

Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Antropologie a genetika člověka



Bc. Veronika Břežná

Mapování buněčné populace exprimující Sonic hedgehog při embryonálním
vývoji srdce

Mapping of the cell population expressing Sonic hedgehog during the
embryonic development of heart

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Mária Hovořáková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Hana Kolesová, Ph.D.

Praha, 2022

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.4.2022

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Márii Hovořákové PhD. za vedení této práce, za její podporu a vynaložený čas a energii. Dále děkuji svým kolegyním z Laboratoře experimentální embryologie za pomoc při praktické části této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i své konzultantce RNDr. Haně Kolesové Ph.D. za cenné rady v oblasti anatomie.

ABSTRAKT

Sonic hedgehog je jeden ze tří členů rodiny Hedgehog, jejíž signální dráha hraje zásadní roli při řízení vývoje obratlovců. Právě Sonic hedgehog má převládající úlohu při organizaci vývojových procesů většiny orgánových systémů. Je zajímavé, že jeho přímá exprese či příspěvek populací exprimujících tuto signální molekulu v myokardu nebyla nikdy popsána.

Cílem této práce bylo pokusit se detekovat buňky, které exprimovaly Sonic hedgehog přímo v srdeční tkáni se zaměřením na myokard. Tyto buňky jsme sledovali od embryonálního dne 10,5 do 16,5 a dále postnatálně. Rovněž jsme hodnotili aktuální expresi Sonic hedgehog v srdeční tkáni od embryonálního dne 12,5 do embryonálního dne 15,5. K detekci buněčných linií exprimujících Sonic hedgehog jsme využili CreLoxP systém, X-galové barvení, fluorescenční a konfokální mikroskopii. Přítomnost buněk, které exprimovaly Sonic hedgehog v minulosti jsme ve vyvíjejícím se srdci rovněž hodnotili s pomocí imunohistochemie.

Dle našich výsledků byla v myším myokardu prenatálně i postnatálně prokázána přítomnost descendentní linie buněk v minulosti exprimujících Sonic hedgehog. Z provedené analýzy vyplývá, že tyto buňky lze v srdeční tkáni detekovat od embryonálního dne 10,5 až do postnatálního období. Aktuální exprese *Shh* v srdeční tkáni v embryonálních dnech 12,5 až 14,5 nalezena nebyla.

Tato studie přinesla zásadní nové poznatky v oblasti vývoje srdce a mohla by v budoucnu pomoci v boji proti srdečním vývojovým vadám a také v hledání nových přístupů pro regeneraci srdeční tkáně pomocí cílené genové terapie.

Klíčová slova: Sonic hedgehog, vývoj srdce, myš, embryogeneze, myokard

ABSTRACT

Sonic hedgehog is one of three members of the Hedgehog family, whose signaling pathway plays a crucial role in controlling the development of vertebrates. Sonic hedgehog has an important role in organizing the developmental processes of majority of organ systems. Interestingly, its direct expression or a contribution of cell lineages expressing this signaling molecule in the myocardium has never been described.

The aim of this work was to try to detect the cells that expressed Sonic hedgehog directly in the heart tissue with a focus on the myocardium. We monitored these cells from embryonic day 10.5 to 16.5 and then postnatally. We also evaluated current Sonic hedgehog expression in cardiac tissue from embryonic day 12.5 to embryonic day 15.5. We used the CreLoxP system, X-gal staining, fluorescence and confocal microscopy to detect cell lines expressing Sonic hedgehog. We also assessed the presence of cells that expressed Sonic hedgehog in the developing heart in the past using immunohistochemistry.

According to our results, the presence of a descendant cell lineage expressing Sonic hedgehog in the past was demonstrated prenatally and postnatally in the mouse myocardium. The performed analysis shows that these cells can be detected in cardiac tissue from embryonic day 10.5 till the postnatal period. No actual expression of *Shh* was found in cardiac tissue at embryonic days 12.5 to 14.5.

This study has brought new significant knowledge in the heart development and it could help in the future to prevent developmental heart defects as well as to find new approaches for cardiac tissue regeneration using targeted gene therapy.

Keywords: Sonic hedgehog, heart development, mouse, embryogenesis, myocardium

Obsah

Seznam zkratek	7
1. Úvod.....	8
2. Literární přehled	10
2.1. Vývoj srdce	11
2.1.1. Srdeční trubice	13
2.1.2. Srdeční klička	15
2.1.3. Růst srdce.....	18
2.1.4. Výtokový trakt	18
2.2. Specifika vývoje srdce u myší.....	18
2.2.1. Primární řasinky ve vývoji srdce myší	21
2.3. Sonic hedgehog a vývoj srdce.....	23
2.3.1. Signální dráha Sonic hedgehog.....	24
2.3.2. <i>Shh</i> ve faryngovém endodermu	24
2.3.3. <i>Shh</i> exprese v neurální liště a vývoj srdce	24
2.4. Vývojové vady srdce spojené s poruchami exprese <i>Shh</i> v raném vývoji	25
2.4.4. Vývojové vady srdce u myší v souvislosti s <i>Shh</i>	27
2.5. Regenerace srdce.....	28
3. Cíle práce	31
4. Metodika práce	35
4.1. Použitý materiál	35
4.2. Embryonální odběr.....	37
4.3. Zjištění positivity embryí.....	38
4.4. Detekce RFP.....	39
4.5. Detekce aktivity B-galaktosidázy	39
4.6. Dokumentace vzorků	41
4.7. Histologické zpracování.....	41
4.7.1. Zalévání do parafínu	41
4.7.2. Imunohistochemie fluorescenční	42
4.7.3. Imunohistochemie s DAB reakcí.....	44
4.7.4. Klasické barvení	46
5. Výsledky	48
5.1. Postnatální analýza přítomnosti <i>Shh</i> descendentních buněčných linií v srdci	48
5.2. Prenatální analýza přítomnosti <i>Shh</i> descendetních buněčných linií v srdci.....	49

5.2.1.	Embryonální den 10,5	50
5.2.2.	Embryonální den 11,5	51
5.2.3.	Embryonální dny 12,5 až 15,5	54
5.2.4.	Embryonální den 16,5	59
5.3.	Analýza aktuální exprese <i>Shh</i> v srdeční tkáni	60
6.	Diskuse	62
6.1.	Poloha a význam buněk exprimujících <i>Shh</i>	62
6.2.	Původ buněk exprimujících <i>Shh</i>	63
6.3.	Využití v medicíně	65
7.	Závěr	67
8.	Použitá literatura	68

Seznam zkratek

Dhh	Desert hedgehog
ED	Embryonální den
FHF	Primární srdeční pole
GFP	Zelený fluorescenční protein (Green fluorescent protein)
Gli	Glioblastom
Gli3	Glioblastom3
HH	Hedgehog signální dráha
H-H	Stádia podle Hamburger – Hamilton
Ihh	Indian hedgehog
P	Počet dní po narození
Pdgfra	Receptor růstového faktoru z destiček
Ptc	Patched
Ptc1	Patched1
Ptc2	Patched2
RFP	Červený fluorescenční protein (Red fluorescent protein)
SHF	Sekundární srdeční pole
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
Wnt	Wingless/Int-1

1. Úvod

Srdce je svalový orgán se čtyřmi dutinami, jehož úkolem je kontinuální pumpování krve, kterou tak pohání cévami po celém těle. Krev následně umožňuje výživu a výměnu látek. Srdce je uloženo za sternem v perikardu. Hrot srdce směřuje ventrolaterálně doleva. Srdeční stěna je tvořena třemi vrstvami směrem od dutiny na povrch, a to endokardem, myokardem a epikardem. V myokardu a subepikardiálně se nacházejí koronární arterie, které srdce vyživují. Jednotlivé dutiny srdce jsou odděleny srdečními chlopněmi. Vnitřní prostor srdce se dělí na pravou a levou předsň (*atrium*) a pravou a levou komoru (*ventriculus*). Srdeční skelet tvoří oporu chlopním, a dále také srdce funkčně rozděluje na oddíl síní a oddíl komor.

U člověka se cévní systém začíná vyvíjet třetí týden embryonálního vývoje, kdy už je výživa difuzí u embrya nedostačující. Kardiogenní pole se nejprve nachází v epiblastu, odkud migruje přes primitivní proužek nejprve do krční a následně hrudní oblasti. V důsledku ohýbání embrya se párové základy srdce spojí do jedné srdeční trubice. V této fázi, tedy okolo 21. dne vývoje, již začíná trubice pumpovat krev a další změny se dějí za plného chodu. 23. den vývoje se trubice začne ohýbat a vzniká srdeční klička a od 28. dne vývoje je srdce zavinuté do své anatomické polohy a dále se již jen prohlubují komory a síně.

Signální dráha Hedgehog (HH) hraje zásadní roli při řízení normálního vývoje obratlovců. Jeden ze členů rodiny Hedgehog je Sonic hedgehog (*Shh*). *Shh* protein je v raném vývoji produkován ve třech klíčových doménách, a to v neuroektodermu předního mozku, ektodermu obličeje a faryngeálním endodermu (Xavier *et al.*, 2016). Samotná exprese *Shh* v raných stádiích ve vyvíjejícím se srdci nebyla detekována, avšak, jak bylo zmíněno, *Shh* je exprimován ve ventrální neurální trubici a ventrálním faryngeálním endodermu. Exprese *Shh* v těchto oblastech může přímo ovlivnit vývoj buněk, které se na vývoji srdce podílí (Goddeeris *et al.*, 2007).

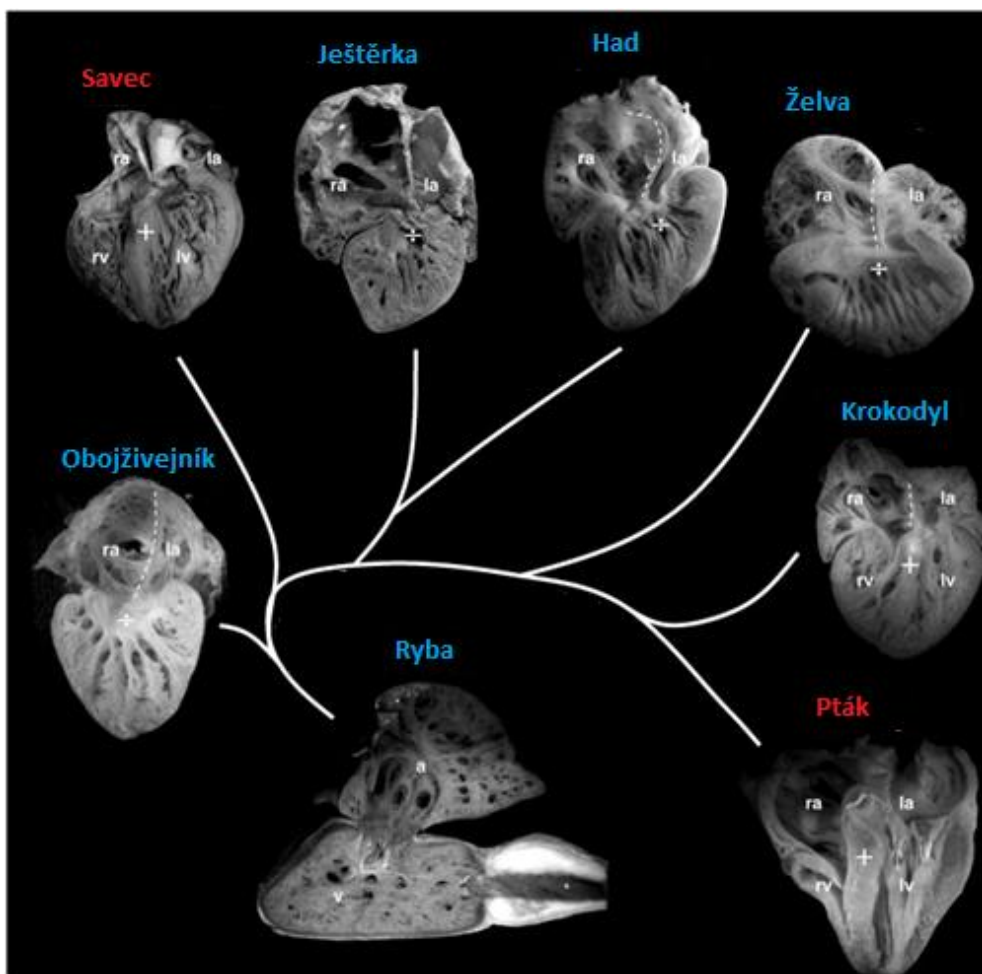
Kardiovaskulární onemocnění vykazují jednu z nejvyšších úmrtností na světě (Farhan *et al.*, 2019). Některá z těchto onemocnění jsou vrozená a jejich původ můžeme vystopovat až do embryonálního vývoje. Ne vše v oblasti vývoje srdce je však dostatečně probádáno. Studium fyziologického vývoje srdce umožňuje vzniku vývojových vad lépe porozumět, anebo jim dokonce předejít. Plné pochopení vývojových dějů v embryogenezi můžeme také využít při terapeutických opravách tkání jejich reaktivací (Kusano *et al.*, 2005), což může pomoci i při regeneraci srdeční tkáně u již dospělého člověka.

V rámci předložené práce bylo naším cílem v různých embryonálních stádiích mapovat buněčné populace, které exprimují nebo v minulosti exprimovaly *Shh*, a analyzovat jejich možný původ a úlohu ve vývoji srdce u myši.

2. Literární přehled

Během evoluce obratlovců prošel kardiovaskulární systém výraznými anatomickými i funkčními změnami. Časný vývoj srdce zahrnuje vytvoření srdeční trubice, vznik srdeční kličky a vytvoření komor a síní. Tyto procesy jsou velmi podobné u všech obratlovců, což naznačuje existenci evoluční konzervace stavebního plánu srdce (Jensen *et al.*, 2013).

U vývojově nejnižších živočišných druhů se nachází otevřený krevní oběh. Tekutinu zvanou hemolymfa zde do pohybu uvádí jediná hřbetní céva. U měkkýšů ještě pozorujeme otevřený krevní systém, který je ale uváděný do pohybu tepenným srdcem, kterým prochází pouze okysličená krev. Toto srdce má zpravidla jednu komoru i síň. Uzavřenou cévní soustavu můžeme pozorovat od členovců. Všichni strunatci se již vyznačují uzavřeným krevním systémem rozděleným na tepny a žíly. Srdce u strunatců najdeme ve všech fylogenetických stádiích od srdce trubicovitého po srdce čtyřkomorové. Časný kardiovaskulární vývoj, tedy základní formace trubicového srdce a hlavních plicních a systémových cév, je podobný u všech vyšších živočichů. Následný vývoj srdečních komor a síní se však značně liší (Crossley *et al.*, 2009). U paryb a ryb nacházíme srdce venózní, prochází jím tedy pouze odkysličená krev. Srdce má v tuto chvíli jednu síň a jednu trabekularizovanou komoru (Obr. 1, ryba) a stále se jedná spíše o mírně zakřivenou trubici. Obojživelníci mají oběh rozdělen na plicní a tělní, i srdce už je tedy arteriovenózní. Srdce má dvě síně a jednu komoru (Obr. 1, obojživelník) a dochází tedy k mísení okysličené krve s odkysličenou. Plazi mají stále ještě jednu komoru (Obr. 1, ještěrka, had a želva), která je už ovšem rozdělena neúplnou přepážkou a k mísení krve nedochází v plném rozsahu. Ptáci a savci nezávisle vyvinuli endotermii od svých předků podobných plazům a stejně tak savci i ptáci nezávisle vyvinuli srdce s úplnou septací komor a síní (Obr. 1, savec a pták). Silná kompaktní stěna levé komory jim následně umožnila značné zvýšení systémového krevního tlaku (Jensen *et al.*, 2013). Ptáci i savci mají tedy čtyřdílné srdce skládající se ze 2 síní a 2 komor, které plně oddělují plicní a tělní oběh, a tedy i krev okysličenou od odkysličené. Srdce savců a ptáků se tedy vyvíjejí podle stejného stavebního plánu jako u ektotermních obratlovců, jejich komory však na rozdíl od ostatních tvoří tlusté kompaktní stěny počínaje embryonálním dnem (ED) 12,5 u myši, 6. týdnem embryonálního vývoje u člověka a ve stádiu Hamburger – Hamilton (H-H) 32 u kuřete (Jensen *et al.*, 2013). V pochopení buněčných mechanismů pohánějících tvorbu srdeční tkáně jsou v současnosti stále nezodpovězené otázky, a to především kvůli strukturální a funkční složitosti srdce (Sereti *et al.*, 2018).



Obrázek 1: Typy srdcí u dospělých jedinců různých zástupců. Ryba: jedna síň (a) a jedna komora (v). Obojživelník, ještěrka, had a želva: jedna nerozdělená komora (+), ale rozdělená síň na pravou (ra) a levou (la). Savec, pták a krokodýl: plně rozdělená komora (+) na pravou (rv) a levou (lv) a plně rozdělená síň na pravou a levou. Endotermové jsou značeni červenou a ektotermové modrou. Krokodýl je jediný ektotermní živočich s plně rozděleným srdcem na 4 dutiny (upraveno podle Jensen *et al.*, 2013).

2.1. Vývoj srdce

Srdce (*Cor*) všech strunatců se tvoří z embryonálního disku, kde se laterální kardiogenní mezoderm spojuje ventrálně v embryonální střední čáře a vytváří srdeční trubici (Jensen *et al.*, 2013). Na rozdíl od myšího vývoje má lidská kardiogeneze mnohem delší začátek diverzifikace a expanze srdečních buněk (Lei *et al.*, 2009).

Cévní systém se u člověka začne vyvíjet 3. týden embryonálního vývoje, jelikož difuze zabezpečující přívod živin je v dané velikosti zárodku již nedostačující. Na začátku 3. týdne se ze 3 zárodečných listů (ektoderm, mesoderm a entoderm) začínají tvořit specializované tkáně. Kardiogenní buňky se nachází v epiblastu, laterálně od primitivního proužku a migrují přes něj, a to v přesně daném pořadí. První migrují buňky zakládající levou komoru

(*Ventriculus sinister*). Srdce se zakládá v rostrální části embrya před orofaryngovou membránou. Endoderm faryngu, uložený pod zakládajícím se srdcem, indukuje diferenciaci buněk v buňky myoblastu. Exprimován je zde v tomto období *Shh* (Dyer & Kirby, 2009) a bylo zjištěno, že faryngový endoderm si zachovává tuto expresi pro indukci srdce až do vytvoření třetího faryngeálního oblouku (Waldo *et al.*, 2001). V mesodermu se mezi perikardovou dutinou a endodermem tvoří krevní ostrůvky (angiogenní buňky). Dehiscencí těchto buněk vzniknou štěrbin, jejichž propojení dá vzniknout dvěma neúplně odděleným endotelovým trubicím. Mezenchym ležící mezi trubicemi a perikardovou dutinou diferencuje ve srdeční svalovinu.

Do nedávna ale nebylo jasné, zda nově generované kardiomyocyty pocházejí ze srdečních kmenových (progenitorových) buněk nebo z již existujících kardiomyocytů, které znovu vstupují do buněčného cyklu. Recentně bylo popsáno, že si progenitorové buňky srdce zachovávají proliferační potenciál a jsou hlavním zdrojem kardiomyocytů během vývoje (Sereti *et al.*, 2018). Nejnovější studie také ukazují, že epikardiální buňky mohou také fungovat jako progenitory kardiomyocytů (Rajagopal *et al.*, 2008). Kardiomyocyty jsou elektricky propojené a mají schopnost automacie, vyplývající z jejich vlastnosti samočinně, bez vnějšího podnětu, generovat elektrický potenciál, který spouští kontrakci. V důsledku toho buňka nebo skupina buněk s nejvyššími spontánními depolarizačními frekvencemi bude určovat tepovou frekvenci celého srdce a tyto buňky jsou označovány jako „pacemaker“. Jednotlivé kardiomyocyty spolu komunikují přes Gap-junctions (Jensen *et al.*, 2013).

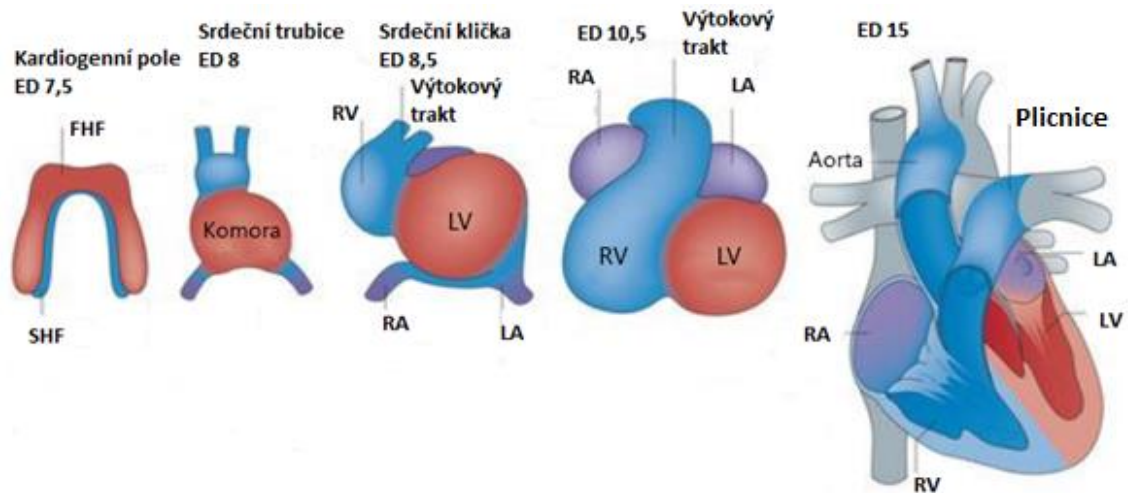
Ale i buňky kardiomyocytů se na úplném začátku vývoje srdce dělí, i když srdce dospělých savců je již dlouho považováno za neregenerativní orgán a kardiomyocyty, stavební jednotky srdce, za terminálně diferencované buňky. Zejména geny kódující buněčný cyklus, diferenciaci srdečních buněk a buněčnou migraci byly v postnatálních buňkách myši downregulovány, zatímco tyto stejné markery byly exprimovány ve vysokých hladinách u většiny kardiomyocytů embryí v ED 9,5 a ED 12,5. Naopak exprese genů kódujících strukturální proteiny a buněčný metabolismus byla v postnatální populaci upregulována, ale v dřívějších časových bodech byla exprimována na nízkých úrovních (Sereti *et al.*, 2018).

