* u kuřecího zárodku. Cílem této práce bylo pochopit vliv prosté mechanické zátěže na vývoj převodního systému za použití *in vitro* metodického přístupu.

Vzájemně jsme porovnávali 3 skupiny explantovaných kuřecích srdcí. První experimentální skupinou byla kuřecí srdce *in vitro* kultivována 24 hodin bez hemodynamické pracovní zátěže z ED3 na ED4 nebo z ED4 na ED5 a následně opticky mapována. Ihned po explantaci z vajíčka byla opticky mapována skupina kontrolních srdcí ED3, ED4 a ED5. Poslední experimentální skupinu reprezentovala srdce explantovaná ED4 a kultivována 24 hodin s pracovní zátěží, kterou jsme vyvolali naplněním komory silikonovým olejem.

Pro jednotlivé embryonální dny je typický výskyt více komorových aktivačních způsobů, což reflektuje přirozenou variabilitu. Ve sledovaném „vývojovém okénku“ mezi ED3 a ED5 se vyskytují všechny aktivační vzory a dochází ke konverzi aktivačních způsobů. Při experimentálním zásahu s potenciálním vlivem na vývoj převodního systému je důležitý správný výběr vývojového okénka. Příkladem může být testování role endothelinové signalizace podáním blokátoru receptoru pro enzym zahrnutý v signalizační kaskádě, kdy byla

reakce na farmakologický zásah zaznamenána jen v pozdnější fázi diferenciaci komorového převodního systému (Sedmera et al., 2008).

U kontrolních ED3 srdcí převládá aktivace primitivním způsobem, kdy aktivace kopíruje tok krve směrem od báze k apexu. Následující embryonální den ED4 již ubývá srdcí aktivovaných od báze k apexu ve prospěch dočasného aktivačního způsobu využívající primární prstenec. V ED5 již je většina srdcí aktivována zralým způsobem od apexu k bázi při současném výskytu i obou zbývajících aktivačních způsobů. Postupný nárůst počtu srdcí aktivovaných zralým způsobem od apexu k bázi dokládá postupnou diferenciaci komorového převodního systému. Tyto výsledky jsou ve shodě s dříve publikovanými výsledky (Reckova et al., 2003; Chuck et al., 2004; Sedmera et al., 2004).

Vliv kultivace bez hemodynamické zátěže byl posuzován na základě porovnání frekvence výskytu jednotlivých způsobů aktivace současně se sledováním morfologických změn v konfokálním mikroskopu. Všechna srdce explantovaná ED3 a následně kultivovaná byla aktivována primitivním způsobem od báze k apexu. Podobný efekt zpoždění ve vývoji koverze aktivačních způsobů byl pozorován i při kultivaci z ED4 do ED5, kdy se již u části srdcí objevila aktivace pomocí primárního prstence, ale stále převládal primitivní způsob aktivace od báze k apexu. Kultivovaná srdce v porovnání s přirozeně vyvíjejícími se srdci *in ovo* měla prodlouženou a kolabovanou výtokovou část, pozastavený růst a regresivní změny ve stavbě trabekul. Trabekuly, výběžky do lumen komor srdce tvořené myokardem a tenkou vrstvou endokardu, jsou v úzkém a intenzivním kontaktu s proudící krví. Místa nejintenzivnějšího „shear stress“ u ED2 kuřecího embrya jsou výtoková část, atrioventrikulární kanál a vnitřní zakřivení srdeční kličky. Opačně nejnižší míra „shear stress“ je v oblasti vnějšího zakřivení a prostoru mezi trabekulami (Groenendijk et al., 2005). Na základě dat z našeho experimentu lze předpokládat, že tvorba a diferenciaci trabekul je závislá na hemodynamickém zatížení.

Normalizace funkce převodního systému bylo dosaženo při „záchraném“ pokusu, kdy před kultivací byla injekčně vpravena kapka silikonu do primitivní komory, bylo tak dosaženo distribuce aktivačních způsobů srovnatelných s kontrolními. Za použití selektivního inhibitoru nesvalového myosinu II (blebbistatin) s efektem bránící kontrakci, bylo ověřeno, že principem je pasivní natahování myocytů nezávislé na myosinu. Mechanické napínání myocytů představuje nezbytný epigenetický faktor pro časný vývoj převodního systému kuřete.

O podobnou sérii experimentů jsme se pokoušeli i u myši, kdy jsme chtěli kromě efektu změn v hemodynamické zátěži testovat exogenním podáním různých

farmakologických látek význam jednotlivých složek endothelinové signální kaskády. Pro velmi nízké procento srdcí se spontánní srdeční aktivitou při optickém mapování jsme tento směr výzkumu museli ukončit. Tato situace ilustruje citlivost srdce myši jako modelového organismu v porovnání s embryi kuřete či křepelky. Práce během optického mapování vyžaduje rychlé a přesné zacházení, kdy čas od disekce prvního embrya představuje limitující faktor podmiňující úspěšnost experimentu.

