

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů



Pavel Vebr

Funkční morfologie myokardu
Functional morphology of myocardium

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 5. 5. 2014

Podpis:

Poděkování:

Za cenné rady a svědomitý přístup školitele, který zdaleka nemusí být samozřejmostí, jsem vděčný a upřímně děkuji RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. Za přínosné rady a pomoc v problematice mikroskopie a za šanci v rámci bakalářské práce vycestovat do zahraničí patří velký dík RNDr. Barbaře Elsnicové, Ph.D a RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D. RNDr. Martě Novotové, CSc., děkuji za pomoc při zorientování se v ultrastruktuře srdeční buňky a motivaci k další morfologicky zaměřené práci. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu, ale především děkuji své mamince, která při mně stála nejen při psaní této práce, ale při celém studiu, za její pevné nervy a důvěru, kterou ve mne vkládá.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je literární rešerší shrnující dosavadní poznatky o ultrastruktuře myokardu, v celkovém kontextu vývoje a anatomie srdce. První část práce je shrnutím poznatků anatomie srdce a jeho embryonálního vývoje s důrazem na morfologii kardiomyocytu. Stav vnitřní architektury buněk pracovního myokardu a kvalita jejich vzájemného propojení odráží funkčnost srdce. Lokalizace a kondice buněčných kompartmentů odráží celkový stav buňky. Následující část práce je věnována základnímu rozboru mikroskopických metod, vhodných pro výzkum ultrastruktury srdeční buňky. Výstupem této práce je ucelený přehled o uspořádání morfologicky a funkčně zajímavých útvarů kardiomyocytu, možných proměnách těchto struktur ve vztahu k fyziologickým podmínkám a porovnání mikroskopických metod s ohledem na jejich použití při výzkumu ultrastruktury kardiomyocytu.

Klíčová slova: myokard, morfologie, experimentální metody

ABSTRACT

The thesis is a literary review summarizing current knowledge about the ultrastructure of myocardium in the overall context of the development and anatomy of the heart. The first part of the study is a summary of heart anatomy and its embryonic development, with emphasis on the morphology of cardiomyocytes. The state of inner cytoarchitecture of myocardial cells and the quality of inter-cellular connection reflects the functionality of the heart. Location and condition of cell compartments reflect the overall condition of the cell. The following part is devoted to the basic microscopic analysis methods suitable for research ultrastructure of cardiac cells. The outcome of this work is a comprehensive overview of the organization of remarkable morphological formations in cardiomyocyte, possible changes in ultrastructure in context of physiological conditions and comparison of microscopic methods with regard to their use in research of cardiomyocytes ultrastructure.

Key words: myocardium, morphology, experimental approaches

SEZNAM ZKRATEK

BMP	bone morphogenetic protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DGC	dystrofin-glykoproteinový komplex
DHPR	dihydropyridinový receptor
DKK	Dickkopf protein
ECC	excitacion contraction coupling (spřažení excitace a kontrakce)
FgF8	fibroblast growth factor (fibroblast růstový faktor)
FPALM	fluorescence photoactivation localization microscopy
HF	heartfield
HT	heart tube (srdeční trubice)
LV	left ventricle (levá komora)
<i>Opal/Opal</i>	optical atrophy gene/protein
PALM	photoactivation localization microscopy
PMCA	plasma membrane calcium atpase
PSS	převodní systém srdeční
RV	right ventricle (pravá komora)
RyR2	ryanodinový receptor v srdeční buňce
SERCA2	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SIM	structured illumination microscopy
SRM	superrezoluční metody
STED	stimulated emission depletion
STORM	stochastic optical reconstruction microscopy
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TIRFM	total internal reflection fluorescence microscopy
TOM	translocase of the outer membrane (translokáza vnější membrány)

OBSAH:

1	ÚVOD	1
2	EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ SRDCE	2
3	ANATOMIE SRDCE	5
4	BUŇKA SRDEČNÍHO SVALU.....	6
4.1	Funkční morfologie srdeční buňky	6
4.1.1	Sarkolema	7
4.1.2	Jádro	8
4.1.3	Kontraktilní aparát.....	8
4.1.4	Mitochondrie.....	10
4.1.5	Sarkoplazmatické retikulum	12
5	MIKROSKOPICKÉ METODY.....	14
5.1	Světelná (optická) mikroskopie	14
5.1.1	Klasická světelná mikroskopie	15
5.1.2	Fluorescenční mikroskopie	15
5.2	Elektronová mikroskopie.....	19
5.2.1	Rastrovací elektronový mikroskop	19
5.2.2	Transmisní elektronový mikroskop	19
6	ZÁVĚR	21
7	Použitá literatura	22