Čtyřkomorové srdce se skládá z různých typů buněk. Všechny tyto typy buněk přispívají ke strukturálním, biochemickým, mechanickým a elektrickým vlastnostem funkčního srdce. Síňové a komorové kardiomyocyty tvoří svalové stěny srdce, tedy myokard. Endoteliální

buňky tvoří endokard, vnitřní výstelku krevních cév a srdečních chlopní. Epikard přispívá k většině nemyokardiálních buněk v dospělém srdci (Van Wijk *et al.*, 2009), vznikají z něj prekurzory koronárních tepen a srdeční fibroblasty, které tvoří více než 50 % buněk srdce. Buňky převodního systému srdečního a Purkyňova vlákna v převodním systému jsou specializované kardiomyocyty, které generují a vedou elektrické impulsy (Xin *et al.*, 2013).

2.1.1. Srdeční trubice

Tvorba a růst primární srdeční trubice u embryí probíhá ve 20. až 25. dnu lidského vývoje (Sizarov *et al.*, 2011). Budoucí srdeční trubice s diferencující se svalovinou se nazývá kardiogenní pole, které obklopuje intra-embryonální dutina. Kardiogenní pole se dělí na dvě skupiny buněk: primární srdeční pole (FHF), umístěné vpředu, a laterálně a sekundární srdeční pole (SHF), umístěné vzadu a mediálně. FHF se bude vyvíjet hlavně do levé komory, části síní a atrioventrikulárního kanálu (Später *et al.*, 2013). SHF přispívá k tvorbě pravé komory, části síní a výtokového traktu (Obr. 2) (Sirbu *et al.*, 2020). Primárním účelem FHF je generování srdečního svalu a podpora kontraktilní aktivity primitivní srdeční trubice, zatímco progenitory odvozené od SHF přispívají k diverzifikaci linie srdečních buněk (Später *et al.*, 2013). SHF tedy nakonec přispívá k různým typům kardiovaskulárních buněk prostřednictvím vytvoření multipotentních srdečních progenitorů, například v pravé síni (*Atrium dextrum*) a výtokovém traktu (Lei *et al.*, 2009).



Obrázek 2: Schéma vzniku srdce u myši od embryonálního dne (ED) 7,5. Červeně je značeno primární srdeční pole (FHF) a jeho deriváty. Modře je značeno sekundární srdeční pole (SHF) a jeho deriváty. RA – pravá síň, RV – pravá komora, LA – levá síň, LV – levá komora (upraveno podle Xin *et al.*, 2013).

Kardiogenní pole, původně vznikající nad orofaryngovou membránou, se vlivem kraniálního růstu centrálního nervového systému dostane pod něj. Srdce a perikardová dutina sestupují tedy nejprve do oblasti krční a následně hrudní. Tento pohyb, spolu s ventrolaterálním ohybem embrya, vede k přibližování obou endotelových trubice, až dojde k jejich splynutí. V časných vývojových stádiích se primitivní srdeční trubice skládá ze srdečního svalu (základ myokardu) vystlaného jedinou vrstvou endotelových buněk (základ endokardu) (Andrés-Delgado *et al.*, 2016). Myokard se ztlušťuje a produkuje srdeční rosol. Vrstva myokardu tvořící srdeční trubici má tloušťku dvou buněk. Srdeční rosol je acelulární a odděluje myokard od endoteliálních buněk endokardu vystylajících úzké lumen (Sizarov *et al.*, 2011). Vzniká tedy mohutná vrstva mezibuněčné hmoty s vysokým obsahem kyseliny hyaluronové. Kraniální konec srdeční trubice diferencuje do arterií a dvou dorzálních aort, kaudální konec trubice se mění ve venózní a napojuje se na *venae vitellinae* (cévy žloutkového váčku) a později *venae umbilicales* (vedoucí k placentě).

Z bývalých mezotelových buněk, pokrývajících perikardovou dutinu, se vytváří proepikardový orgán a jeho následnou buněčnou migrací po povrchu srdce vzniká epikard. Srdeční trubice má v tuto chvíli 3 vrstvy: endokard, myokard a epikard. Epikardiální buňky se mohou diferencovat na endotelové buňky, buňky hladkého svalstva cév, fibroblasty a dokonce i kardiomyocyty (Zhou *et al.*, 2008). Arteriální konec srdce je přes aortální oblouky

uchycen ve faryngových obloucích, zatímco jeho venózní konec je fixován přes *septum transversum*.

U kuřat, které jsou často využívaným modelem pro studie srdečního vývoje a množství recentně známých poznatků bylo získáno právě jejich studiem, je primární srdeční trubice endokardiální a je obklopená buňkami myokardu, které se vyvíjejí z bilaterálních primárních srdečních polí, umístěných v mezodermu. Atrioventrikulární kanál, síně a superiorní konec *bulbus cordis* jsou formovány sekundárně do primární srdeční trubice, a to během vytváření kličky. Srdeční trubice se během vzniku srdeční kličky prodlužuje a souběžně v ní narůstá nový myokard. Atria jsou tvořena z kaudálních primárních srdečních polí, zatímco myokard a konec *bulbus cordis* je ze středního sekundárního srdečního pole. Přidání sekundárního myokardu k primární srdeční trubici představuje proces, v rámci něhož může dojít k vzniku patologií vývoje srdce (Waldo *et al.*, 2001).

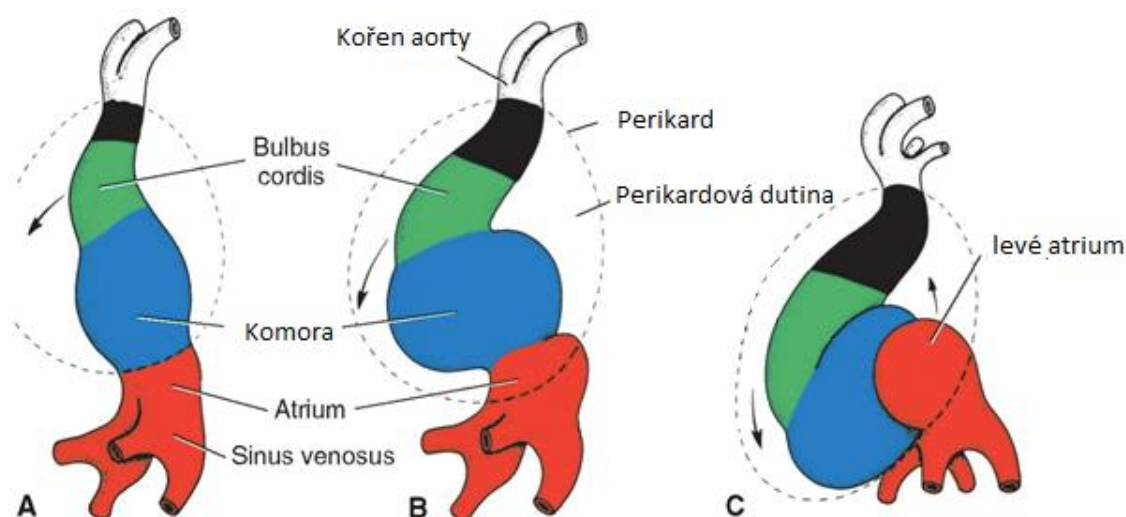
2.1.2. Srdeční klička

Na konci 3. týdne, od 21. dne vývoje, srdce již pulzuje a další vývoj se odehrává za jeho plné činnosti. 23. den se prodloužená srdeční trubice začíná ohýbat, tím vzniká srdeční klička (Obr. 3). Došlo k regionálnímu rozšíření srdeční trubice a vrstva myokardu zesílila, ačkoli trabekuly se ještě nevytvořily. Uvnitř je srdeční trubice stále vyplněna acelulárním rosolem, který odděluje myokard a endokard. Epikard dosud nepokrývá vnější povrch srdeční kličky (Sizarov *et al.*, 2011).

Srdeční klička dělí srdce na tři oddíly (Obr. 3A a 3B). Kraniálně se nachází *bulbus cordis* navazující na komoru, dále se nachází atrium. Přechod mezi komorou a *bulbos cordis* je zúžený (Xavier *et al.*, 2016). Komora je přes úzký *canalis atrioventricularis* spojena s atriem. *Atrium* dále pokračuje *sinus venosus*. *Canalis atrioventricularis* se po vytvoření a splynutí hlavních endokardových polštářů rozdělí na kanál pravý a levý. Kanál lemují endokardové polštáře postranní. Endokardové polštáře se zpočátku jeví jako regionální zesílení srdečního rosolu, extracelulární matrix, která se nachází mezi myokardem a endokardem primitivní srdeční trubice (Eisenberg & Markwald, 1995).

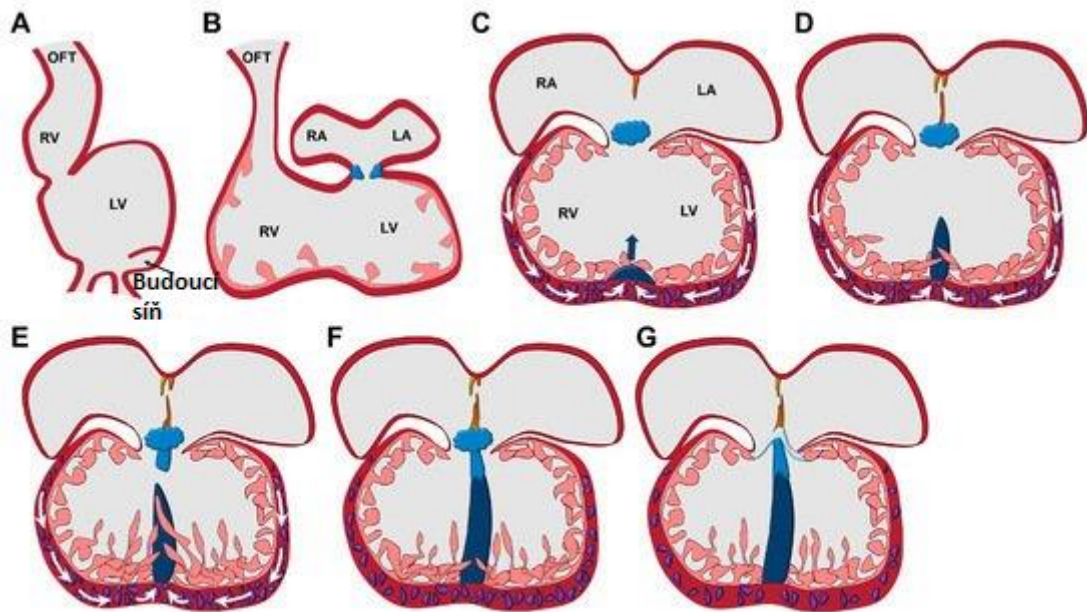
Dále se dělí i celé společné atrium na dvě oddělené síně, a to pomocí *septum primum*, které vyrůstá z kraniální oblasti atria směrem ke kaudálně položeným endokardovým polštářům. V tomto septu se nachází dočasně *foramen primum*, které později srůstá za vytvoření

foramen secundum v kraniální části *septum primum*. Vpravo od *septum primum* začne vznikat *septum secundum* rovněž s otvorem, tzv. *foramen ovale*. Ten ale zaniká při zapojení plicního oběhu při narození.



Obrázek 3: Proces tvorby smyčky při vývoji srdce. A: 22. den vývoje zárodku, B: 23. den vývoje, C: 24. den vývoje (upraveno podle Sadler, 2011).

Komory se v dospělém srdci nachází rovněž dvě. *Bulbus cordis* vytvoří komoru pravou a primitivní komora komoru levou (Obr. 4A). Obě části přechodně odděluje *septum interventriculare primitivum* a později *septum interventriculare*. Se vznikem srdeční kličky dochází k septaci i v oblasti atria, a tím vznikají dvě síně (Obr. 4B). K rozvoji dvou komor přispívá expanze dvou ložisek tvořících levou a pravou komoru, které jsou od sebe odděleny oblastí s potlačenou expanzí a vzniká tak přepážka (Jensen *et al.*, 2013). Expanze komor se časově shoduje s tvorbou svalové části komorového septa (Anderson *et al.*, 2014). Septum se zakládá v hrotu srdečním a roste směrem k endokardovým polštářům. Při jeho tvorbě hrají důležitou roli jak endokardové polštáře, tak myokard (Obr. 4C – 4F) (Zhang *et al.*, 2006). Rovněž obsahuje otvor *foramen interventriculare*, který se později uzavírá tenkou *pars membranacea septi interventriculare*.



Obrázek 4: Vznik septa oddělující komory a síně. A: srdeční trubice s počínajícím rozdělením na výtokový trakt (OFT), pravou komoru (RV) a levou komoru (LV). B: vznik srdeční kličky, a tedy i pravé síně (RA) a levé síně (LA). C: buňky ze stěn komor (fialové) začínají proliferovat a vytváří svalovou část komorového septa (tmavě modře), zároveň začíná tvorba septa v oblasti síní. D: do formace septa se připojují trabekuly (růžově). E: svalová část septa interaguje na molekulární úrovni s buňkami endokardových polštářů (světle modře) a ty začínají proliferovat. F: svalová část septa z buněk komor se spojí s membranózní částí septa z endokardových polštářů. G: buňky endokardových polštářů se mění na atrioventrikulární chlopně (upraveno podle Wiegering *et al.*, 2017).

Septum se nachází také mezi *bulbus cordis* a aortou, nazývá se *septum aorticopulmonare*.

Celý proces vytváření srdeční kličky je u lidí dokončen 28. embryonální den. Od 26. do 38. embryonálního dne se prohlubují komory a síně v takzvané komorotvorné fázi. Po dokončení kličky se ve stěně levé komory tvoří drobné trabekuly, pokryté výrazně tenčí vrstvou acelulárního rosolu než na vnitřním zakřivení s hladkými stěnami. O dva dny později, kdy začala septace srdce, se rozšiřování komor významně zrychluje a trabekuly v komorách expandují (Sizarov *et al.*, 2011).

Proliferace buněk v srdci se dá zobrazit jako dvoufázový model, přičemž myokardiální trubice zpočátku vzniká z vysoce proliferačně aktivních buněk z přilehlé coelomové stěny a poté, po fázi klidu, se reiniciací proliferace a diferenciace buněk tvoří čtyři oddíly srdce (Sizarov *et al.*, 2011).

2.1.3. Růst srdce

Aby srdce dostačovalo požadavkům rostoucího embrya, musí růst jak kapacitou, tak intenzitou svého výkonu. To je zvláště patrné během pozdní gestace, kdy srdce prochází fází rychlého růstu, konsolidací vedoucí ke ztrátě komorových trabekulací a tvorbě kompaktní zóny myokardu. Vzhledem k hustotě a velikosti nově vytvořeného kompaktního myokardu kyslík již nemůže difundovat z komorového lumen, aby dosáhl celého myokardu, což je kompenzováno vývojem specializované koronární vaskulatury (Sirbu *et al.*, 2020). Po narození procházejí kardiomyocyty dalším kolem syntézy DNA bez cytokineze, což způsobuje, že většina z nich je dvoujaderná nebo i více jaderná (Xin *et al.*, 2013). V tomto okamžiku buněčné dělení ustává a postnatálního srdečního růstu je dosaženo především hypertrofií (zvětšením) kardiomyocytů (Li *et al.*, 1996).

2.1.4. Výtokový trakt

Výtokový trakt srdce začíná vznikat jako kanál lemovaný endoteliálními buňkami obklopený srdečním svalem a k jeho vzniku přispívají jak buňky srdeční neurální lišty, tak i buňky z předního srdečního pole (Goddeeris *et al.*, 2007). Sekundární srdeční pole generuje „sekundární“ neboli definitivní odtokový myokard, který je odlišný od myokardu primární srdeční trubice, kvůli svému odlišnému původu a době přidání se do srdeční trubice, kdy blízkost primárního myokardu je nezbytná pro diferenciaci sekundárního myokardu (Waldo *et al.*, 2001). Vytvoření srdečního odtokového traktu je zásadní pro tvorbu aortálních a plicních tepen, do kterých výtokový trakt vyústuje, a poruchy jeho vytvoření vedou k těžkým vývojovým vadám. Arterie oblouku aorty vznikají jako kondenzace prekurzorů endoteliálních buněk a postupně se vyvíjejí v mezenchymu faryngálních oblouků (Washington Smoak *et al.*, 2005).

U kuřat je definitivní výtokový myokard generován kaudálně do primárního výtokového traktu, zatímco definitivní přítokový myokard se zdá být generován z kaudálního pokračování primárních kardiogenních polí (Waldo *et al.*, 2001).

2.2. Specifika vývoje srdce u myši

Podobně jako u jiných orgánů, i u srdce bylo nezanedbatelné množství poznatků o vývoji a jeho mechanismech získáno na myši jako na savčím modelu srdečního vývoje. Tato data

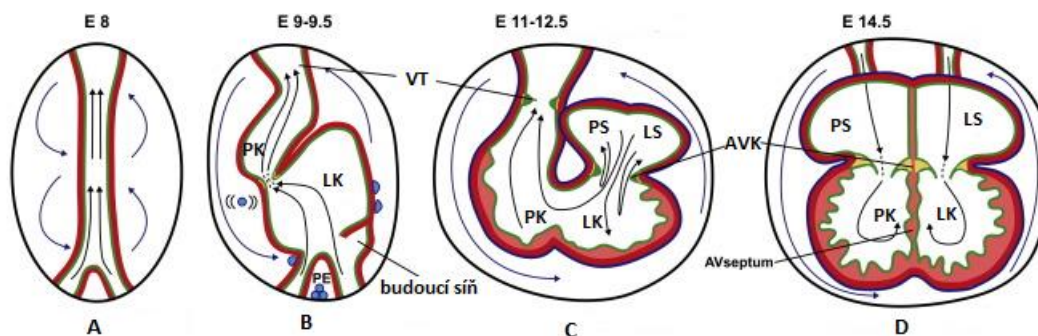
však tvoří velmi zásadní součást současného stavu znalostí a jsou extrapolována do obecné roviny platné i pro člověka navzdory určitým specifickým vývoje myšího srdce ve srovnání s člověkem. Vývoj srdce u myši probíhá na dně hluboce invaginovaného žloutkového váčku, což je v kontrastu s raným vývojem kuřete a člověka, který probíhá na téměř plochém žloutkovém váčku (de Boer *et al.*, 2012). Specifikace srdce začíná v raných až středních fázích gastrulace a vede ke vzniku populace přibližně 250 srdečních progenitorů v předním primitivním proužku, které následně migrují předozadně a vytvářejí strukturu podobnou podkově pod záhyby hlavy (Samira *et al.*, 2016). Tato migrace se uskutečňuje v embryonálním dni 6,5 (Xin *et al.*, 2013). U myších zárodků je splachnický mezoderm vysoce proliferačně aktivní a rychlost proliferace klesá až po migraci buněk do srdeční linie v embryonálním dni 7,75. Diferenciaci splachnického mezodermu na myokard doprovází zpomalení proliferace. Proliferace se následně zvyšuje v místech tvorby srdečních komor. Analýza proliferace buněk ukázala na postupný pokles rychlosti proliferace buněk komorových stěn a pokles rychlosti proliferace v trabekulách od základny k vrcholu (de Boer *et al.*, 2012). Na rozdíl od vývoje kuřete a člověka, kde lze jasně rozlišit fáze raného vývoje srdce, se v časném vývoji myšího srdce fáze tvorby trubice a vytváření komor překrývají (de Boer *et al.*, 2012). Tvorba a růst primární srdeční trubice u embryí myši odpovídá vývoji v ED 8-9 (Obr. 5A) (Sizarov *et al.*, 2011) a od stejného období můžeme u myši pozorovat poprvé tlukot v této chvíli ještě srdeční trubice (Chen *et al.*, 2010). Od 8. dne vývoje do 11. dne se počet kardiomyocytů zvyšuje ze 700 na 68 000. ED 8,5 se vyznačuje srústem trubice na dorzální straně a jejím následným stočením (Obr. 5B a 5C). Výtokový trakt se v ED 9,5 značně protáhne a vykazuje již charakteristický ohyb. U levé komory vykazuje výtokový trakt silnou proliferaci buněk a tvorbu trabekul (de Boer *et al.*, 2012). Od 9,5 do 12,5 embryonálního dne se prohlubují komory a síně v takzvané komorotvorné fázi (Sizarov *et al.*, 2011).

Během ED 10,5 u myši můžeme již jasně vidět arterie vystupující z aortálního oblouku (Washington Smoak *et al.*, 2005), zároveň můžeme pozorovat první rysy tvorby primárního síňového septa. Tato svalová struktura v ED 11,5 roste směrem k endokardovým polštářům vytvořeným v atrioventrikulárním kanálu a nese na svém předním okraji mezenchym. Jeho kraniální úpon se rozpadne a vytvoří *foramen secundum* v době, kdy mezenchymová část fúzuje s atrioventrikulárními endokardovými polštáři, přičemž touto fúzí zaniká *foramen primum*. Poté primární septum spolu s mezenchymálním výběžkem na svém kaudálním konci muskularizuje a tvoří základ definitivního síňového septa a dna *foramen ovale*

(Anderson *et al.*, 2014). *Foramen ovale* definitivně obliteruje po narození podobně jako u člověka.

U myši byl navržený model tvorby komorového septa, který předpokládá, že srdeční řasinky regulují proliferaci (detaily viz kapitola 2.2.1.). Komorové buňky mají na svém povrchu cilie a tyto srdeční řasinky obsahují součásti signalizační dráhy *Shh*. Nakonec zprostředkování těchto signálů srdečními řasinkami stimuluje buňky k proliferaci a tato proliferace vede k tlačení buněk do základny svalového komorového septa (Gerhardt *et al.*, 2013). Svalová část komorového septa je ale také tvořena pouhým zhutňováním samotných trabekul (Anderson *et al.*, 2014). Jak tlačené buňky, tak trabekulární formace, formují tedy svalovou složku komorového septa, která na své straně roste do určitého bodu a pak molekulárně interaguje s endokardovými polštáři. Endokardové polštáře začnou tvarovat membránovou složku komorového septa, která pak roste směrem k svalovému septu. Když se setkají, splynou a vývoj je ukončen (Gerhardt *et al.*, 2013).

V ED 12,5 již v embryu nacházíme klasické čtyřkomorové srdce (de Boer *et al.*, 2012). Na konci ED 12,5 se endokardové polštáře spojí, čímž rozdělí dutinu původně společného atrioventrikulárního kanálu na samostatný pravý a levý atrioventrikulární otvor (Anderson *et al.*, 2014). Stejně jako u lidí a kuřat je proliferace v myokardu myši vysoce regionalizovaná, s pomalejší proliferací v atrioventrikulárním kanálu a výtokovém traktu a rychlou proliferací ve formujících se komorách. Při komorové diferenciaci tvoří stěny levé a pravé komory trabekularizovaný myokard na luminální straně, zatímco zbývající vnější výstelka se později diferencuje na kompaktní myokard (de Boer *et al.*, 2012). Celý proces vytváření srdeční kličky je dokončen u myši 14,5. den (Obr 5D). Mezi ED 13,5 až 14,5 je pak do své anatomické pozice umístěna i aorta (Anderson *et al.*, 2014).



