

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Vývojové mechanismy arytmií – úloha konexinů v arytmogenezi

MUDr. Jiří Beneš, Jr.

Praha 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Vývojová biologie

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

Školící pracoviště: Anatomický ústav, 1.LF UK

Školitel: prof. MUDr. David Sedmera, DSc.

Konzultant (byl-li):

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.

Abstrakt:

Cíle: Hlavním cílem této práce je prohloubení znalostí o vlastnostech konexinů při arytmogenezi. Práce se zabývá hlavně rolí konexinu 40 (Cx40) při embryonálním vývoji srdce u myši a změnami v distribuci konexinu 43 (Cx43) při objemovém srdečním selhání u potkanů.

Metody: Vliv Cx40 na vývoj srdce byl studován na transgenním kmenu myši GFP:Cx40 s použitím metody optického mapování. Oběhové selhání bylo zkoumáno na potkanech s provedeným aortokaválním zkratem. Morfologické změny v srdcích byly zkoumány na histologických řezech za použití imunofluorescenčních metod.

Výsledky: V síních je Cx40 během vývoje nutný zejména v počátečních fázích, od 12,5 embryonálního dne postupně zastupuje jeho funkci Cx43. Absence Cx40 vede ke zpomalení vedení a ke vzniku ektopických pacemakerů. V komorách vede absence Cx40 v převodním systému k insuficienci vedení přes pravé Tawarovo raménko a dochází postupně k blokádě. U potkanů s oběhovým srdečním selháním byla prokázána excentrická hypertrofie (definovaná jak makroskopicky tak mikroskopicky) bez přítomnosti výraznější fibrózy. Hlavní potenciální arytmogenní změnou je snížení množství a defosforylace Cx43.

Shrnutí: Práce komplexně popisuje vliv absence Cx40 na vývoj převodního systému srdečního během kardiogeneze a morfologicky hodnotí dopad oběhového přetížení na myokard komor a na vznik potencionálního arytmogenního substrátu.

Klíčová slova: *connexin40*, *connexin43*, optické mapování, hypertrofie srdce, srdeční selhání, arytmogeneze, myš, potkan

Abstract:

Objective: The aim of this study is an improvement of our knowledge concerning the role of connexins in arrhythmogenesis. The main focus is on the role of *connexin40* (Cx40) in heart development in mice and changes in *connexin43* expression in volume overload heart failure rat model.

Methods: The influence of Cx40 on heart development was studied on transgenic mouse Cx40:GFP model using the method of optical mapping. Volume overload heart failure was examined in the rats with aortocaval shunt. Morphological changes in hearts were examined using immunofluorescence microscopical techniques.

Results: In the atria, Cx40 is important especially during the early stages. Cx43 can partially substitute its function from 12.5 embryonic day on. Cx40 deficiency leads to decreased conduction velocity and ectopic sites of activation. Absence of Cx40 in ventricular conduction system leads to the development of right bundle branch block. Volume overload in rats leads to eccentric hypertrophy and later to heart failure. We described morphological as well as microscopical changes in failing hearts. Without the presence of fibrosis, the main arrhythmogenic substrate we found was reduced amount of Cx43 and its dephosphorylation.

Conclusions: This study describes in detail the impact of Cx40 deficiency on the development of cardiac conduction system during cardiogenesis and evaluates the changes during volume overload heart failure that can function as arrhythmogenic substrate.

Key words: *connexin40*, *connexin43*, optical mapping, cardiac hypertrophy, heart failure, arrhythmogenesis, mouse, rat

Obsah

Abstrakt	3
Obsah	4
1. Úvod	6
1.1 Hypotézy	6
2. Přehled problematiky disertační práce	7
2.1 Funkční anatomie převodního systému srdečního	7
2.1.1 Sinoatriální uzel	7
2.1.2 Atrioventrikulární uzel a komorový převodní systém	7
2.1.3 Historické souvislosti objevu převodního systému srdečního	8
2.1.4 Vývoj převodního systému	8
2.2 Konexiny	8
2.2.1 Cx43	9
2.2.2 Cx40	11
2.2.3 Cx45	11
2.2.4 Cx30	11
2.2.5 Cx30.2	12
2.2.6 Konexiny v myokardu a jejich role v arytmogenezi	12
2.3 Základní patofyziologie srdečního selhání	13
2.3.1 Změny konexinů při srdečním selhání	13
3 Metodika	15
3.1 Zvířata	15
3.2.1 Myši Cx40:GFP	15
3.2.2 Potkani s objemovým srdečním selháním	15
3.2.3 Aortokavální zkrat	15
3.2 Optické mapování	16
3.3 Mikroskopické metody	16
3.4 Analýza dat	16
4. Výsledky I. - Vliv deficitu Cx40 na aktivaci síní a komor během embryonálního vývoje u myši	18
4.1 Aktivace síní a porovnání vlivu deficitu Cx40 ve stádiu 12,5ED	18
4.1.1 Druhy aktivace 12,5ED	18
4.1.2 Frekvence síní 12,5ED	18
4.1.3 Zhodnocení situace na stádiu 14,5ED	18
4.1.4 Pátrání po místu ektopické aktivity	19
4.1.5 Shrnutí	19
4.2 Normální vývoj komorového převodního systému u myši	19
4.2.1 Vedení v časných fázích vývoje	19
4.2.2 Vedení v pozdějších fázích vývoje	19
4.3 Vliv deficitu Cx40 na vývoj převodního systému u myši	20
4.3.1 Funkce levého Tawarova raménka během vývoje	20
4.3.2 Funkce pravého Tawarova raménka během vývoje	20
4.3.3 Doba aktivace komor	20
4.3.4 Shrnutí	20

5. Výsledky II. - Arytmogenní substrát a morfologické změny u potkaního modelu objemového srdečního selhání	22
5.1 Makroskopické a mikroskopické morfologické změny	22
5.2 Arytmogenní substrát v myokardu selhávajících komor	22
6. Závěry a diskuze	24
6.1 Vliv Cx40 na šíření vzruchu v síních	24
6.1.1. Rychlost vedení vzruchu	24
6.2.2 Ektopická místa aktivace	24
6.2.3 Doba aktivace síní z ektopického místa	25
6.2 Vliv Cx40 na vývoj funkce komorového převodního systému	25
6.2.1 Blokáda pravého raménka Tawarova	25
6.2.2 Snížení funkce levého raménka Tawarova ve 14,5ED	25
6.3 Arytmogenní substrát při objemovém srdečním selhání	26
7. Literatura	27
8. Seznam publikací autora a jeho podíl na nich	34

1. Úvod

Srdeční choroby jsou v rozvinutých zemích stále nejčastější příčinou mortality populace. Arytmie k této úmrtnosti nemalou měrou přispívají, mají však též druhý aspekt. Maligní arytmie jsou nejčastější příčinou náhlé srdeční smrti, která často nastává u mladých a dříve zdravých jedinců (často s neodhalenou genetickou či morfologickou vadou). Hluboké a komplexní pochopení mechanismů arytmiogeneze je klíčové pro diagnostiku, prevenci a terapii takovýchto arytmí.

Ve své práci jsem se snažil prohloubit znalosti lékařské vědy o vlastnosti a potenciální roli konexinů v arytmiogenezi na zvířecích modelech a o jejich vliv na embryonální vývoj srdce.

Ve své práci jsem používal dva zvířecí modely. Prvním byly geneticky upravené myši s deficitem Cx40, u nichž jsem zkoumal dopad této absence na vznik a šíření vzruchu v komorách a v síních během embryogeneze pomocí speciální elektrofyziologické metody optického mapování. Druhým modelem byli potkani, kterým byla operativně vytvořena komunikace mezi břišní aortou a dolní dutou žilou, čímž vznikl arteriovenózní zkrat, objemové přetížení a postupné rozvinutí srdečního selhávání a posléze selhání. Na tomto modelu jsem jednak popsal morfologii změn při vznikajícím srdečním selhání a pak jsem se zaměřil na možné faktory, které u těchto potkanů mohou vyvolávat (často maligní) arytmie.

1.1 Hypotézy

1.) Cx40 je hlavním konexinem v síních a předpokládal jsem tedy největší dopad jeho deficitu na šíření vzruchu právě zde.

2.) Je také nejrychleji vedoucím konexinem (viz. 2.2), dá se tedy předpokládat, že hlavním dopadem bude zpomalení vedení vzruchu. V pozdějších fázích vývoje se vyskytuje též v raménkách převodního systému, kde lze tedy očekávat změny ve vedení.

3.) Při objemovém srdečním selhání u potkanů jsem předpokládal vznik excentrické hypertrofie komor, jak byla popsána v literatuře, a v takto změněném myokardu se dá předpokládat řada patologických změn. Zaměřil jsem se na hlavní mechanismy, které by za tohoto stavu mohly být přítomny a mohly by vést ke vzniku arytmí. Předpokládal jsem změny zejména v distribuci „gap junctions“ v myokardu a jejich lokalizace na kardiomyocytu, změny fosforylace Cx43 a jeho množství.

2. Přehled problematiky disertační práce

Tato kapitola nabízí teoretický základ k mé práci. Zabývá se anatomii převodního systému srdečního, mikroanatomii buněčných spojení typu „gap junctions“, obecnými patofyziologickými mechanismy vzniku arytmii a mechanismy srdečního selhání.

2.1 Funkční anatomie převodního systému srdečního

Srdce vyšších obratlovců má vyvinutý vlastní autonomní systém tvorby a šíření elektrických impulzů svalovinou a vegetativní nervový systém srdeční činnost pouze moduluje.

Převodní systém srdeční tvoří sinoatriální (SA) uzel, atrioventrikulární (AV) uzel, Hisův atrioventrikulární svazek, Tawarova raménka a Purkyňova vlákna. Největší pozornost v této kapitole věnuji SA uzlu, neboť má pro mou práci největší význam.

2.1.1 Sinoatriální uzel

Místo, v němž činnost srdeční vzniká, se nazývá „pacemaker“, a fyziologicky ho představuje SA uzel. Je to anatomicky relativně složitá struktura tvaru dlouhé slzy, u které můžeme popsat hlavu, která se nachází ve stěně pravé síně subendokardiálně v oblasti ústí horní duté žíly. a ocas, který se táhne dále do *crista terminalis* (Anderson, 1979). V uzlu rozeznáváme centrální a periferní oblasti, které se od sebe liší skladbou „gap junctions“, iontových kanálů a tedy i elektrofyziologickými vodivými vlastnostmi (Lei et al., 2007). Pro funkci uzlu je též důležitá okrajová oblast přechodu tkáň SA uzlu do myokardu síně, která je typicky prstovitě uspořádaná. Předpokládá se, že toto uspořádání hraje důležitou roli při šíření vzruchu (Liu et al., 2007).

Pacemakerová aktivita je umožněna díky souhře několika specifických iontových kanálů na membráně buněk SA uzlu. Patří mezi ně sodíkový kanál SCN5A a kalciové kanály RYR2 a CASQ2 (Park and Fishman, 2011). Pro automaticitu je nejdůležitějším iontovým kanálem Na^+/K^+ kanál HCN4 (Accili et al., 2002). Tento kanál vytváří tzv. „funny current“, otevírá se totiž netradičně během hyperpolarizace membrány, čímž vyvolá opět depolarizaci a celý proces začne znovu – je tedy zodpovědný za automaticitu vzniku vzruchu v srdci. Je tedy dobrým molekulárním markrem pacemakerové aktivity (Moosmang et al., 2001).

Z dalších významných molekul přítomných v SA uzlu je třeba zmínit gap junction proteiny Cx45 a Cx30,2 (viz. 2.2.4) (Gros et al., 2004).