1 ÚVOD

Srdce je nejdéle fungujícím orgánem v těle. Srdeční svalovina pracuje již od raného embryonálního vývoje - celý život, bez přestávky, ideálně pravidelně, v závislosti na aktivitě organismu. Jeho úloha pumpy je zcela nezbytná. Kardiovaskulární onemocnění jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí, a proto je kardiovaskulární výzkum zaměřen na studium mechanismů vzniku a možnou prevenci chorob. Morfologické změny přímo souvisí se změnami fyziologických procesů na buněčné úrovni, které se liší v jednotlivých anatomických oblastech srdce. Je tedy nezbytné zabývat se anatomickou strukturou srdce, znát ji do nejmenšího detailu a poznávat morfologické proměny v závislosti na různých fyziologických i patofyziologických podmínkách. Tato poznání jsou důležitá jak v základním, tak aplikovaném výzkumu, protože ultrastruktura srdeční buňky a komunikace jednotlivých kompartmentů je klíčová pro spřažení excitace a kontrakce, a tím pádem funkci celého srdečního svalu jako celku. V rámci fyziologických podmínek můžeme rozpoznat obměny v ultrastrukturálním uspořádání, jako adaptační reakci na různé podmínky, které mohou buď kompenzovat určitá přetížení, nebo negativně ovlivnit funkci kardiomyocytu. Pokud dojde k významné reorganizaci struktury kardiomyocytů, jsou tyto neschopny efektivní kontrakce a způsobují dysfunkci srdeční svaloviny.

Mikroskopie udělala za posledních 40 let obrovský krok vpřed a stala se nenahraditelným článkem výzkumu nejen srdeční struktury a ultrastruktury. Z klasických optických mikroskopů se vyvinuly fluorescenční mikroskopy, elektronové mikroskopy a další. Pro správnou metodiku práce je důležité zvolit vhodnou zobrazovací techniku, proto je druhá část práce věnována základním mikroskopickým principům a technikám, které lze využít pro výzkum morfologických změn v srdci.

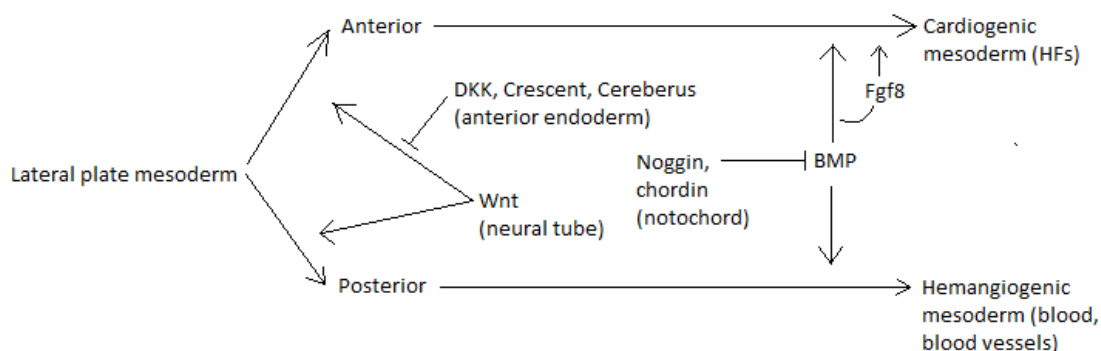
2 EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ SRDCE

Srdce je první funkční orgán embrya, ještě nedovyvinuté začíná tepat asi v 6. týdnu fetálního vývoje jedince. Vzniká ze dvou míst splachnického mezodermu, kdy po obou stranách těla za interakce s okolní tkání vznikají progenitorové buňky srdce. Shlukují se po obou stranách epiblastu do malých chomáčků na přední straně embrya blízko primitivního proužku. Tyto buňky následně migrují skrze primitivní proužek a tvoří dvě skupiny buněk mezodermu laterální plotny (Tam and Behringer, 1997). V okamžiku migrace buněk skrze primitivní proužek vzniká tzv. kardiogenní mezoderm. Progenitorové buňky migrují a proliferyjí tak, že se jejich uspořádání stane anterior – posteriorní osou srdeční trubice (HT), jíž dávají vzniknout (Stalsberg and DeHaan, 1969). Z HT dějem zvaným loop (přetočení) vznikne srdeční klička, následně srdce.