Obrázek 5: Vývoj srdce u myši. Endokard zeleně, myokard červeně, epikard modře, chlopně žlutě, modré kuličky značí buňky proepikardu (PE). Černé šipky značí tok krve a modré směr točení kličky. Výtokový trakt (VT), pravá síň (PS), levá síň (LS), atrioventrikulární kanál (AVK). A: Srdeční trubice v embryonálním dni (E) 8. Začínají kontrakce myokardu. B: Srdeční trubice v E 9-9,5. Počátek vzniku srdeční kličky. Začíná se formovat pravá komora (PK) a levá komora (LK). Buňky z proepikardu začínají osidlovat povrch srdce. C: Srdeční trubice v E 11-12,5. Komory se trabekularizují a síně jsou již vytvořeny. Formují se chlopně a epikard již pokrývá povrch srdce. D: Srdce v E 14,5 má již 4 oddělené dutiny. Probíhá závěrečná separace (upraveno podle Andrés-Delgado *et al.*, 2016).

Mechanismy, které jsou základem tvorby, růstu a diferenciaci primární srdeční trubice a komor jsou vysoce konzervované, jelikož se z větší části shodují u lidí, myši i kuřat (Sizarov *et al.*, 2011).

2.2.1. Primární řasinky ve vývoji srdce myši

Cilium je evolučně konzervovaná struktura vyčnívající z buněčného povrchu, která zabezpečuje některé základní role v různých buněčných procesech (Li *et al.*, 2015). Řasinky lze klasifikovat jako primární řasinky a klasické řasinky, ty se nacházejí na řasinkových epitelech, jako je například průdušnice. Primární řasinky jsou jediné řasinky, které se nacházejí téměř na každé nedělící se buňce, a jsou důležitým mechanismem, kterým buňky přijímají a přenášejí signály z extracelulárního prostředí (Davis *et al.*, 2006).

Primární řasinky jsou nepohyblivé a jsou to 1–15 μm dlouhé výběžky na většině buněk obratlovců (Gerhardt *et al.*, 2013). Signální dráha, která do značné míry závisí na zprostředkování signálů primárními řasinkami a hraje důležitou roli ve vývoji mnoha orgánů obratlovců, je signální dráha Hedgehog (Bangs *et al.*, 2017). Dalšími drahami signalizujícími přes řasinky jsou například Wingless/Int-1 (Wnt) a z destiček odvozený receptor růstového faktoru (Pdgfra) (Davis *et al.*, 2006). Primární řasinky jsou také důležité při chemické a mechanické komunikaci v mnoha tekutinou naplněných orgánech, takže by mohly mít

podobnou roli ve vývoji srdce. Jedna z možných dalších funkcí primárních řasinek v srdci je, že mohou také sloužit jako mechanosenzor reagující na průtok krve (Slough *et al.*, 2008).

Primární řasinky je v srdci možné detekovat v různých částech síní a komor v ED 9,5–12,5 a jsou nezbytné pro rozvoj srdeční pravolevé asymetrie, a to prostřednictvím své funkce v embryonálním organizátoru (Slough *et al.*, 2008). Bylo zjištěno že zkrácení primárních řasinek přímo v srdci vede k snížené proliferaci v oblastech, kde se v síních a komorách tyto řasinky v ED 11,5 vyskytují. V důsledku toho se v těchto oblastech zmenšuje tloušťka srdeční stěny (Gerhardt *et al.*, 2013). U embryí myši v ED 9,5 s úplně chybějícími řasinkami byl prokázán abnormální vývoj endokardových polštářků a kompaktního myokardu (Slough *et al.*, 2008).

V ED 9,5 jsou řasinky detekovatelné v celém embryonálním myším srdci. V této fázi došlo ke stočení srdeční trubice. Řasinky vystylají endotel jak pravé, tak levé primitivní síně. Řasinky se také nacházejí v endokardu obklopujícím tvořící se komorové trabekuly. Méně řasinek se nachází v raném kompaktním myokardu. Začínají se tvořit endokardové polštáře a na endotelu na jejich síňové straně jsou řasinky přítomny. Ty nalezneme i na mezenchymálních buňkách v endokardových polštářích (Slough *et al.*, 2008). Naproti tomu primární cilie nebyly v ED 10,5-12,5 detekovatelné na buňkách komorového septa, ani nebyla prokázána přítomnost řasinek na těch komorových buňkách, které jsou blízko základny komorového septa. Řasinky se v srdci myši vyskytují na buňkách myokardu a endokardu, ale ne na srdečních fibroblastech (Gerhardt *et al.*, 2013). Zajímavé je, že v ED 12,5 se srdce začíná pokrývat epikardem, a i tato vrstva obsahuje velké množství řasinek (Slough *et al.*, 2008).

V embryonálních srdcích jsou řasinky nezbytné pro zprostředkování proliferačních signálů, které jsou zodpovědné za proliferaci srdečních buněk. Řasinky v pozdějších stádiích již ale chybí. Proliferace buněk v srdcích od ED14,5 je tedy již řízena jiným způsobem (Gerhardt *et al.*, 2013).

Li *et al.* (2015) uvedli, že velké množství vrozených srdečních vad u myši je způsobeno mutacemi v genech kódujících ciliární proteiny (Li *et al.*, 2015). Nejzávažnější je úplná absence řasinek, která má zásadní vliv na všechny aspekty srdeční morfogeneze. Při úplném chybění řasinek v srdci je zajímavé, že endokardové polštáře jsou tvořeny menším počtem buněk (Slough *et al.*, 2008).

Primární řasinky byly nalezeny i v kuřecích embryonálních srdcích ve stádiích H-H 24-30, kdy dochází k síňové a komorové septaci a vývoji atrioventrikulární chlopně (Van der Heiden et al., 2006).

2.3. Sonic hedgehog a vývoj srdce

Signální dráha Hedgehog hraje zásadní roli při řízení normálního vývoje obratlovců. HH je rozhodující pro vývoj téměř každého orgánu u savců, stejně jako pro homeostázu a regeneraci. Na rozdíl od jiných hlavních vývojových signálních drah je HH signalizace obratlovců zcela závislá na vysoce specializované struktuře, primární řasince (Bangs *et al.*, 2017).

U savců najdeme tři členy rodiny Hedgehog, a to Sonic hedgehog, Indian hedgehog (Ihh) a Desert hedgehog (Dhh). Mezi nimi má *Shh* převládající roli při organizování vývojových procesů. Důležitost *Shh* ve vývoji srdce dokládá, že na rozdíl od *Shh* mutantních myší nebyly dosud vrozené srdeční vady popsány ani u *Ihh* nebo *Dhh* mutantních myší (Wiegeling *et al.*, 2017).

Shh v rané embryogenezi je produkován ve třech klíčových doménách, a to v neuroektodermu předního mozku, ektodermu obličeje a faryngeálním endodermu (Xavier *et al.*, 2016). Samotná exprese *Shh* v raných stádiích ve vyvíjejícím se srdci nebyla detekována, avšak *Shh* je exprimován ve ventrální neurální trubici a ventrálním faryngeálním endodermu. Exprese *Shh* v těchto oblastech může tedy přímo ovlivnit vývoj buněk, které se na vývoji srdce podílí (Goddeeris *et al.*, 2007).

Během biosyntézy *Shh* proteinu se autokatalýzou vytváří fragment, modifikovaný lipid s aminokoncem, který je zodpovědný za veškerou známou signální aktivitu a který je evolučně vysoce konzervovaný. Je velmi neobvyklé, že extracelulární protein, jako je *Shh*, je palmitoylován, a tato skutečnost tedy dále přispívá ke komplexní povaze tohoto proteinu. *Shh* se uvolňuje z povrchu signálních buněk jako duální lipidový protein modifikovaný přidáním skupin cholesterolu a palmitátu v C-koncových, respektive N-koncových oblastech. Předpokládá se, že *Shh* působí jak jako induktor závislý na kontaktu s krátkým dosahem, ale také jako difuzní morfogen s dlouhým dosahem. V současné době není jasné, zda stejný molekulární druh *Shh* dokáže signalizovat oběma způsoby. Modifikace

cholesterolem a modifikace kyselinou palmitovou se ovšem nejspíše vyvinula jako součást mechanismu pro regulaci signalizace krátkého a dlouhého dosahu (Pepinsky *et al.*, 1998).

2.3.1. Signální dráha Sonic hedgehog

Pro všechny proteiny z rodiny Hedgehog existuje receptor Patched (Ptc), nacházející se na membráně primární řasinky (Wiegering *et al.*, 2017), který se váže na protein Smoothened (Smo), semitransmembránový receptor. Ten přenáší signál na transkripční faktory glioblastomu (Gli) (Gerhardt *et al.*, 2013) a je receptorem Patched inhibován v případě, že na něj není Hedgehog navázán. V nepřítomnosti HH zůstává Ptc na ciliární (řasinkové) membráně a Smo zůstává mimo cilium (Wiegering *et al.*, 2017).

2.3.2. *Shh* ve faryngovém endodermu

Shh je exprimován ve faryngovém endodermu sousedícím s kardiogenní oblastí, kde je exprimován jeho receptor Patched2 (Ptc2) s nejsilnější expresí v kaudálním úseku. Vypnutí Ptc2 u kuřat vede ke snížené proliferaci v této oblasti, *Shh* tedy udržuje proliferaci v progenitorových buňkách kardiogenního pole (Dyer & Kirby, 2009). Bylo zjištěno, že faryngový endoderm si zachovává schopnost pro indukci srdce až do vytvoření třetího faryngeálního oblouku (Waldo *et al.*, 2001). Tepna třetího faryngeálního oblouku je v myším embryu přítomna od 9,5 až 10 dne gestace (Hiruma *et al.*, 2002).

Pro přežití faryngeálního endodermu je autokrinním způsobem vyžadována endodermální signalizace *Shh*, která pravděpodobně produkuje sekundární signál potřebný pro přetrvávání předního srdečního pole a pro prodloužení endokardových polštářů odtokového traktu. *Shh* produkovaný ve faryngeálním endodermu autokrinním způsobem mezi ED 9,5 a ED 10,5 je nezbytný pro zachování předních srdečních polí a prodloužení výtokového traktu a je účinný i při odstranění receptoru Smo, i když běžně *Shh* přes Smo ve faryngálním endodermu signalizuje. Spíše se zdá, že exprese Smoothened je nutná pro pozdější fázi septace srdce mezi ED 10,5 a ED 12,5 (Goddeeris *et al.*, 2007).

2.3.3. *Shh* exprese v neurální liště a vývoj srdce

Buňky neurální lišty jsou ekto-mezenchymální buňky, které migrují z oblasti spojení povrchového ektodermu a neuroektodermu podél dorzální neurální trubice a osídlí četné

struktury v celém embryu (Washington Smoak *et al.*, 2005). *Shh* je vyžadován pro buňky srdeční neurální lišty, aby přežily a vytvořily endokardové polštáře odtokového traktu. *Shh* také zprostředkovává signalizaci do buněk myokardu, odvozených z předního kardiogenního pole, k dokončení septace. Gerhardt *et al.* (2013) se domnívají, že proliferace buněk komorového septa je regulována řasinkami. Regulaci zde zprostředkovává *Shh*, které signalizuje na *Pdgfra*, který je lokalizován v řasinkách. Primární řasinky tedy řídí srdeční proliferaci, která je nezbytná pro správný vývoj síňového a komorového septa. Nebyl zjištěn žádný protein glioblastom3 (*Gli3*) v řasinkách endokardových polštářů, což naznačuje, že tyto řasinky vůbec netransdukuje signalizaci *Shh* (Gerhardt *et al.*, 2013). Kromě toho vede v embryích *Shh* $-/-$ deficit tohoto genu k chybné lokalizaci buněčných derivátů z neurální lišty, a tudíž je *Shh* nezbytný i pro korektní migraci těchto buněk (Washington Smoak *et al.*, 2005).

Ve vývoji myších buněk neurální lišty byla prokázána důležitost *Shh* při inhibici *Smo* receptoru, jehož odstranění vedlo k vývojovým vadám embryí zhruba od poloviny březosti myši. Zásadní vliv *Shh* je patrný i u studií myších embryí s fenotypem *Shh* $-/-$. Tato embrya vykazují vývojové vady dříve než embrya s odstraněným receptorem *Smo*, což naznačuje dřívější autonomní roli buněk *Shh* ve vývoji buněk neurální lišty (Washington Smoak *et al.*, 2005).

Endodermálně produkovaný ligand *Shh* je z hlediska vývoje srdce zásadní, a to z několika důvodů. Za prvé je *Shh* nutný k přežití buněk z neurální lišty a jejich migraci do polštářů odtokového traktu (Goddeeris *et al.*, 2007). Za druhé *Shh* signalizuje buňkám myokardu pocházejícím z předních srdečních polí, aby dokončily septaci. A nakonec endodermální signalizace *Shh* autokrinním způsobem determinuje přežití faryngeálního endodermu, který pravděpodobně produkuje sekundární signál potřebný pro přežití předních srdečních polí a pro prodloužení odtokového traktu (Goddeeris *et al.*, 2007).

2.4. Vývojové vady srdce spojené s poruchami exprese *Shh* v raném vývoji

Vývojové vady srdce patří mezi nejčastější vývojové vady u člověka (Wyszynski *et al.*, 2010). Vyskytují se asi u 1 % živě narozených dětí. Neléčená vývojová vada srdce může vést až k srdečnímu selhání v prvních dnech života. Vrozené vývojové vady jsou široce kategorizovány jako strukturální, ovlivňující tvar, nebo funkční, ovlivňující funkčnost

orgánu nebo tělesného systému, v tomto případě srdce a krevního oběhu. Vývojové vady srdce lze obecně dále rozdělit na vady vedoucí k cyanóze a vady, které k ní nevedou.

V této kapitole budou vzhledem k zaměření této práce popsány vybrané vrozené vývojové vady srdce, u nichž byl zjištěn vztah k dráze HH.

2.4.1 Fallotova tetralogie

Jedná se o závažnou vrozenou multifaktoriální srdeční vadu, která se vyskytuje přibližně u 1 z 3 500 porodů a představuje až 10 % všech vrozených srdečních malformací (Villafañe *et al.*, 2013). Je charakterizovaná čtyřmi anomáliemi:

- 1) Defekt komorového septa
- 2) Dextropozice aorty
- 3) Stenóza plicnice
- 4) Hypertrofie pravé komory

Dále může být přítomen i defekt septa síní. Díky včasné chirurgické léčbě a pooperační péči se téměř všichni lidé narození s Fallotovou tetralogií v současné době dožijí dospělosti (Apitz *et al.*, 2009), i když 0,2 % pacientů ročně stále podléhá náhlé smrti vlivem selhání srdce (Villafañe *et al.*, 2013).

Jak bylo popsáno výše, jednou z vad, které jsou součástí Fallotovy tetralogie, je defekt komorového septa, který však může vznikat i jako vada samostatná (viz níže).

2.4.2. Defekt síňového/komorového septa

Největší nárůst incidence v poslední době sledujeme u defektů septa síní a komor (Gaze, 2018). Síňové/komorové septum je otvor, který umožňuje komunikaci mezi pravou a levou síní nebo komorou. Neúplná septace komor v srdci obratlovce, která narušuje oddělení obsahu obou komor, se nazývá defekt komorového septa (Wiegering *et al.*, 2017).

Mutace v mnoha genech, jejichž produkty pozitivně kontrolují HH signalizaci, vedou k rozvoji defektu komorového septa u myši, což ukazuje, že HH signalizace je důležitá pro správný vývoj komorového septa. Na vzniku komorového septa se kromě extrakardiální HH signalizace ve faryngeálním endodermu podílí i intrakardiální zprostředkování primárními řasinkami, která řídí proliferaci buněk myokardu v oblastech stěn komor. Pokles HH signalizace v důsledku dysfunkce řasinek v těchto oblastech má za následek zhoršenou

proliferaci myokardu, a nakonec výskyt tenčích komorových stěn u myší. V této souvislosti HH signalizace řídí růst svalové části komorového septa (Wiegering *et al.*, 2017). Defekty mohou existovat v kterékoli části svalového komorového septa a mohou být i vícečetné. Nejhorší varianta mnohočetných defektů je typicky popisována jako přepážka „swiss-cheese“ (přepážka typu švýcarského sýra). To lze dobře vysvětlit neúplným zhutněním trabekul, které tvoří apikální složku vyvíjejícího se septa (Anderson *et al.*, 2014).

U síní se nejčastěji jedná o *ostium secundum* (Gaze, 2018). Jedná se o perzistenci embryonálního *foramen ovale*.

2.4.3. Otevřený ductus arteriosus

Ductus arteriosus je krátká céva, která spojuje levou plicní tepnu se sestupnou aortou distálně od levé podklíčkové tepny. V prenatálním stádiu je to základní vaskulární struktura, která umožňuje okysličené krvi obejít plicní oběh, protože plíce se v tomto stádiu nezapojují do okysličování krve. Přetrvávající průchodnost arteriálního vývodu po 3 měsících věku u donošených dětí je běžnou formou vrozené kardiovaskulární abnormality představující 5–10 % všech vrozených srdečních vad (Gaze, 2018).

K vytvoření výtokového traktu přispívá SHF (Sirbu *et al.*, 2020) a buňky neurální lišty (Goddeeris *et al.*, 2007). Právě *Shh* je jedním z morfogenů, který má na reorganizaci neurální lišty značný vliv (Gerhardt *et al.*, 2013).

2.4.4. Vývojové vady srdce u myší v souvislosti s *Shh*

Myší embrya *Shh* ^{-/-} nejsou životaschopná, ale vykazují defekty faryngeálních oblouků (Goddeeris *et al.*, 2007), které vedou k srdečním a kraniofaciálním defektům. Defekty připomínají těžkou formu Fallotovy tetralogie, lidské vrozené vady s úplnou atrézií plicní tepny, a také syndrom u delecce 22q11 (Washington Smoak *et al.*, 2005).

V raných fázích vývoje embrya má ztráta exprese *Shh* dopad na přežití buněk faryngeálních oblouků a neurální lišty. U mutantů deficientních pro *Shh* je zmenšena pravá komora a výtokový trakt, což naznačuje přímé účinky *Shh* na specifikaci, proliferaci a celkové zapojení SHF (Dunwoodie, 2007). U myší s narušeným vývojem a prodloužením výtokového traktu je zajímavé, že tento defekt se začal projevovat již ve stádiu ED 9, a tedy před příchodem buněk z neurální lišty. V ED 10,5, kdy buňky z neurální lišty do výtokového

traktu migrují, byl následně defekt ještě prohlouben a stával se mnohem výraznějším (Washington Smoak *et al.*, 2005).

Myší embrya *Shh* *-/-* ve vývojových stádiích ED 16,5–18,5 vykazovala abnormální kardiovaskulární vývoj, který zahrnoval jedinou výtokovou tepnu vycházející z pravé komory namísto dvou cév, kde plicní kmen vychází z pravé komory a aorta vychází z levé komory. Aortální oblouk byl pravostranný namísto levostranný a vedl k vytvoření jediné středové krční tepny s abnormálními podklíčkovými tepnami. Nebyl přítomen *ductus arteriosus*. Celkově jsou srdce *Shh* deficientních myší v této fázi vývoje menší, stejně jako celá embrya. Koronární tepny a epikard jsou ale přítomny, a to zcela normální (Washington Smoak *et al.*, 2005).

Srdce dále vykazovala defekty komorového i síňového septa. Síňové septum bylo ve všech svých stádiích natolik defektní, že se srdce morfologicky jevílo jako jednosíňové. Atrioventrikulární chlopně byly přítomny, ale vzdálenost mezi nimi byla velmi malá (Washington Smoak *et al.*, 2005), z čehož můžeme usuzovat nízkou proliferaci buněk v oblasti endokardových polštářů, tak jak popisuje Slough *et al.* při úplném chybění řasinek v srdci (Slough *et al.*, 2008). S tím může souviset i defekt membránové části komorového septa, který byl také zaznamenán (Washington Smoak *et al.*, 2005).

U myší s deficiencí *Smo* nacházíme i v pozdějších stádiích srdce v podobě lineární trubice a nedochází u nich k jeho stočení. Navíc je u nich vývoj srdce celkově opožděn (Zhang *et al.*, 2001).

2.5. Regenerace srdce

Vývojové signalizační dráhy organizují interakce mezi endodermem, mesodermem, a ektodermem, což má za následek odlišnou tkáňovou stavbu, která umožňuje správnou funkci orgánů. Jakmile je vývoj orgánů dokončen, mnoho z těchto cest je potlačeno nebo omezeno na tkáňově specifickou údržbu kmenových buněk. Nově se ale zjišťuje, že některé z těchto drah mohou také reagovat na poranění (Kugler *et al.*, 2015).

Srdeční selhání zabíjí v současné době více lidí než jakákoli jiná nemoc. Obvykle je důsledkem nedostatku buněk srdečního svalu, kardiomyocytů, a terapie k regeneraci ztraceného myokardu by tedy mohla pomoci milionům pacientů každý rok. Konečným cílem výzkumu je tedy nepochybně i regenerace myokardu po jeho úbytku, aby se zabránilo

srdečnímu selhání. Regenerace srdce je dobře zdokumentována u obojživelníků, ryb a u vyvíjejících se savců (Laflamme & Murry, 2011). Navzdory tradičnímu názoru, že savčí kardiomyocyty se po diferenciaci přestávají dělit, současné výzkumy naznačují, že lidské kardiomyocyty se mohou po infarktu myokardu aktivně dělit (Beltrami *et al.*, 2001). A i když postrádají pozoruhodnou regenerační schopnost jako například srdce zebřičky, postnatální srdce savců také podléhají určitému stupni obnovy kardiomyocytů během stárnutí a onemocnění (Laflamme & Murry, 2011).