3.2. Normální vývoj komorového převodního systému a vliv absence Cx40 na vedení vzruchu v komorách

Sankova B, Benes J, Jr., Krejci E, Dupays L, Theveniau - Ruissy M, Miquerol L, Sedmera D. 2012. The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. Cardiovasc Res. 2012 Sep 1;95(4):469 - 479.

Morfologie a vývoj převodního systému u myši byly popsány histologicky, poměrně dobře byl charakterizován i jeho vývoj z molekulárního hlediska (Christoffels et al., 2010). Nejnověji však optické mapování umožňuje studium funkčního zapojení převodního systému během ontogeneze a případně hodnocení různých parametrů s potenciálním vlivem na vývoj převodního systému. Hlavním cílem této práce bylo kvantitativně zhodnotit měřitelné parametry získané pomocí optického mapování, jako jsou: aktivační čas nezbytný pro aktivaci levé komory, lokalizace prvního aktivovaného místa, směr šíření vzruchu a způsob aktivace. Takto popsaný normální vývoj převodního systému u myši umožňuje analýzu a interpretaci vývojových změn pozorovaných u různých transgenních linií.

Laboratoř Anatomického ústavu 1. lékařské fakulty vybavená pro optické mapování je jedinou takovou laboratoří v rámci České republiky a ani v rámci Evropy není mnoho laboratoří se zaměřením na optické mapování. Mezi publikacemi, jejichž součástí jsou data z optického mapování, je minimum prací zaměřeno na vývoj převodního systému u myši. V období, kdy jsem do laboratoře nastoupila v roce 2008, byly této problematice věnovány jen dvě práce (Rentschler et al., 2001; Rentschler et al., 2002). Velkým nedostatkem těchto prací byl fakt, že popis způsobů aktivace ve studovaných embryonálních dnech byl založen na minimálním počtu analyzovaných srdcí ve skupině a situace vypadala jednotně, tzn. výskyt vždy jen jednoho aktivačního způsobu v daném embryonálním dni.

Pomocí metody optického mapování jsme studovali funkci převodního systému u myši počínaje ED9,5. Způsoby aktivace komor jsme rozčlenili do kategorií využívající pro aktivaci pracovního myokardu: primární interventrikulární prstenec; levé Tawarovo raménko; pravé

Tawarovo raménko; obě raménka a přechodný způsob aktivace. Typická situace v daném embryonálním dni je reprezentována spektrem několika aktivačních způsobů (Reckova et al., 2003) a proto není možné popsat normální vývoj analýzou méně než 10 embryí ve skupině. První primitivní aktivační vzor, který se objeví v časném vývoji převodního systému u myši, je aktivace pomocí primárního interventrikulárního prstence. Na rozdíl od kuřete, kde se jako první způsob aktivace objevuje aktivace od báze k apexu, nebyl tento typ aktivace doposud nikdy pozorován u myši. Vedení elektrického impulsu v rozmezí ED9,5 - 11,5 je charakteristické tím, že je využit primární interventrikulární prsteneček, struktura v oblasti budoucího mezikomorového septa. Jak pokračuje vývoj srdce, postupně mizí aktivace pomocí primárního interventrikulárního prstence (ED12,5 se vyskytuje naposled) a je nahrazována aktivací pomocí Tawarových ramének. Z komorového převodního systému je první aktivní levé raménko, ale s výskytem přechodného typu aktivace, kdy je první aktivované místo na apexu levé komory a v okamžiku, kdy elektrický impuls dosáhne oblasti vznikajícího mezikomorového septa, je rychlost šíření vzruchu navýšena, což naznačuje, že preferenčně vedoucí oblast primárního prstence je stále aktivní. V ED11,5 se stává aktivní i pravé raménko. V ED14,5 je většina srdcí aktivovaných ze dvou center, ale ojediněle bylo první aktivované místo jen na jedné straně. Šíření elektrického impulsu se urychluje nejvýrazněji ve „vývojovém okénku“ mezi ED10,5 - 12,5, což vyplývá z porovnání aktivačních časů u jednotlivých embryonálních dnů. Rychlost šíření vzruchu je podmíněna způsobem aktivace, pro aktivaci pomocí primárního prstence je charakteristické relativně pomalé vedení v porovnání se zralou rychlou aktivační sekvencí od apexu k bázi.

Zhodnocení normálního vývoje aktivace komor poskytuje nezbytný rámec pro analýzu transgenických myší s potenciálními vadami převodního systému. Pro interpretaci změn pozorovaných u myších modelů je nutné systematické a kvantitativní studium aktivačních sekvencí. Jako pozadí byla použita získaná data během analýz myší postrádající geny pro Cx40, Tbx1 (zatím nepublikováno), ErbB2 (nepublikováno) a u myšího modelu pro syndrom dlouhého QT intervalu (publikace 4). Vlivu absence Cx40 na funkci komorového převodního systému během vývoje se věnuje druhá část této publikace.