Progenitorové srdeční buňky vznikají na základě působení rozdílného gradientu morfogenů produkovaných pharyngeálním (anteriorním) entodermem a chordou. Důkazem tohoto působení je zastavení vývoje srdce po vyjmutí anteriorního entodermu (Nascone and Mercola, 1995). Působení morfogenů BMPs (Bone morphogenetic protein), především BMP2 produkovaného z anteriorního entodermu, zapříčiňuje vznik srdce, ale i krve při vhodném poměru morfogenů. Významnou úlohu zde hrají inhibitory Wnt signální kaskády, které rozdělují osud laterálního mezodermu na dvě větve, prokardiogenní a hemangiogenní. Mezi tyto inhibitory patří Dickkopf (DKK), Crescent, Cerberus (Schneider and Mercola, 2001). Bez přítomnosti těchto inhibitorů, jako je tomu v posteriorní oblasti embrya, by Wnt proteiny produkované nervovou trubicí daly signál ke vzniku krve a cévního řečiště. BMPs navíc indukují expresi genů pro fibroblast růstový faktor (Fgf8), jehož syntéza je kritickým bodem nezbytným ke vzniku srdečních proteinů (Alsan and Schultheiss, 2002). Inhibiční signály jsou důležité, aby srdce nevzniklo na nevhodném místě embrya. Pro lepší představu poslouží schéma (Obr. 1).

Jedny z nejraněji se exprimujících genů při počátečním formování zárodků srdce jsou *Nkx2-5* a *Mesp1*, regulované BMP (Alsan and Schultheiss, 2002), které jsou důležité pro spuštění mnohočetné a zpětnovazebné genové regulace. Jedním z genů, této regulační kaskády je gen pro expresi regulačního faktoru GATA4, který je prvně přítomný v prekardiálních buňkách při jejich migraci skrze primitivní proužek a je nezbytný pro expresi mnoha genů typických pro srdce, včetně exprese genu pro N-cadherin. N-cadherin

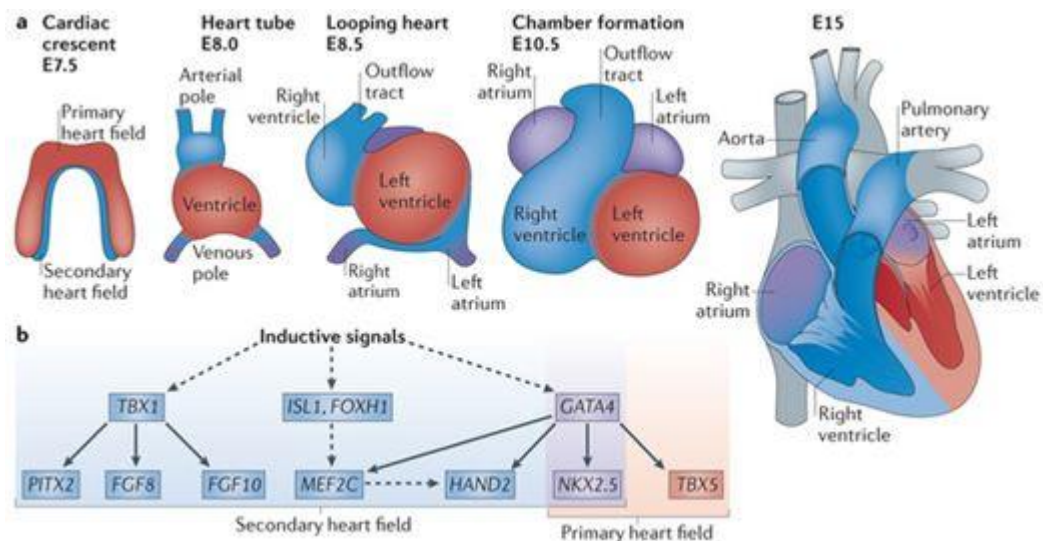
je adhezivní bílkovina důležitá pro splynutí dvou srdečních rudimentů v HT a vznik perikardu (Linask, 1992).