S regenerací myokardu souvisí i regenerace koronárních tepen, jejichž rozvoj zajišťuje v embryogenezi signální dráha Hedgehog (Washington Smoak *et al.*, 2005). Shh byl navržen jako jedna z možných molekul, které mohou podporovat proliferaci kardiomyoblastů a angiogenezi během regenerace myšího srdce, jelikož vyřazení signální dráhy *Shh* vedlo k srdeční dysfunkci u myší po infarktu myokardu. *Shh* je aktivován v procesu opravy po ischemii a silně indukuje expresi Patched1 (*Ptc1*), což ukazuje na postnatální aktivitu Hedgehog signální dráhy. Přenosem „naked“ DNA kódující *Shh* do myokardu bylo zjištěno, že Hedgehog dráha byla následně více aktivní ve fibroblastech a kardiomyocytech. To vedlo k zachování funkce levé komory u akutní i chronické ischemie myokardu, a to pomocí zvýšené neovaskularizace a snížením fibrózy a srdeční apoptózy. Přenos genu *Shh* také zvýšil příspěvek endoteliálních progenitorových buněk pocházejících z kostní dřene k neovaskularizaci myokardu (Kusano *et al.*, 2005).

V reakci na poškození srdce se aktivuje mezoteliální tkáňová vrstva obklopující srdce, nazývaná epikard, k proliferaci a akumulaci v místě poranění. Na rozdíl od zebřiček ale srdce dospělých savců tvoří v místě poranění fibrotické jizvy (Xin *et al.*, 2013). Transplantace kuliček nasáklých Shh na bázi komory u zebřiček stimuluje regeneraci epikardu po odstranění *bulbus arteriosus*, což naznačuje, že HH signalizace může nahradit vliv exprese v oblasti výtokového traktu. Komorový epikard má tedy výraznou regenerační kapacitu, regulovanou sousedním srdečním výtokovým traktem a HH signalizací. Vzhledem k tomu, že regenerace epikardu může podporovat růst myokardu a rozvoj koronárních tepen, může zacílení HH signalizace v epikardu představovat novou strategii pro opravu a regeneraci srdce (Wang *et al.*, 2015).

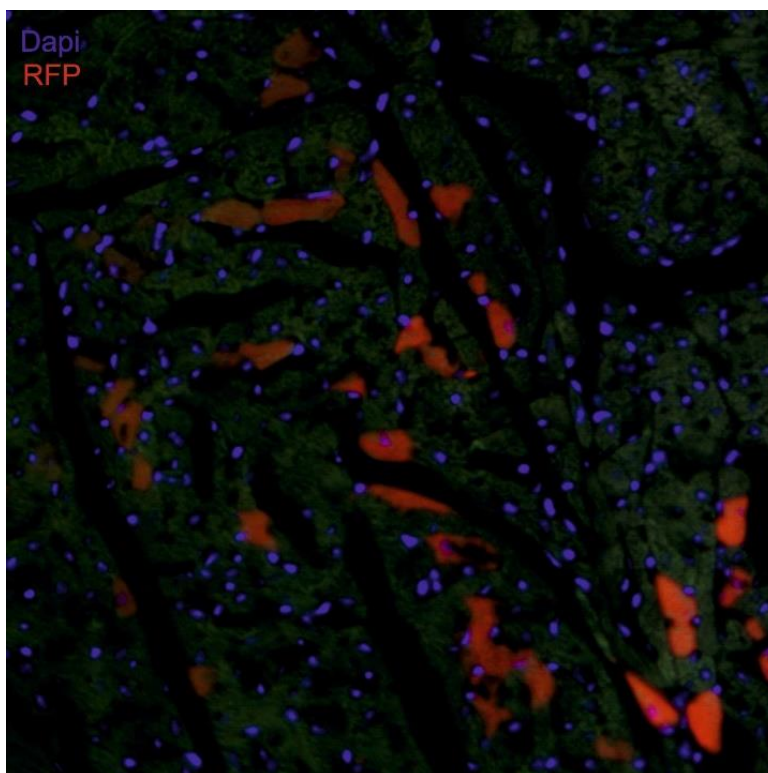
U savců je plná postnatální regenerace srdeční tkáně popsána pouze ve dnech krátce po narození. Při amputaci srdeční komory u jednodenních myších mláďat může srdce podstoupit plnou regeneraci bez tvorby jizev, podobně jako u dospělých zebřiček. Sledování

linie kardiomyocytů ukázalo, že nově vytvořené kardiomyocyty pocházejí spíše z proliferace již existujících kardiomyocytů než z populace kmenových buněk. Chirurgická resekce apexu komory 7 dní po narození, tedy v době, kdy se většina kardiomyocytů dostala do fáze G0 buněčného cyklu, má za následek ztrátu regenerační schopnosti v této oblasti (Xin *et al.*, 2013).

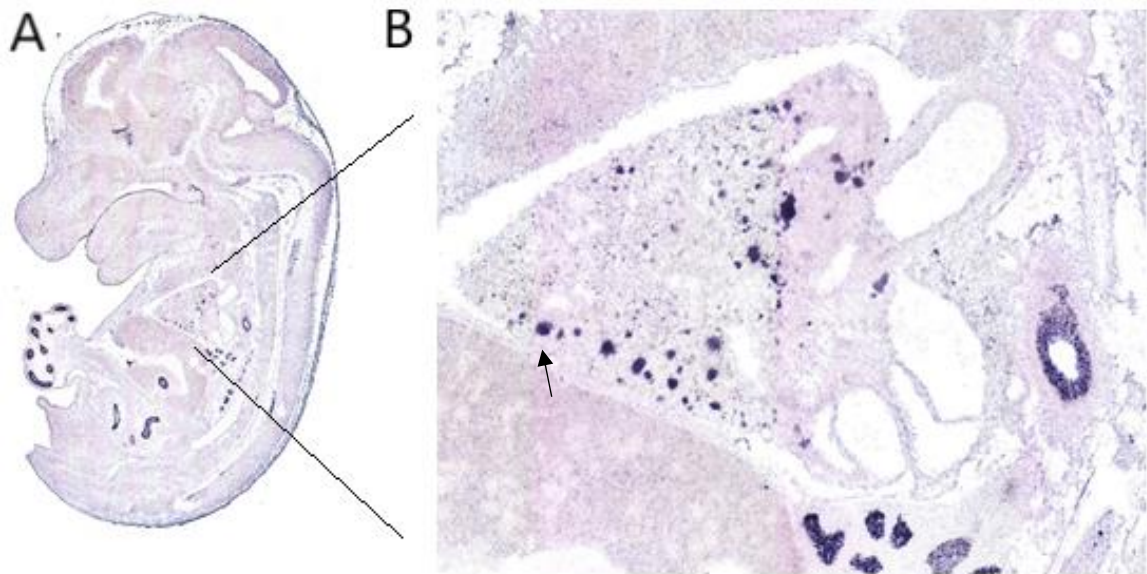
Již potvrzený průkaz znovuoaktivace *Shh* dráhy při poškození tkání máme například z plic. Tam se *Shh* dráha aktivuje v plicní tkáni u dospělých při plicních onemocnění, jako je plicní fibróza, astma, chronická obstrukční plicní nemoc a rakovina plic (Kugler *et al.*, 2015).

3. Cíle práce

Shh byl popsán jako signální molekula, která ovlivňuje vývoj srdce v nejranějších stádiích embryogeneze. Exprese této molekuly však přímo ve vyvíjejícím se myokardu nebyla popsána. Preliminární data z naší laboratoře získaná na postnatálním srdci myši ukazovala, že by se *Shh* exprimující buňky mohly na vývoji srdce jako takového přímo podílet (Obr. 6). V ED 14,5 navíc byla na již funkčním srdci myšího zárodku detekována, i když ne detailněji popsána, exprese *Shh* s pomocí in situ hybridizace (Obr. 7).



Obrázek 6: *Přítomnost descendní linie buněk exprimujících Shh v srdci postnatální myši. Srdce bylo odebráno 8 postnatální týden a v mezikomorovém septu byly detekovány potomci buněk v minulosti exprimujících Shh (RFP - červená fluorescence). Jádra buněk jsou značena modře (Dapi), vizualizováno pomocí imunohistofluorescence (z archivu laboratoře, zvětšeno 40x).*



Obrázek 7: *Detekce exprese Shh na myším embryu ED 14,5. A: sagitální řez myším embryem s vizualizací buněk exprimujících Shh. B: detail srdce s vizualizací buněk exprimujících Shh (šipka) (upraveno podle GenePaint, 2001).*

Zajímavé je, že v raných vývojových stádiích v srdci ještě žádné buňky descendentní linie buněk exprimujících *Shh* pozorovatelné nejsou (Obr. 8).



Obrázek 8: *Myší embryo na ED 9,5. Vizualizovaná descendenní linie buněk v minulosti exprimujících *Shh* (RFP – červeně), tyto buňky lze v tomto stádiu detekovat například ve vyvíjejícím se endodermu. Vyvíjející se srdeční oblast je RFP negativní – nejsou přítomné linie buněk exprimujících v minulosti *Shh* (šipka) (z archivu laboratoře).*

Na základě výše uvedeného jsme se rozhodli zjistit, zda buňky exprimující *Shh* skutečně v průběhu embryogeneze přímo přispívají k vývoji srdce, a od kterého vývojového stádia je v základu srdce lze pozorovat. S využitím transgenních myších kmenů umožňujících sledování populací buněk exprimujících *Shh* jsme se tedy zaměřili na detailní analýzu příspěvku těchto buněk v průběhu prenatálního vývoje srdce jako takového. V neposlední řadě jsme si za cíl položili provést longitudinální analýzu samotné exprese *Shh* v průběhu vývoje srdce myši s cílem ověřit možnost aktuální exprese *Shh* ve vyvíjejícím se základu srdce v průběhu embryogeneze.

Cíle:

1. Longitudinální analýza prenatalního vývoje myšího myokardu od ED 10,5 do 16,5 se zaměřením na sledování populace exprimující *Shh* od začátku vývoje s využitím Cre-loxP technologie, fluorescenční a konfokální mikroskopie a imunohistochemie.
2. Analýza aktuální exprese *Shh* v myokardu od ED 12,5 do 14,5 s využitím fluorescenční a konfokální mikroskopie a imunohistochemie.

4. Metodika práce

4.1. Použitý materiál

Jako experimentální organismus byla vybrána myš (*Mus musculus*), díky své rychlé embryogenezi (20 dní) a vysoké četnosti potomstva ve vrhu. Díky tomu jsme schopni analyzovat velké série vyvíjejících se embryí, což nám poskytuje dostatek materiálu k zajištění přesnosti a jednotnosti pozorovaných změn (Anderson *et al.*, 2014). Byly využity transgenní kmeny myši umožňující sledování buněčných populací exprimujících *Shh* pomocí exprese fluorescenčních proteinů, v našem případě se jednalo o zelený fluorescenční protein pro sledování aktuální exprese *Shh* a červený fluorescenční protein pro sledování descendentních buněčných linií, které exprimovaly *Shh* v minulosti. Vzájemné křížení myši TdTomato (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J) a B6.129S-Shhtm2(cre/ESR1)Cjt/J umožnilo sledovat i descendentní linie buněčné exprese v tamoxifen indukčním Cre-loxP systému. Dále byla použita embrya myši nesoucích gen pro Beta-galaktosidázu vložený do lokusu *Gt(ROSA)26Sor* (kmen B6.129S4-*Gt(ROSA)26Sor^{tm1LacZSor}/J*), u nichž byla descendentní linie buněk exprimujících *Shh* značena pomocí 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindolu, který je oxidován na modrou nerozpustnou sloučeninu, která je vidět pouhým okem (blíže viz níže). Zaměřili jsme se na vývojová stádia od ED 10,5 až po postnatální jedince (P) staré 1 den, kdy je již základ srdce vytvořen.

Pro sledování aktuální exprese *Shh* v prenatálním vývoji myokardu byly využity samice WT (wild type), přesněji kmen CD1, které byly připouštěny k samcům CD1 X B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J.

Všechny experimenty probíhaly v souladu se schváleným projektem pokusů (MSMT-272/2020–3) a s všeobecně platnými pravidly pro chov a ustájení laboratorních zvířat (č. 39/2009 Sb.).

Myši byly připouštěny na základě tohoto připouštěcího schématu:

CD1 X B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J

Gen pro fúzní produkt EGFP/Cre je vložen do lokusu *Shh*, což má za následek produkci zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) v buňkách, které normálně exprimují *Shh* mRNA.

Toto křížení nám u potomků umožnilo detekci buněk exprimujících *Shh* s pomocí vizualizace zelené fluorescence. Embrya získaná z tohoto křížení byla využita pro sledování aktuální exprese *Shh* pod fluorescenčním mikroskopem nebo po imunohistochemickém zpracování.

B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1LacZSor/J X B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J

V tomto křížení vizualizujeme descendentní linie buněk exprimujících *Shh* během embryonálního vývoje, a to od jeho počátku. Jedná se o kmen, který nese gen pro Beta-galaktosidázu (LacZ) vložený do lokusu *Gt(ROSA)26Sor*. Buňky jsou vizualizovány s využitím detekce galaktosidázové aktivity barvením X-gal. X-gal je organická sloučenina složená z galaktózy a indolu, která je štěpena galaktosidázou (kódovanou genem LacZ). Dochází ke vzniku galaktózy a 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindolu, který je oxidován na modrou nerozpustnou sloučeninu, která je viditelná pouhým okem. Tohoto křížení bylo využito pro prenatální i postnatální odběry.

Pro vizualizaci descendentní linie buněk exprimujících *Shh* během embryonálního vývoje byl použit Cre/loxP systém. Cre/loxP systém je založen na křížení myši se STOP sekvencí mezi 2 LoxP místy a genem pro LacZ s myšmi nesoucími gen pro cre rekombinázu. U potomstva tohoto křížení dojde k vyštěpení STOP sekvence a započne exprese LacZ ve všech buňkách, které transkribují gen pro cre rekombinázu. V našem případě v buňkách exprimujících *Shh*.

B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J X B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J

Z tohoto křížení byla embrya využita pro sledování aktuální exprese *Shh* pod fluorescenčním mikroskopem. Buňky exprimující *Shh* zde současně exprimují GFP. Zároveň u tohoto křížení můžeme sledovat populace buněk, které expimovaly *Shh* od začátku vývoje až do momentu odběru pomocí červené fluorescence (RFP).

Pro vizualizaci descendentní linie buněk exprimujících *Shh* během embryonálního vývoje byl použit Cre/loxP systém. Cre/loxP systém je založen na křížení myši se STOP sekvencí mezi 2 LoxP místy a genem pro RFP s myšmi nesoucími gen pro cre rekombinázu. U potomstva tohoto křížení dojde k vyštěpení STOP sekvence a započne exprese RFP ve všech

buňkách, které transkribují gen pro cre rekombinázu. V našem případě v buňkách exprimujících *Shh*.

B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J X B6.129S-Shhtm2(cre/ESR1)Cjt/J – tamoxifen inducibilní Cre-loxP systém

Pro vizualizaci descendentní linie buněk exprimujících *Shh* během embryonálního vývoje v přesně determinovaných stádiích byl použit tamoxifen inducibilní Cre/loxP systém. Tento systém nám umožnil detekovat descendentní linie buněk exprimujících *Shh* od aplikace tamoxifenu do odběru embryí. Opět byl použit Cre/loxP systém s využitím detekce RFP. Cre/loxP systém je založen na křížení myši se STOP sekvencí mezi 2 LoxP místy a genem pro RFP s myši nesoucími gen pro cre rekombinázu. U potomstva tohoto křížení dojde k vyštěpení STOP sekvence a započne exprese RFP ve všech buňkách, které transkribují gen pro cre rekombinázu od momentu aplikace tamoxifenu. V našem případě v buňkách exprimujících *Shh*.

Samice jednotlivých potřebných kmenů byly k samcům relevantních kmenů připouštěny ve večerních hodinách. Březost byla u samic potvrzena detekcí vaginální zátky následující ráno. Vaginální zátka se u myši tvoří po oplození, a tedy slouží jako poměrně spolehlivý indikátor zabřeznutí. Půlnoc před odečtením vaginální zátky byla určena jako ED 0,0. Následně byl sledován průběžný růst tělesné hmotnosti u myši, což potvrdilo probíhající březost. Podle data detekce vaginální zátky byl spočítán požadovaný embryonální den odběru, tedy prenatální vývojové stádium, ve kterém byla myš usmrcena.

4.2. Embryonální odběr

Březí samice byly usmrceny cervikální dislokací. Embrya byla po usmrcení samice vyjmuta z dělohy a zárodečných obalů a zbavena přebytečné tekutiny. Vývojové stádium bylo po odběru ještě potvrzeno zvážením jednotlivých embryí, jelikož tělesná hmotnost reflektuje vývojové stádium zárodku lépe než pouze ED (Peterka *et al.*, 2002). Všechna embrya, kromě těch z křížení B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1LacZSor/J X B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J byla přes noc fixována ve 4% PFA v PBS při 4°C a dále byla do zpracování uchována v 1% PFA rovněž při 4°C. Embrya LacZ/ShhGFP byla okamžitě po odběru podrobena X-gal barvení (viz níže).

Celkově bylo zabito 39 samic myši a odebráno 237 embryí z různých křížení (viz tab. 1).

Tabulka 1: Počet odebraných embryí z jednotlivých křížení v různém ED / P.

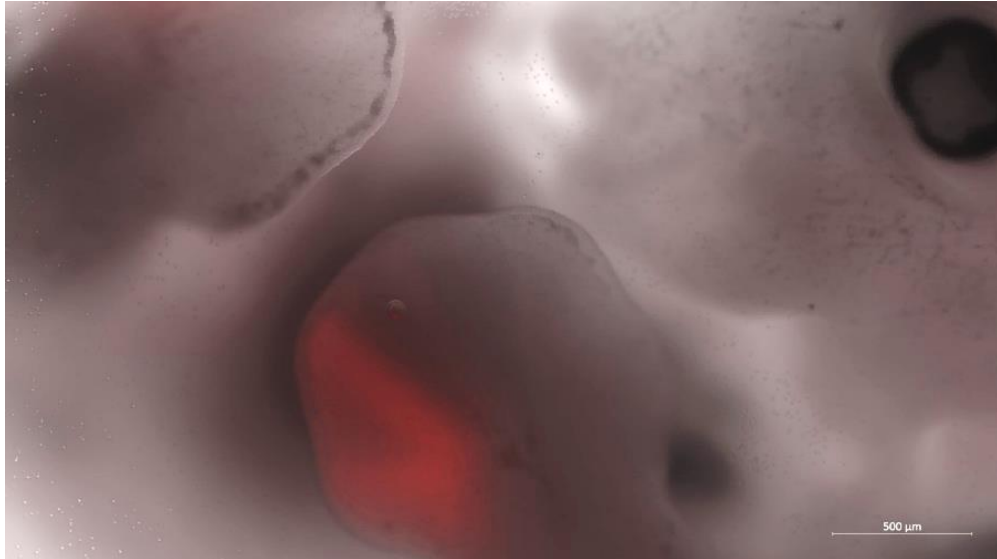
Odběr ED / P:	10,5	11,5	12,5	13,5	14,5	15,5	16,5	18,5	20	P1
CD1/ShhGFP			25	86	30					
LacZ/ShhGFP	9	7	1	2	8	2				5
TdTomato/ShhGFP	6	8		9		7	8	3		
TdTomato/ShhERCre			13			4			4	

Matkám embryí TdTomato/ShhERCre byl před odběrem aplikován tamoxifen, a to v rozmezí jednoho až čtyř dnů před usmrcením.

Aktuálně nevyužitá embrya či jejich části byly fixovány a uchovány pro pozdější využití. Embrya byla využita buď celá nebo pouze jejich srdce.

4.3. Zjištění positivity embryí

Pozitivita či negativita embryí z křížení CD1 X B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J, B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J X B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J a B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J X B6.129S-Shhtm2(cre/ESR1)Cjt/J (tamoxifen inducibilní) byla určována pomocí fluorescenčního mikroskopu. Folikuly v obličejové oblasti prokazatelně exprimují *Shh* (St-jacques *et al.*, 1998, Chiang *et al.*, 1999) a stejně tak se exprese *Shh* nachází v zóně polarizační aktivity v končetinových pupenech (Obr. 9) (Galli *et al.*, 2010). A proto byly obě tyto struktury použity na detekci positivity či negativity exprese GFP nebo RFP v embryích. K vizualizaci fluorescence byl použit fluorescenční mikroskop AXIO Vert.A1 (Zeiss, Jena - Německo) a kamera AxioCam 202 mono (Zeiss, Jena - Německo).



Obrázek 9: Expres RFP (červeně) v končetině embrya ED 12,5 v buněčné populaci exprimující v minulosti *Shh* v zóně polarizační aktivity v končetinovém pupenu u embrya na ED 9,5.

4.4. Detekce RFP

Srdce některých embryí (12 embryí CD1/ShhGFP v rozmezí ED 12,5 až 14,5 a 4 embrya TdTomato/ShhERCre v ED 12,5 a 15,5) byla promyta v PBS a následně projasňována v temnu při 4 °C ve SCALE A2 (viz níže) po dobu nezbytně nutnou pro jejich projasnění (doba projasňování se odvíjí od ED). Srdce byla následně focena na konfokálním mikroskopu Olympus BX61 (Tokyo – Japonsko) s lasery Olympus FLUOVIEW FV1000 a kamerou Olympus U-CMAD INFINITY 3. Detekována byla červená fluorescence značící descendentní linie *Shh* exprimujících buněk nebo zelená fluorescence značící aktuální expresi *Shh* proteinu.

SCALE A2:

- 240,24g Urea (CAS:57-13-6 – Carl Roth) rozpustíme v 800ml destilované vody
- Přidáme 1ml Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH) a 100 ml glycerolu (CAS:56-81-5 – penta chemicals unlimited)
- Promícháme a dolijeme destilovanou vodou do objemu 1000ml

4.5. Detekce aktivity B-galaktosidázy

Pro sledování buněčných populací exprimujících *Shh* byl využit Cre-LoxP systém, založený na expresi LacZ. Jedná se o detekci galaktosidázové aktivity pomocí X-gal barvení. X-gal

je organická sloučenina složená z galaktózy a indolu (5-bromo-4-chloro-indolyl- β D-galactopyranosid), která je štěpena galaktosidázou (kódovaná genem LacZ). Dochází ke vzniku galaktózy a 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindolu, který je oxidován na modrou nerozpustnou sloučeninu, 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo, která je vidět pouhým okem. Toto nám umožnilo sledovat všechny buňky u nichž došlo k transkripci *Shh* a následně i jejich potomky, jelikož buňky se po reakci modře zbarvily.