Rozdíly mezi genotypy při analýze aktivačních časů komor nebyly pozorovány. Sledování četnosti výskytu jednotlivých aktivačních sekvencí komor odhalilo značný pokles frekvence aktivace pomocí levého Tawarova raménka na ED12,5 a ED14,5 u embryí s absencí Cx40. U heterozygotů byla četnost výskytu také snížena, ale v menším rozsahu. Podíl aktivačních sekvencí se začal obracet v ED16,5, kde bylo aktivní levé Tawarovo raménko u všech genotypů v téměř plném rozsahu. Frekvence pravostranné aktivace začala klesat u myši

s Cx40 deficitem, což naznačuje rozvoj dysfunkce pravého Tawarova raménka. Nejvýraznější fenotyp byl zaznamenán v ED18,5, kde srdce bez Cx40 měla funkční pravé Tawarovo raménko pouze v 33% případech, na rozdíl od 96% u heterozygotů a 94% wild type kontrol. Výskyt bloku pravého raménka je v souladu s již publikovanými pracemi se zaměřením na studium absence Cx40 u dospělců (Simon et al., 1998; Tamaddon et al., 2000). Blok pravého Tawarova raménka je tedy vzhledem k jeho morfologii, kdy v pozdějších fázích vývoje dochází k remodelaci v relativně tenký svazek, považován za citlivý indikátor dysfunkčního převodního systému. V této pozdější fázi se pak plně projevuje nezbytnost přítomnosti konexinu 40 pro jeho funkci.

3.3. Význam Cx40 pro vedení elektrického vzruchu v síních během vývoje

Benes J Jr, Ammirabile G, Sankova B, Campione M, Krejci E, Kvasilova A, Sedmera D. 2014. The role of connexin40 in developing atrial conduction. FEBS Lett. 2014 Apr 17;588(8):1465 - 9.

Cx40 je hlavní protein vodivých buněčných spojů (gap junctions) exprimovaný v síních a komorách od časných fází embryogeneze. Jak embryogeneze pokračuje exprese Cx40 v síních se nemění, na rozdíl od komor. Nicméně funkční význam Cx40 během vývoje převodního systému se zaměřením na síně byl doposud studován v omezené míře, kdy se tomuto tématu se věnovala jedna publikace (Leaf et al., 2008).

Při optickém mapování musí být analyzovaná tkáň zaostřena v jedné ohniskové rovině, tento fakt nekomplikuje mapování embryí ve stádiu ED10,5; u ED12,5 musí být odstraněna výtoková část zakrývající oblast mezi levou a pravou síní. Ouška síní u ED14,5 jsou relativně velká, prodlužují se směrem dopředu a to neumožňuje umístění celé plochy síní do jedné roviny a tak se komplikuje interpretaci získaných dat. Orientace srdcí při optickém mapování síní se liší od přístupu při aktivaci komor, úspěšnost experimentu je podmíněna co nejkratším časem pokusu, což neumožňuje reorientaci analyzovaného srdce, proto nelze během jednoho experimentu analyzovat síně i komory současně. V důsledku tohoto faktu jsme se v další samostatné práci zaměřili na vliv absence Cx40 na vedení vzruchu v síních.

V ED10,5; ED12,5 a ED14,5 bylo zaznamenáno různorodé vedení rychlosti vzruchu síněmi v závislosti na Cx40 genotypu. Vliv nedostatku Cx40 se projevil prodloužením aktivačního času síní, který byl výrazně prodloužen hlavně u ED10,5 a ED12,5 stádií v porovnání s ED14,5. Pravděpodobný důvod měnící se síly fenotypového projevu, který klesal se stářím embryí, souvisí se vzájemnou funkční náhradou jednoho konexinu při

nedostatku druhého. Taková funkční substituce byla již dříve popsána. Protože exprese Cx43 v síních začíná až v ED12,5 (Delorme et al., 1997), je v ranějších fázích vývoje funkční nahrazení vyloučeno. U kontrolních a heterozygotních embryí bylo první aktivované místo v oblasti předpokládaného SA uzlu. U myši s absencí Cx40 se objevily dvě atriální aktivační sekvence, aktivace z SA uzlu a ektopická aktivace vycházející vždy ze stejné oblasti pravého ouška. Přestože SA uzel lze imunohistochemicky lokalizovat pomocí Anti - HCN4 protilátky, nám se nepodařilo iniciační místo ektopického vzruchu morfoloogicky lokalizovat.

Chybějící Cx40 během vývoje ovlivňuje aktivační sekvence šíření vzruchu v síních a výrazně zpomaluje rychlost šíření elektrického vzruchu síněmi. U člověka byl prokázán vztah mezi predispozicí k fibrilaci síní a mutací genu pro Cx40 (Yang et al., 2010). Cx40 má důležitou roli při fyziologickém vývoji síní a další studium této problematiky rozšíří představu o molekulárním mechanismu rozvoje supraventrikulárních arytmií.