Obr. 1. Zásadní proteinové interakce při určení vývoje srdce a cév; (převzato z Gilbert, 2013; s. 452)

Kubánská embryoložka De La Cruz a kolektiv (1989) zjistili, že kardiogenní mezoderm obratlovců je možno rozdělit na dvě oblasti ze kterých vznikají dvě tzv. srdeční pole (HF1 - heartfields). De La Cruz se domnívala, že se HF1 stává jakýmsi lešením pro vznikající srdce a dává vzniknout pouze levé komoře (LV), jelikož proliferativní schopnost progenitorových buněk, jež ji tvoří, je omezená. Za formaci LV je zodpovědný produkt genu *Tbx5*, který je aktivován transkripčním faktorem *Mesp1* (Koshiba-Takeuchi et al., 2009). Kvůli zjištění, že distribuce progenitorových buněk jednotlivých oddílů srdce není taková, jak předpokládala De La Cruz, se začaly používat také pojmy primárního a sekundárního srdečního pole. Nejnovější poznatky totiž ukazují, že HF1 dává vzniknout i síním (Xin et al., 2013). Buněční předchůdci HF2 přispívají k vývoji obou stran HT. Díky přítomnosti *Mesp1* a *Nkx 2-5* vytváří buňky HF2 produkt *Foxh1* genu. Tento gen je zodpovědný za to, že se z nich stane pravá komora (RV) a srdeční výstupy (základ aorty a plicních tepen), ale zároveň i síně a srdeční vstupy (plicní žíla a vstup duté žíly) (von Both et al., 2004; van den Berg and Moorman, 2011). Podle stávajícího názoru k tvorbě síní přispívají jak prekurzory HF1, tak HF2. Antagonistou *Tbx5*, formujícího levou komoru je *Tbx20*, exprimovaný v RV. Na rozhraní buněk LV exprimujících *Tbx5* a buněk RV exprimujících *Tbx20* se při přetočení vytváří septum interventriculare. Všechny části srdce, ať už myokard, endokard, chlopně, Purkyňova vlákna nebo epikard, jsou tvořeny z těchto srdečních polí a tedy původně jednoho typu srdeční prabuňky (Gourdie et al., 1999; van Wijk et al., 2009).

Směr přetočení HT je závislý na expresi genů signální kaskády Nodal (Franco and Campione, 2003) a genu pro transkripční faktor Pitx2. Pitx2 je exprimován v levém mesodermu laterální ploténky a později vlevo v srdeční trubici (Campione et al., 2001). V HT Nkx2-5 reguluje transkripční faktory Hand1 a Hand2. Jakmile se zahájí přetočení, Hand1 se vyskytuje výhradně v levé komoře a Hand2 v pravé (Biben and Harvey, 1997). Pro správné přetočení srdce jsou velmi důležité také proteiny cytoskeletu (Garita et al., 2011). Samotný proces přetočení je také ovlivňován mechanotransdukci, např. bílkovinou flektinem, jež se podobá myosinu. Důležité pro loop jsou transkripčními faktory Nkx2-5 a Mef2C aktivující *Xin* gen nebo speciální metaloproteinázy (Grosskurth et al., 2008; Lu et al., 2008). Přetočení znázorněno níže (Obr. 2).



Obr. 2. Vývoj srdce. a) Formování progenitorových buněk srdce v pŕlměsíci, vznik srdeční trubice, přetočení srdeční trubice do srdeční kličky, vznik srdce; b) Schéma embryonální proteinové regulace vzniku srdce; (převzato z Xin et al., 2013)