Všechna odebraná LacZ pozitivní embrya (34), případně jejich srdce, byla vložena do sodného fosfátového pufru, následně byly fixovány ve 4% PFA ve 4°C. Poté byly vzorky opět promyty v sodném fosfátovém pufru a inkubovány v barvicím roztoku. Po zabarvení byla embrya nebo jejich srdce promyta v PBS a dále fixována v 4% PFA (viz tab. 2). Další den byly vzorky nafoceny a dále zpracovávány (viz kapitoly 4.6. a dále).

Tabulka 2: *Protokol X-gal barvení.*

X-gal barvení	
4% PFA	20 minut
Fosfátový pufr	Proplach
Barvicí roztok	Individuální
PBS	3x 10 minut

Sodný fosfátový pufr je složený ze 115ml roztoku A a 385 ml roztoku B.

Roztok A: 6g NaH₂PO₄ · H₂O v 500 ml destilované vody

Roztok B: 13,4 g Na₂HPO₄ v 500 ml destilované vody

Barvicí roztok je složen z:

100 ml sodného fosfátového pufru

62,5 mg KCl 20,3 mg MgCl₂ · 6H₂O

126 mg K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O

98,7 mg K₃Fe(CN)₆

Těsně před použitím přidáme na 10 ml barvicího roztoku 240 μ l X-gal (50 mg/ml DMF).

4.6. Dokumentace vzorků

Srdce nebo embrya LacZ/ShhGFP byla nejprve zdokumentována vyfocením na stereomikroskopu Leica MZ16 (Pragolab) pomocí digitální kamery AxioCam 208 color (Zeiss).

4.7. Histologické zpracování

Histologické analýze byla podrobena neprojasněná fixovaná embrya nebo vypreparovaná srdce, a embrya nebo vypreparovaná srdce, která již prošla X-gal barvením. Vzorky byly nejprve zality do parafínu (viz kapitola 4.7.1.), nakrájeny na rotačním mikrotomu Leica RM2245 na řezy o 7 mikrometrech a následně podrobeny imunohistochemickému barvení (viz kapitoly 4.7.2. a 4.7.3.) nebo zabarveny přehlednou barvicí metodou (viz kapitola 4.7.4.).

4.7.1. Zalévání do parafínu

Vzorky pro účely imunohistochemie nebo histologického barvení byly odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou a přes toluen zality do parafínu dle standardního protokolu (srdce viz tab. 3 a embrya viz tab. 4).

Tabulka 3: *Protokol zalévání vypreparovaných srdcí do parafínu.*

Zalévání srdcí do parafínu	
70% etanol	Přes noc
80% etanol	Přes noc
96% etanol	3x vyměnit po 20 minutách
100% etanol	3x vyměnit po 20 minutách
Toluen 1	Pouze namočit
Toluen 2	Pouze namočit
Parafín P1A	30 minut
Parafín P1B	30 minut
Parafín P2	45 minut
Parafín P3	45 minut
Formička	Přes noc

Tabulka 4: Protokol zalévání embryí do parafínu.

Zalévání embryí do parafínu				
<i>Embryonální stádium</i>	<i>ED 10 a 11</i>	<i>ED 12 a 13</i>	<i>ED 14</i>	<i>ED 15 a 16</i>
70% etanol	Přes noc	Přes noc	Přes noc	Přes noc
80% etanol	Přes noc	Přes noc	Přes noc	Přes noc
96% etanol	3x vyměnit po 1 hodině	2x vyměnit po 1 hodině a po další výměně přes noc	2x vyměnit po 1 hodině a po další výměně přes noc	2x vyměnit po 1 hodině a po další výměně přes noc
100% etanol	3x vyměnit po 20 minutách	2x vyměnit po 30 minutách a po další výměně počkat hodinu	2x vyměnit po 45 minutách a po další výměně počkat hodinu	3x vyměnit po 1 hodině
Toluen 1	5 minut	10 minut	14 minut	13 minut
Toluen 2	5 minut	10 minut	14 minut	15 minut
Parafín P1A	30 minut	1 hodina	1 hodina	1 hodina
Parafín P1B	30 minut	1 hodina	1 hodina	1 hodina
Parafín P2	45 minut	1,5 hodiny	1,5 hodiny	Do večera
Parafín P3	45 minut	1,5 hodiny	1,5 hodiny	Přes noc
Formička	Přes noc	Přes noc	Přes noc	3 hodiny

Vzorky, které byly ponechány přes noc v parafínu, byly druhý den naorientovány a ponechány při pokojové teplotě do ztuhnutí parafínu. Následně byl vytvořen parafínový bloček a tkáň byla sériově nakrájena na mikrotomu Leica RM2245 na 7 mikrometrové řezy.

4.7.2. Imunohistochemie fluorescenční

Imunohistochemická analýza (viz tab. 5) byla prováděna na parafínových řezech embryí, anebo samotných srdcí (10 embryí CD1/ShhGFP v rozmezí ED 12,5 až 14,5, 4 embrya TdTomato/ShhERCre v ED 12,5 a 15,5 a 4 embrya TdTomato/ShhGFP v ED 16,5). Nejprve

byla tkáň deparafinizována za pomoci xylenu. Řezy byly následně rehydratovány sestupnou alkoholovou řadou.

Tabulka 5: *Protokol fluorescenční imunohistochemie.*

Imunohistochemie fluorescenční	
Xylen	2x vyměnit po 10 minutách
100% etanol	2x vyměnit po 10 minutách
96% etanol	2x vyměnit po 10 minutách
Promytí v PBS	2x vyměnit po 5 minutách
Inkubace ve vodní lázni (93 °C) v roztoku citrátu sodného dihydrátu	25 minut
Chladnutí v roztoku citrátu sodného dihydrátu pod tekoucí vodou	15 minut
Promytí v PBS	2x vyměnit po 5 minutách
0,1% triton v PBS	15 minut
Blokovací roztok	2 hodiny
Aplikace primární protilátky v blokačním roztoku (lednice 4 °C)	Přes noc
Promytí v PBS	3x vyměnit po 10 minutách
Aplikace sekundární protilátky v blokačním roztoku	1 hodina
Promytí v PBS	2x vyměnit po 10 minutách
Aplikace DAPi v blokačním roztoku	10 minut
Promytí v PBS	2x vyměnit po 10 minutách

Řezy byly následně zamontovány pod krycí sklo pomocí 80 % glycerolu a foceny na fluorescenčním mikroskopu.

Byly použity tyto primární protilátky:

Protilátka	Číslo	Poměr
Anti-DsRed2 – Rabbit	sc-101526, Santa Cruz	1:200
Anti-GFP – Rabbit	A-11122, ThermoFisher SCIENTIFIC	1:200
Anti-Cleaved Parp – Mouse	9548S	1:300
Mounting medium s DAPI	ab104139, Abcam	1:3000

Byly použity tyto sekundární protilátky:

Protilátka	Číslo	Poměr
Donkey anti-Rabbit IgG – Alexa 488	A-21206, ThermoFisher SCIENTIFIC	1:1000
Donkey anti-Mouse IgG - Alexa 488	A-21202, ThermoFisher SCIENTIFIC	1:1000
Wheat Germ Agglutinin – Alexa 488	W11261, ThermoFisher SCIENTIFIC	1:1000
Goat anti-Rabbit – Alexa 568	A-11036, ThermoFisher SCIENTIFIC	1:1000

4.7.3. Imunohistochemie s DAB reakcí

Imunohistochemická analýza (viz tab. 6) byla prováděna na parafinových řezech embryí, anebo samotných srdcí (2 embrya CD1/ShhGFP v ED 12,5, 1 jedinec LacZ/ShhGFP P1 a 1 embryo TdTomato/ShhGFP v ED 18,5). Nejprve byla tkáň deparafinizována za pomoci xylenu. Řezy byly následně rehydratovány sestupnou alkoholovu řadou. Protilátka byla vizualizována pomocí DAB reakce a celý řez byl následně histologicky obarven.

Tabulka 6: Protokol imunohistochemie s DAB reakcí.

Imunohistochemie s DAB reakcí	
Xylen	2x vyměnit po 10 minutách
100% etanol	2x vyměnit po 10 minutách
96% etanol	2x vyměnit po 10 minutách
Promytí v PBS	2x vyměnit po 5 minutách
2% H ₂ O ₂ v metanolu	45 minut
Promytí v PBS	2x vyměnit po 5 minutách
Inkubace ve vodní lázni (93 °C) v roztoku citrátu sodného dihydrátu	23 minut
Chladnutí v roztoku citrátu sodného dihydrátu pod tekoucí vodou	10 minut
Promytí v PBS	2x vyměnit po 5 minutách
0,1% triton v PBS	15 minut
Blokovací roztok	1,5 hodiny
Aplikace primární protilátky v blokačním roztoku (lednice 4 °C)	Přes noc
Promytí v PBS	3x vyměnit po 10 minutách
Blokovací roztok	1,5 hodiny
Aplikace sekundární protilátky v blokačním roztoku	1 hodina
Promytí v PBS	3x vyměnit po 15 minutách
Aplikace ABC kitu	30 minut
Promytí v PBS	3x vyměnit po 15 minutách
DAB reakce	Individuální (sledováno pod mikroskopem)
Promytí v PBS	5 minut
Histologické barvení	Individuální dle zvolené barvy
96% etanol	2x vyměnit po 1 minutě
100% etanol	2x vyměnit po 5 minutách
Xylen	2x vyměnit po 5 minutách

Řezy byly opět dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou a projasněny v xylenu. Následně byly řezy zamontovány pod krycí sklo pomocí DPX Mountant for histology a foceny na mikroskopu Leica DMLB s procházejícím světlem a kamerou Leica MC170 HD.

Byly použity tyto primární protilátky:

Protilátka	Číslo	Poměr
Anti-SOX2 –Goat	AF2018-SP, R&D systems	1:500
Anti-GFP-Rabbit	A-11122, ThermoFisher SCIENTIFIC	1:300

Byly použity tyto sekundární protilátky:

Protilátka	Číslo	Poměr
Rabbit anti-Goat IgG - Biotinylated	BA-5000, Vector laboratories	1:200
Goat anti-Rabbit IgG - Biotinylated	BA-1000, Vector laboratories	1:200

4.7.4. Klasické barvení

Přehledné barvicí metody byly využity na dobarvení řezů po barvení X-gal anebo DAB imunohistochemickou detekcí protilátek, případně pro obarvení histologických řezů srdcem na různých stádiích pro morfologickou analýzu. Analýza (viz tab. 7) byla prováděna na parafinových řezech embryí, anebo samotných srdcí. Nejprve byla tkáň deparafinizována za pomoci xylenu. Řezy byly následně rehydratovány sestupnou alkoholovu řadou. Řezy byly barveny buďto kombinací barev hematoxylin (jádro) a eosin nebo pouze jádrovou červení. Při barvení jádrovou červení se vynechalo barvení eosinem a následné promytí destilovanou vodou.

Tabulka 7: *Protokol klasického histologického barvení.*

Barvení hematoxylin – eosin nebo jádrová červeň	
Xylen	2x vyměnit po 10 minutách
100% etanol	2x vyměnit po 5 minutách
96% etanol	2x vyměnit po 5 minutách
Hematoxylin / jádrová červeň	Do 1 minuty (závisí na typu tkáně)
Promytí pod tekoucí vodou v kyvetě	12 minut
Promytí destilovanou vodou	5 minut
Eosin	5 až 50 sekund (závisí na typu tkáně)
Promytí destilovanou vodou	3x vyměnit po 1,5 minutách
96% etanol	2x vyměnit po 5 minutách
100% etanol	2x vyměnit po 5 minutách
Xylen	2x vyměnit po 10 minutách

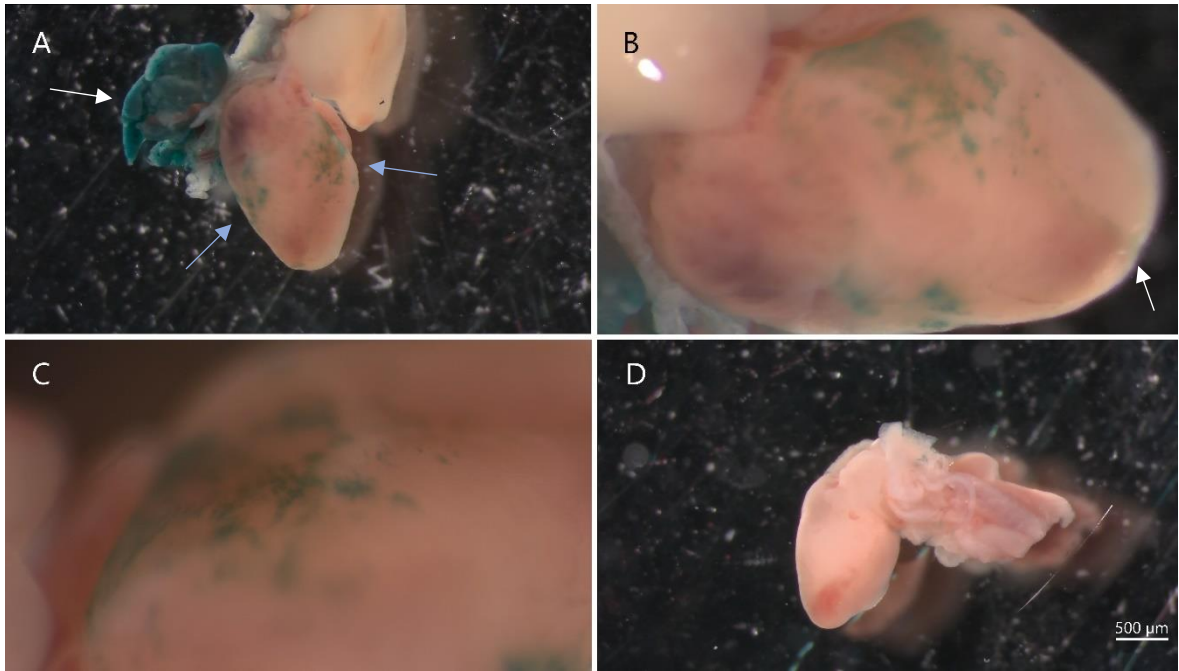
Po barvení se řezy opět dehydratovaly vzestupnou alkoholovou řadou a projasnily v xyleny. Řezy byly následně zamontovány pod krycí sklo pomocí DPX Mountant for histology a foceny na mikroskopu s procházejícím světlem.

5. Výsledky

Hlavním záměrem naší práce byla longitudinální analýza přítomnosti descendentní linie buněk exprimujících *Shh* v myokardu. Jedná se o buňky (případně jejich potomky), které v minulosti exprimovaly *Shh*. Následně jsme se pokusili zachytit možnou aktuální expresi *Shh* v srdeční tkáni s cílem detekovat možný zdroj buněk descendentní linie buněk.

5.1. Postnatální analýza přítomnosti *Shh* descendentních buněčných linií v srdci
V srdci LacZ/ShhGFP pozitivního postnatálního jedince starého 1 den jsme detekovali oblasti, jejichž buňky jsou descendentní linií těch, které *Shh* někdy v minulosti exprimovaly (Obr. 10A -10C). A to od počátku vývoje jedince. Tyto buňky byly vizualizovány pomocí β -galactosidázy při X-gal barvení. Jako pozitivní kontrola a kontrola správnosti barvení nám sloužila plicní tkáň. U plic byla exprese *Shh* a jeho významná role během vývoje prokázána (Kugler *et al.*, 2015) a značení descendentní linie buněk je zde jasně viditelné. Srdce negativní z P1 myši bylo zpracováno stejnou metodou, ale k obarvení buněk zde nedošlo ani u srdce ani u plic (Obr. 10D).

Modře značené buňky se na postnatálním srdci nachází ve šlucích, a to na hranici síní a komor z ventrální i dorzální strany srdce (Obr. 10).



Obrázek 10: **Buněčná populace exprimující v minulosti *Shh* v srdci první postnatální den.** A: Descendentní linie buněk exprimujících *Shh* vizualizované pomocí detekce β -galactosidázy X-gal značením (modře) viz modré šipky. U plic (viz bílá šipka) byla exprese *Shh* a jeho významná role během vývoje prokázána a značení descendentní linie buněk je zde jasně viditelné. B: Detail srdce. Šipka ukazuje linii buněk sestupujícím k hrotu srdce. C: Detail shluku modře značených buněk na ventrální straně srdce. D: Srdce LacZ negativní postnatální jeden den staré myši vizualizované X-gal značením. V plicích ani v srdci nejsou detekovatelné žádné X-gal pozitivní buňky.

Postnatální srdce vykazuje přítomnost descendentní linie buněk, které exprimovaly *Shh*.

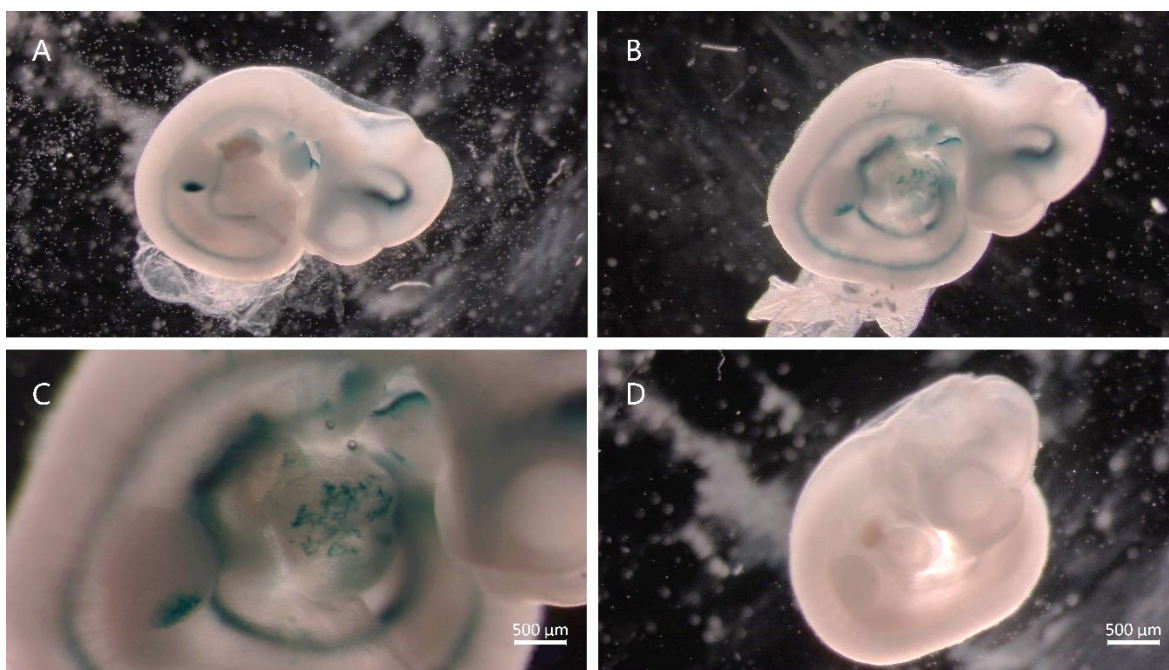
Přítomnost těchto buněk evokuje otázku, zda v srdci v průběhu vývoje byl exprimován *Shh*, případně ve kterých stádiích a pokud ne, tak od kterého stádia lze v srdci detekovat descendentní populace exprimující *Shh* v minulosti, a kde je zdroj těchto descendentních buněčných populací. Sestavili jsme tedy longitudinální řadu embryí LacZ/*Shh*GFP od ED 10,5 do ED 15,5, abychom mohli mapovat populaci v každém jednotlivém dni vývoje.

5.2. Prenatální analýza přítomnosti *Shh* descendentních buněčných linií v srdci
 V práci jsme se zaměřili na embryonální stádia starší ED 9,5. V ranějších fázích není descendentní linie buněk exprimujících *Shh* v srdci přítomna (Obr. 8).

5.2.1. Embryonální den 10,5

Méně pokročilé zárodky na ED 10,5 (Obr. 11) modře značenou descendentní linii buněk exprimujících *Shh* v základu srdce nevykazují (Obr. 11A). Tato embrya jsou vývojově méně pokročilá, a tedy vývojově blíže embryím z ED 9,5.

Naproti tomu více pokročilé zárodky na ED 10,5 vykazují modře značenou descendentní linii buněk exprimujících *Shh* jak v oblasti endodermu, tak i v oblasti srdce (Obr. 11B a 11C). V tomto embryonálním dni vyvíjející se srdce obsahuje modře značené buňky, které jsou u tohoto stádia víceméně rovnoměrně rozptýleny v rámci srdečního základu. Srdce se v tuto chvíli stále nachází vně embrya.



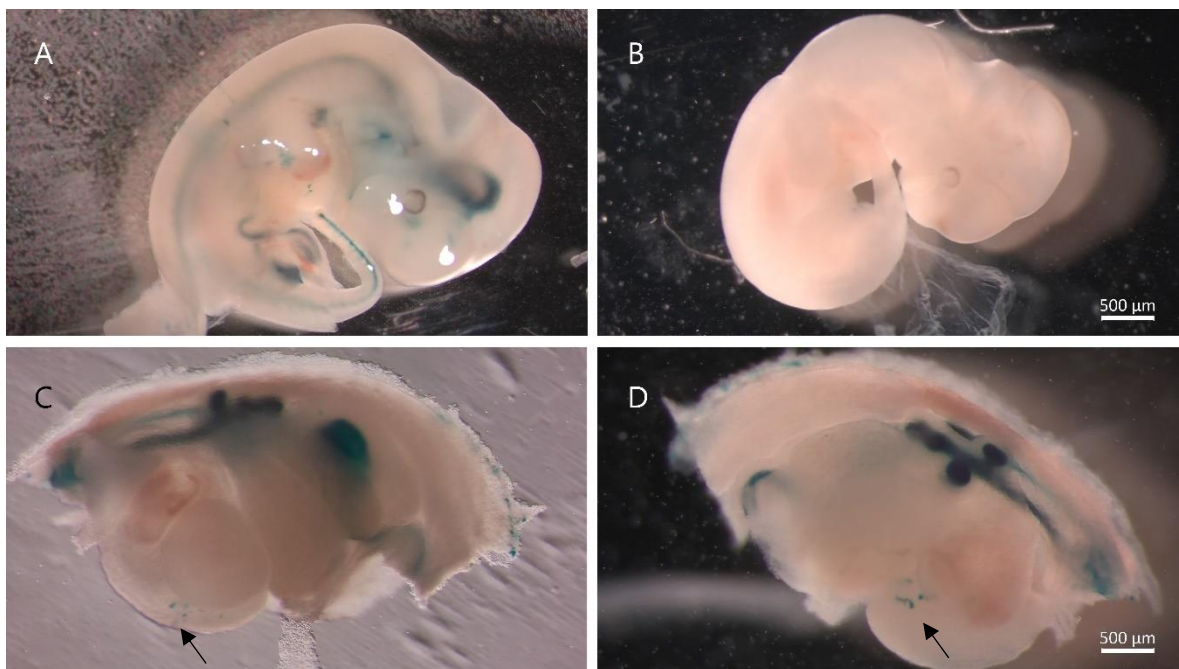
Obrázek 11: *Populace buněk v minulosti exprimujících Shh v embryonálním dni 10,5. A: Vývojově mladší embryo s modře značenou descendentní linií buněk exprimujících v minulosti Shh v oblasti endodermu. B: Vývojově starší embryo s modře značenou descendentní linií buněk exprimujících v minulosti Shh v oblasti endodermu, ale také v oblasti vyvíjejícího se srdce. C: Detail srdce s modře značenou linií buněk exprimujících v minulosti Shh. D: Negativní embryo, u kterého k žádnému obarvení buněk nedošlo.*

Pomocí X-gal barvení jsme descendentní linii buněk exprimujících *Shh* dále vizualizovali u srdcí embryí z ED 11,5 až ED 15,5 (Obr 12 a 13). U všech srdcí byly při preparaci zachovány plíce, jakožto pozitivní kontrola barvení. Descendentní linie buněk exprimujících *Shh* se u srdcí nachází na ventrální i dorzální straně srdce a v postupném vývoji srdce zaujímá stále větší plochu. U embryí z ED 11,5 a ED 13,5 jsme se navíc rozhodli podrobit srdce

histologickému barvení na parafinových řezech, které nám umožňuje lepší vizualizaci buněk descendentní linie exprimujících *Shh* i uvnitř srdeční tkáně a lépe tak popsat jejich rozmístění.