3.4. Funkční inhibice proteinu KvLQT1 draslíkových kanálů a vliv na funkci komorového převodního systému

de la Rosa AJ, Dominguez JN, Sedmera D, Sankova B, Hove - Madsen L, Franco D, Aranega A. 2013. Functional suppression of Kcnq1 leads to early sodium channel remodeling and cardiac conduction system dysmorphogenesis. Cardiovasc Res. 2013 Jun 1;98(3):504 - 14

V této studii jsme se společně s kolegy z Univerzity Jaén pokusili rozšířit míru znalostí o transgenní myši linii α - MHC - KvLQT1 - iso2 - T7, modelovém organismu pro studium syndromu dlouhého QT intervalu (LQTS, (Demolombe et al., 2001)). Zaměřili jsme se na studium změn exprese sodíkových kanálů, a jejich vzájemnému vztahu se změnami morfologie a funkce komorového převodního systému, společně s nově popsanou srdeční hypertrofií u toho myšního modelu, která se objevuje během pozdního embryonálního vývoje.

Syndrom dlouhého QT intervalu je kongenitální porucha s incidencí 1:2000 (Schwartz et al., 2009) charakterizovaná prodlouženým akčním potenciálem v komorách, který se na EKG křivce se projevuje prodloužením QT intervalu. Pacientům hrozí zvýšené riziko synkopy nebo náhlého úmrtí v důsledku komorové arytmie. Prodloužení QT intervalu je podmíněno snížením toku draslíkových iontů směrem ven z buňky během fáze plató nebo repolarizace akčního potenciálu, nebo zvýšení toku vápníkových a sodíkových iontů do buňky během depolarizace. Mutace 3 hlavních genů (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*) způsobí většinu případů LQTS. Mutace v dalších 10 genech je dávána do souvislosti s LQTS. U námi studované transgenní myši byl funkčně inaktivován KvLQT1 protein (kódovaný genem

KCNQ1), který má důležitou roli při repolarizační fázi a podmiňuje I_{KS} pomalou složku zpožděného vyrovnávacího toku iontů draslíku ven z buněk. Exprese dominantně negativní lidské izoformy 2 proteinu KvLQT1 je u studované transgenní linie pod kontrolou promotoru pro α - MHC. Isoforma 2 nedává vzniknout funkční podjednotce kanálu a na izomorfu 1 tvořící kanál má dále dominantně negativní efekt.

V původní práci (Demolombe et al., 2001) je fenotypová analýza transgenní linie zaměřená na změny exprese draslíkových kanálů, toku iontů draslíku, délky trvání akčního potenciálu a EKG parametry u postnatálních stádií. V rámci původní studie vznikly 3 linie α - MHC - KvLQT1 - iso2 - T7, které se vzájemně lišily intenzitou exprese dominantně negativní izoformy 2 proteinu KvLQT1, a tedy i mírou fenotypových změn. Pro účely naší studie byla vybrána linie H05 s nejnižší mírou exprese transgenu a s fenotypem nejvíce odpovídajícím LQTS. Protože je známo, že dochází sekundárně ke změnám exprese iontových kanálů v reakci na změny srdečního rytmu (Aiba and Tomaselli, 2010), je pravděpodobné, že se mohou objevit i změny komorového převodního systému jako reakce na výskyt arytmie. Většina mutací, které způsobí LQTS souvisí se změnami draslíkových kanálů, ale zhruba 10 - 15% případů je podmíněno mutací genu *SCN5A*, který kóduje jednu z podjednotek sodíkového kanálu. Simulačním navýšením sodíkových toků (Cardona et al., 2010) se podařilo experimentálním přístupem potvrdit vliv na prodloužení trvání akčního potenciálu.

Kolegové z Univerzity Jaén nově popsali u této transgenní linie hypertrofii srdce, k rozvoji které dochází mezi ED14,5 a ED18,5. Souvislost srdeční hypertrofie a LQTS již byla doložena i v několika předcházejících studiích (Kang, 2006). Za použití RT - PCR a imunohistochemického přístupu byla nově identifikována zvýšená exprese sodíkových kanálů v časně fázi embryonálního vývoje, tj. dříve, než dochází k remodelaci draslíkových kanálů. Zvýšená exprese kanálů korelovala se změnami toku sodíkových iontů a zpomalením obnovy při inaktivaci.

Za použití optického mapování embryonálních stádií ED14,5, ED18,5 a dospělců jsme v naší laboratoři doplnili data části práce věnované funkci komorového převodního systému. Parametr, který byl odlišný u transgenní linie, byl celkový čas nezbytný pro aktivaci levé komory. Došlo k jeho prodloužení a to až u pozdního embryonálního stádia a u dospělců. Pro identifikaci příčiny pomalejšího vedení vzruchu jsme po zaznamenání spontánní elektrické aktivity srdce prováděli elektrickou stimulaci, umožňující odlišení příčiny snížené rychlosti vedení vzruchu mezi komorovým převodním systémem a pracovním myokardem. Stimulační elektroda byla umístěna k bázi levé komory, aby nedošlo k interferenci s komorovým převodním systémem, a elektrický impuls byl dále veden jen pracovním myokardem. Při

porovnání aktivačních časů stimulovaných srdcí transgenní linie a kontrolní skupiny nebyl zaznamenán žádný statisticky signifikantní rozdíl. Funkční inhibice KvLQT1 proteinu nemá tedy vliv na rychlost vedení ektopického vzruchu pracovním myokardem, ale je zpomalené vedení spontánního vzruchu komorovým převodním systémem.