3 ANATOMIE SRDCE

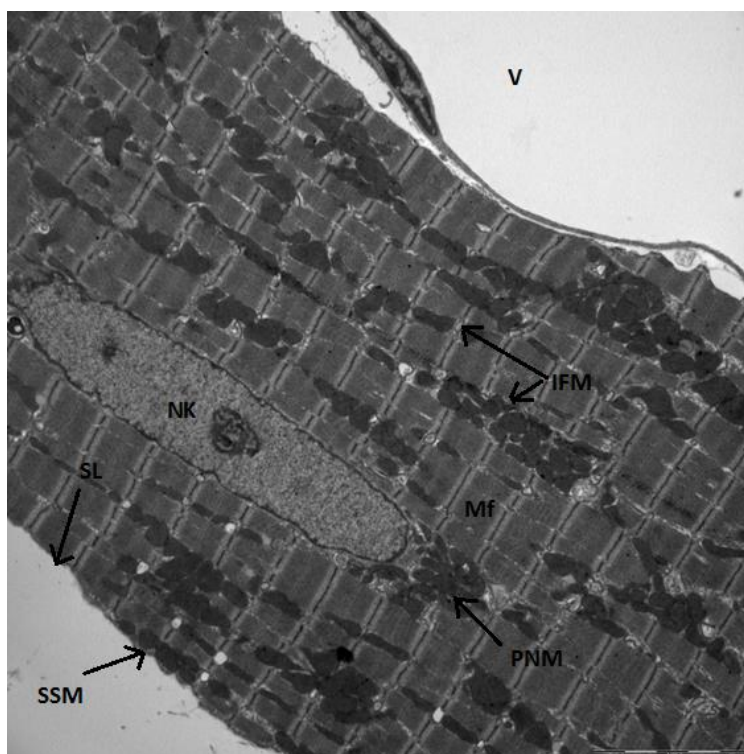
Srdce je hlavním motorem celé oběhové soustavy. Můžeme ho rozdělit proximálně na bazální část (*basis cordis*) s výstupem cév, se síněmi a apikální část (*apex cordis*) se srdečním hrotem. Dále z vnějšího pohledu rozlišujeme *facies sternocostalis* (*anterior*) což je přední vyklenutá plocha směřující ke kosti hrudní a žebrům a *facies diaphragmatica* (*inferior*) strana směrem k bránici, dále *facies pulmonaris*, někdy také česky levá plocha mířící k plíci, *margo acutus* - pravý ostrý okraj srdce a *margo obtusus* - levý oblý okraj srdce (Čihák et al., 2001). Dále můžeme popsat pouhým okem viditelné koronární cévy. Výživu a okysličení stěn srdce zajišťují *aa. coronariae*, jakožto první větve aorty vycházející ze *sinus aortae dexter et sinister*, probíhající a větvící se po celém povrchu srdce, chráněné vazivem a tukem. Jejich komplexnost se srdcem je zajištěna na ně těsně naléhajícím epikardem. Svod odkysličené krve zpět do srdce je zajištěn srdečními žilami, *venae cordis*. Ty ústí buď do *sinus coronarius*, rovnou do pravé síně, nebo například malé žilky mohou ústit přímo do dutin srdce. Srdeční žíly jsou nejčastěji bez chlopní.

Autonomii, automacii a rytmicitu zajišťuje tzv. převodní systém srdeční (PSS) neboli systém srdeční automacie, který je tvořen pozměněnými kardiomyocyty uzpůsobenými k iniciaci a vedení signálu po celém srdci. Vnější vliv na funkci srdce je možný pouze na úrovni frekvence srdečních stahů, pomocí sympatiku a parasympatiku. PSS je tvořen sinoatriálním uzlem, kde se akční potenciál vytváří, a vede přes internodální síňové spoje do atrioventrikulárního uzlu, odkud je veden Hisovým svazkem. Po rozdělení Hisova svazku vedví se vzniklé větve nazývají Tawarova raménka, pravé a levé, ta jsou následně rozdělena v Purkyňova vlákna, která rozvádí vzruch na pracovní myokard komor (Trojan, 2003).

Pracovní myokard je uspořádán do tří vrstev. Povrchová vrstva obtáčí v levotočivé spirále celé srdce, v apikální části se noří snopce dovnitř a tvoří svalovinu papilárních svalů. V průběhu obtáčení povrchové vrstvy se z ní oddělují snopce, které se zanořují pod povrch komor a tvoří druhou, střední, a třetí, hlubokou, vrstvu myokardu. Střední vrstva je cirkulární, vede každou komorou zvlášť nebo osmičkovitě mezi komorami, čímž tvoří hluboké vrstvy septa. Hluboká vrstva je pokračováním dvou předešlých vrstev. Je spíše longitudinální, tvoří papilární svaly a *trabeculae carneae* (Čihák et al., 2001). Nutno připomenout, že všechny výše popsané struktury se mohou v rámci zdravé populace svým tvarem a umístěním mírně lišit.