5.2.2. Embryonální den 11,5

Srdce z embryonálního dne 11,5 se oproti srdci z ED 10,5 podstatně zvětšilo, avšak populace buněk descendentní linie exprimujících *Shh* se naopak nezvětšila a seskupila na ventrální a dorzální stranu srdce (Obr. 12). Srdce je v tuto chvíli již více vtaženo do hrudní dutiny embrya, což by mohlo limitovat plné obarvení všech pozitivních buněk. Rozhodli jsme se proto srdce embryí od ED 12,5 hned po odběru embryí před dalším zpracováním vypreparovat.

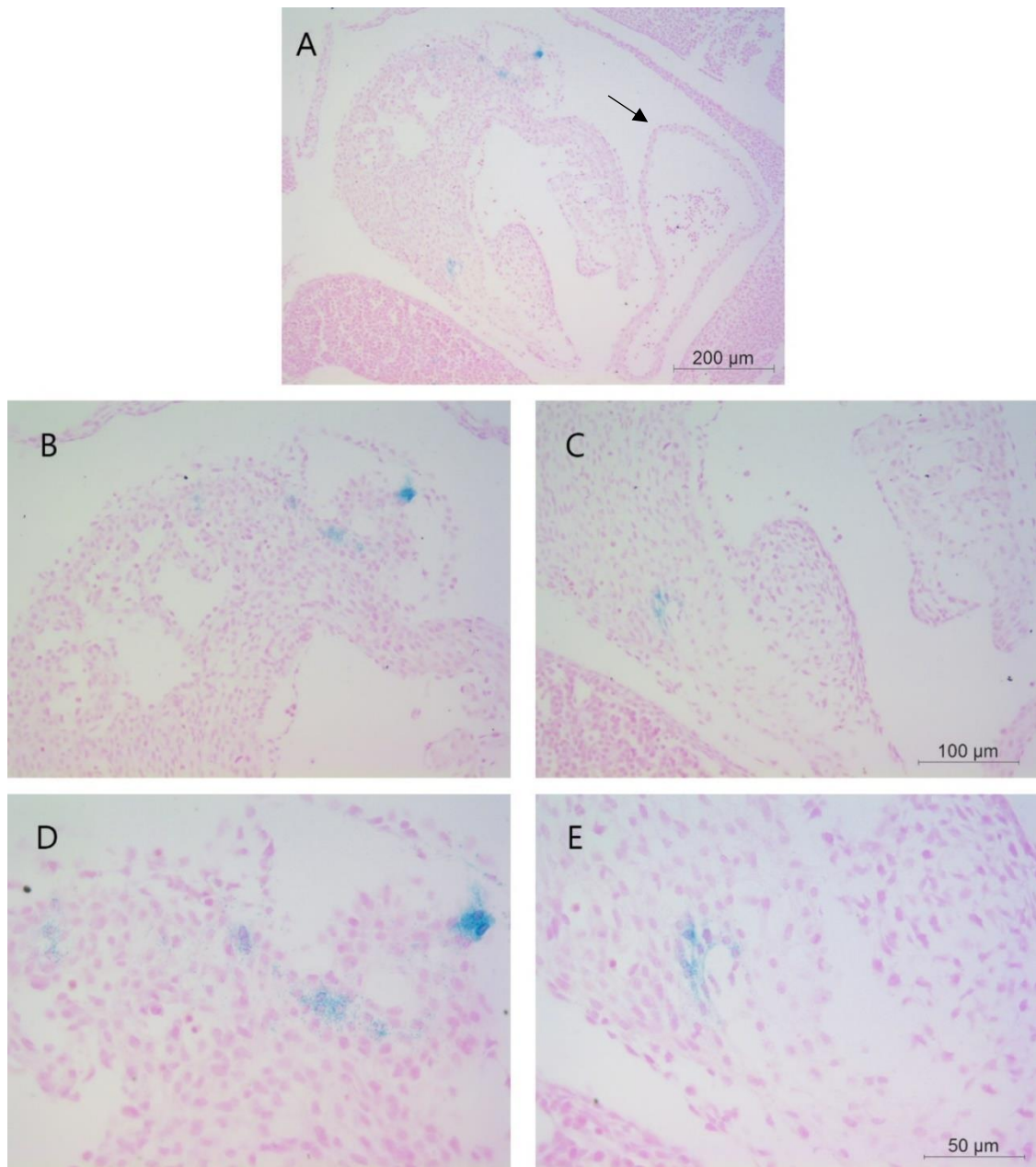


Obrázek 12: *Populace buněk v minulosti exprimujících Shh v embryonálním dni 11,5.* A: Embryo s modře značenou descendentní linií buněk exprimujících v minulosti *Shh* v oblasti endodermu a vyvíjejícího se srdce. B: Negativní embryo, u něhož k obarvení descendentní linie buněk nedošlo. C: Detail srdce s modře značenou linií buněk exprimujících v minulosti *Shh* (šipka) z levé strany. D: Detail srdce s modře značenou linií buněk exprimujících v minulosti *Shh* (šipka) z pravé strany.

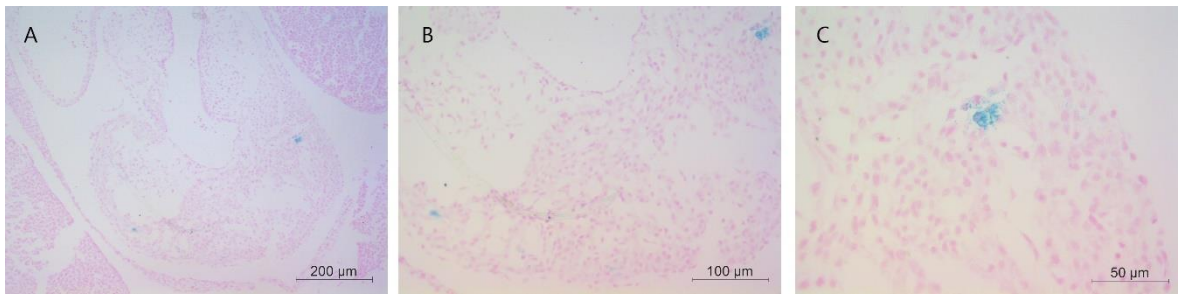
I když se z makroskopického pohledu u embrya z ED 11,5 (Obr. 12) zdálo, že se descendentní linie buněk exprimujících *Shh* nachází pouze v malé koncentraci na ventrální a dorzální straně komor, histologická analýza odhalila, že se tyto buňky nachází i ve spodní

části srdce (Obr. 13 a 14) a hrotu (Obr. 15). Žádné modře značené buňky nebyly u tohoto stádia prokázány ve vznikajících síních (Obr. 13A).

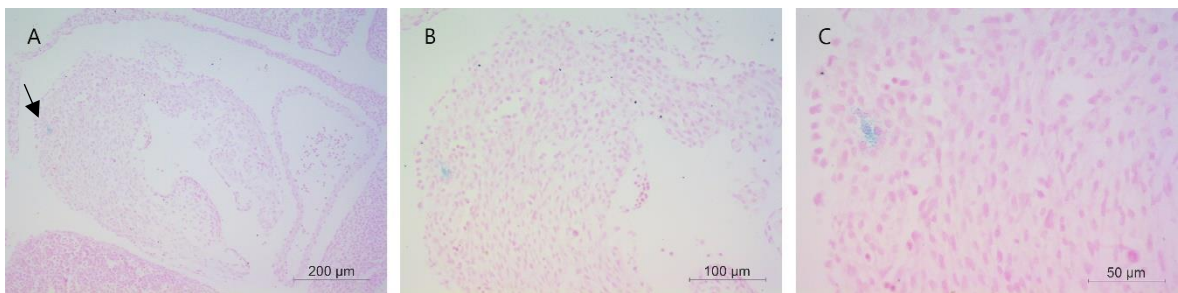
Na řezech nacházejících se blíže ke středu srdce nacházíme stále menší populace modře značených buněk, až nakonec úplně vymizí a v oblasti mediálního řezu srdce se žádné tyto buňky nenachází. (Obr. 16).



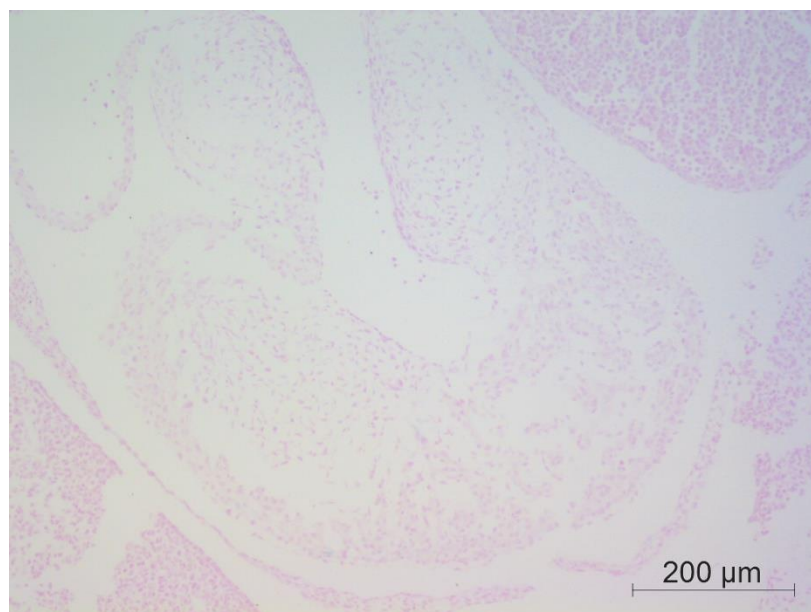
Obrázek 13: *Histologie srdce z embrya LacZ/ShhGFP+ na ED 11,5. Modře značené buňky descendantní linie exprimující Shh a jádra buněk obarvená jádrovou červení. A: Řez srdcem. V oblasti vznikající síně (šipka) se žádné modře značené buňky nevyskytují. B: Detail kaudálně položené oblasti srdce. C: Detail kranálně položené oblasti srdce. D: Bližší detail kaudálně položené oblasti srdce. E: Bližší detail kranálně položené oblasti srdce.*



Obrázek 14: **Histologie srdce z embrya *LacZ/ShhGFP+* na ED 11,5.** Modře značené buňky descendntní linie exprimující *Shh* a jádra buněk obarvená jádrovou červení. A: Řez srdcem. B: Detail oblasti srdce. C: Bližší detail kranálně položené oblasti srdce.



Obrázek 15: **Histologie srdce z embrya *LacZ/ShhGFP+* na ED 11,5.** Modře značené buňky descendntní linie exprimující *Shh* a jádra buněk obarvená jádrovou červení. A: Řez srdcem. Šipka znázorňuje modře značené buňky v hrotu srdce. B: Detail hrotu srdce. C: Bližší detail hrotu srdce.



Obrázek 16: **Středová oblast srdce z embrya *LacZ/ShhGFP+* ED 11,5.** Řez okolo mediální roviny srdce, kde se modře značené buňky descendntní linie exprimující *Shh* nevyskytují.

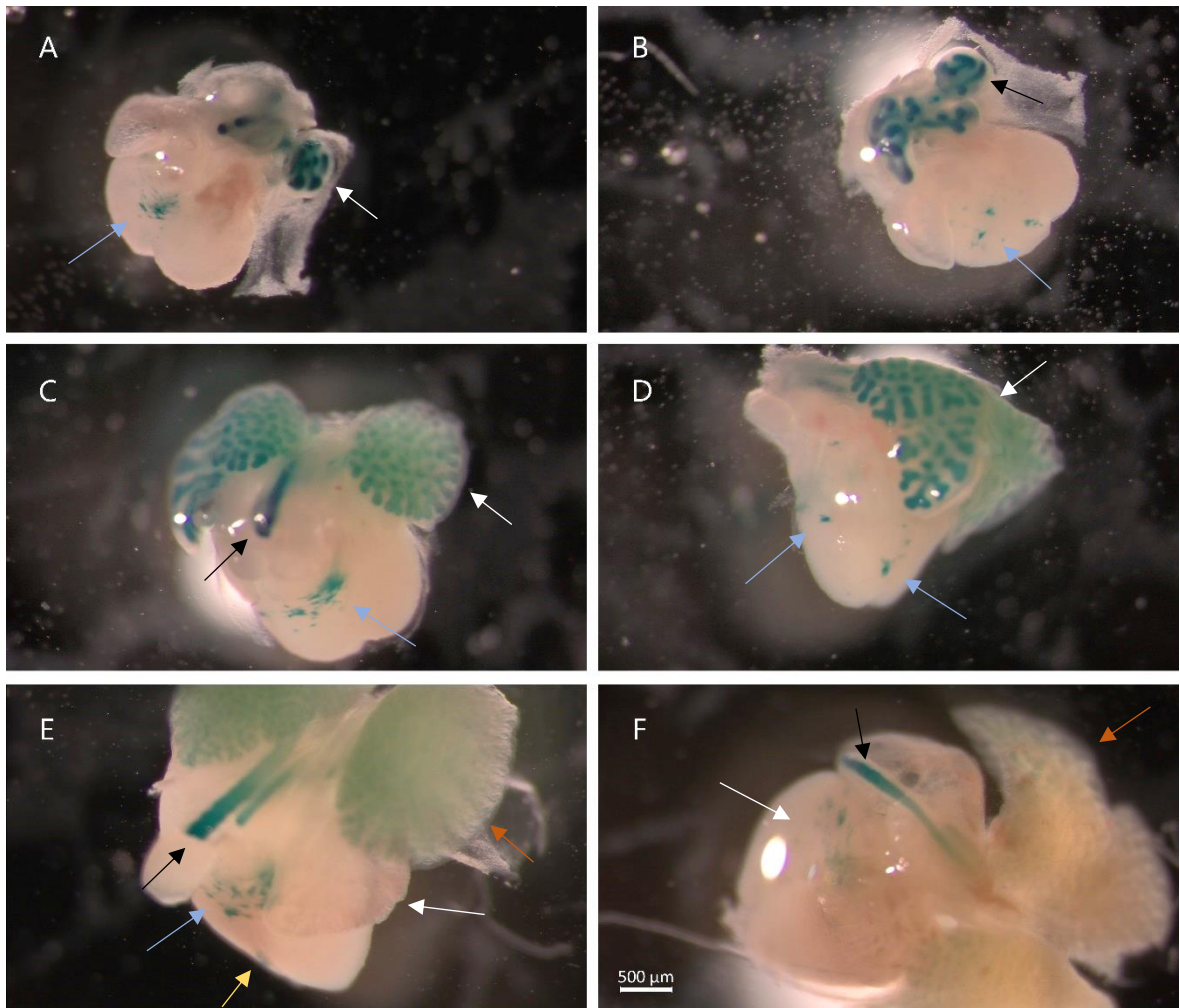
5.2.3. Embryonální dny 12,5 až 15,5

U srdce embrya z ED 12,5 vidíme opět značný přírůstek srdeční tkáně. Modře značené buňky zaujímají u tohoto stádia větší plochu. Buňky můžeme pozorovat na ventrální (Obr. 17A, modrá šipka) v horní polovině komor. Populace buněk descendentní linie exprimující *Shh* je vidět na ventrální straně jako jeden velký shluk buněk. Na dorzální straně (Obr. 17B, modrá šipka) se descendentní linie buněk vyskytuje naopak spíše ve spodní polovině komor směrem k hrotu.

U ED 13,5 se srdce opět zvětšilo co do velikosti, a i populace modře značených buněk se zvětšila. Buňky se ale už nezdají tak koncentrované a zaujímají větší plochu (Obr. 17C, modrá šipka a 17D, modré šipky).

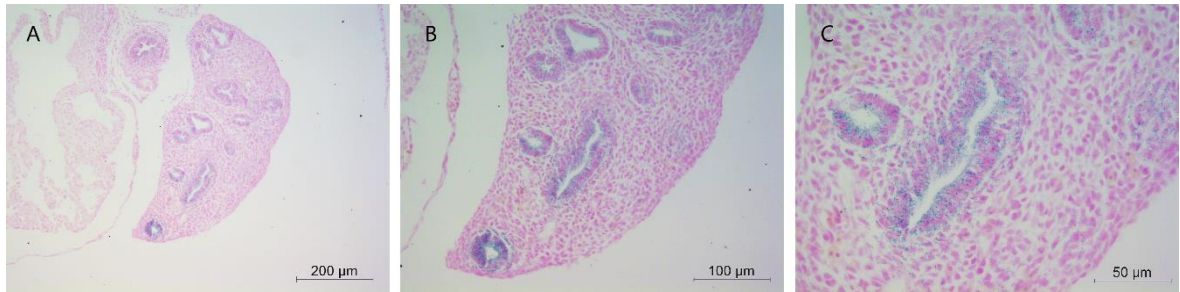
U srdce z embryonálního dne 14,5 vidíme již poměrně vyvinuté síně a z makroskopického pohledu se zdá, že descendentní linie buněk exprimujících *Shh* se zde nenachází (Obr. 17E, bílá šipka). Zároveň si můžeme všimnout, že modře značené buňky se v komorách již shlukují do menších skupin, které jsou ale od sebe více vzdálené (Obr. 17E, modrá šipka). Malá populace buněk descendentní linie exprimující *Shh* se dokonce nachází i o něco níže na komorách srdce a přesouvá se tedy i do spodní poloviny komor (Obr. 17E, žlutá šipka), kde jsme dosud žádné modře značené buňky na ventrální straně nepozorovali.

Žádné buňky descendentní linie v síních nevidíme z makroskopického pohledu ani u srdce z ED 15,5. Stále zde ovšem dobře vidíme modře značené buňky v oblasti komor, a to v jejich horní polovině (Obr. 17F, bílá šipka).



Obrázek 17: Srdce LacZ pozitivních myši embryonální den 12,5 až 15,5. A: Srdce myši ED 12,5, vyvíjející se plíce s buňkami descendentní linie exprimující Shh a descendentní linie buněk exprimující Shh v samotném srdci (modrá šipka) z ventrální strany. Bílá šipka označuje zárodek plic, který také obsahuje descendentní linii buněk exprimující Shh. B: Srdce myši ED 12,5, vyvíjející se plíce s buňkami descendentní linie exprimující Shh a descendentní linie buněk exprimující Shh v samotném srdci (modrá šipka) z dorzální strany. Černá šipka označuje zárodek plic, který také obsahuje descendentní linii buněk exprimující Shh. C: Srdce myši ED 13,5, vyvíjející se plíce s buňkami descendentní linie exprimující Shh a descendentní linie buněk exprimující Shh v samotném srdci (modrá šipka) z ventrální strany. Bílá šipka označuje zárodek plic a černá šipka označuje vývodní dýchací cesty, které také obsahuje descendentní linii buněk exprimující Shh. D: Srdce myši ED 13,5, vyvíjející se plíce s buňkami descendentní linie exprimující Shh a descendentní linie buněk exprimující Shh v samotném srdci (modré šipky) z levé strany. Bílá šipka označuje zárodek plic, který také obsahuje descendentní linii buněk exprimující Shh. E: Srdce myši ED 14,5, vyvíjející se plíce s buňkami descendentní linie exprimující Shh a descendentní linie buněk exprimující Shh v samotném srdci z ventrální strany, modrá šipka značí linii v horní polovině komor, žlutá šipka značí linii přesouvající se do spodní poloviny komor. Bílá šipka značí síň, v níž se žádná descendentní linie buněk exprimující Shh neobjevuje. Červená šipka označuje zárodek plic a černá šipka označuje vývodní dýchací cesty, které také obsahuje descendentní linii buněk exprimující Shh. F: Srdce myši ED 15,5, vyvíjející se plíce s buňkami descendentní linie exprimující Shh a descendentní linie buněk exprimující Shh v samotném srdci (modře) z ventrální strany (bílá šipka). Červená šipka označuje plíce a černá šipka označuje vývodní dýchací cesty, které také obsahuje descendentní linii buněk exprimující Shh. Dorzální strana srdcí ED 14,5 a ED 15,5 není zobrazena.

Srdce z embrya z ED 13,5 bylo histologicky dobarvováno spolu s plicemi, kde jsme našli modře značené buňky descendenní linie exprimující *Shh* v epitelu (Obr. 18).