Přítomnost HCN4 mRNA je v buňkách vznikajícího myšního myokardu detekovatelná již velmi záhy – od 7,5ED; osmý den je patrná distribuce symetricky v kaudálních částech srdeční trubice a postupně dochází k asymetrické lokalizaci do oblasti SA uzlu v pravé síni (Garcia-Frigola et al., 2003). Kromě oblasti SA uzlu můžeme kanály HCN4 vidět též v oblasti ústí pulmonálních žil, což jistě stojí za všimnutí, zejména vzhledem k častému původu fibrilace síní právě v této oblasti. Embryonální mechanismy podmiňující vznik SA uzlu jsou z velké části stále neznámé. Nicméně je známo, že důležitou roli při vývoji SA uzlu hraje transkripční faktor Tbx3 (Hoogaars et al. 2007), transkripční faktor Pitx2 (zodpovědný za pravo/levou orientaci těla) (Ammirabile et al., 2011) a transkripční faktor Nkx2-5 (Mommersteeg et al., 2007).

2.1.2 Atrioventrikulární uzel a komorový převodní systém

Z SA uzlu se šíří vzruch síněmi až do oblasti atrioventrikulárního (AV) uzlu, který leží před ústím sinus coronarius do pravé síně. V tomto místě je vzruch výrazně zpomalen, aby měly komory během své diastoly dostatek času na naplnění (také reguluje eventuální přenos rychle následujících impulsů při patologii síní). Myokard síní a komor je totiž v tomto místě elektricky izolován fibrózní tkání srdečního skeletu (zejména fibrózními prstenci cípatých chlopní) a Hisův svazek, což je struktura tvořená speciálně přeměněnými kardiomyocyty pokračující z AV uzlu, je (fyziologicky) jediným místem jejich komunikace (Kolditz et al., 2007).

Hisův svazek se záhy rozdělí na dvě Tawarova raménka – menší a tenčí pravé raménko a na široké levé. Raménka se posléze větví v trabekulách komor na Purkyňova vlákna. Vlákna převodního systému se nacházejí převážně subendokardiálně (v části myokardu sousedícím s intraluminální výstelkou srdce).

2.1.3 Historické souvislosti objevu převodního systému srdečního

Převodní systém srdeční byl objeven ve zcela opačném pořadí, než v jakém funguje (Eliška, 2006).

Jako první byla morfologicky popsána vlákna v komorách ovcí J. E. Purkyněm v roce 1845. Purkyně tato vlákna zpočátku považoval za chrupavčitou tkáň, což později zavrhl (Purkyně, 1845). Až po několika letech, v roce 1852, popsal funkci těchto vláken švýcarský fyziolog Rudolf Kölliker a nazval je Purkyňova vlákna.

Druhou objevenou částí převodního systému byl svazek mezi síněmi a komorami, který objevil internista Wilhelm His Jr. v roce 1893. Na něj navazoval objev AV uzlu, který publikoval ve své knize Sunao Tawara (Tawara, 1906).

Posledním objeveným prvkem byl potom SA uzel objevený až o rok později Keithem a Flackem (Keith and Flack, 1907).

2.1.4 Vývoj převodního systému

Původ buněk převodního systému byl dlouhou dobu předmětem bádání. Původně se předpokládalo, že vznikají z buněk neurální lišty (Gorza et al., 1988), později se však pomocí retrovirových studií potvrdilo, že progenitory buněk převodního systému pocházejí ze základů embryonálního srdce (Gourdie et al., 1995).

Studie zabývající se vývojem převodního systému srdečního byly prováděny zejména na kuřatech a na potkanech. U obou druhů je v zásadních bodech vývoj převodního systému podobný. Na počátku vývoje srdce je vytvořena primitivní trubice, ve které se šíří vzruch pomalu izotropicky od venózního konce k arteriálnímu, zatím bez přispění převodního systému (Kamino et al., 1991). Později dochází k zakroucení srdeční trubice a v tomto stádiu srdeční kličky, kdy dochází stále k šíření signálu jednoduše od počátku ke konci, můžeme již rozlišit rychleji a pomaleji vedoucí oblasti (Arguello et al., 1986). Významným krokem ve vývoji vedení vzruchu je trabekularizace myokardu. V trabekulách dochází k rychlejšímu vedení a vytváří se zde podklad pro pozdější His-Purkyňův systém (Reckova et al., 2003; Sedmera et al., 1998). Později se začíná vytvářet mezikomorové septum a když je septace dokončena, definitivně se mění aktivace z dřívější „od baze k hrotu“ na konečnou aktivaci „od hrotu k bazi“, která je úzce spjata s vytvořením Tawarových ramének (Chuck et al., 1997). Před dokončením septace komor probíhá aktivace z podkovovité struktury zvané primární prstenec („primary interventricular ring“ - PIR), kterou tvoří tkáň po obvodu atrioventrikulárního kanálu (Wessels et al., 1992; Sankova et al., 2012).

2.2 Konexiny

Konexiny jsou transmembránové proteiny tvořené čtyřmi transmembránovými α -šroubovicemi, dvěma extracelulárními kličkami (které tvoří základ pozdějšího mezibuněčného spoje), jednou intracelulární kličkou a dvěma konci; C-terminální konec je různě dlouhý a určuje jednotlivé druhy konexinů (Unger et al., 1999). V lidském genomu bylo identifikováno 21 konexinových genů, u myši pak pouze 20 (Sohl et al., 2004). Jejich označení je odvozeno od molekulové hmotnosti a každý konexin má jinou distribuci v buňkách organismu a jiné biofyzikální vlastnosti (Willecke et al., 2002). Jednotlivé konexiny polymerizují do hexamerní struktury, které se říká

konexon. Ten je pak samotným buněčným kanálem (vlastně polovičním, neboli hemi-kanálem, jdoucím pouze přes jednu buněčnou membránu) (Goodenough et al., 1996).

Hlavní úlohou konexinů je mezibuněčná komunikace. Jsou součástí buněčných spojení typu „gap junctions“, které spojují dvě přilehlé buněčné membrány (Herve et al., 2007) a umožňují prostup iontům, malým metabolitům, druhým posílům a jiným molekulám (menším než 1kDa). Konexony se navíc samostatně účastní některých procesů buněčné signalizace (Goodenough et al., 2003).

Vytváření „gap junctions“ z konexinových monomerů je považováno za složitý proces. (Musil a Goodenough, 1993, 1996). Konexiny oligomerizují do hemikanálu (konexonu) a poté jsou přesunuty na plasmatickou membránu, kde interagují s konexonem z protilehlé buňky. Během toho dochází ke shlukování kanálů do funkční organely – „gap junctions“. Celý proces je ovlivňován mnoha faktory (např. napětím, pH, fosforylací) (Saez et al., 2003).

Vzhledem k tomu, že změny v distribuci a geometrii gap junction byly pozorovány u řady lidských nemocí (ischemické choroby srdeční, hypertrofické kardiomyopatie, srdečního selhání, ale také např. u temporální epilepsie), začal se v posledních letech podrobněji zkoumat mechanismus interakce connexinů s cytoskeletem, s molekulami signální transdukce a s jinými buněčnými spojeními (Giepmans et al., 2004). Hlavní molekulou, které se v této souvislosti věnuje nejvíce pozornosti, je membránově asociovaná guanylátkinasa ZO-1 (Zonula Occludens-1), které je mimo jiné zodpovědná za polarizaci buněk (Anderson et al., 1996; Hunter et al., 2005).

V kardiomyocytech savců byla potvrzena exprese pěti konexinů – Cx30, Cx30,2, Cx40, Cx43 a Cx45 (v následujícím textu jsou seřazeny podle jejich významu pro myokard). Jejich role v šíření vzruchu srdečním svalu (a v embryonálním vývoji) byla částečně objasněna studii na transgenních myších (Gros et al., 2004; Verheule et al., 2013).

2.2.1 Cx43

Cx43 je hlavním konexinem savčích srdcí. U myši je Cx43 kódován genem *Gjal* a je exprimován všemi kardiomyocyty s výjimkou buněk většiny částí převodního systému srdečního (SA a AV uzlu, Hisova svazku a prox. částí Tawarových ramének) (Boyett et al., 2006).

Cx43 je během embryonálního vývoje u myši detekován od 13ED jak v komorách, tak v předsíních (van Kempen et al., 1991), zpočátku v malém množství a postupně je ve výrazném nadbytku (Coppens et al., 2003). Jeho význam byl prokázán zejména při vývoji výtokové části srdce (Eckardt et al., 2006).

Expresí Cx43 je potlačovaná transkripčními faktory Tbx18 (determinující SA uzel), Tbx2 a Tbx3 (podílející se na diferenciaci AV uzlu) (Bakker et al., 2008, Kappor et al., 2011).

Vztah snížení Cx43 a zvýšené náchylnosti k arytmiím byl popsán u řady srdečních patologií, například u infarktu myokardu či u srdeční hypertrofie (Saffitz et al., 1999). Mechanismus uzavření „gap junctions“ spojů (tzv. uncoupling) při srdeční ischemii pomáhá srdečnímu svalu při uzdravení (de Mello et al., 1969), což ovšem vede k častým arytmiím v období reperfúze (15-60 minut po ischemii) (Wit and Peters, 2012).

2.2.1.1 Cx43 na myších modelech

Vztah mezi expresí Cx43 a šířením impulsu myokardem byl zkoumán na geneticky modifikovaných myších.

Ztráta Cx43 v srdci během vývoje vede k srdečním abnormalitám a je neslučitelná s postnatálním životem (Eckardt et al., 2006). Cx43^{-/-} myši umírají krátce po porodu na respirační selhání způsobené obstrukcí výtokové části pravé komory (Reaume et al., 1995). Tento defekt je způsoben již záhy během embryogeneze, kdy nepřítomnost Cx43 vede k abnormální aktivaci p53, což způsobí apoptózu kmenových buněk, které by měly migrovat do srdce (Francis and Lo, 2006). U Cx43 deficientních heterozygotů (množství srdečního Cx43 bylo sníženo zhruba na polovinu) byly popsány rozporuplné výsledky. Někteří autoři uvádějí, že rychlost šíření se snížila o 23% - 44% (Eloff et al., 2001), jiní neobjevili abnormality žádné (Morley et al., 1999).

Při použití podmíněné delece Cx43 pouze v buňkách myokardu (při snížení množství Cx43 v kardiomyocytech o 95%) docházelo u myši k náhlé srdeční smrti do 2 měsíců života. U těchto srdcí bylo popsáno snížení longitudinální a transversální rychlosti šíření vzruchu o 42% a 56%. U zvířat byly pozorovány komorové arytmie (Gutstein et al, 2001).

Jiná studie použila k odstranění Cx43 myši mutanty, u nichž se Cx43 kódující sekvence odstranila po podání 4-hydroxytamoxifenu (čímž se odstranily eventuální vývojové kompenzační mechanismy hrající roli u předchozích studií). Zjistilo se, že až při snížení množství Cx43 v buňkách o 70% - 95% dojde ke snížení rychlosti vedení, zvýšení nehomogenity šíření impulsu a vyššímu výskytu arytmií (van Rijen et al, 2004).

2.2.1.2 Fosforylace Cx43

Cx43 je fosfoprotein, který může být fosforylován řadou kináz (Kwak et al., 1996) a defosforylován protein fosfatázami – např. PP1 a PP2A (Duthe et al., 2001). Nejčastější místa fosforylace jsou serinové zbytky na C-konci.