4 BUŇKA SRDEČNÍHO SVALU

Buňka srdečního svalu neboli kardiomyocyt je dráždivá buňka, schopná přijímat, přeposílat, zpracovávat elektrochemický signál a kontrahovat se. Je základní jednotkou myokardu. Na první pohled připomíná v mikroskopu buňku příčně pruhovaného kosterního svalstva. To znamená, že můžeme rozlišit klasické struktury velmi dobře rozpoznatelné díky pravidelnému uspořádání aktinových a myozinových vláken (Obr. 3). Funkčně mohou buňky, díky svým vodivým vlastnostem, připomínat syncytium. Jednotlivé buňky jsou však na rozdíl od kosterního svalu odděleny interkalárními disky, které ale nejsou hermetickým oddělením buněk, nýbrž obsahují mezibuněčné spoje. Při důkladnějším pozorování lze pozorovat i další odlišnosti od svalové buňky kosterního svalu.



Obr. 3. Podélný řez kontrahovaným kardiomyocytem potkana, vnitřní uspořádání buňky. NK – jádro, IFM – interfibrilární mitochondrie, PNM – perinukleární mitochondrie, SSM – subsarkolemární mitochondrie, Mf – myofibrily tvořené sarkomerami, SL – sarkolema, V – lumen cévy; měřítko 5 μ m (Autor: Dr. Barbara Elsnicová)

4.1 Funkční morfologie srdeční buňky

Buňka srdečního svalu je 100 – 150 μ m dlouhá a 10 – 25 μ m široká. Velmi často je rozvětvená, díky čemuž je srdeční svalovina kompaktní a schopná přenosu elektrického

impulzu. Sestává z buněčné membrány a cytosolu obsahujícího buněčné oddíly specifické pro kardiomyocyt. Jednotlivé morfologické celky budou popsány v následujících kapitolách.

4.1.1 Sarkolema

Kardiomyocyt je ohraničen cytoplazmatickou membránou, tzv. sarkolemou. Sarkolema je fosfolipidová dvojrstva tvořená hydrofobními mastnými kyselinami orientovanými do nitra buňky, polárními fosfátovými zbytky vně a zapuštěnými proteinovými komplexy. Z vnější strany může být kryta glykokalyxovou vrstvou 20-60 nm silnou, připojenou k sarkolemě glykolipidy a glykoproteiny (McNutt, 1975). Hlavní složkou fosfolipidů jsou fosfatidylcholin (cca 45 %) a fosfatidyletanolamin (okolo 30 %) (Post et al., 1995).

Sarkolema utváří různě tvarované funkční struktury, jimiž jsou invaginace, tvořící oblé pinocytózu připomínající vchlípeniny, zvané kaveoly a t-tubulární systém savců. T-tubuly tvoří společně se sarkoplazmatickým retikulem funkční spojení zvaná dyády, nezbytná pro spřažení excitace a kontrakce (ECC). Další specializovanou strukturou sarkolemy je interkalární disk na rozhraní dvou buněk (McNutt, 1975).

T-systém se poprvé podařilo popsat pomocí elektronové mikroskopie Lindnerovi (1957). Díky kolokalizaci t-tubulů a Z-linií na podélném řezu bylo odhadováno, že tubuly probíhají příčně, transversálně, tím dostaly svůj název. Později bylo zjištěno, že tubulární systém může vést i podél myofilament a že systém příčných tubulů v srdci je velice druhově specifický. Vyskytuje se pouze u savců a utváří se plně až po jejich narození a to především v srdečních komorách (Hüser et al., 1996; Perni et al., 2012 podle Bossen et al., 1978).

Šířka t-tubulů je velice rozmanitá jak mezidruhově, tak v rámci jedné buňky. U potkana se pohybuje v rozmezí 30-130 nm v závislosti na poloze. Blíže okraji buňky jsou t-tubuly širší, čím blíže k nitru buňky, tím více se zužují (Ayettey and Navaratnam, 1978).