Součástí analýzy pomocí optického mapování je sledování četnosti aktivačních způsobů komor během vývoje. Již u ED14,5 byla v porovnání s kontrolní skupinou změněna distribuce aktivačních způsobů. Je typické v ED14,5 že převládá aktivace směrem od apexu k bázi s prvním aktivovaným místem na apexu obou komor, což naznačuje, že jsou funkční obě Tawarova raménka. U transgenní linie převládala aktivace pouze levým Tawarovým raménkem. U dalšího analyzovaného stádia ED18,5 byla změna distribuce aktivačních způsobů výrazná a dodržovala stejný trend jako u ED14,5 (95% kontrolních versus 12% transgenních srdcí aktivováno od apexu obou komor současně). Funkční analýza optickým mapováním odhalila u transgenní linie výskyt bloku pravého Tawarova raménka u většiny ED18,5 srdcí.

Pro účely morfologické analýzy komorového převodního systému byla převedena transgenní linie na pozadí Cx40:GFP. Byly pozorovány změny komorového převodního systému, které byly v korelaci s daty z optického mapování. V distální části Purkyňových vláken obou komor ED18,5 embryí byla zaznamenána redukce sítě GFP pozitivních vláken při porovnání s kontrolami. V časnějším stádiu ED14,5 byla snížena intenzita GFP signálu v trabekulách, kde se diferencují Purkyňova vlákna. I přestože byl snížen výskyt GFP pozitivních buněk v obou komorách, na funkci levého Tawarova raménka to vliv nemělo, pravděpodobně díky mohutně vyvinuté souvislé vrstvě vláken, kterými je levé raménko tvořeno. Pravé raménko je v pozdějších fázích vývoje remodelováno v relativně tenký svazek, který je vnímavý a citlivý ke změnám a proto může být považována aktivita pravého raménka za indikátor dysfunkčního převodního systému.

4. Závěry:

Mechanické zatížení v raném vývoji převodního systému kuřete

Orgánová kultura srdcí bez pracovního zatížení v období, kdy dochází ke změně aktivačních způsobů, vede ke zpomalení až regresi konverze od báze k apexu směrem ke zralejším způsobům aktivace.

Funkční fenotyp je při absenci mechanického zatížení myokardu doplněn morfologickými změnami, kdy jsou redukovány trabekuly, pozastaven růst a výtoková část je prodloužena. V komorách se funkční fenotyp normalizuje při „záchranných“ pokusech, kdy je vyvolána během kultivace pracovní zátěž.

Pro normální vývoj převodního systému u myši je charakteristické

V jednotlivých embryonálních dnech se zároveň vyskytuje více způsobů aktivace komor a to odpovídá přirozené variabilitě.

Primitivní aktivaci srdce od báze k apexu, kopírující tok krve, se nepodařilo zaznamenat u nejčasnějšího mapovaného stádia - ED9,5.

V časně fázi embryonálního vývoje je typický způsob aktivace primárním prstencem, strukturou preferenčně vedoucí vzruch v oblasti vznikající mezikomorové přepážky. Tento způsob aktivace postupně během vývoje mizí a v ED12,5 je zaznamenán zcela sporadicky. Rychlost šíření vzruchu je podmíněna způsobem aktivace komor. K výraznému zrychlení vedení elektrického vzruchu dochází ve „vývojovém okénku“ mezi ED9,5 až ED12,5, kdy úměrně tomu klesá počet srdcí aktivovaných dočasným způsobem pomocí primárního prstence.

Vliv absence Cx40 na iniciaci, způsob a rychlost vedení vzruchu v komorách a síních

V pozdní fázi vývoje (významně od ED18,5) se objevuje blok pravého Tawarova raménka popsany dříve u dospělců s delecí genu pro Cx40.

Od ED12,5 je většina síní aktivována z ektopického místa lokalizovaném v pravém oušku. Rychlost šíření vzruchu v síních je podmíněná Cx40 genotypem, kdy úplná absence Cx40 vede k výraznému zpomalení vedení.

Pravděpodobně je u pozdějších stádií (ED14,5) absence Cx40 kompenzována Cx43 (počátek exprese ED12,5).

Funkce komorového převodního systému transgenní linie myši α -MHC-KvLQT1-iso2-T7

Dochází k prodloužení času nezbytného pro aktivaci levé komory u pozdního embryonálního stádia (ED18,5) a u dospělců.