Zatímco fosforylace Cx43 může mít na kanály „gap junctions“ různé dopady (Bowling et al., 2001), defosforylace prokazatelně potlačuje mezibuněčnou komunikaci pomocí „gap junctions“ (Duthe et al., 2001). Změny ve fosforylaci Cx43 byly popsány u řady patologických stavů srdce, zejména při srdeční ischemii (Uzzaman et al., 2000; Emdad et al., 2001), ale též u stavů srdečního selhání (Ai et al., 2005; Benes Jr. et al., 2011). Zpomalení vedení v důsledku snížené fosforylace Cx43 může přispívat k arytmogenezí při těchto stavech a modulace fosforylace Cx43 je možným terapeutickým cílem při pátrání po nových antiarytmických lécích. Skupina Roberta Gourdieho popsala nedávno zpomalení patologických změn v okolí infarktové zóny po podání látky α CT1 (peptid podobný C-konci Cx43) (O'Quinn et al., 2011).

2.2.2 Cx40

U myši je Cx40 kódován genem *Gja5* a je exprimován zejména v kardiomyocytech síní myši i lidí (u potkanů nebyl v síních Cx40 objeven), v buňkách převodního systému komor a v centrálních částech AV uzlu. Cx40 se nenachází v pracovním myokardu komor dospělců ani v SA uzlu (Verheijck et al., 2001).

Hlavními transkripčními faktory, které potlačují expresi Cx40, jsou Tbx2 a Tbx3 (Hoogaars et al., 2004). Inaktivace Tbx2 vede k vytvoření Cx40 pozitivní akcesorní dráhy a k ventrikulární preexcitaci (Aanhaanen et al., 2011). Expresi Cx40 naopak zesilují transkripční faktory Nkx2-5, Tbx5 a T3-LacZ (Harris et al., 2006; Pikard et al., 2005).

3.2.2.1 Cx40 na myších modelech

Myší knock-out pro Cx40 byl původně vytvořen dvěma skupinami (Kirchhof et al., 1998; Simon et al. 1998). V obou případech byly myši životaschopné, což znamená, že funkce Cx40 je zastupitelná nějakým jiným konexinem. Tento myší model byl oběma skupinami (a později i jinými) velmi dobře popsán. U dospělých jedinců byla zjištěna prodloužená doba aktivace síní

(na EKG jde o vlnu P) i komor (na podkladě rozšířeného QRS komplexu) a porucha AV vedení (Bevilacqua et al., 2000). Při stimulacích síní byla u těchto myší popsána vyšší incidence supraventrikulárních tachyarytmií (Hagendorff et al., 1999).

Rozsáhlou elektrofyziologickou studií u dospělých jedinců provedli též Verheule et al. (1999). Zjistili, že rychlost šíření vzruchu komorami není u Cx40 deficitních myší výrazněji změněna, zatímco rychlost šíření vzruchu v síních byla snížena o 30% (u heterozygotů nepozorovali výraznější změny). Navíc na EKG křivkách pozorovali změny QRS komplexů, které se dají interpretovat jako blokáda pravého Tawarova raménka. Poruchu vedení v pravém raménku u dospělých jedinců bez Cx40 potvrdili později též van Rijen et al. (2001).

Další skupina, která se podrobně zabývala studiem Cx40, je skupina Gregory Morleyho (Tamaddon et al., 2000; Leaf et al., 2008). Jejich práce je zajímavá zejména tím, že též používají metodu optického mapování (viz 3.1). Uvedli, že jak částečná (u heterozygotů), tak úplná ztráta Cx40 vede k nehomogenní vodivosti myokardu síní. U embryonálních stádií pozorovali v síních vznik ektopických pacemakerů (viz 6.2.2).

Kromě myokardu je Cx40 přítomen též v endotelu tepen a má zde též vztah k ateroskleróze (Kwak et al., 2002; Chadjichristos et al., 2010). U Cx40 deficitních myší byla v této souvislosti popsána sekundární arteriální hypertenze způsobená změnami tepen v ledvinách (de Wit et al., 2003).

2.2.2.2 Cx40 během myší embryogeneze

Přítomnost malých množství mRNA pro Cx40 je patrna již v 8,5ED; až do 14,5ED je distribuce Cx40 stejná v síních i v komorách (v levé komoře se objevuje dříve než v pravé). Po 14. dnu však dochází k výraznému úbytku Cx40 v komorách, zatímco v síních přetrvává (Delorme et al., 1997). U dospělých jedinců je pak omezen pouze na síně a na komorový převodní systém srdeční (Gros et al., 1996).

Role Cx40 při kardiogenezi jako takové je víceméně neznámá. Je však zřejmé, že deficit Cx40 je spojen s častějšími závažnými vrozenými srdečními vadami (Gu et al., 2003).

2.2.3 Cx45

Cx45 je u myší kódován genem *Gjcl*. Je prvním konexinem, který se začne vyskytovat ve vyvíjejícím se myokardu. V časných stádiích vývoje (do 9,5ED) se nachází ve všech částech myokardu, časem však dochází k jeho omezení pouze na oblasti převodního systému (včetně SA uzlu) a na nejperifernější oblasti mezikomorové přepážky (Gros et al., 2005). Delece *Gjcl* vede k prenatalnímu úmrtí plodu ve stádiu 10ED, což poukazuje na fakt, že přítomnost Cx45 je nutná pro normální kardiogenezi (Gros et al., 2004). Bez Cx45 dochází k poruše epitelo-mesenchymální transformace, která je v srdci nutná pro tvorbu endokardových poštářků a k septaci (Kumai et al., 2000).

U dospělých je Cx45 hlavním konexinem v SA uzlu, který jinak zcela postrádá Cx40 i Cx43 (Verheijck et al., 2001). Studie na podmíněném knock-outu Cx45 postnatálně ukázaly, že defekt v expresi Cx45 neovlivní srdeční frekvenci, což předpokládá, že se sám o sobě nepodílí na pacemakerové aktivitě (Frank et al., 2012).

2.2.4 Cx30

Jde o protein tvořící relativně rychle vodící kanál a u myší se nachází zejména v SA uzlu (Gros et al., 2010). Cx30 deficitní myší mají asi o 9% vyšší srdeční frekvenci než kontroly a tato vyšší frekvence je přítomna i po blokaci autonomní inervace, což ukazuje, že Cx30 nějakým způsobem ovlivňuje pacemakerovou aktivitu (Gros et al., 2010).

2.2.5 Cx30.2

Cx30.2 je kódován genem *Gjc3* a vyskytuje se zejména v SA a AV uzlu (a v menších množstvích též v Hisové svazku a v proximálních částech Tawarových ramének). Jeho hlavní funkcí je zpomalení propagace impulsu v oblasti AV uzlu, což ovlivňuje počet impulsů převedených z atrií na komory (Kreuzberg et al., 2006).

2.2.6 Konexiny v myokardu a jejich role v arytmogenezi

Na rozdíl od svalů kosterního není srdeční svalovina tvořena syncytií uspořádanými do svalových vláken. Je tvořena krátkými buňkami, kardiomyocyty, které jsou spojeny v oblastech tzv. interkalárních disků. Mezibuněčné spoje umožňují četná spojení „gap junctions“, která zprostředkovávají rozsáhlou výměnu látek mezi buňkami (proto se svalovina myokardu někdy označuje jako tzv. „funkční syntitium“). Důležitou roli v šíření vzruchu hraje prostorové uspořádání jednotlivých „gap junctions“. Velmi se liší například v myokardu komor a síní (Saffitz et al., 1994). Kardiomyocyt v komorách (měřeno u psů v oblasti subendokardu) je napojen interkalárními disky průměrně na 11-12 jiných buněk, z nichž polovina je orientovaná bokem („side-to-side“) a polovina koncem („end-to-end“). Naproti tomu v síních (v oblasti crista terminalis pravé síně, u psů) je většina kardiomyocytů spojena „end-to-end“. Snížené množství „gap junctions“ bylo prokazatelně spojené se zpomalením vedení vzruchu myokardem (Peters et al., 1997). Kromě sníženého množství „gap junctions“ však bude hrát v arytmogenezi velkou roli i distribuce a poměr jednotlivých end-to-end a side-to-side spojení (Gourdie et al., 1996).

Strukturální změny (remodelace) patří k základní odpovědi srdeční tkáně na poškození či nemoc. Změny v srdeční mikrostruktuře vedou k výrazným funkčním změnám. Ačkoli strukturální remodelace jistě slouží důležitým účelům adaptace na vyvolávající patologický stav, je zřejmé, že také nemalou měrou přispívá k morbiditě a mortalitě pacientů se srdečním onemocněním. Klasickým příkladem těchto maladaptivních procesů je vznik anatomického podkladu (substrátu) komorových arytmií. Tyto substráty vznikají vlivem strukturálních změn v odpovědi na běžné srdeční nemoci jako je infarkt myokardu nebo arteriální hypertenze. V obou případech jsou změny v myokardu zpočátku prospěšné – vazivová jizva po transmurálním infarktu zabraňuje ruptuře stěny a hypertrofie kardiomyocytů umožní srdci lépe snášet zvýšenou tlakovou zátěž. Nicméně obě tyto změny současně mění elektrické vlastnosti srdeční tkáně a tím zvyšují riziko vzniku vážných arytmií. Zpomalování vedení či blokace jsou nečastějším podkladem reentry fenoménu.

Ten nejčastěji vzniká v životaschopném, nicméně pozměněném, myokardu v okrajích infarktových jizev (Dillon et al., 1988). Řada elektrofyziologických vlastností této tkáně (jako klidový membránový potenciál či vznik akčního potenciálu) se po nějaké době vrací téměř k původním hodnotám. I přesto však si tyto oblasti zachovávají svou arytmogenicitu (Boyden et al., 1988). Mezi nejdůležitější patofyziologické mechanismy, které jsou za tento fakt zodpovědné, patří změny v přenosu látek mezi kardiomyocyty pomocí „gap junctions“.

Vzhledem k tomu, že u lidských patologií můžeme těžko předpokládat úplnou ztrátu Cx40, asi nejlepším modelem pro korelaci se situací u pacientů jsou heterozygotní jedinci. Např. u heterozygotní delece Cx40 u dospělých myší bylo popsáno zpomalené vedení v levé síni (Leaf, 2008). Vzhledem k tomu, že častým místem vzniku atriální fibrilace je oblast ústí plicních žil v levé síni, jsou změny vedení v této oblasti velmi důležitým arytmogenním činitelem.

Jiným mechanismem vzniku arytmií v poškozených srdcích může být spuštěná aktivita (tzv. „triggered activity“), která nevzniká na podkladě fenoménu reentry, nýbrž nestabilitou membránového potenciálu srdečních buněk, které se opakovaně depolarizují a repolarizují. Tento mechanismus se vyskytuje často u neischemických poruch srdečního rytmu a je spojen zejména s poruchami iontových kanálů (Pogwizd et al., 2004).

2.3 Základní patofyziologie srdečního selhání

Srdeční selhání je stav, kdy srdce nestačí plnit svou funkci při přečerpávání krve. Velmi hrubě a orientačně lze srdeční selhání rozdělit na selhávání z tlakového přetížení (např. při arteriální hypertenzi) a na selhávání z objemového přetížení (např. při aortální regurgitaci).

Zvýšení objemu krve, které musí srdce přečrpat, svalovinu zatěžuje a postupně dochází k rozšíření (dilataci) a následné (excentrické) hypertrofii jednotlivých oddílů srdečních (Ford et al., 1976). Nejen rozšíření stěny, ale též zvětšení celého objemu srdečního oddílu tím slouží jako kompenzační mechanismus a srdce se tím adaptuje na nastalou situaci (Grossmann et al., 1975). V tomto stádiu je srdeční selhání kompenzované a tento stav se dá spíše vhodněji označit jako srdeční selhávání. Nicméně po určité době dochází k dekompenzaci a rozvíjí se již plně srdeční selhání (Hood et al., 1968). Mezi nejčastější patologické stavy, které k tomuto stavu vedou, patří u lidí chlopenní vady (nedomykavost chlopní) a arteriovenózní ztráty (např. uměle vytvářené shuntů u dlouhodobě hemodialyzovaných pacientů pro snadnější přístup do cévního řečiště).

