

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Mechanismy vývoje převodního systému srdečního u obratlovců

Mgr. Barbora Šaňková

2016

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Vývojová a buněčná biologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Jan Černý, PhD.

Školící pracoviště:

- Laboratoř Molekulární embryogeneze, Anatomický ústav, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
- Laboratoř Kardiovaskulární morfogeneze, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Školitel: Prof. MUDr. David Sedmera, DSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah:

Abstrakt .....	3
1. Úvod.....	5
2. Hypotézy a cíle práce.....	8
3. Materiál a metodika.....	9
4. Komentáře k publikacím.....	11
4.1. Vliv mechanické zátěže na časný vývoj převodního systému u kuřete.....	11
4.2. Normální vývoj komorového převodního systému a vliv absence Cx40 na vedení vzruchu v komorách.....	13
4.3. Význam Cx40 pro vedení elektrického vzruchu v předsíních během vývoje.....	15
4.4. Funkční inhibice proteinu KvLQT1 draslíkových kanálů a vliv na funkci komorového převodního systému.....	16
5. Závěry.....	19
6. Použitá literatura.....	21
7. Seznam publikovaných prací autorky.....	23
8. Životopis.....	24

## 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 pojítkem 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 předsíní při absenci Cx40 je od 12. embryonálního dne iniciována u většiny srdcí z ektopického místa v oušku pravé předsíně a dochází u takto aktivovaných předsíní k výraznému prodloužení aktivačního času. Rychlost vedení vzruchu je podmíněna Cx40 genotypem pouze v předsíních na rozdíl od komor, nejdelší čas nezbytný pro aktivaci předsíní 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.

## 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 12<sup>th</sup> 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.

## 1. Úvod

Převodní systém u dospělého jedince 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.

Jednotlivé části převodního systému u teplokrevných obratlovců jsou během vývoje postupně funkčně zapojeny v pořadí korelujícím s morfogenetickým vývojem. Z primitivního trubcovitého srdce se postupně stává čtyřduťový 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 směřuje od vtokové části 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 předsíně a komory, se zvýší rychlost proliferace, dojde k expresi genů jako je Cx40 nebo specifických sodíkových kanálů a rychlost vedení vzruchu se zvýší. Rychle vedoucí oblasti jsou ohraničeny místy, 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 dosud nalezena u ED9,5 embryí myši (Rentschler et al., 2001; Rentschler et al., 2002) ani králíka (Rothenberg et al., 2005). Pomalu vedoucí segmenty srdeční kličky odpovídají přechodovým zónám. Tenké dorzoventrálně uspořádané výběžky myokardu směrem do lumen srdce, trabekuly, jsou identifikovatelné u srdce ve stádiu srdeční kličky. Při optickém mapování povrchu endokardu, kterému předcházelo rozstřížení komor srdce u kuřecích embryí, bylo prokázáno preferenční radiální vedení vzruchu trabekulami (Reckova et al., 2003).

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 od apexu k bázi. Zralá aktivační sekvence je mimo jiné podmíněna elektrickou izolací předsíní 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 (**publikace 2**). V období změny aktivačního způsobu od báze k apexu se i u kuřete objevuje tento dočasný způsob aktivace (**publikace 1**).

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 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 myší linie na Cx40:GFP pozadí (**publikace 4**). Správné interpretaci funkční analýzy za použití optického mapování u takových myších linií předchází popis Cx40 heterozygotů, kde je situace srovnatelná s normálními kontrolami typu „wild type“ (**publikace 2**).

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 signifikantně souvisí se změnami při vzniku a šíření elektrického vzruchu převodním systémem srdečním.

Myocyty jsou vzájemně propojeny tak, že si mohou vyměňovat ionty, metabolity a signální molekuly pomocí mezibuněčných spojení typu gap junctions. Takto propojené myocyty mají nízký elektrický odpor a tvoří jeden funkční celek - syncytium, které umožňuje rychlé a koordinované šíření elektrického vzruchu. V myokardu se nachází tyto hlavní konexiny: Cx40, Cx43, Cx45 a Cx30,2 (srhnuto v (Jongbloed et al., 2008)). Arytmie mohou být způsobeny nejen změnami v iontových kanálech primárně určených pro excitaci (**publikace 4**), ale také defekty v mezibuněčné komunikaci pomocí gap junctions kanálů (**publikace 2, 3**).