Vedení ektopického vzruchu pracovním myokardem se nezměnilo, ale bylo zpomaleno vedení spontánního vzruchu komorovým převodním systémem.

Objevuje se blok pravého Tawarova raménka u většiny ED18,5 srdcí.

5. Použitá literatura

- Aiba T, Tomaselli GF. 2010. Electrical remodeling in the failing heart. *Current opinion in cardiology* 25:29-36.
- Bashore TM. 2007. Adult congenital heart disease: right ventricular outflow tract lesions. *Circulation* 115:1933-1947.
- Blom NA, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Poelmann RE, Mentink MM, Ottenkamp J. 1999. Development of the cardiac conduction tissue in human embryos using HNK-1 antigen expression: possible relevance for understanding of abnormal atrial automaticity. *Circulation* 99:800-806.
- Boehm C, Johnson TR, Caston JD, Przybylski RJ. 1987. Cardiac hypertrophy in chick embryos induced by hypothermia. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 252:C97-C104.
- Cardona K, Trenor B, Rajamani S, Romero L, Ferrero JM, Saiz J. 2010. Effects of late sodium current enhancement during LQT-related arrhythmias. A simulation study. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Annual Conference 2010*:3237-3240.
- de Jong F, Opthof T, Wilde AAM, Janse MJ, Charles R, Lamers WH, Moorman AFM. 1992. Persisting zones of slow conduction in the developing chicken hearts. *Circ Res* 71:240-250.
- Delorme B, Dahl E, JarryGuichard T, Briand JP, Willecke K, Gros D, TheveniauRuissy M. 1997. Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circulation Research* 81:423-437.
- Demolombe S, Lande G, Charpentier F, van Roon MA, van den Hoff MJ, Toumaniantz G, Baro I, Guihard G, Le Berre N, Corbier A, de Bakker J, Opthof T, Wilde A, Moorman AF, Escande D. 2001. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform. Part I: Phenotypic characterisation. *Cardiovasc Res* 50:314-327.
- Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppens SR, Khan N, Kaprielian R, Yacoub MH, Severs NJ. 2001. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33:359-371.
- Efimov IR, Nikolski VP, Salama G. 2004. Optical Imaging of the Heart. *Circulation Research* 95:21-33.
- Epstein Jonathan A, Aghajanian H, Singh Manvendra K. 2015. Semaphorin Signaling in Cardiovascular Development. *Cell Metabolism* 21:163-173.
- Gassmann M, Casagrande F, Orioll D, Simon H, Lai C, Klein R, Lamke G. 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378:390-394.
- Gittenberger-de Groot AC, Mahtab EA, Hahurij ND, Wisse LJ, Deruiter MC, Wijffels MC, Poelmann RE. 2007. Nkx2.5-negative myocardium of the posterior heart field and its correlation with podoplanin expression in cells from the developing cardiac pacemaking and conduction system. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)* 290:115-122.

- Gourdie RG, Harris BS, Bond J, Justus C, Hewett KW, O'Brien TX, Thompson RP, Sedmera D. 2003. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 69:46-57.
- Gourdie RG, Mima T, Thompson RP, Mikawa T. 1995. Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development* 121:1423-1431.
- Grim M, Druga R. 2016. *Základy anatomie, 2. Kardiovaskulární a lymfatický systém.* Galen:38-44.
- Groenendijk BC, Hierck BP, Vrolijk J, Baiker M, Pourquie MJ, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE. 2005. Changes in shear stress-related gene expression after experimentally altered venous return in the chicken embryo. *Circ Res* 96:1291-1298.
- Gros D, Théveniau-Ruissy M, Bernard M, Calmels T, Kober F, Söhl G, Willecke K, Nargeot J, Jongsma HJ, Mangoni ME. 2010. Connexin 30 is expressed in the mouse sino-atrial node and modulates heart rate. *Cardiovascular Research* 85:45-55.
- Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. 1999. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 99:1508-1515.
- Hall CE, Hurtado R, Hewett KW, Shulimovich M, Poma CP, Reckova M, Justus C, Pennisi DJ, Tobita K, Sedmera D, Gourdie RG, Mikawa T. 2004. Hemodynamic-dependent patterning of endothelin converting enzyme 1 expression and differentiation of impulse-conducting Purkinje fibers in the embryonic heart. *Development* 131:581-592.
- Hauer RN, Groenewegen WA, Firouzi M, Ramanna H, Jongsma HJ. 2006. Cx40 polymorphism in human atrial fibrillation. *Adv Cardiol* 42:284-291.
- Hogers B, Deruiter MC, Baasten AMJ, GittenbergerdeGroot AC, Poelmann RE. 1995. Intracardiac Blood-Flow Patterns Related to the Yolk-Sac Circulation of the Chick-Embryo. *Circulation Research* 76:871-877.
- Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, Christoffels VM. 2004. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* 62:489-499.
- Challice CE, Viragh S. 1973. The architectural development of the early mammalian heart. *Tissue Cell* 6:447-462.
- Christoffels VM, Hoogaars WM, Moorman AFM. 2010. *Patterning and Development of the Conduction System of the Heart: Origins of the Conduction System in Development.* London: Elsevier.
- Chuck ET, Freeman DM, Watanabe M, Rosenbaum DS. 1997. Changing activation sequence in the embryonic chick heart. Implication for the development of the His-Purkinje system. *Circ Res* 81:470-476.
- Chuck ET, Meyers K, France D, Creazzo TL, Morley GE. 2004. Transitions in ventricular activation revealed by two-dimensional optical mapping. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 280:990-1000.
- Chuck ET, Watanabe M. 1997. Differential expression of PSA-NCAM and HNK-1 epitopes in the developing cardiac conduction system of the chick. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 209:182-195.
- Jackman CP, Shadrin IY, Carlson AL, Bursac N. 2015. Human Cardiac Tissue Engineering: From Pluripotent Stem Cells to Heart Repair. *Current opinion in chemical engineering* 7:57-64.
- Jenni R, Rojas J, Oechslin E. 1999. Isolated noncompaction of the myocardium. *N Engl J Med* 340:966-967.