Srdeční selhání (nezávisle na druhu a etiologii) představuje výrazné riziko vzniku život ohrožujících komorových tachyarytmií (Artham et al., 2009) a je jedním z největších rizikových faktorů náhlé srdeční smrti (Haider et al., 1998).

Zlepšující se lékařská péče a relativně stagnující (či klesající) porodnost v rozvinutých zemích způsobuje postupné stárnutí naší populace. Tento fakt spolu se útlumem fyzické aktivity vede k častějšímu výskytu srdečních patologií vedoucích postupně až k srdečnímu selhání. Například úmrtnost na infarkty myokardu s rozvojem katetrizačních technik v posledním desetiletí velmi výrazně poklesla a téměř každý pacient po infarktu v co nejkratší době podstoupí katetrizační zákrok a uzávěr je mu rekanalizován. Zlepšením terapie akutních stavů (tento fakt nepostihuje pouze kardiologii, jde o celomedicínský problém) přibývá pacientů s chronickými obtížemi, a proto se dnes stále více a více kardiaků postupně dostává do fáze srdečního selhávání.

2.3.1 Změny konexinů při srdečním selhání

Proces hypertrofie je dynamický děj, při němž dochází k velkým změnám k genové expresi a ve struktuře jak kardiomyocytů tak intersticia. Rychlost vedení je v hypertrofických komorách zpočátku zvýšená, časem dochází k jejímu poklesu (Winterton et al., 1994). V souvislosti s těmito změnami bylo prokázáno, že u pacientů s chronickými myokardiálními poruchami (jako je ischemická kardiomyopatie či aortální stenóza), dochází ke snížení exprese Cx43 (Peters et al., 1993). Remodelace gap junction byla velmi úzce spjata s rozvojem reentry arytmií u pacientů po zhojených infarktech myokardu (Peters et al., 1997). Po obvodu infarktových jizev byly popsány oblasti fibrózy, přestavby a redistribuce „gap junctions“, což přispívá ke zpomalení a k blokům vedení vzruchu (Takamatsu et al., 2008). V oblastech myokardu sousedícím s jizvou bylo prokázáno snížení mezibuněčných spojů, snížení celkových napojení jedné buňky na okolní a redistribuce „gap junctions“ na strany buněk (Luke et al., 1991).

Šíření vzruchu zdravým myokardem probíhá ve směru dlouhé osy kardiomyocytu, což umožňuje rychlé a přímé šíření vzruchu. Oproti tomu např. komorová tachykardie je typicky způsobena tím,

že se signál šíří myokardem transversálně. Koncová spojení v oblasti interkalárních disků jsou přerušena a signál musí kličkovat myokardem dokud nenarazí na porefrakterní tkáň a neinicuje další impuls (De Bakker et al., 1993).

Podobné změny byly popsány též u neischemických chronických srdečních patologií (Uzzaman et al., 2000).

3 Metodika

3.1 Zvířata

Všechny experimenty byly prováděny v souladu s §11 vyhlášky č.207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat a byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1.LF UK a IKEM. Zvířata byla držena ve větrané místnosti s dvanáctihodinovým cyklem světlo/tma a byla krmena ad libitum.

3.1.1 Myši Cx40:GFP

Kmen transgenních knock-in myši vyvinula ve své laboratoři Lucille Miquerol pro studium morfologie převodního systému (Miquerol et al., 2004). Alela GFP v místě genu pro Cx40 umožňuje u heterozygotů fluorescenční vizualizaci míst, kde je exprimován Cx40 (tedy zejména převodní systém srdeční). V homozygotním stavu lze daný model užít jako model Cx40 deficitních myši (absence molekuly Cx40 u homozygotů potvrzena pomocí metod molekulární biologie). Myši byly připouštěny přes noc a při ranním nálezu zátky, byl tento čas považován za stádium 0,5ED. Myši byly pravidelně váženy a matky byly v daném požadovaném stádiu (9,5ED – 18,5ED) usmrceny cervikální dislokací, embrya byla rychle disekována a uložena do studeného Tyrodova pufru.

3.1.2 Potkani s objemovým srdečním selháním

Pro zkoumání vlivu objemového srdečního selhání na arytmogenezi (viz. Kapitola 5) byly použiti samci rodu Wistar vážící 300-350g. U potkanů byl proveden arteriovenózní zkrat (viz dále) a data byla hodnocena ve dvou intervalech po provedení zkratu – po 11 týdnech (ve stádiu počínajícího srdečního selhání) a po 21 týdnech (ve stádiu pokročilého srdečního selhání). Asi 13% zvířat uhynulo do sedmi dnů po provedeném zkratu, dalších 5% potom do ukončení projektu. Tato zvířata byla vyloučena ze studie.

Mezi základní vnější příznaky vznikajícího srdečního selhání patřila letargie, obtížné dýchání, cyanóza a naježení chlupů. Tyto příznaky se po 21 týdnech po operaci vyskytovaly až u 80% zvířat.

Jako kontroly byly užiti potkani, kteří prošli stejnou operací, bez finálního provedení zkratu („sham“).

3.1.3 Aortokavální zkrat

Pro vyvolání oběhového přetížení u potkanů se operativně provedl aortokavální zkrat dle metody popsané Garciou a Dieboltem (Garcia et al., 1990). Potkani byli uspáni intraabdominální aplikací ketaminu a midazolamu, proveden řez ve střední čáře a z přístupu do levého srůstového pole byla v retroperitoneu obnažena aorta a dolní dutá žíla. Do aorty byla opatrně vbodnuta jehla 1,2 mm a poté z lumen bylo bodnuto do dolní duté žíly, čímž se vytvořila komunikace. Aorta byla nad bodnutím zaklipována, jehla odstraněna a na místo vpichu bylo aplikováno akrylamidové lepidlo. Po třech minutách byl klip odstraněn a zkrat prokázán pulsační dolní duté žíly. Tím byla vytvořena spojka mezi tepenným a žilním systémem (AVF – arteriovenous fistula).

3.2 Optické mapování

Optické mapování je specializovaná elektrofyziologická mikroskopická metoda, která využívá schopnosti látky di-4-ANEPPS reagovat na změny membránového potenciálu buněk změnou intenzity fluorescence (Kamino et al., 1981).

Po usmrcení samice cervikální dislokací a explantací dělohy byla pod disekčním mikroskopem z jednotlivých embryí vyjmuta srdce s dorzální částí hrudní stěny a byla vložena do chladného roztoku di-4-ANEPPS (předem připraveném v roztoku DMSO v koncentraci 1,25g/l) v Tyrodově pufru, obvykle v poměru 1:25 (celkové množství se lišilo dle stádia embryonálního vývoje) a byla zde inkubována 5-10 minut (opět v závislosti na stádiu vývoje). Obarvená srdce byla vložena do tkáňové komůrky se silikonovým dnem, ve které byl Tyrodův pufr (o teplotě 37°C a se stálým probubláváním 100% kyslíkem), a zde bylo srdce pomocí miniaturních špendlíků pod disekčním mikroskopem připevněné za ponechání části hrudní stěny. Při zkoumání šíření signálu v síních bylo ještě nutné mikrochirurgicky odstříhnout výtokovou část srdce (konotrunkus).

Kvůli odstranění eventuálních artefaktů způsobených přílišnými pohyby srdce při kontrakci aplikujeme blebbistatin, což je mykotoxin, který vazbou na aktin blokuje vazbu s myosinem, čímž zabraňuje kontrakci, aniž by interagoval s přenosem akčního potenciálu na membráně (Biermann et al., 1998; Fedorov et al., 2007). Malé množství cytochalasinu aplikujeme buď do tkáňové komůrky nebo spolu s di-4-ANEPPS přímo do inkubace.

Tkáňovou komůrku jsme umístili pod mikroskop, kde jsme obarvenou tkáň osvětlili světlem z xenonové lampy procházejícím přes filtr, který propouští světlo o vlnových délkách 480-550 nm. Toto zelené světlo vyvolá červenou fluorescenci, jejíž pokles, vlivem obarvení barvivem di-4-ANEPPS, odpovídá akčnímu potenciálu na povrchu srdce (Witkowski et al., 1997). To je snímáno vysokorychlostní digitální kamerou MiCAM ULTIMA L.

Pořízená data jsou analyzována programem BV_Analyzer – potlačí se šum pomocí digitální filtrace a provede se derivace získaných dat, díky níž se nám zobrazí části záznamu s největší změnou intenzity fluorescence v čase jako jednotlivé hroty, které odpovídají aktivaci v jednotlivých pixelech obrázku. Z toho lze získat jak videa šíření vzruchu, tak aktivační mapy (viz Kapitola 4).

3.3 Mikroskopické metody

Pro posuzování morfologie srdeční tkáně jak potkanů se srdečním selháním (viz Kapitola 5), tak Cx40 deficitních myší (viz Kapitola 4) jsme používali konfokální mikroskop Leica SPE a světelný mikroskop Olympus BX51.

Vzorky tkáně byly fixovány 4% paraformaldehydem v PBS a napuštěny sacharózou. Poté byly zality do média Tissue-Tek a pomocí tekutého dusíku prudce zmrazeny. Bločky byly krájeny na kryotomu a poté obarveny klasickými postupy – první řez obarven hematoxylin-eosinem a následné řezy poté pikrosiriusovou červení (kolagen), Sudanovou černí (lipidy) nebo specifickou protilátkou.

Použité protilátky – α -actinin, *connexin43*, *phosphoconnexin43*, HCN4.

Dále byl použit Hoechst 33342 k dobarvení jader a WGA:Alexa488 na obarvení membrán.

3.4 Analýza dat

Snímky pořízené konfokálním mikroskopem jsem analyzoval pomocí Adobe Photoshopu a programu ImageJ.

Pro měření šíře kardiomyocytů bylo nutné barvení pomocí WGA, které zobrazilo membrány. Měřili jsem deset šířek z jednoho řezu. Aby bylo jisté, že buňka je zobrazena ve svém největším průměru, hledali jsem buňky s přítomností jádra na řezu.

Pro měření délky kardiomyocytů jsme využívali imunofluorescenčně značený Cx43, který dobře zobrazil oblasti interkalárních disků.

Na hodnocení množství jsme využívali poměr plochy zeleného fluorescenčního signálu (reprezentující autofluorescenci cytoplasmy kardiomyocytů) a červeného signálu (protilátka proti Cx43). Nálezby byly korelovány s metodou western blottu.

Distribuci Cx43 jsme měřili podobným způsobem jako množství, ale před analýzou plochy dané červeným signálem jsme odstranili z obrázku signál Cx43 z interkalárních disků. Tím zůstal pouze Cx43 přítomný na buněčné membráně laterálně či v cytoplasmě.

Statistickou analýzu jsme prováděli dle standardních postupů nepárováním t-testem a výsledky byly shledány statisticky významnými při hodnotě $p < 0,05$.

4. Výsledky I.

Vliv deficitu Cx40 na aktivaci síní a komor během embryonálního vývoje u myší

Následující kapitola shrnuje výsledky z rozsáhlé studie myšího modelu Cx40/GFP myší, kdy jsme v naší laboratoři pomocí optického mapování definovali základní aktivační vzory pozorované na embryonálních srdcích v různých fázích vývoje a korigovali je s morfoloogicko-embryologickými poznatky a následně zjišťovali, jak se liší obrazy aktivace u myší s částečným či úplným deficitem Cx40 (Sankova et al., 2012; Benes et al., under revision).