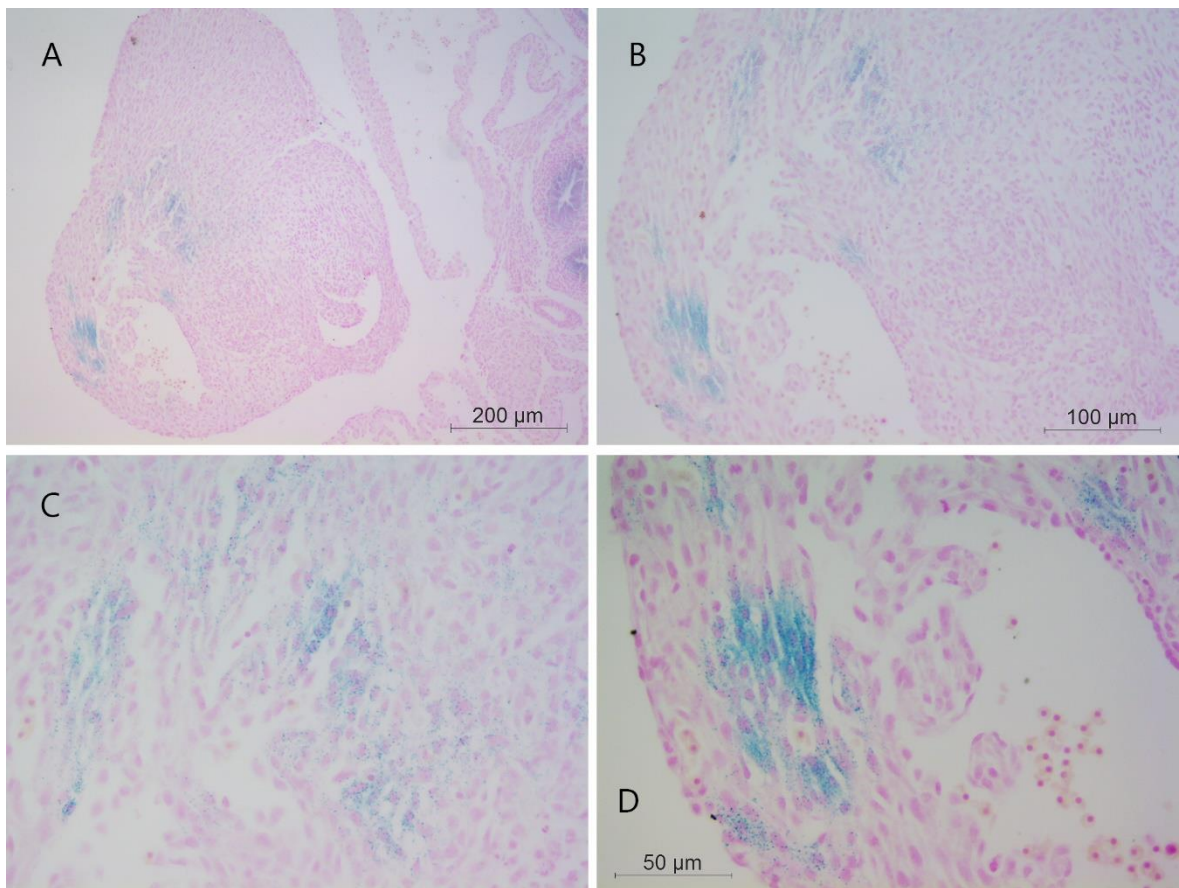


Obrázek 18: Oblast plic z embrya *LacZ/ShhGFP+* ED 13,5. A: Modře značené buňky descendenní linie exprimující *Shh* v oblasti epitelu plic a jádra buněk obarvená jádrovou červení. B: Detail plic. C: Bližší detail plic.

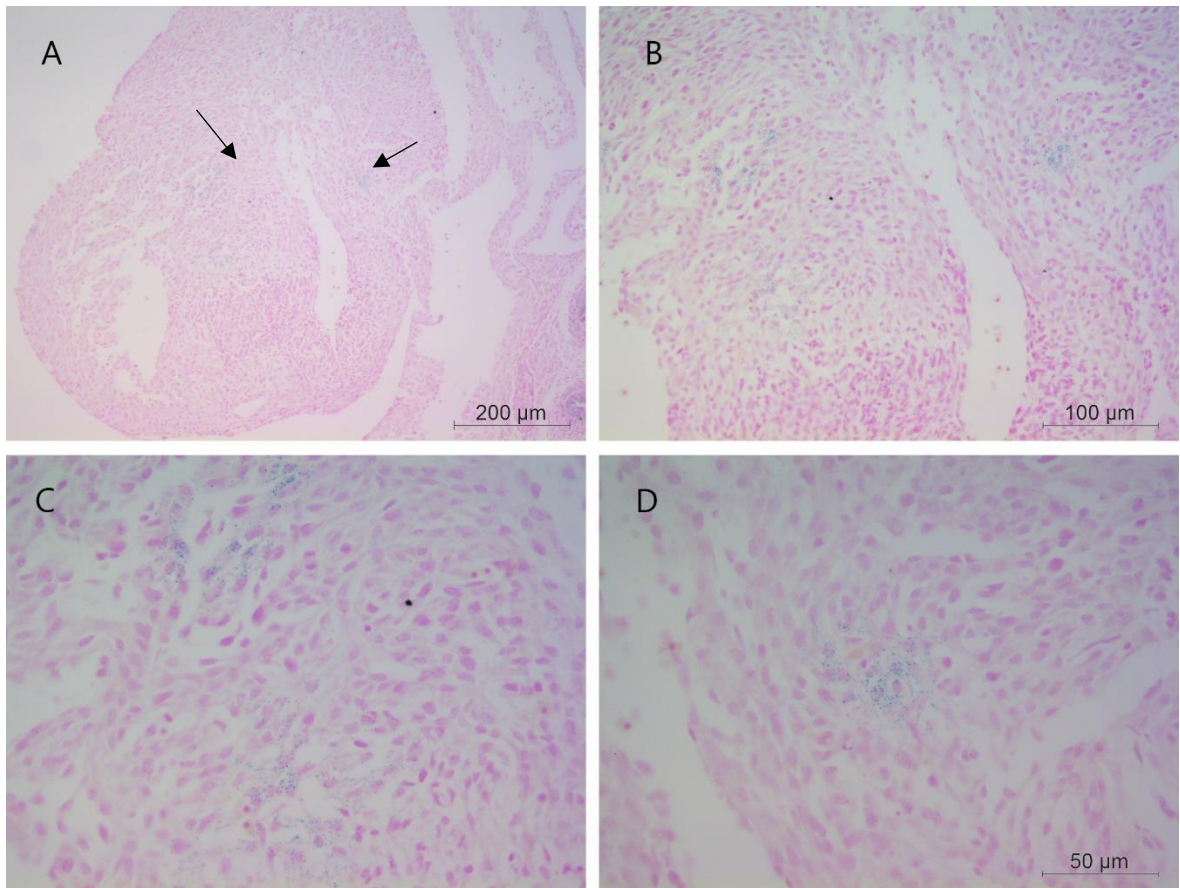
Modře obarvené buňky descendenní linie exprimující *Shh* jsme u srdce embrya z ED 13,5 zachytili po celé délce komor v oblasti trabekul a buněk z této linie se více nachází směrem k hrotu na spodní polovině srdce než u jeho báze (Obr. 19 a 20). Populace modře značených buněk v horní třetině srdce jsou oproti spodní třetině méně koncentrované.

I když to z makroskopického pohledu (Obr. 17C a 17D) nebylo patrné, našli jsme malou populaci buněk descendenní linie exprimující *Shh* i v jedné ze síní (Obr. 21). Tato populace byla však podstatně menší než ta, kterou jsme detekovali v oblasti komor.

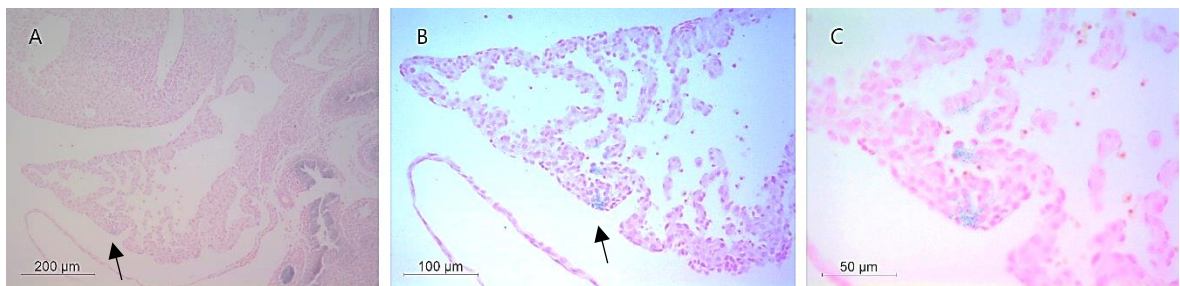
Bylo potvrzeno, že descendenní linie buněk exprimující *Shh* se nachází spíše na ventrální a dorzální straně srdce. Čím hlouběji jsme na řezech postupovali, tím bylo modře obarvených populací buněk descendenní linie méně, v nejhlubších oblastech nebyly tyto buňky přítomné (Obr. 22).



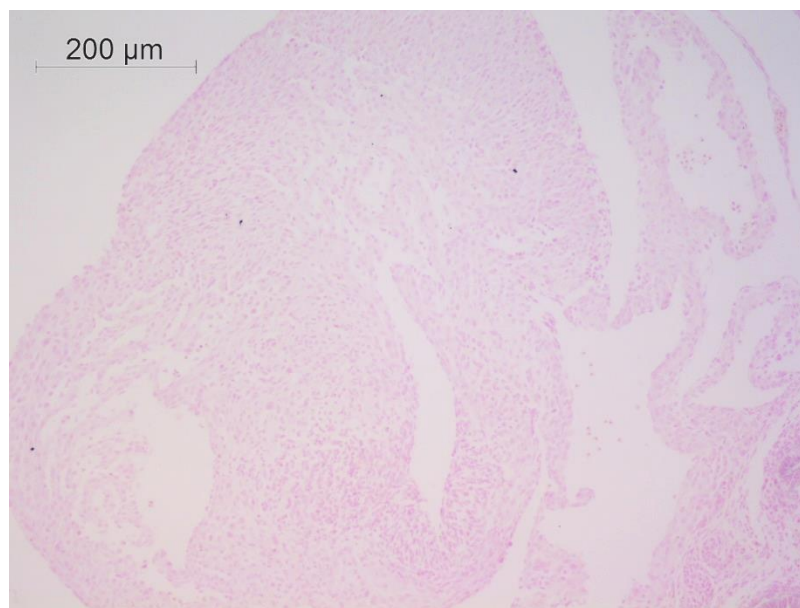
Obrázek 19: **Histologie srdce z embrya *LacZ/ShhGFP+* na ED 13,5.** Modře značené buňky descendentní linie exprimující *Shh* a jádra buněk obarvená jádrovou červení. A: Řez srdcem. B: Detail hrotu srdce. C: Bližší detail kraniálně položené oblasti hrotu srdce. D: Bližší detail kaudálně položené oblasti hrotu srdce.



Obrázek 20: *Histologie srdce z embrya LacZ/ShhGFP+ na ED 13,5. A: Modře značené buňky descendentní linie exprimující Shh (šipky) a jádra buněk obarvená jádrovou červení. B: Detail oblasti srdce. C: Bližší detail kaudálně položené oblasti srdce. D: Bližší detail kranálně položené oblasti srdce.*



Obrázek 21: *Síť srdce z embrya LacZ/ShhGFP+ ED 13,5. A: Modře značené buňky descendentní linie exprimující Shh (šipka) a jádra buněk obarvená jádrovou červení. B: Detail oblasti síně. C: Bližší detail oblasti síně srdce.*

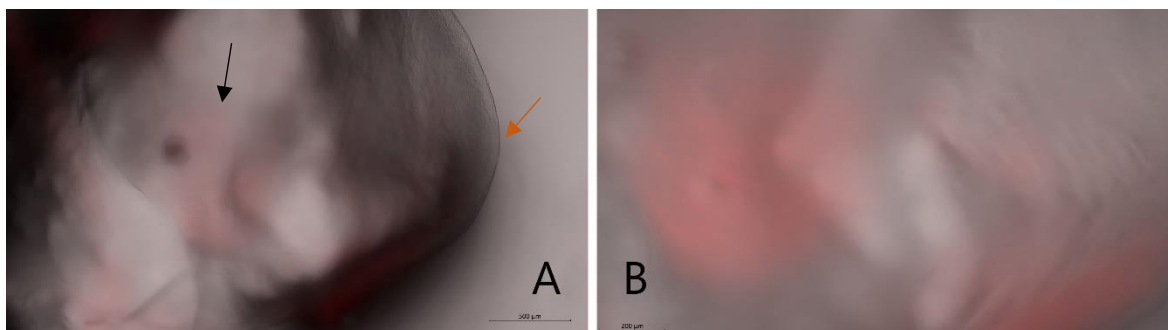


Obrázek 22: *Středová oblast srdce z embrya LacZ/ShhGFP+ ED 13,5. Řez okolo mediální roviny srdce, kde se modře značené buňky descendentní linie exprimující Shh nevyskytují.*

5.2.4. Embryonální den 16,5

Descendentní linii buněk exprimujících *Shh* jsme se v srdeční tkáni pokusili detekovat i s využitím dalšího Cre-loxP systému pro fluorescenční a konfokální zobrazení. Naši longitudinální řadu jsme tedy rozšířili o srdce embrya TdTomato/ShhGFP z ED 16,5. Červená fluorescence byla opět zachycena v oblasti komor až směrem k hrotu srdce (Obr 23).

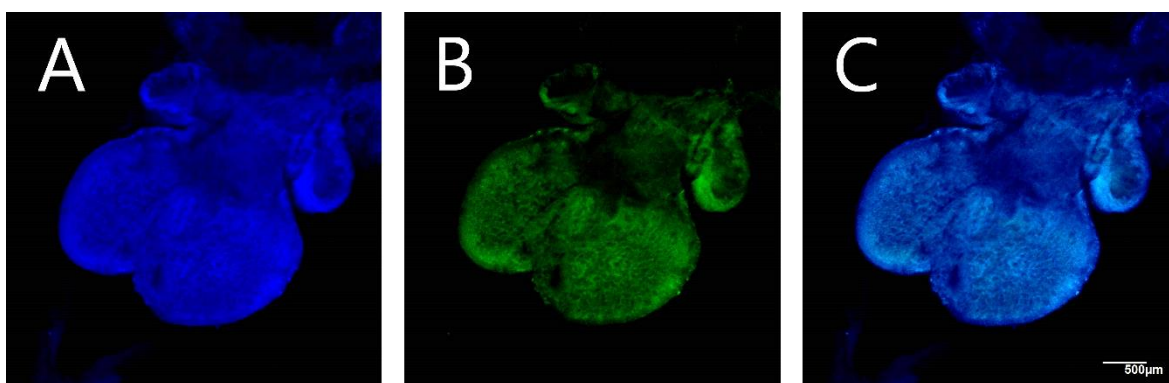
Descendentní linii buněk exprimující *Shh* jsme tedy v myokardu zachytili pomocí dvou různých vizualizačních metod, a to pokaždé ve stejné oblasti.



Obrázek 23: *Srdce embrya TdTomato/ShhGFP z ED 16,5. Červená fluorescence vizualizuje buňky descendentní linie exprimující Shh. A: Oblast komor a hrot srdce (červená šipka) zobrazující descendentní linii buněk exprimujících Shh (černá šipka). B: Detail oblasti označené černou šipkou na snímku A.*

5.3. Analýza aktuální exprese *Shh* v srdeční tkáni

Analýza aktuální exprese byla prováděna na embryích z křížení CD1 X B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J. Detekce signálu byla prováděna pomocí GFP na konfokálním mikroskopu. V ED 12,5 až ED 14,5 nebyla žádná aktuální exprese *Shh* detekována. Použity byly dvě metody, a to projasnění srdce a jeho přímé focení na konfokálním mikroskopu (Obr. 24) a dále fluorescenční imunohistochemie a opět focení na konfokálním mikroskopu, tentokrát řezů (data neukázána).



Obrázek 24: Srdce embrya CD1/ShhGFP+ z ED 12,5 bez aktuální *Shh* exprese. Zelená a modrá fluorescence jsou ve shodných oblastech, jedná se tedy o autofluorescenci buněk. A: Modrá autofluorescence buněk. B: Zelená autofluorescence buněk. C: Složený snímek, kde dochází k úplnému překryvu obou fluorescencí.

Jako kontrolní způsob pro ověření negativní exprese *Shh* na ED12,5 – 14,5 nám posloužila embrya z křížení B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J X B6.129S-Shhtm2(cre/ESR1)Cjt/J – tamoxifen indukibilní Cre-loxP systém. Zde byla použita aplikace tamoxifenu od ED11,5 do 15,5 a odběry embryí byly provedeny od ED 12,5. I v tomto případě byly použity dvě metody detekce, a to projasnění embryonálních tkání a jejich následná vizualizace pomocí fluorescence na konfokálním mikroskopu a pomocí fluorescenční imunohistochemie na histologických řezech.

U žádného z odebraných embryí po aplikaci tamoxifenu nebyly zachyceny RFP pozitivní buňky, což by znamenalo přítomnost *Shh* exprimujících buněk v období aplikace

tamoxifenu. Lze tedy říct, že v období aplikace tamoxifenu nebyl gen *Shh* v srdeční tkáni exprimován (data neukázána).

6. Diskuse

Již nějakou dobu se v literatuře spekuluje o vlivu *Shh* na embryonální vývoj srdce. Tento vliv byl popisován jako vliv vnější, tedy z okolních struktur. Byl popsán například vliv *Shh* exprimovaného ve ventrální neurální trubici a ventrálním faryngeálním endodermu, kdy exprese *Shh* v těchto oblastech může přímo ovlivnit vývoj buněk, které se na vývoji srdce následně podílí (Goddeeris *et al.*, 2007). *Shh* například udržuje proliferaci v progenitorových buňkách kardiogenního pole (Dyer & Kirby, 2009), dále je *Shh* vyžadován pro buňky srdeční neurální lišty, aby přežily a vytvořily endokardové polštáře odtokového traktu, a také v neposlední řadě zprostředkovává signalizaci do buněk myokardu, odvozených z předního kardiogenního pole, k dokončení septace (Gerhardt *et al.*, 2013).

Naše výsledky však ukázaly, že i srdeční tkáň již v průběhu vývoje srdce obsahuje buňky, které někdy během svého života *Shh* aktivně exprimovaly, nebo potomky těchto buněk, a že tyto buňky součástí myokardu zůstávají i postnatálně.

6.1. Poloha a význam buněk exprimujících *Shh*

K začátku stáčení srdeční trubice dochází u myších embryí mezi ED 8,5 až ED 9,5 (de Boer *et al.*, 2012). My jsme naše pozorování započali v ED 10,5, kdy je srdce již mírně stočené, ale stále se nachází vně embrya (Obr. 11). V tomto stádiu jsme pozorovali první buňky descendentní linie exprimující *Shh* v srdci. V tomto období byla v srdci popsána přítomnost primárních řasinek, které je možné detekovat v různých částech síní a komor také v ED 10,5–12,5 (Gerhardt *et al.*, 2013). Zajímavé je, že právě primární řasinky reagují na expresi *Shh* a jejich správné fungování je od *Shh* exprese přímo závislé. Od 8. dne vývoje do 11. dne se počet kardiomyocytů v srdci rapidně zvyšuje, a to ze 700 na 68 000 (de Boer *et al.*, 2012). I my pozorujeme ještě mezi ED 10,5 a ED 11,5 rapidní zvětšení srdce, které ovšem nevedlo k podstatnému zvětšení populace modře značených buněk (Obr. 12).

Srdce se v tomto období rovněž dostává z polohy vně embrya do dutiny hrudní, čímž by mohlo dojít k nedostatečnému zabarvení buněčných linií pomocí X-galového barvení. Falešné negativitě některých pozitivních buněk z důvodu nemožnosti přístupu dostatku X-galu k hlubším tkáním uvnitř zvětšujícího se zárodka jsme se při vyšších ED vyvarovali preparací srdcí z tělní hrudní dutiny ještě před X-gal barvením. Od ED 9,5 do ED 12,5 se u myších zárodků také začínají prohlubovat komory a síně v takzvané komorotvorné fázi

(Sizarov *et al.*, 2011). V ED 12,5 již v embryu nacházíme klasické čtyřkomorové srdce. Proliferace v myokardu myši je v tomto stádiu vysoce regionalizovaná, s pomalejší proliferací v atrioventrikulárním kanálu, výtokovém traktu a rychlou proliferací ve formujících se komorách (de Boer *et al.*, 2012). To je možné vysvětlení, proč došlo k zvětšení populace buněk descendentní linie exprimujících *Shh* v tomto stádiu (Obr. 17A a 17B) oproti ED 11,5. Znamenalo by to zároveň u descendentních buněk schopnost množit se, což by bylo zajímavé do budoucna otestovat. Celý proces vytváření srdeční kličky je dokončen u myši 14,5. den embryonálního vývoje (Anderson *et al.*, 2014), u tohoto stádia již tedy vidíme konečnou distribuci buněk descendentní linie exprimujících *Shh* (Obr. 17E). V porovnání se srdcem z ED 15,5 opravdu k výrazným změnám nedošlo (Obr. 17F).

Descendentní linii buněk exprimujících *Shh* jsme se v srdeční tkáni detekovali i pomocí červené fluorescence u srdce embrya TdTomato/ShhGFP z ED 16,5. Červená fluorescence byla zachycena v oblasti komor (Obr 23).

Jak již bylo řečeno, výskyt primárních řasinek v srdci byl pozorován v období ED 10,5–12,5. Řasinky v pozdějších stádiích již ale popsány nebyly (Gerhardt *et al.*, 2013). Tento fakt byl mohl vysvětlovat, že od ED 12,5 nebyla v srdci myši detekována žádná aktuální exprese *Shh* (Obr. 27,28 a 29). Pokud je srdeční tkáň uzpůsobena na přímou expresi *Shh*, musí se tak dít dříve. Bylo by tedy v budoucnu potřebné podrobit detekci přímé exprese ještě srdce z ED 10,5 a ED 11,5 a tím přímou expresi *Shh* v srdeční tkáni buďto potvrdit, anebo definitivně vyvrátit.