- Jongbloed MR, Mahtab EA, Blom NA, Schalijs MJ, Gittenberger-de Groot AC. 2008. Development of the cardiac conduction system and the possible relation to predilection sites of arrhythmogenesis. *TheScientificWorldJournal* 8:239-269.
- Jongsma HJ, Wilders R. 2000. Gap junctions in cardiovascular disease. *Circ Res* 86:1193-1197.
- Kamino K. 1991. Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development. *Physiol Rev* 71:53-91.
- Kang YJ. 2006. Cardiac hypertrophy: a risk factor for QT-prolongation and cardiac sudden death. *Toxicologic pathology* 34:58-66.
- Kapoor N, Liang W, Marban E, Cho HC. 2013. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. *Nat Biotech* 31:54-62.
- Kondo RP, Anderson RH, Kupersmidt S, Roden DM, Evans SM. 2003. Development of the cardiac conduction system as delineated by minK-lacZ. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14:383-391.
- Kreuzberg MM, Sohl G, Kim JS, Verselis VK, Willecke K, Bukauskas FF. 2005. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ Res* 96:1169-1177.
- Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, Buck CA, Labow MA. 1995. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* 121:489-503.
- Leaf DE, Feig JE, Vasquez C, Riva PL, Yu C, Lader JM, Kontogeorgis A, Baron EL, Peters NS, Fisher EA, Gutstein DE, Morley GE. 2008. Connexin40 imparts conduction heterogeneity to atrial tissue. *Circ Res* 103:1001-1008.
- Lindsey SE, Butcher JT, Yalcin HC. 2014. Mechanical regulation of cardiac development. *Frontiers in Physiology* 5:318.
- McCabe CF, Gourdie RG, Thompson RP, Cole GJ. 1995. Developmentally regulated neural protein EAP-300 is expressed by myocardium and cardiac neural crest during chick embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 203:51-60.
- Meyer D, Birchmeier C. 1995. Multiple essential function of neuregulin in development. *Nature* 378:386-390.
- Miquerol L, Dupays L, Theveniau-Ruissy M, Alcolea S, Jarry-Guichard T, Abran P, Gros D. 2003. Gap junctional connexins in the developing mouse cardiac conduction system. *Novartis Found Symp* 250:80-98; discussion 98-109, 276-109.
- Miquerol L, Moreno-Rascon N, Beyer S, Dupays L, Meilhac SM, Buckingham ME, Franco D, Kelly RG. 2010. Biphasic Development of the Mammalian Ventricular Conduction System. *Circulation Research* 107:153-161.
- Nanka O, Krizova P, Fikrle M, Tuma M, Blaha M, Grim M, Sedmera D. 2008. Abnormal Myocardial and Coronary Vasculature Development in Experimental Hypoxia. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 291:1187-1199.
- Nishii K, Kumai M, Egashira K, Miwa T, Hashizume K, Miyano Y, Shibata Y. 2003. Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect. *Cell communication & adhesion* 10:365-369.
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z. 1996. Teratogenic and lethal effects of long-term hyperthermia and hypothermia in the chick embryo. *Reproductive Toxicology* 10:327-332.