4.1 Aktivace síní a porovnání vlivu deficitu Cx40 ve stádiu 12,5ED

Měření a posuzování šíření aktivace v síních naráží na značné anatomické překážky, neboť síně jsou výrazně prostorově členité anatomické struktury a získávat vhodný dvourozměrný obraz v jedné rovině zaostření je problematické. Je jistě možné jejich tvar mechanicky uzpůsobit podobně to v některých studiích udělala skupina Gregory Morleyho (Leaf et al., 2008), avšak tato manipulace přináší řadu artefaktů, změněných podmínek pro šíření vzruchu a je spojena s traumatizací stěny, která mění podmínky vodivosti.

Proto jsme pro základní analýzu aktivace síní zvolili stádium 12,5ED, neboť v tomto stádiu nejsou ještě atria tolik členitá a po odstranění výtokové části srdce lze bez obtíží vizualizovat oblast SA uzlu i síní.

4.1.1 Druhy aktivace 12,5ED

U wild type myší (WT) (n=19) jsme pozorovali zcela jednotné druhy aktivace – z oblasti paramediálně vpravo, tedy z oblasti základů SA uzlu (Liu et al., 2007). Odtud se pak šíří signál na obě strany, nejdříve aktivuje pravou a posléze levou síň. Průměrná celková doba aktivace obou síní byla 7 ms.

U heterozygotů (Cx40^{+/-}) (n=12) byl způsob aktivace obdobný jako u WT. Průměrná doba aktivace byla však signifikantně prodloužena, činila 9 ms.

U srdcí Cx40 deficitních (Cx40^{-/-}) jsme pozorovali dva druhy aktivace síní. Pouze v 6 případech (z 18) docházelo k typické aktivaci, jakou jsme pozorovali u WT. U zbytku srdcí docházelo k aktivaci z ektopického místa, které se nacházelo více laterálně v pravé síni. Doba aktivace komor byla 19 ms, v případě aktivace z oblasti SA uzlu a 28 ms v případě aktivace ektopické. Rozdíly mezi výsledky byly statisticky významné (p<0,05).

4.1.2 Srdeční frekvence na 12,5ED

Frekvence síní byla relativně uniformní, pokud docházelo k aktivaci z oblasti SA uzlu. U WT byla 96 aktivací/min; u Cx40^{+/-} pak 92 aktivací/min a u Cx40^{-/-} 85 aktivací/min (SD se u všech genotypů pohybovalo mezi hodnotami 25-29). Tyto výsledky poukazují na fakt, že množství Cx40 neovlivňuje srdeční frekvenci. Výrazné rozdíly ve frekvenci byly však u srdcí s ektopickou aktivací, kde byl průměr 116 aktivací/min, nicméně směrodatná odchylka 52,6 poukazuje na značnou variabilitu.

4.1.3 Zhodnocení situace na stádiu 14,5ED

V tomto stádiu již atria výrazně prominují vpřed a hodnocení dorzálních partií síní je problematické (viz výše). I přesto jsme se pokoušeli zhodnotit aspoň orientačně situaci i na tomto pozdějším stádiu vývoje.

Průměrná doba aktivace u WT byla 9,5 ms, u Cx40 heterozygotů 9,7 ms a u Cx40 deficitních myší byla vyšší – 14 ms. Stejně jako na předchozím stádiu i zde byla patrná ektopická aktivace u řady srdcí.

4.1.4 Pátrání po místě ektopické aktivity

Vzhledem k relativně identickému místu ektopické aktivity, pozorované v oblasti pravé síně, jsem se rozhodli prozkoumat, zda toto ektopické místo nemá nějaký morfologický podklad. Prozkoumali jsme histologickou strukturu řady srdcí Cx40^{-/-} (na stádiu 12,5ED, 14,5ED i dospělců) nabarvených anti-HCN4 protilátkou a nenalezli žádné HCN4 pozitivní buňky v oblasti pravého ouška ani nikde jinde mimo oblast vznikajícího SA uzlu .

4.1.5 Shrnutí

1. Přítomnost Cx40 přímo ovlivňuje rychlost šíření vzruchu v síních a pokud chybí, je šíření výrazně zpomalené (doba aktivace prodloužená).
2. U Cx40 deficitních myší jsme u 2/3 případů pozorovali ektopickou aktivaci síní a doba této aktivace byla výrazně prodloužená.
3. Množství Cx40 neovlivňuje frekvenci srdeční činnosti; při ektopické aktivaci jsou srdeční frekvence značně nehomogenní.
4. V pravé síni jsme neobjevily HCN4 pozitivní buňky mimo oblasti SA uzlu.

4.2 Normální vývoj komorového převodního systému u myší

Předtím než jsme začali zkoumat vliv Cx40 na vedení vzruchu v komorách, bylo nejprve potřeba podrobně popsat, jaké druhy aktivace vidíme u WT během jednotlivých fází kardiogeneze. Podobné studie byly provedeny i v minulosti (Rentschler et al., 2001) na relativně malém množství vzorků. Proto jsme v naší laboratoři provedli rozsáhlou studii pomocí optického mapování na myších (Sankova et al., 2012).

4.2.1 Vedení v časných fázích vývoje

Pomocí optického mapování jsme byli schopni získat informace o šíření vzruchu až od 9,5ED. V dřívějších stádiích byla vyvíjející se srdce příliš náchylná k toxicitě di-4-ANEPPS a nedostali jsme dostatečný signál (resp. srdce *in vitro* často nejevila spontánní aktivitu vůbec).

Ve vznikající komoře pozorujeme T3-LacZ pozitivní prstenec v okolí budoucího interventrikulárního septa – tzv. primární interventrikulární prstenec („primary interventricular ring“, PIR). Tato struktura v komorách poté slouží k šíření vzruchu před vývojem Tawarových ramének. Od 10,5ED pozorujeme v komorách expresi Cx40 v trabekulách a postupný vývoj Tawarových ramének.

Na mapách z optického mapování vidíme v těchto stádiích dva druhy aktivace. První je vznik aktivace v oblasti levé komory a druhý typ aktivace je z oblasti mezikomorové, tedy z místa PIR. Signál u této cirkulární struktury může šířit oběma směry, což ovlivňuje místo vzniku první aktivace.

4.2.2 Vedení v pozdějších fázích vývoje

Pozdější fáze vývoje byly již dříve popsány i jinými skupinami (Renschler et al., 2001). Tyto studie byly prováděny na malém množství embryí a přisuzovaly obvykle každému stádiu specifický druh aktivace. Z našich dat vyplývá, že celá situace je značně složitější a k aktivaci dochází postupným přechodem z primitivnějších vzorů na vyspělejší.

Aktivace pomocí PIR je postupně nahrazována aktivací cestou Tawarových ramének a poslední stádium, na kterém PIR pozorujeme, je 12,5ED. První raménko, které začne fungovat, je zpravidla to pravé, posléze se přidá i levé a od stádia 14,5ED je převážná část srdcí aktivována již oběma raménky, což se projeví typickým obrazem dvou míst aktivac. Toto je již dospělý typ, který pozorujeme i postnatálně.

4.3 Vliv deficitu Cx40 na vývoj převodního systému u myší

Na časných stádiích vývoje neměl deficit Cx40 výraznější dopad na vznik a šíření signálu po komorách. Hlavními strukturami, které byly nedostatkem Cx40 postiženy, byla přirozeně Tawarova raménka, v nichž hraje tento konexin klíčovou úlohu. Proto jsme se zaměřili na zhodnocení funkčnosti jednotlivých ramének během vývoje. Ta byla reprezentována aktivací z oblasti levé resp. pravé komory.

Zajímali jsme se o stádia 12,5ED a výše, neboť právě v této době dochází k jejich nejmarkantnějšímu vývoji.

4.3.1 Funkce levého Tawarova raménka během vývoje

Na 12,5ED je převažujícím typem aktivace zprava. Levé raménko je u všech genotypů funkční asi v 40 - 60% zkoumaných srdcí. U Cx40 deficitních je tento poměr sice nižší, rozdíly výsledků však nejsou statisticky významné.

Zajímavá situace nastává ve stádiu 14,5ED, kdy vidíme zřejmé (a statisticky významné) snížení funkčních levých ramének u Cx40 deficitních myší, kdy u nich toto raménko nacházíme funkční u 54% srdcí, zatímco u WT je funkční v 93%.

Situace se ovšem v dalších stádiích již normalizuje a jak na 16,5ED tak na 18,5ED je levé raménko funkční ve 100% případů u všech genotypů.

4.3.2 Funkce pravého Tawarova raménka během vývoje

Dynamika funkčnosti pravého raménka je značně odlišná od levého. U všech genotypů je na 12,5ED i na 14,5ED pravé raménko funkční zhruba v 80% případů. U WT a Cx40^{+/-} zárodků dochází poté k postupnému vzestupu až do 100%, zatímco u Cx40 deficitních jedinců dochází k prudkému poklesu a na stádiu 18,5ED je aktivace zprava přítomna pouze u 27% srdcí. Podobný blok pravého Tawarova raménka byl popisován dříve v literatuře u dospělých myší s deficitem Cx40 (Verheule et al., 1999).

U heterozygotů je ve většině případů naznačen mírný pokles funkčnosti (přechodný fenotyp).

4.3.3 Doba aktivace komor

Podobně jako u síní se naskytá otázka, zda je u Cx40 deficitních srdcí delší doba aktivace.

Rozdíly v časech aktivace u WT a heterozygotů byly pouze malé a statisticky nevýznamné. U Cx40 deficitních srdcí docházelo k prodloužení aktivačních časů, které však bylo patrné a statisticky významné až v pozdějších stádiích vývoje. Na 18,5ED byla průměrná doba aktivace komor u WT 5,2 ms a u Cx40^{-/-} 7,5 ms ($p < 0,05$). Je zřejmé, že rozdíl zde není natolik výrazný jako v síních.

4.3.4 Shrnutí

1. Funkce levého raménka je deficitem Cx40 ovlivněna méně výrazně, dochází pouze k nižšímu zastoupení funkčních levých ramének na stádiu 14,5ED a později je stav již normální.

2. Funkce pravého raménka je zpočátku vývoje normální a později vlivem deficitu Cx40 rapidně klesá.
3. Deficit Cx40 mírně prodlužuje aktivační čas komor v pozdějších stádiích vývoje.

5. Výsledky II.

Arytmogenní substrát a morfologické změny u potkaního modelu objemového srdečního selhání

Druhou studií je model objemového srdečního selhání u potkanů. Na tomto modelu pracuje skupina doc. MUDr. Melenovského v IKEMu a zajímá se mj. o změny v metabolismu lipidů při vyvolaném srdečním selhání (Melenovsky et al., 2011). Ve své studii jsem se zajímal zejména o morfologické změny, které oběhové přetížení přineslo, a o potenciální patofyziologický podklad arytmií, které byly při srdečním selhání pozorovány jak u tohoto modelu, tak u pacientů v klinické praxi. Práce byly publikovány (Benes, Jr. et al., 2011; Melenovsky et al., 2011) a máme v plánu pokračovat s výzkumem i na pozdějších stádiích selhání.

5.1 Makroskopické a mikroskopické morfologické změny

K posouzení celkových změn v organismu byly zváženy u potkanů všechny vnitřní orgány s maximální pozorností zaměřenou na srdce. Hypertrofie srdeční se dá nejlépe vyjádřit pomocí poměru váhy srdce ku váze těla (HBWR – heart to body weight ratio), které bylo v obou stádiích selhávání u AVF potkanů zhruba dvojnásobné (přesné hodnoty viz příložený článek). U srdcí byly výrazně zesílené stěny a to vždy výrazněji v pravé komoře (stěna pravé komory po 11 týdnech o 58% silnější a po 21 týdnech o 146% silnější než kontroly; stěna levé komory v těchto stádiích o 33% a o 83%). Tento fakt poukazuje na vznikající kompenzatorní excentrickou hypertrofii myokardu.