6.2. Původ buněk exprimujících *Shh*

Existují tři možná vysvětlení původu descendentní linie buněk exprimujících *Shh* v srdeční tkáni. První možné vysvětlení je, že tyto buňky se v srdci nachází od samého počátku a v krátkém období okolo ED 10,5 a ED 11,5 exprimují v srdeční tkáni *Shh*. Bylo totiž zjištěno, že zejména geny kódující buněčný cyklus, diferenciaci srdečních buněk a buněčnou migraci byly v postnatálních buňkách myši downregulovány, zatímco tyto stejné markery byly exprimovány ve vysokých hladinách u většiny kardiomyocytů embryí v ED 9,5 a ED 12,5 (Sereti *et al.*, 2018). Další možností je, že buňky exprimovaly *Shh* v jiné části embrya a do srdeční tkáně se dostaly pomocí migrace jako descendentní linie někdy okolo ED 10,5. Poslední možností je kombinace obou výše zmíněných dějů, tedy částečná migrace buněk

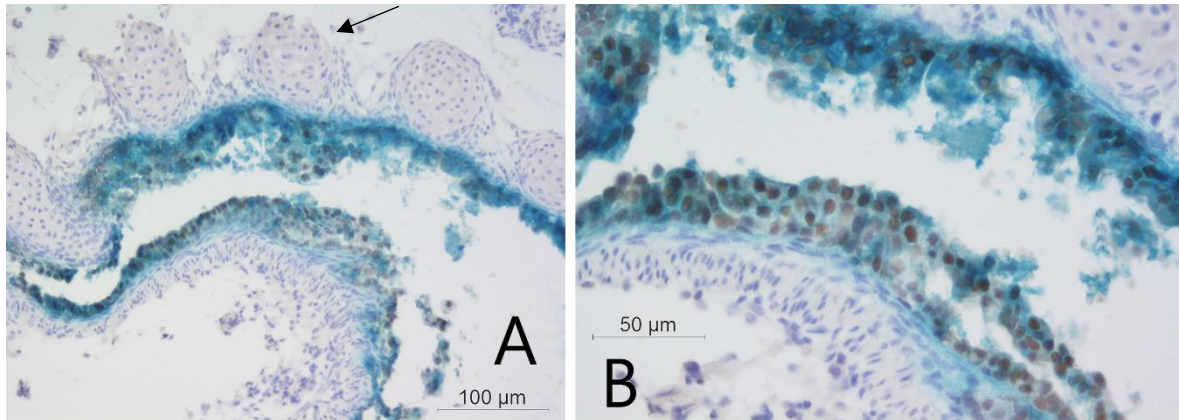
do srdce v kombinaci s přímou expresí *Shh* v srdeční tkáni, což je potřeba rovněž v budoucnu ověřit.

Bylo dokumentováno, že na vývoji výtokového traktu se přímo podílejí buňky neurální lišty a dále přední srdeční pole (Goddeeris *et al.*, 2007). Tyto buňky z neurální lišty do výtokového traktu migrují v ED 10,5 (Washington Smoak *et al.*, 2005). Již dříve byla popsána i nezbytná role *Shh* pro vývoj a prodloužení výtokového traktu, a jako zdroj *Shh* byl označen faryngeální endoderm mezi ED 9,5 a ED 10,5 (Goddeeris *et al.*, 2007). Přesně v tomto období jsme zachytili descendentní linii buněk exprimujících *Shh* i přímo v oblasti myokardu. Je tedy možné, že buňky z neurální lišty nemigrují pouze do výtokového traktu, ale do celého zárodku srdce. Tuto teorii podporuje také fakt, že srdce myších embryí *Shh* -/- jsou celkově menší než u kontrol (Washington Smoak *et al.*, 2005).

Jednou z méně prozkoumaných oblastí je také fúze proepikardu se srdcem. To je klíčový krok k zahájení tvorby koronárních tepen (Ishii *et al.*, 2010). Výzkum Rajagopal *et al.* odhalil, že některé buňky v epikardu v ED 10,5 až 11,5 se diferencují na kardiomyocyty. Kardiomyocyty odvozené od těchto buněk byly lokalizovány v myokardu všech čtyř srdečních dutin, a i v interventrikulárním septu. Tyto buňky představovaly 7 %–10 % kardiomyocytů v komorách a 18 % v síních (Rajagopal *et al.*, 2008). Je zajímavé, že právě okolo ED 10,5 jsme v oblasti myokardu zachytili buňky descendentní linie exprimující *Shh*. V tomto období zde dochází ke vzniku nové generace kardiomyocytů z epikardu (Rajagopal *et al.*, 2008). Je tedy možné, že toto vývojové stádium srdce se vyznačuje migrací buněk a definitivním osídlením jeho tkáně. Souvislost buněk epikardu a naší buněčné linie v myokardu by rovněž bylo potřeba v budoucnu ověřit. Buňky z proepikardu by mohli dokonce sloužit jako kmenové buňky dělící se při poranění (Zhou *et al.*, 2008), je tedy pravděpodobné, že *Shh* také kdysi exprimovaly a mohou jeho expresi znovu spustit.

V dýchací soustavě se nám podařilo lokalizovat descendentní linii buněk exprimující *Shh* v epitelu, což bylo dle našeho očekávání (Schittny, 2017). Zároveň jsme tyto buňky kolokalizovali s markerem SOX2 (Obr. 29), který je používán jako marker kmenových buněk (Sarkar a Hochedlinger, 2013). Lze tedy říct, že se jedná o kmenové buňky, které v minulosti exprimovaly právě *Shh*. Dalším pokračováním naší studie by tedy mělo být pokusit se zjistit, zda k expresi SOX2 dochází i u descendentní linie buněk exprimující *Shh* nalezené v srdci. Pokud by i zde byla prokázána kolokalizace, mohlo by se jednat o buňky, které jsou při regeneraci zdrojem nových kardiomyocytů. Bylo popsáno, že i v srdci

dospělých jedinců ke vzniku nových kardiomyocytů v omezené míře dochází (Beltrami *et al.*, 2001, Laflamme & Murry, 2011).



Obrázek 29: Vizualizace kmenových buněk v dýchacích cestách. A: Vertikální řez některým úsekem dýchacích cest, na povrchu se nachází podkovovité chrupavky (šipka), pod nimi najdeme epitel, který se skládá z descendentní linie buněk exprimujících v minulosti *Shh* (modře) s jádry, ve kterých byla zachycena exprese *SOX2* (hnědě). B: Detail oblasti epitelu, můžeme vidět jádra buněk, které exprimují *SOX2* (hnědě) a jedná se tedy o buňky kmenové.

6.3. Využití v medicíně

Život všech živočichů je závislý na správné funkci jejich srdce. Srdce dospělého savce nemůže plně generovat nové buňky srdečního svalu v reakci na zranění, a ačkoli řada léků a mechanických zařízení může dočasně zlepšit srdeční funkci, takové přístupy nenahrazují ztracený srdeční sval a jsou tedy přechodné. Je zde ovšem určitá podobnost ve schopnosti regenerace srdce mezi zebříčkami a novorozenými savci. Tento proces je řízen především dediferenciací a proliferací existujících kardiomyocytů, a nikoli srdečními progenitorovými buňkami. Buněčné procesy a regulační mechanismy, které se podílejí na růstu a vývoji srdce, lze tedy možná využít k opravě dospělého srdce prostřednictvím „znovuprobuzení“ drah, které jsou aktivní během embryogeneze, a rozšířit neonatální regenerační reakce na poranění (Xin *et al.*, 2013).

V práci Xin *et al.* (2013) byl popsán možný vliv *Shh* na vývojové vady srdce a regeneraci srdeční tkáně. Pro účinnou léčbu srdce je tedy nezbytně nutné pochopit nejen jeho embryonální vývoj, ale také molekulární děje, které tento vývoj doprovází. Jak bylo již zmíněno výše, přenos DNA kódující *Shh* do myokardu myši vyvolá obnovení Hedgehog dráhy ve fibroblastech a kardiomyocytech. To vedlo k zachování funkce srdce pomocí zvýšené neovaskularizace (Kusano *et al.*, 2005). Transplantace kuliček nasáklých *Shh* na

bázi komory u zebřiček také stimuluje regeneraci, tentokrát pomocí epikardu (Wang *et al.*, 2015). Tato zjištění spolu s lepším pochopením polohy buněk descendentní linie exprimujících *Shh* v srdeční tkáni v budoucnu nám přináší možnost výzkumu cílené genetické léčby v rámci genového inženýrství. Zacílení na správné buňky je totiž klíčové pro správnou genetickou léčbu (Curiel *et al.*, 2007).

Bylo zjištěno, že téměř 50 % kardiomyocytů je v srdeční tkáni obměněno během normální délky života (Bergmann *et al.*, 2009). Nám se navíc podařilo zdokumentovat v myokardu descendentní linii buněk exprimující *Shh*, jejíž populace se během vývoje srdce zvětšuje. Bylo by tedy dobré zaměřit se v dalším výzkumu na schopnost proliferace u těchto buněk a potvrdit, anebo vyvrátit tak jejich schopnost se dělit. Potvrzením jejich proliferace a následně i zpětného zapojení exprese *Shh* bychom mohli definitivně potvrdit regeneraci myokardu u myší.

Celkově tyto výsledky naznačují, že srdce savců má schopnost obnovy, která je ovšem nedostatečná pro regeneraci v reakci na zranění, ale která by mohla být zvýšena terapií (Xin *et al.*, 2013). Takže pokud má lidské srdce, byť jen malou vrozenou regenerační odezvu, měli bychom ji terapeuticky maximálně využít ke zlepšení funkce srdce.

7. Závěr

Vliv *Shh* na srdce je v literatuře diskutován jak v souvislosti embryonálního vývoje, tak v souvislosti regenerace postnatálních srdcí například po infarktu myokardu. Původ *Shh* proteinu pro vývoj srdce jako takový byl až dosud připisován pouze difúzi z okolních struktur, jako neurální trubice nebo faryngeální endoderm. Nyní jsme přinesli důkaz, že i samotné buňky myokardu ve své minulosti *Shh* exprimují, a tudíž může být srdce při svém fyziologickém vývoji ovlivňováno jak z venku, tak i zevnitř. Tento poznatek s sebou přináší spoustu nových otázek. Exprese *Shh* v srdeční tkáni otvírá možnost cílené genetické léčby, a to jak prenatalní u vývojových vad, tak postnatální u regenerace srdce.

1. Sestavili jsme longitudinální řadu z embryí od ED 10,5 do ED 16,5, což nám umožnilo sledovat buňky descendentní linie exprimujících *Shh* v myokardu. První pozitivní buňky jsme zachytili na ED10,5. U buněk jsme následně pozorovali zvětšení plochy, kterou zaujímají, v průběhu narůstajícího ED u odběrů. Buňky jsme detekovali jak na ventrální, tak na dorzální straně srdce a toto rozložení si zachovaly až do stádia P1.
2. Analýzou aktuální exprese *Shh* v srdcích embryí od ED 12,5 do ED 14,5 jsme prokázali, že v těchto stádiích se zde aktuální exprese *Shh* v rámci vyvíjející se srdeční tkáně nevyskytuje.

Na naše zjištění by měl navázat výzkum, který bude podrobněji studovat chování těchto buněk v srdci, například jejich proliferaci, či expresi dalších genů, které by nám více řekly jak o původu, tak o funkci a dalším osudu těchto buněk. My navrhujeme například marker SOX2, který by tyto buňky označil za kmenové, a Ki67, jehož exprese by potvrdila schopnost proliferace těchto buněk.

8. Použitá literatura

- Anderson, R. H., Spicer, D. E., Brown, N. A., & Mohun, T. J. (2014). The Development of Septation in the Four-Chambered Heart. *Anatomical record* (Hoboken, N.J: 2007), 297(8), 1414-1429.
- Andrés-Delgado, L., & Mercader, N. (2016). Interplay between cardiac function and heart development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(7), 1707-1716.
- Apitz, C., Webb, G. D., & Redington, A. N. (2009). Tetralogy of Fallot. *The Lancet* (British edition), 374(9699), 1462-1471.
- Bangs, F., & Anderson, K. V. (2017). Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(5), a028175.
- Beltrami, A. P., Beltrami, C. A., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. -min, Finato, N., Bussani, R., Nadal-ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., & Anversa, P. (2001). Evidence That Human Cardiac Myocytes Divide after Myocardial Infarction. *The New England journal of medicine*, 344(23), 1750-1757.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S., & Frisen, J. (2009). Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science* (American Association for the Advancement of Science), 324(5923), 98-102.
- Chen, F., De Diego, C., Chang, M. G., McHarg, J. L., John, S., Klitzner, T. S., & Weiss, J. N. (2010). Atrioventricular conduction and arrhythmias at the initiation of beating in embryonic mouse hearts. *Developmental Dynamics*, 239(7), 1941-1949.
- Chiang, C., Swan, R. Z., Grachtchouk, M., Bolinger, M., Litingtung, Y., Robertson, E. K., Cooper, M. K., Gaffield, W., Westphal, H., Beachy, P. A., & Dlugosz, A. A. (1999). Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Developmental biology*, 205(1), 1-9.

- Crossley II, D. A., & Burggren, W. W. (2009). Development of cardiac form and function in ectothermic sauropsids. *Journal of morphology* (1931), 270(11), 1400-1412.
- Curiel, D. T., Waehler, R., & Russell, S. J. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics*, 8(8), 573-587.
- Davis, E. E., Brueckner, M., & Katsanis, N. (2006). The Emerging Complexity of the Vertebrate Cilium: New Functional Roles for an Ancient Organelle. *Developmental Cell*, 11(1), 9-19.
- de Boer, B. A., van den Berg, G., de Boer, P. A. J., Moorman, A. F. M., & Ruijter, J. M. (2012). Growth of the developing mouse heart: An interactive qualitative and quantitative 3D atlas. *Developmental biology*, 368(2), 203-213.
- Dunwoodie, S. L. (2007). Combinatorial signaling in the heart orchestrates cardiac induction, lineage specification and chamber formation. *Seminars in cell & developmental biology*, 18(1), 54-66.
- Dyer, L. A., & Kirby, M. L. (2009). Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation [Article]. *Developmental Biology*, 330(2), 305-317.
- Eisenberg, L. M., & Markwald, R. R. (1995). Molecular Regulation of Atrioventricular Valvuloseptal Morphogenesis. *Circulation research*, 77(1), 1-6.
- Farhan, C., Jenna, I., Tejeshwar, B., Dhruvil, P., Katherine, G., David, E. L., Douglas, M. R., & Phillip, D. L. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of the Cardiovascular System: New Looks for Old Diseases [article]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6.
- Galli, A., Robay, D., Osterwalder, M., Bao, X., Bénazet, J. -denis, Tariq, M., Paro, R., Mackem, S., & Zeller, R. (2010). Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and

posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS genetics*, 6(4), e1000901-e1000901.

Gaze, D. C. (2018). Introductory Chapter: Congenital Heart Disease. IntechOpen.

Genepaint (2001): Sonic hedgehog, <https://gp3.mpg.de/results/Shh>

Gerhardt, C., Lier, J. M., Kuschel, S., & Rütger, U. (2013). The Ciliary Protein Ftm Is Required for Ventricular Wall and Septal Development. *PLoS one*, 8(2), e57545-e57545.

Goddeeris, M. M., Klingensmith, J., Meyers, E. N., & Schwartz, R. (2007). Independent requirements for hedgehog signaling by both the anterior heart field and neural crest cells for outflow tract development [Article]. *Development*, 134(8), 1593-1604.

Hiruma, T., Nakajima, Y., & Nakamura, H. (2002). Development of pharyngeal arch arteries in early mouse embryo. *Journal of anatomy*, 201(1), 15–29.

Ishii, Y., Garriock, R. J., Navetta, A. M., Coughlin, L. E., & Mikawa, T. (2010). BMP signals promote proepicardial protrusion necessary for recruitment of coronary vessel and epicardial progenitors to the heart. *Developmental cell*, 19(2), 307–316.

Jensen, B., Wang, T., Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. M. (2013). Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1833(4), 783-794.

Kugler, M. C., Joyner, A. L., Loomis, C. A., & Munger, J. S. (2015). Sonic hedgehog signaling in the lung: From development to disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 52(1), 1-13.

Kusano, K. F., Pola, R., Murayama, T., Curry, C., Kawamoto, A., Iwakura, A., Shintani, S., Ii, M., Asai, J., Tkebuchava, T., Thorne, T., Takenaka, H., Aikawa, R., Goukassian,

- D., von Samson, P., Hamada, H., Young-sup Yoon, Silver, M., Eaton, E., & Hong Ma. (2005). Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nature Medicine*, 11(11), 1197–1204.
- Laflamme, M. A., & Murry, C. E. (2011). Heart regeneration. *Nature*, 473(7347), 326–335.
- Lei Bu, Xin Jiang, Martin-Puig, S., Caron, L., Shenjun Zhu, Ying Shao, Roberts, D. J., Huang, P. L., Domian, I. J., & Chien, K. R. (2009). Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*, 460(7251), 113–117.
- Li, F., Wang, X., Capasso, J. M., & Gerdes, A. M. (1996). Rapid Transition of Cardiac Myocytes from Hyperplasia to Hypertrophy During Postnatal Development. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 28(8), 1737-1746.
- Li, Y., Klena, N. T., Gabriel, G. C., Liu, X., Kim, A. J., Lemke, K., Chen, Y., Chatterjee, B., Devine, W., Damerla, R. R., Chang, C., Yagi, H., San Agustin, J. T., Thahir, M., Anderton, S., Lawhead, C., Vescovi, A., Pratt, H., Morgan, J., & Haynes, L. (2015). Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature*, 521(7553), 520–524.
- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., Taylor, F. R., Wang, E. A., & Galdes, A. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *The Journal of biological chemistry*, 273(22), 14037-14045.
- Peterka, M., Lesot, H. and Peterková, R. (2002) ‘Body Weight in Mouse Embryos Specifies Staging of Tooth Development’, *Connective Tissue Research*. Taylor & Francis, 43(2–3), pp. 186–190.
- Rajagopal, S., Ikeda, S., Ma, Q., Rivera-feliciano, J., von Gise, A., Wu, S. M., Domian, I., Zhou, B., Jiang, D., Pu, W. T., & Chien, K. R. (2008). Epicardial progenitors

contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* (London), 454(7200), 109-113

Sadler, T. W. (2011). *Langmanova lékařská embryologie*. Grada.

Samira, C., Fabienne, L., Steffen, R., Navrita, M., Benjamin, D. S., & Cédric, B. (2016). Uncovering the Number and Clonal Dynamics of *Mesp1* Progenitors during Heart Morphogenesis [article]. *Cell Reports*, 14(1), 1-10.

Sarkar, A., & Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell*, 12(1), 15–30.

Schittny, J. C. (2017). Development of the lung. *Cell and tissue research*, 367(3), 427-444.

Sereti, K.-I., Nguyen, N. B., Kamran, P., Zhao, P., Ranjbarvaziri, S., Park, S., Sabri, S., Engel, J. L., Sung, K., Kulkarni, R. P., Ding, Y., Hsiai, T. K., Plath, K., Ernst, J., Sahoo, D., Mikkola, H. K. A., Iruela-Arispe, M. L., & Ardehali, R. (2018). Analysis of cardiomyocyte clonal expansion during mouse heart development and injury. *Nature communications*, 9(1), 754.

Sirbu, I. O., Chiş, A. R., & Moise, A. R. (2020). Role of carotenoids and retinoids during heart development. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1865(11), 158636.

Sizarov, Aleksander, Ya, Jing, MD, PhD, de Boer, Bouke, Lamers, Wouter, MD, PhD, et al. (2011). Formation of the Building Plan of the Human Heart: Morphogenesis, Growth, and Differentiation. *Circulation*, 123, 1125-1135.

Slough, J., Cooney, L., & Brueckner, M. (2008). Monocilia in the embryonic mouse heart suggest a direct role for cilia in cardiac morphogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(9), 2304-2314.

- Später, D., Abramczuk, M. K., Buac, K., Zangi, L., Stachel, M. W., Clarke, J., Sahara, M., Ludwig, A., & Chien, K. R. (2013). A HCN4⁺ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells. *Nature cell biology*, *15*(9), 1098-1106.
- St-jacques, B., Dassule, H. R., Karavanova, I., Botchkarev, V. A., Li, J., Danielian, P. S., McMahon, J. A., Lewis, P. M., Paus, R., & McMahon, A. P. (1998). Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Current biology*, *8*(19), 1058-1069.
- Van der Heiden, K., Groenendijk, B. C. W., Hierck, B. P., Hogers, B., Koerten, H. K., Mommaas, A. M., Gittenberger-de Groot, A. C., & Poelmann, R. E. (2006). Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas. *Developmental dynamics*, *235*(1), 19-28.
- Van Wijk, B., van den Berg, G., Abu-issa, R., Barnett, P., van der Velden, S., Schmidt, M., Ruijter, J. M., Kirby, M. L., Moorman, A. F. M., & van den Hoff, M. J. B. (2009). Epicardium and Myocardium Separate From a Common Precursor Pool by Crosstalk Between Bone Morphogenetic Protein- and Fibroblast Growth Factor-Signaling Pathways. *Circulation research*, *105*(5), 431-U71.
- Villafañe, J., Feinstein, J. A., Jenkins, K. J., Vincent, R. N., Walsh, E. P., Dubin, A. M., Geva, T., Towbin, J. A., Cohen, M. S., Fraser, C., Dearani, J., Rosenthal, D., Kaufman, B., & Graham, T. P. (2013). Hot Topics in Tetralogy of Fallot. *Journal of the American College of Cardiology*, *62*(23), 2155-2166.
- Waldo, K. L., Kumiski, D. H., Wallis, K. T., Stadt, H. A., Hutson, M. R., Platt, D. H., & Kirby, M. L. (2001). Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field [Article]. *Development*, *128*(16), 3179-3188.
- Wang, J., Cao, J., Dickson, A. L., & Poss, K. D. (2015). Epicardial regeneration is guided by cardiac outflow tract and Hedgehog signalling. *Nature*, *522*(7555), 226–230.

- Washington Smoak, I., Byrd, N. A., Abu-Issa, R., Goddeeris, M. M., Anderson, R., Morris, J., Yamamura, K., Klingensmith, J., & Meyers, E. N. (2005). Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development [Article]. *Developmental Biology*, 283(2), 357-372.
- Wiegering, A., R  ther, U., & Gerhardt, C. (2017). The role of Hedgehog signalling in the formation of the ventricular septum. *Journal of developmental biology*, 5(4), 17.
- Wyszynski, D. F., Correa-Villase  nor, A., & Graham, T. P. (2010 - 2010). *Congenital heart defects: from origin to treatment*. Oxford University Press.
- Xavier, G. M., Seppala, M., Barrell, W., Birjandi, A. A., Geoghegan, F., & Cobourne, M. T. (2016). Hedgehog receptor function during craniofacial development [Review Article]. *Developmental Biology*, 415(2), 198-215.
- Xin, M., Olson, E. N., & Bassel-duby, R. (2013). Mending broken hearts: Cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(8), 529-541.
- Zhang, H., Zhou, L., Yang, R., Sheng, Y., Sun, W., Kong, X., & Cao, K. (2006). Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization [Article]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(1), 135-144.
- Zhang, X. M., Ramalho-santos, M., & McMahon, A. P. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell*, 105(6), 781-792.
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Jiang, D., Von Gise, A., Ikeda, S., Pu, W. T., Rivera-Feliciano, J., Wu, S. M., Domian, I., & Chien, K. R. (2008). Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart [Article]. *Nature*, 454(7200), 109-113.