- Poelmann RE, Van der Heiden K, Gittenberger-de Groot A, Hierck BP. 2008. Deciphering the Endothelial Shear Stress Sensor. *Circulation* 117:1124-1126.
- Polontchouk L, Haefliger JA, Ebel B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER, Dhein S. 2001. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 38:883-891.
- Reckova M, Rosengarten C, deAlmeida A, Stanley CP, Wessels A, Gourdie RG, Thompson RP, Sedmera D. 2003. Hemodynamic is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system. *Circ Res* 93:77-85.
- Rentschler S, Jay PY. 2014. A spin on cardiac conduction and rhythm from developmental biology and human genetics. *Newsletter of the cardiac bioelectricity and arrhythmia center (CBAC)* 8:1-12.
- Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE, Janife J, Fishmann GI. 2001. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development* 128:1785-1792.
- Rentschler S, Zander J, Meyers K, France D, Levine R, Porter G, Rivkees SA, Morley GE, Fishmann GI. 2002. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10464-10469.
- Rothenberg F, Nikolski VP, Watanabe M, Efimov IR. 2005. Electrophysiology and anatomy of embryonic rabbit hearts before and after septation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 288:H344-H351.
- Ryu S, Yamamoto S, Andersen CR, Nakazawa K, Miyake F, James TN. 2009. Intramural Purkinje Cell Network of Sheep Ventricles as the Terminal Pathway of Conduction System. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 292:12-22.
- Sedmera D, Harris BS, Grant E, Zhang N, Jourdan J, Kurkova D, Gourdie RG. 2008. Cardiac expression patterns of endothelin-converting enzyme (ECE): implications for conduction system development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237:1746-1753.
- Sedmera D, Pexieder T, Rychterova V, Hu N, Clark EB. 1999. Remodeling of chick embryonic ventricular myoarchitecture under experimentally changed loading conditions. *The Anatomical Record* 254:238-252.
- Sedmera D, Reckova M, Bigelow MR, Dealmeida A, Stanley CP, Mikawa T, Gourdie RG, Thompson RP. 2004. Developmental transitions in electrical activation patterns in chick embryonic heart. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 280A:1001-1009.
- Sedmera D, Reckova M, Rosengarten C, Torres MI, Gourdie RG, Thompson RP. 2005. Optical Mapping of Electrical Activation in the Developing Heart. *Microsc Microanal* 11:209-215.
- Schroder EA, Tobita K, Tinney JP, Foldes JK, Keller BB. 2002. Microtubule Involvement in the Adaptation to Altered Mechanical Load in Developing Chick Myocardium. *Circulation Research* 91:353-359.
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G, Gabbarini F, Goulene K, Insolia R, Mannarino S, Mosca F, Nespoli L, Rimini A, Rosati E, Salice P, Spazzolini C. 2009. Prevalence of the Congenital Long-QT Syndrome. *Circulation* 120:1761-1767.
- Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. 1998. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol* 8:295-298.

- Tamaddon HS, Vaidya D, Simon AM, Paul DL, Jalife J, Morley GE. 2000. High-resolution optical mapping of the right bundle branch in connexin40 knockout mice reveals slow conduction in the specialized conduction system. *Circ Res* 87:929-936.
- Thompson RP, Reckova M, DeAlmeida A, al. e. 2003. *The oldest, toughest cells in the heart*. Chichester (England): Wiley.
- Vaidya D, Tamaddon HS, Lo CW, Taffet SM, Delmar M, Morley GE, Jalife J. 2001. Null mutation of connexin43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development. *Circ Res* 88:1196-1202.
- van Rijen HV, van Veen TA, van Kempen MJ, Wilms-Schopman FJ, Potse M, Krueger O, Willecke K, Opthof T, Jongsma HJ, de Bakker JM. 2001. Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation* 103:1591-1598.
- van Wijk B, van den Hoff M. 2010. Epicardium and myocardium originate from a common cardiogenic precursor pool. *Trends in cardiovascular medicine* 20:1-7.
- Vanderbrink BA, Sellitto C, Saba S, Link MS, Zhu W, Homoud MK, Estes NAM, Paul DL, Wang PJ. 2000. Connexin40-deficient mice exhibit atrioventricular nodal and infra-Hisian conduction abnormalities. *J Cardiovasc Electr* 11:1270-1276.
- Vostarek F, Sankova B, Sedmera D. 2014. Studying dynamic events in the developing myocardium. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 115:261-269.
- Vostarek F, Svatunkova J, Sedmera D. 2016. Acute Temperature Effects on Function of the Chick Embryonic Heart. *Acta physiologica* (Oxford, England).
- Webster WS, Abela D. 2007. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 81:215-228.
- Wessels A, Sedmera D. 2003. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiological Genomics* 15:165-176.
- Wessels A, Vermeulen JL, Verbeek FJ, Viragh S, Kalman F, Lamers WH, Moorman AF. 1992. Spatial distribution of "tissue-specific" antigens in the developing human heart and skeletal muscle. III. An immunohistochemical analysis of the distribution of the neural tissue antigen G1N2 in the embryonic heart; implications for the development of the atrioventricular conduction system. *Anat Rec* 232:97-111.
- Wikenheiser J, Doughman YQ, Fisher SA, Watanabe M. 2006. Differential levels of tissue hypoxia in the developing chicken heart. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235:115-123.
- Yang YQ, Zhang XL, Wang XH, Tan HW, Shi HF, Jiang WF, Fang WY, Liu X. 2010. Connexin40 nonsense mutation in familial atrial fibrillation. *Int J Mol Med* 26:605-610.