Z ostatních orgánů byl výrazný nárůst váhy pozorován zejména u plic, což souvisí s retencí tekutiny danou městnáním krve při selhávání levé komory.

Na skenech z konfokálního mikroskopu jsme měřili změny ve velikosti buněk. Jak se dá předpokládat, kardiomyocyty se při popisované excentrické hypertrofii jak prodloužily, tak zesílily, a to výrazněji opět v pravé komoře a více ve střední vrstvě stěny (v midmyokardu) než ve vnitřní vrstvě svaloviny stěny (v subendokardu).

5.2 Arytmogenní substrát v komorách selhávajících srdcí

Z hlediska vzniku arytmií jsme se zajímali zejména o množství, distribuci a fosforylaci Cx43 a o přítomnost fibrotických změn v myokardu.

Komorovou fibrózu jsme hodnotili na konfokálních skenech poměrem plochy zeleného kanálu (charakterizující barvení pomocí WGA, tedy vazivo a membrány) vůči červenému kanálu, který reprezentoval cytoplasmu buněk (při barvení pomocí fluorescenční Ig proti alfa-actininu). Poté jsme nález potvrdili klasickým barvením picosiriusovou červení. Výsledek byl vyjádřen jako poměr plochy zeleného signálu ku ploše tkáně. U AVF potkanů 21 dní po operaci byla 26%, u kontrol 28,6%.

Distribuci a množství Cx43 a fosforylované formy Cx43 jsme hodnotili též z konfokálních skenů na řezech barvených specifickými protilátkami. Výsledky jsme poté ještě ověřovali pomocí Western blottingu.

Celkové množství Cx43 nebylo při hodnocení z histologických řezů u AVF srdcí výrazněji sníženo. Western blotting prokázal snížení asi na 60% (což by vzhledem k abundanci Cx43 nemělo mít výraznější funkční dopad). Mnohem důležitější pro arytmogenezi je však lokalizace „gap junctions“. Kromě oblasti interkalárních disků se Cx43 může též vyskytovat na laterálních stranách kardiomyocytů nebo v cytoplasmě (viz 2.2.1). Nicméně ani v tomto jsme neobjevili na daných řezech rozdíl. Poměr Cx43 umístěného v interkalárních discích ku celkovému Cx43 v buňkách byl u AVF 33,7% a u kontrol 35,5%.

Hlavním parametrem, který vykazoval změnu, byla fosforylace. Měřili jsme množství fosforylovaného Cx43 v levé komoře v obou stádiích srdečního selhání a zjistili jsem, že v období 11 týdnů po operaci nedocházelo ještě k poklesu fosforylovaného Cx43, ale 21 týdnů po operaci se již projevilo pokles množství fosforylovaného Cx43 zhruba na 50% (tento údaj potvrdil též Western blotting).

6. Diskuze a závěry

6.1 Vliv Cx40 na šíření vzruchu v síních

Role Cx40 v arytmogenezi byla popsána již mnoha skupinami (Dupont et al., 2001; Polontchouk et al., 2001; Hauer et al., 2006). I přesto stále není přesná úloha Cx40 zcela objasněna.

Ve své studii jsem popsal pomocí metody optického mapování způsob šíření vzruchu v atriích u myši na embryonálním stádiu 12,5ED (a orientačně jsem vyhodnotil též situaci na 14,5ED). Výsledky mé studie přinesly následující závěry.

6.1.1. Rychlost vedení vzruchu

Nedostatek Cx40 v embryonálních síních přímo ovlivňuje rychlost šíření vzruchu myokardiální tkání. Tento fakt sám o sobě překvapivý není, neboť Cx40 je převažujícím konexinem v síních a je rychle vedoucím kanálem. Fakt, že k šíření dochází (byť zpomaleně) i v Cx40 deficitních atriích ukazuje, že chybějící funkci Cx40 je schopen zastat jiný protein, zejména Cx43. Podle studie Delorme et al. (Delorme et al., 1997) je exprese Cx43 v myších atriích patrná od 12,5ED. Z našich dat vyplývá, že zpomalení vedení při absenci Cx40 je na 12,5ED mnohem výraznější než na 14,5ED (aktivační čas na tomto stádiu je u Cx40^{-/-} pouze cca o 30% delší oproti více než trojnásobnému zvýšení na 12,5ED). Postupné zastoupení funkce chybějícího Cx40 postupně vzrůstajícím množstvím konexinu 43 by tento fakt vcelku dobře vysvětlovalo. Navíc naše současné výzkumy tohoto modelu na stádiu 10,5ED ukazují, že zde je dopad absence Cx40 ještě větší než na 12,5ED.

6.2.2 Ektopická místa aktivace

Až 2/3 ze zkoumaných Cx40^{-/-} srdcí vykazovaly ektopické místo první aktivace v síních. Toto místo bylo u všech srdcí, která jsme zmapovali, umístěno v oblasti pravé síně a jejího ouška. Vzhledem k tomu, že ektopické místo jevílo takovouto uniformitu, přemýšleli jsem o možném ektopickém vzniku srdečního pacemakeru. Na histologických řezech deseti Cx40^{-/-} srdcí na stádiu 12,5ED jsme nenašli v pravé síni žádné HCN4 pozitivní kardiomyocyty, které by mohly přispívat k potenciální tkáňové automacii. Nález lze tak vysvětlit buď funkční poruchou (u níž je však takováto jednotnost ne zcela přesvědčivá) nebo abnormálním šířením signálu z SA uzlu. Vzhledem k tomu, že v uzlu samotném se Cx40 nenachází, musí docházet k hlavním změnám v oblasti obklopující uzlu, kde poté vzniká blok vedení, podobně jak byl popsán v literatuře v králičích srdcích (Sano et al., 1965; Boyett et al., 1999). Vzruch by poté odcházel z SA uzlu jinou cestou, tzv. „abnormal exit site“ (Fedorov et al., 2009). Proti této teorii svědčí fakt, že frekvence srdcí s ektopickým místem aktivity byly obvykle vyšší než při aktivaci z SA uzlu (která naopak byla relativně uniformní v rámci genotypů). Dá se proto předpokládat, že opravdu vzniká funkční místo ektopické aktivity v pravé síni, které začne vytvářet rychlejší rytmus, čímž znemožní funkci pomalejšímu SA uzlu (jde vlastně o jakési síňové extrasystoly).

Rozsáhlou studii zabývající se Cx40 deficitními myšmi provedla slupina Gregory Morleyho (Leaf et al., 2008). Zabývali se řadou stádií a mimo jiné popsali též změny během embryonálního vývoje, resp. na stádiích 13,5ED a 15,5ED. V mnohém se jejich data shodují s našimi, avšak s jednou důležitou diskrepancí. Též pozorovali u Cx40^{-/-} srdcí vznik ektopických aktivací v síních, avšak na mnoha rozličných místech. Tato odlišnost má jistě řadu možných vysvětlení. Leaf et al. (Leaf et al., 2008) používali odlišný protokol pro optické mapování a techniku přípravy a umístění srdce (zejména mechanické přizpůsobování tvaru síní). Odlišná stádia vývoje a odlišný genetický podklad myši jistě též sehráli svou roli.

6.2.3 Doba aktivace síní z ektopického místa

Pokud docházelo k šíření aktivace z ektopického místa, doba šíření po atriích byla ještě více prodloužena než při pouhé absenci Cx40 při šíření z SA uzlu. Tento fakt poukazuje na přítomnost jistých preferenčních cest šíření vzruchu v síních, které vedou od SA uzlu a urychlují průběh aktivace. Jedním z těchto svazků je například interatriální svazek Bachmannův, který byl již dříve popsán u kuřete (Sedmera et al., 2006).

Verheule et al. popsal ve své studii řadu elektrofyziologických změn u Cx40 deficitních dospělých myší (Verheule, 1999). Mimo jiné objevil prodlouženou vlnu P (která odpovídá aktivaci síní) a pokles rychlosti vedení vzruchu o 30%, což odpovídá našim výsledkům na stádiu 14,5ED. Navíc při stimulaci síní elektrodou vyvolával u myší síníové tachyarytmie až u 50% zkoumaných Cx40^{-/-} mutant. Toto dokazuje, že takového zpomalení vedení by mohlo být též u lidí podkladem pro vznik arytmií při poruchách distribuce Cx40.

6.2 Vliv Cx40 na vývoj funkce komorového převodního systému

Vzhledem k převažující lokalizaci Cx40 v trabekulách komor a posléze v Tawarových raménkách, hlavní změny při deficitu Cx40 jsme očekávali ve změnách aktivací v jednotlivých fázích vývoje. Struktura PIR neobsahuje Cx40, a proto jsme nepředpokládali (a ani nenacházeli) výraznější změny v aktivaci na časných stádiích. V pozdějších obdobích embryonálního vývoje jsme však našli změny výrazné.

6.2.1 Blokáda pravého raménka Tawarova

Nejzajímavějším nálezem byl postupně vznikající blok pravého Tawarova raménka. Změny EKG tohoto druhu popsalo už dříve na dospělých myších několik vědeckých skupin (Verheule et al., 1999; Tamaddon et al., 2000). Důvod, proč je pravé raménko zpočátku u většiny Cx40^{-/-} srdcí funkční a posléze dochází k jeho blokadě, je třeba hledat v morfoloické stavbě vznikajícího pravého raménka. Je patrné, že struktura raménka je zpočátku relativně objemná a široká a s postupujícím růstem srdce dochází ke ztenčování až do konečné fáze, kdy pravé raménko Tawarovo tvoří pouze nevelké množství vláken převodního systému. Předpokládáme tedy, že v počátcích vývoje ramének převodního systému je pro funkci rozhodující morfoloické struktura (v tomto případě velikost), která dostatečně nahrazuje absenci rychle vedoucího Cx40. S postupem času, kdy dochází k ztenčování této struktury, stává se závislejší na přítomnosti rychle vedoucích kanálů, které v případě Cx40^{-/-} srdcí přítomny nejsou a tudíž zde dochází k blokadě.

6.2.2 Snížení funkce levého raménka Tawarova ve 14,5ED

Statisticky významný pokles funkčnosti levého Tawarova raménka na 14,5ED připisujeme spíše než morfoloii (jak tomu bylo vpravo) samotnému deficitu Cx40. Ten je v komorách ve větším množství detekovatelný až od 14,5ED dále. Otázka přítomnosti a funkčnosti Tawarových ramének na stádiu 12,5ED je silně diskutabilní. Cx43 je zde detekovatelný až o den později. Tato diskrepance nejspíš způsobuje pokles funkčnosti. Na 14,5ED je nepřítomnost Cx40 v levém raménku částečně kompenzována morfoloii, nicméně jak je vidět, pokles funkčnosti tu patrný je. O den později nastoupí exprese Cx43, který dostatečně zastoupí v objemném levém raménku funkci Cx40.

6.3 Arytmogenní substrát při objemovém srdečním selhání

U velké řady srdečních patologií (např. angina pectoris, hypertrofie komory při hypertenzi) je jedním z hlavních arytmogenních činitelů srdeční fibróza. V myokardu se nacházejí oblasti (větší či menší) fibrotické tkáně, které vytvářejí blokády vodivosti a jsou příčinou reentry fenoménů. V našem modelu objemového srdečního selhání jsme však fibrózu neprokázali, a přesto byly u potkanů pozorovány časté arytmie. Důvodů hledat na těchto srdcích arytmogenní potenciál bylo však více. Podobné stavy objemového přetížení myokardu prokazatelně spojeny se život ohrožujícími komorovými tachyarytmiemi byly popsány v literatuře (von Olshausen et al., 1983). Zvýšené riziko náhlé srdeční smrti bylo popsáno i u symptomatických pacientů s objemovým přetížením daným mitrální regurgitací (Grigioni et al., 1999).