Arytmie vznikají z mnoha důvodů a mezi hlavní patří kongenitální onemocnění srdce, genetické mutace, stárnutí a vlivy prostředí. Místa vzniku arytmií nejsou v srdeční tkáni lokalizována zcela náhodně. 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). Existuje stále mnoho neobjasněných otázek týkajících se vlivu epigenetických faktorů na vývoj převodního

systemu. Jednou z příčin vrozených kardiovaskulárních malformací jsou abnormality v toku krve a hemodynamiky, jejich změny představují silný stimul pro vývoj převodního systému.



## 2. Hypotézy a cíle práce

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 předsíní a komorového převodního systému, vliv na funkčnost převodního systému a na rychle vedoucí tkáň předsíní. Předpokládáme, že Cx 40 bude nezbytný během vývoje a že dojde ke zpomalení 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.

### Specifické 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 předsíních
- U transgenní linie myši  $\alpha$ -MHC-KvLQT1-iso2-T7, s fenotypem shodným se syndromem dlouhého QT intervalu, zhodnotit funkci komorového převodního systému

### 3. Materiál a metodika

#### Materiál

Kuřecí embrya stádií ED3 až ED5 (plemeno Leghorn)

Myší embrya transgenní myší linie Cx40:GFP stádií ED9,5 - 18,5

Myší embrya modelového organismu syndromu dlouhého QT intervalu ( $\alpha$  - MHC - KvLQT1 - iso2 - T7), stádia ED14,5 a ED18,5

Dospělci  $\alpha$  - MHC - KvLQT1 - iso2 - T7

#### Metody

##### Optické mapování

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

Princip metody 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).

Získaná data jsou po zhodnocení v programu BV\_ ANA (Brainvision) interpretována v časo - prostorových epikardiálních aktivačních mapách. Hodnocené parametry jsou první aktivované místo, směr šíření vzruchu a čas nezbytný pro aktivaci levé komory (obou předsíní - publikace 3), syntézou těchto parametrů byl stanoven způsob aktivace, který vypovídá o míře zralosti převodního systému srdečního. Frekvence četností jednotlivých způsobů aktivace byla statisticky hodnocena Pearsonovým testem dobré shody ( $\chi^2$ ). Nepárový

Studentův t - test byl použit při hodnocení statistické významnosti u komorových aktivačních časů. Kritériem pro evaluaci rychlosti šíření vzruchu byl stanoven čas nezbytný pro aktivaci levé komory, kde lze snadno stanovit hranici na rozdíl od pravé komory s nejasně definovaným přechodem komory ve výtokovou část, pro kterou je charakteristická relativně malá rychlost vedení elektrického vzruchu.

### **Orgánové kultury**

Během experimentů, které jsou podkladem první publikaci, byla izolovaná kuřecí srdce kultivována *in vitro* po 24 hodin v DMEM médiu a následně hodnocena funkce převodního systému optickým mapováním. V sérii „záchranných“ experimentů byla do komory srdce vpíchnuta kapka silikonového oleje a vyvolána mechanická pracovní zátěž.

### **Morfologická analýza**

Data z optického mapování byla korelována s morfologií za použití klasických imunohistochemických metod a „whole mount“ konfokální mikroskopie.

## 4. 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.

### 4.1. 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 trubcovitého srdce ve čtyřduřinový 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 signalizační 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.

#### **4.2. 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 prsteneček; 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 impulzu v rozmezí ED9,5 - 11,5 je charakteristické tím, že je využit primární interventrikulární prstenec, 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. V tomto případě je první aktivované místo na apexu levé komory a v okamžiku, kdy elektrický impulz 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 impulzu 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 transgenních myši 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 myši 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.

#### **4.3. Význam Cx40 pro vedení elektrického vzruchu v předsíních 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 předsíních a komorách od časných fází embryogeneze. Jak embryogeneze pokračuje exprese Cx40 v předsíních se nemění, na rozdíl od komor. Nicméně funkční význam Cx40 během vývoje převodního systému se zaměřením na předsíně 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 předsíní. Ouška předsíní u ED14,5 jsou relativně velká, prodlužují se směrem dopředu a to neumožňuje umístění celé plochy předsíní do jedné roviny a tak se komplikuje interpretaci získaných dat. Orientace srdcí při optickém mapování předsíní 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 předsíně i komory současně. V důsledku tohoto faktu jsme se v další samostatné práci zaměřili na vliv absence Cx40 na vedení vzruchu v předsíních.

V ED10,5; ED12,5 a ED14,5 bylo zaznamenáno různorodé vedení rychlosti vzruchu předsíněmi v závislosti na Cx40 genotypu. Vliv nedostatku Cx40 se projevil prodloužením aktivačního času předsíní, 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 předsíních 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 morfologicky lokalizovat.