Vzhledem k absenci výraznějších fibrotických změn v selhávajících srdcích jsme se zaměřili na jiné potenciální zdroje arytmii. Věnovali jsme se zejména změnám v distribuci, množství a fosforylaci Cx43 v srdci. Kromě změn v Cx43 však mohou přicházet jako možné zdroje poruch rytmu v úvahu též např. změny v iontových kanálech, které se často výrazně podílejí na patogenezi arytmii (Shah et al., 2005).

Většina změn v distribuci a množství Cx43 v myokardu selhávajících potkanů nebyla významná a výsledky korespondovaly s některými obdobnými studii provedenými v minulosti (u několika studií docházelo ve výsledcích k diskrepancím vlivem odlišných metod výzkumu – viz diskuse v příloženém článku) (Burstein et al., 2009; Dupont et al., 2001; Emdad et al., 2001).

Jako možný arytmogenní substrát jsme objevili výrazně sníženou fosforylaci Cx43 ve stádiu dekompenzovaného srdečního selhání (21 týdnů po vytvoření zkratu). Tyto změny jsou v souladu s výsledky jiných skupin zabývajících se srdečním selháním a arytmii (Ai et al., 2005). Ovlivnění fosforylace Cx43 při srdečních patologiích se tímto jeví jako dobrá potenciální cesta k farmakologické profylaxi arytmii, jak potvrdila již skupina Roberta Gourdieho (O'Quinn et al., 2011).

7. Literatura

- Aanhaanen WT, Boukens BJ, Sizarov A, Wakker V, de Gier-de Vries C, van Ginneken AC, Moorman AF, Coronel R, and Christoffels VM.** Defective Tbx2-dependent patterning of the atrioventricular canal myocardium causes accessory pathway formation in mice. *J Clin Invest* 121: 534-544.
- Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, and DiFrancesco D.** From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *News Physiol Sci* 17: 32-37, 2002.
- Ai X and Pogwizd SM.** Connexin 43 downregulation and dephosphorylation in nonischemic heart failure is associated with enhanced colocalized protein phosphatase type 2A. *Circ Res* 96: 54-63, 2005.
- Ammirabile G, Tessari A, Pignataro V, Szumska D, Sutera Sardo F, Benes J, Jr., Balistreri M, Bhattacharya S, Sedmera D, and Campione M.** Pitx2 confers left morphological, molecular, and functional identity to the sinus venosus myocardium. *Cardiovasc Res* 93: 291-301.
- Anderson JM.** Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol* 6: 382-384, 1996.
- Anderson KR, Ho SY, and Anderson RH.** Location and vascular supply of sinus node in human heart. *Br Heart J* 41: 28-32, 1979.
- Arguello C, Alanis J, Pantoja O, and Valenzuela B.** Electrophysiological and ultrastructural study of the atrioventricular canal during the development of the chick embryo. *J Mol Cell Cardiol* 18: 499-510, 1986.
- Artham SM, Lavie CJ, Milani RV, Patel DA, Verma A, and Ventura HO.** Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. *Prog Cardiovasc Dis* 52: 153-167, 2009.
- Bakker ML, Boukens BJ, Mommersteeg MT, Brons JF, Wakker V, Moorman AF, and Christoffels VM.** Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system. *Circ Res* 102: 1340-1349, 2008.
- Bevilacqua LM, Simon AM, Maguire CT, Gehrman J, Wakimoto H, Paul DL, and Berul CI.** A targeted disruption in connexin40 leads to distinct atrioventricular conduction defects. *J Interv Card Electrophysiol* 4: 459-467, 2000.
- Biermann M, Rubart M, Moreno A, Wu J, Josiah-Durant A, and Zipes DP.** Differential effects of cytochalasin D and 2,3 butanedione monoxime on isometric twitch force and transmembrane action potential in isolated ventricular muscle: implications for optical measurements of cardiac repolarization. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9: 1348-1357, 1998.
- Bowling N, Huang X, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Esterman M, Allen PD, Maddi R, McCall E, and Vlahos CJ.** Protein kinase C-alpha and -epsilon modulate connexin-43 phosphorylation in human heart. *J Mol Cell Cardiol* 33: 789-798, 2001.
- Boyden PA, Gardner PI, and Wit AL.** Action potentials of cardiac muscle in healing infarcts: response to norepinephrine and caffeine. *J Mol Cell Cardiol* 20: 525-537, 1988.
- Boyett MR, Honjo H, Yamamoto M, Nikmaram MR, Niwa R, and Kodama I.** Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node. *Am J Physiol* 276: H686-698, 1999.
- Boyett MR, Inada S, Yoo S, Li J, Liu J, Tellez J, Greener ID, Honjo H, Billeter R, Lei M, Zhang H, Efimov IR, and Dobrzynski H.** Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Adv Cardiol* 42: 175-197, 2006.
- Burstein B, Comtois P, Michael G, Nishida K, Villeneuve L, Yeh YH, and Nattel S.** Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res* 105: 1213-1222, 2009.

- Coppen SR, Kaba RA, Halliday D, Dupont E, Skepper JN, Elneil S, and Severs NJ.** Comparison of connexin expression patterns in the developing mouse heart and human foetal heart. *Mol Cell Biochem* 242: 121-127, 2003.
- de Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Tasseron S, Vermeulen JT, de Jonge N, and Lahpor JR.** Slow conduction in the infarcted human heart. 'Zigzag' course of activation. *Circulation* 88: 915-926, 1993.
- de Mello WC, Motta GE, and Chapeau M.** A study on the healing-over of myocardial cells of toads. *Circ Res* 24: 475-487, 1969.
- de Wit C, Roos F, Bolz SS, and Pohl U.** Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* 13: 169-177, 2003.
- Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Briand JP, Willecke K, Gros D, and Theveniau-Ruissy M.** Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ Res* 81: 423-437, 1997.
- Dillon SM, Alessie MA, Ursell PC, and Wit AL.** Influences of anisotropic tissue structure on reentrant circuits in the epicardial border zone of subacute canine infarcts. *Circ Res* 63: 182-206, 1988.
- Dupont E, Ko Y, Rothery S, Coppen SR, Baghai M, Haw M, and Severs NJ.** The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 103: 842-849, 2001.
- Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppen SR, Khan N, Kaprielian R, Yacoub MH, and Severs NJ.** Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33: 359-371, 2001.
- Duthe F, Plaisance I, Sarrouilhe D, and Herve JC.** Endogenous protein phosphatase 1 runs down gap junctional communication of rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1648-1656, 2001.
- Eckardt D, Kirchhoff S, Kim JS, Degen J, Theis M, Ott T, Wiesmann F, Doevendans PA, Lamers WH, de Bakker JM, van Rijen HV, Schneider MD, and Willecke K.** Cardiomyocyte-restricted deletion of connexin43 during mouse development. *J Mol Cell Cardiol* 41: 963-971, 2006.
- Eliška O.** Purkyňova vlákna převodního systému srdce – historie a současnost Purkyňových objevů. *Časopis lékařů českých* 145, 2006
- Eloff BC, Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE, and Rosenbaum DS.** High resolution optical mapping reveals conduction slowing in connexin43 deficient mice. *Cardiovasc Res* 51: 681-690, 2001.
- Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, Kodama I, and Murata Y.** Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 33: 219-231, 2001.
- Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, Kodama I, and Murata Y.** Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 33: 219-231, 2001.
- Fedorov VV, Lozinsky IT, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Rosen MR, Balke CW, and Efimov IR.** Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm* 4: 619-626, 2007.
- Fedorov VV, Schuessler RB, Hemphill M, Ambrosi CM, Chang R, Voloshina AS, Brown K, Hucker WJ, and Efimov IR.** Structural and functional evidence for discrete exit pathways that connect the canine sinoatrial node and atria. *Circ Res* 104: 915-923, 2009.
- Ford LE.** Heart size. *Circ Res* 39: 297-303, 1976.

- Francis RJ and Lo CW.** Primordial germ cell deficiency in the connexin 43 knockout mouse arises from apoptosis associated with abnormal p53 activation. *Development* 133: 3451-3460, 2006.
- Frank M, Wirth A, Andrie RP, Kreuzberg MM, Dobrowolski R, Seifert G, Offermanns S, Nickenig G, Willecke K, and Schrickel JW.** Connexin45 provides optimal atrioventricular nodal conduction in the adult mouse heart. *Circ Res* 111: 1528-1538.
- Garcia-Frigola C, Shi Y, and Evans SM.** Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene Expr Patterns* 3: 777-783, 2003.
- Giepman BN.** Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62: 233-245, 2004.
- Goodenough DA and Paul DL.** Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 285-294, 2003.
- Goodenough DA, Goliger JA, and Paul DL.** Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65: 475-502, 1996.
- Gorza L, Schiaffino S, and Vitadello M.** Heart conduction system: a neural crest derivative? *Brain Res* 457: 360-366, 1988.
- Gourdie RG, Mima T, Thompson RP, and Mikawa T.** Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development* 121: 1423-1431, 1995.
- Grigioni F, Enriquez-Sarano M, Ling LH, Bailey KR, Seward JB, Tajik AJ, and Frye RL.** Sudden death in mitral regurgitation due to flail leaflet. *J Am Coll Cardiol* 34: 2078-2085, 1999.
- Gros D, Alcoléa S, Dupays L, Meysen S, Miquerol L, Théveniau-Ruissy M et al.** Connexins in cardiac development: expression, role, and transcriptional control. In: Winterhagen E ed. *Gap Junctions in Development and Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. p29-55
- Gros D, Dupays L, Alcolea S, Meysen S, Miquerol L, and Theveniau-Ruissy M.** Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart-new models for cardiovascular research. *Cardiovasc Res* 62: 299-308, 2004.
- Gros D, Dupays L, Alcolea S, Meysen S, Miquerol L, and Theveniau-Ruissy M.** Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart-new models for cardiovascular research. *Cardiovasc Res* 62: 299-308, 2004.
- Gros D, Theveniau-Ruissy M, Bernard M, Calmels T, Kober F, Sohl G, Willecke K, Nargeot J, Jongsma HJ, and Mangoni ME.** Connexin 30 is expressed in the mouse sino-atrial node and modulates heart rate. *Cardiovasc Res* 65: 45-55, 2004.
- Gros DB and Jongsma HJ.** Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18: 719-730, 1996.
- Grossman W, Jones D, and McLaurin LP.** Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56-64, 1975.
- Gu H, Smith FC, Taffet SM, and Delmar M.** High incidence of cardiac malformations in connexin40-deficient mice. *Circ Res* 93: 201-206, 2003.
- Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, and Fishman GI.** Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res* 88: 333-339, 2001.

- Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, and Willecke K.** Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 99: 1508-1515, 1999.
- Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, and Levy D.** Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol* 32: 1454-1459, 1998.
- Harris BS, Spruill L, Edmonson AM, Rackley MS, Benson DW, O'Brien TX, and Gourdie RG.** Differentiation of cardiac Purkinje fibers requires precise spatiotemporal regulation of Nkx2-5 expression. *Dev Dyn* 235: 38-49, 2006.
- Hauer RN, Groenewegen WA, Firouzi M, Ramanna H, and Jongasma HJ.** Cx40 polymorphism in human atrial fibrillation. *Adv Cardiol* 42: 284-291, 2006.
- Herve JC.** Gap junction channels: from protein genes to diseases. *Prog Biophys Mol Biol* 94: 1-4, 2007.
- His W Jr.** Die Thätigkeit des embryonalen Herzen und deren Bedeutung für die Lehre von der Herzbewegung beim Erwachsenen. *Arbeiten aus der med. Klinik zu Leipzig*, 1893
- Hood WP, Jr., Rackley CE, and Rolett EL.** Wall stress in the normal and hypertrophied human left ventricle. *Am J Cardiol* 22: 550-558, 1968.
- Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LY, Bakker ML, Clout DE, Wakker V, Barnett P, Ravesloot JH, Moorman AF, Verheijck EE, and Christoffels VM.** Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* 21: 1098-1112, 2007.
- Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M, and Christoffels VM.** The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* 62: 489-499, 2004.
- Hunter AW, Barker RJ, Zhu C, and Gourdie RG.** Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell* 16: 5686-5698, 2005.
- Chadjichristos CE, Scheckenbach KE, van Veen TA, Richani Saredidine MZ, de Wit C, Yang Z, Roth I, Bacchetta M, Viswambharan H, Foglia B, Dudez T, van Kempen MJ, Coenjaerts FE, Miquerol L, Deutsch U, Jongasma HJ, Chanson M, and Kwak BR.** Endothelial-specific deletion of connexin40 promotes atherosclerosis by increasing CD73-dependent leukocyte adhesion. *Circulation* 121: 123-131.
- Chuck ET, Freeman DM, Watanabe M, and Rosenbaum DS.** Changing activation sequence in the embryonic chick heart. Implications for the development of the His-Purkinje system. *Circ Res* 81: 470-476, 1997.
- Kamino K, Hirota A, and Fujii S.** Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature* 290: 595-597, 1981.
- Kamino K.** Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development. *Physiol Rev* 71: 53-91, 1991.
- Kapoor N, Galang G, Marban E, and Cho HC.** Transcriptional suppression of connexin43 by TBX18 undermines cell-cell electrical coupling in postnatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* 286: 14073-14079.
- Keith A, Flack M.** The for mand nature of the muscular connections between primary divisions of the vertebrate heart. *J. Anat. Physiol.*, 41, 1907
- Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Kruger O, Traub O, and Willecke K.** Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* 8: 299-302, 1998.

Kolditz DP, Wijffels MC, Blom NA, van der Laarse A, Markwald RR, Schalij MJ, and Gittenberger-de Groot AC. Persistence of functional atrioventricular accessory pathways in postseptated embryonic avian hearts: implications for morphogenesis and functional maturation of the cardiac conduction system. *Circulation* 115: 17-26, 2007.

Kreuzberg MM, Willecke K, and Bukauskas FF. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc Med* 16: 266-272, 2006.

Kwak BR and Jongsma HJ. Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol Cell Biochem* 157: 93-99, 1996.

Kwak BR, Mulhaupt F, Veillard N, Gros DB, and Mach F. Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 225-230, 2002.

Leaf DE, Feig JE, Vasquez C, Riva PL, Yu C, Lader JM, Kontogeorgis A, Baron EL, Peters NS, Fisher EA, Gutstein DE, and Morley GE. Connexin40 imparts conduction heterogeneity to atrial tissue. *Circ Res* 103: 1001-1008, 2008.

Lei M, Zhang H, Grace AA, and Huang CL. SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc Res* 74: 356-365, 2007.

Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, Boyett MR, and Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res* 73: 729-738, 2007.

Luke RA and Saffitz JE. Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest* 87: 1594-1602, 1991.

Melenovsky V, Benes J, Skaroupkova P, Sedmera D, Strnad H, Kolar M, Vlcek C, Petrak J, Benes J, Jr., Papousek F, Oliyarnyk O, Kazdova L, and Cervenka L. Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats. *Mol Cell Biochem* 354: 83-96.

Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, van Rijen HV, Abran P, Jongsma H, Nargeot J, and Gros D. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res* 63: 77-86, 2004.

Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, Papaioannou VE, Brown NA, Harvey RP, Moorman AF, and Christoffels VM. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* 100: 354-362, 2007.

Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, and Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268: 1646-1652, 2001.

Morley GE, Vaidya D, Samie FH, Lo C, Delmar M, and Jalife J. Characterization of conduction in the ventricles of normal and heterozygous Cx43 knockout mice using optical mapping. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10: 1361-1375, 1999.

Musil LS and Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115: 1357-1374, 1991.

Musil LS and Goodenough DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74: 1065-1077, 1993.

O'Quinn MP, Palatinus JA, Harris BS, Hewett KW, and Gourdie RG. A peptide mimetic of the connexin43 carboxyl terminus reduces gap junction remodeling and induced arrhythmia following ventricular injury. *Circ Res* 108: 704-715.

- Park DS and Fishman GI.** The cardiac conduction system. *Circulation* 123: 904-915.
- Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, and Wit AL.** Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 95: 988-996, 1997.
- Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, and Severs NJ.** Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation* 88: 864-875, 1993.
- Pizard A, Burgon PG, Paul DL, Bruneau BG, Seidman CE, and Seidman JG.** Connexin 40, a target of transcription factor Tbx5, patterns wrist, digits, and sternum. *Mol Cell Biol* 25: 5073-5083, 2005.
- Pogwizd SM and Bers DM.** Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 14: 61-66, 2004.
- Polontchouk L, Haefliger JA, Ebel B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER, and Dhein S.** Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 38: 883-891, 2001.
- Reckova M, Rosengarten C, deAlmeida A, Stanley CP, Wessels A, Gourdie RG, Thompson RP, and Sedmera D.** Hemodynamics is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system. *Circ Res* 93: 77-85, 2003.
- Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE, Jalife J, and Fishman GI.** Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development* 128: 1785-1792, 2001.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, and Beyer EC.** Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83: 1359-1400, 2003.
- Saffitz JE, Kanter HL, Green KG, Tolley TK, and Beyer EC.** Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. *Circ Res* 74: 1065-1070, 1994.
- Saffitz JE, Schuessler RB, and Yamada KA.** Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovasc Res* 42: 309-317, 1999.
- Sankova B, Benes J, Jr., Krejci E, Dupays L, Theveniau-Ruissy M, Miquerol L, and Sedmera D.** The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. *Cardiovasc Res* 95: 469-479.
- Sano T and Yamagishi S.** Spread Of Excitation From The Sinus Node. *Circ Res* 16: 423-430, 1965.
- Sedmera D, Pexieder T, Hu N, and Clark EB.** A quantitative study of the ventricular myoarchitecture in the stage 21-29 chick embryo following decreased loading. *Eur J Morphol* 36: 105-119, 1998.
- Sedmera D, Wessels A, Trusk TC, Thompson RP, Hewett KW, and Gourdie RG.** Changes in activation sequence of embryonic chick atria correlate with developing myocardial architecture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1646-1652, 2006.
- Sedmera D, Reckova M, Rosengarten C, Torres MI, Gourdie RG, and Thompson RP.** Optical mapping of electrical activation in the developing heart. *Microsc Microanal* 11: 209-215, 2005.
- Sepp R, Severs NJ, and Gourdie RG.** Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 76: 412-417, 1996.
- Shah M, Akar FG, and Tomaselli GF.** Molecular basis of arrhythmias. *Circulation* 112: 2517-2529, 2005.

Simon AM, Goodenough DA, and Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol* 8: 295-298, 1998.

Sohl G and Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232, 2004.

Tamaddon HS, Vaidya D, Simon AM, Paul DL, Jalife J, and Morley GE. 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, 2000.

Tawara S. Das Reizleitungssystem des Säugetierherzen. Eine anatomisch-histologische studie über das Atrioventricularbündel und die Purkinjeschen Fäden. *Jena, Verlag v. Gustav Fischer*, 1906

Takamatsu T. Arrhythmogenic substrates in myocardial infarct. *Pathol Int* 58: 533-543, 2008.

Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, and Yeager M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283: 1176-1180, 1999.

Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, and Kodama I. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 86: 871-878, 2000.

van Kempen MJ, Fromaget C, Gros D, Moorman AF, and Lamers WH. Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ Res* 68: 1638-1651, 1991.

van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, and de Bakker JM. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* 109: 1048-1055, 2004.

van Rijen HV, van Veen TA, van Kempen MJ, Wilms-Schopman FJ, Potse M, Krueger O, Willecke K, Opthof T, Jongsma HJ, and de Bakker JM. Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation* 103: 1591-1598, 2001.

Verheijck EE, van Kempen MJ, Veereschild M, Lurvink J, Jongsma HJ, and Bouman LN. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res* 52: 40-50, 2001.

Verheule S, van Batenburg CA, Coenjaerts FE, Kirchhoff S, Willecke K, and Jongsma HJ. Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10: 1380-1389, 1999.

Verheule S and Kaese S. Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse models. *Front Pharmacol* 4: 81.

von Olshausen K, Schwarz F, Apfelbach J, Rohrig N, Kramer B, and Kubler W. Determinants of the incidence and severity of ventricular arrhythmias in aortic valve disease. *Am J Cardiol* 51: 1103-1109, 1983.

Wessels A, Vermeulen JL, Verbeek FJ, Viragh S, Kalman F, Lamers WH, and Moorman AF. 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, 1992.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, and Sohl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383: 725-737, 2002.

Winterton SJ, Turner MA, O'Gorman DJ, Flores NA, and Sheridan DJ. Hypertrophy causes delayed conduction in human and guinea pig myocardium: accentuation during ischaemic perfusion. *Cardiovasc Res* 28: 47-54, 1994.

Witkowski FX, Clark RB, Larsen TS, Melnikov A, and Giles WR. Voltage-sensitive dye recordings of electrophysiological activation in a Langendorff-perfused mouse heart. *Can J Cardiol* 13: 1077-1082, 1997.

Witt AL, and Peters NS. The role of gap junction in the arrhythmias of ischemia and infarction. *Heart Rhythm* 9, 308-311, 2012

8. Seznam publikací autora a jeho podíl na práci

Články přímo související s prací:

1. [Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload.](#); **Benes J Jr**, Melenovsky V, Skaroupkova P, Pospisilova J, Petrak J, Cervenka L, Sedmera D. *Anat Rec (Hoboken)*. **2011** Jan;294(1):102-11.

IF: 1,473

Podíl J.B. na práci: konfokální mikroskopie, analýza takto získaných dat, zpracování dat do podoby článku

2. [The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development.](#) Sankova B, **Benes J Jr**, Krejci E, Dupays L, Theveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sedmera D. *Cardiovasc Res*. **2012** Sep 1;95(4):469-79. Epub 2012 Jun 27.

IF: 6,064

Podíl J.B. na práci: optické mapování a zpracování dat z Cx40 deficitních myší

3. The role of connexin40 in developing atrial conduction

Benes J, Jr., Ammirabile G, Sankova B, Campione M, Krejci E, Kvasilova A, Sedmera D

(in revision)

Podíl J.B. na práci: optické mapování, analýza a zpracování dat do podoby článku

Ostatní publikace autora:

4. [Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats.](#) Melenovsky V, Benes J, Skaroupkova P, Sedmera D, Strnad H, Kolar M, Vlcek C, Petrak J, **Benes J Jr**, Papousek F, Oliyarnyk O, Kazdova L, Cervenka L. *Mol Cell Biochem*. **2011** Aug;354(1-2):83-96.

IF: 2,057

Podíl J.B. na práci: morfologická analýza modelu srdečního selhání

5. [Pitx2 confers left morphological, molecular, and functional identity to the sinus venosus myocardium.](#) Ammirabile G, Tessari A, Pignataro V, Szumska D, Suter Sardo F, **Benes J Jr**, Balistreri M, Bhattacharya S, Sedmera D, Campione M. *Cardiovasc Res*. **2012** Feb 1;93(2):291-301. Epub 2011 Nov 23.

IF: 6,064

Podíl J.B. na práci: spolupráce a pomoc s optickým mapováním