Chybějící Cx40 během vývoje ovlivňuje aktivační sekvence šíření vzruchu v předsíních a výrazně zpomaluje rychlost šíření elektrického vzruchu předsíněmi. 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 předsíní a další studium této problematiky rozšíří představu o molekulárním mechanismu rozvoje supraventrikulárních arytmí.

#### **4.4. 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  $\alpha$  - MHC - KvLQT1 - iso2 - T7, modelovém organizmu 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 dávana 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  $\alpha$  - 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  $\alpha$  - 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 zpomaleno 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.

## 5. 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 předsíních

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 předsíní aktivována z ektopického místa lokalizovaném v pravém oušku.

Rychlost šíření vzruchu v předsíních 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 $\alpha$ -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 zpomalené vedení spontánního vzruchu komorovým převodním systémem.

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

## 6. Použitá literatura

- Aiba T, Tomaselli GF. 2010. Electrical remodeling in the failing heart. *Current opinion in cardiology* 25:29-36.
- 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.
- Efimov IR, Nikolski VP, Salama G. 2004. Optical Imaging of the Heart. *Circulation Research* 95:21-33.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jongbloed MR, Mahtab EA, Blom NA, Schlij 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.
- 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.
- 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.

- 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, 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, 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, Nespole 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.
- 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.

## 7. Seznam publikovaných prací autorky:

### 1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

- 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, **IF 3,84**
- 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, **IF 5,94**
- 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, **IF 3,17**
- 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 , **IF 5,94**

### 2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

- Vostarek F, Sankova B, Sedmera D. 2014. **Studying dynamic events in the developing myocardium.** Prog Biophys Mol Biol. 2014 Aug;115(2 - 3):261 - 9, Review, **IF 2,74**
- Haque A, Šaňková B, Kvasilová A., Krejčí E., SEDMERA D. 2014. **Does Folic Acid Supplementation Rescue Defects in ECE - 1 - Deficient Mouse Embryos?** Folia Biologica (Praha) 2014;60(5): 244 - 251, **IF 1**



## 8. Životopis

### CV

---

*Mgr. Barbora Šaňková*

#### • ODBORNÉ VZDĚLÁNÍ

- 1998 – 2001** Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta  
Bakalářský studijní program se specializací - Příprava na magisterské studium biologických oborů  
Téma bakalářské práce: Kryprosporidiové infekce u psů  
Realizace bakalářské práce v laboratoři oportunních parazitóz, Parazitologický ústav AVČR  
Školitel: RNDr. Oleg Ditrich, CSc.
- 2001 – 2002** Roční studijní a pracovní pobyt v Austrálii, International Colledge of Queensland
- 2002 – 2005** Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta  
Magisterský studijní program se specializací na obor - Parazitologie a učitelství biologie  
Téma magisterské práce: Mikrosporidiové infekce ve vodním prostředí  
Realizace magisterské práce v laboratořích oportunních parazitóz a molekulární taxonomie, Parazitologický ústav AVČR  
Školitel: RNDr. Oleg Ditrich, CSc., Prof. RNDr. Jiří Vávra DrSc.
- 2004** Zahraniční výměnný studijní pobyt, BRAVO program, Tucson, Arizona, USA  
Řešená problematika: *Giardia intestinalis* u psů v Arizoně, délka pobytu 3 měsíce  
Charles Sterling, vedoucí BRAVO projektu, University of Arizona
- od 2007** PGS studium, obor vývojová biologie na 1LF UK  
Téma projektu - Mechanismy vývoje převodního systému srdečního u obratlovců
- 2008.....**Zahraniční stáž, laboratoř Heart and Skeletal Muscle Development, IBDM, Marseille, Francie
- 2010** Přerušení studia, 1 semestr

#### • ZAMĚSTNANÍ

- 2005 – 2007** Klinické Laboratoře Střešovice s.r.o., oddělení Molekulární biologie a parazitologie, VŠ parazitolog
- 2007 až dosud** částečný pracovní úvazek, pozice asistent na Anatomickém ústavu 1LF UK
- 2007-2010** částečný pracovní úvazek, pracovník ve výzkumu, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i
- 2010 až dosud** částečný pracovní úvazek, pracovník ve výzkumu, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., laboratoř Kardiiovaskulární morfogeneze
- 2010 – 2012** mateřská dovolená, rodičovská dovolená
- 2013 – 2016** mateřská dovolená, rodičovská dovolená