Sarkolema slouží buňce jako zprostředkovatel přenosu informací z jiné buňky nebo extracelulárního prostředí. V sarkolemě jsou přítomny iontové kanály pro ionty Ca^{++} , K^+ , Na^+ a další, výměníky, receptory a jiné další struktury, které udržují iontovou homeostázu buňky, umožňují přenos informací skrze membránu v obou směrech, šíří akční potenciál atp.

Z vnitřní strany se na sarkolemu upínají aktinová filamenta přes dystrofin-glykoproteinový komplex (DGC). Jde o mechanické spojení důležité pro správnou funkci svalového aparátu. Pokud je například dystrofin, jako jeden z mnoha proteinů této struktury díky mutaci na X-chromozomu, nefunkční, dochází ke kardiomyopatii (Lapidos et al., 2004).

Velmi dobře rozpoznatelnou strukturou tvořenou sarkolemou je interkalární disk, který je funkčním spojením mezi dvěma sousedními kardiomyocyty. Nacházíme v něm tři funkčně významné transmembránové proteinové komplexy - desmozomy, fascia adherens a gap junctions. Desmozomy jsou typické pro buněčné spojení ve tkáních, které jsou zatěžovány velkým tlakem (tahem) (Sheikh et al., 2009) a jsou tvořena transmembránovými proteiny desmogleinem a desmocollinem. Desmozomy nejsou mechanicky spojeny s aktinovými filamenty sarkomery, avšak komunikují s nimi pomocí desminu a dalších (Capetanaki, 2000). Fascia adherens je také buněčným spojením, protože obsahuje transmembránové proteiny N-cadheriny, spojující sarkolemy dvou buněk. Navíc tento mezibuněčný spoj pevně váže aktinová filamenta sarkomery k sarkolemě. Gap junction, vodivé spojení, je tvořeno šesti podjednotkami konexinu. Umožňuje dvěma sousedním buňkám metabolicky a elektricky komunikovat přes extracelulární prostředí (Severs et al., 2008). Mutace v genech kódujících proteiny interkalárního disku mají za následek kardiomyopatie a vznik arytmií (Protonotarios et al., 2001).

4.1.2 Jádru

V buňce srdečního svalu nacházíme jedno až tři jádra (nucleus), jenž je nositelem genetické informace. Můžeme v něm pozorovat klasické struktury heterochromatinu, euchromatinu a jadérko. Nukleus je nejčastěji lokalizován v centru kardiomyocytu (vlastní pozorování). Na obrázcích z elektronového mikroskopu jsou v jaderné membráně póry, které slouží k transportu skrze jadernou membránu. Jádro patrné na souhrnném snímku z elektronového mikroskopu výše (Obr. 3) a.

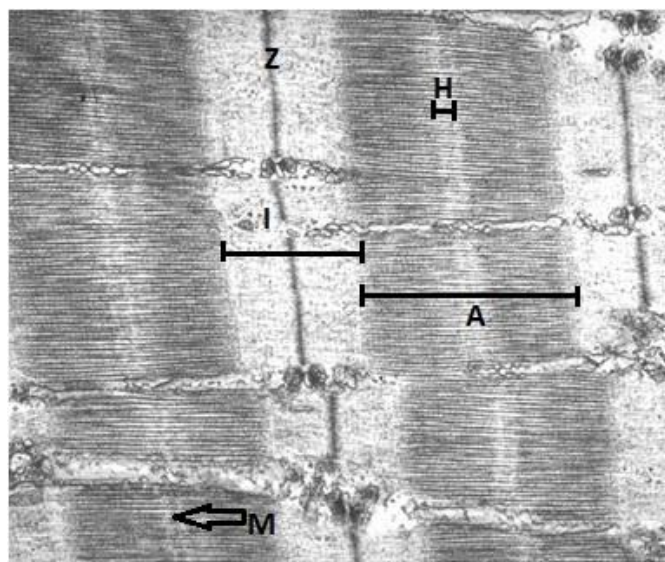
4.1.3 Kontraktilní aparát

Nepřehlédnutelnou strukturu příčně pruhované svaloviny tvoří myofilamenta uspořádaná při pohledu na podélný řez do pravidelných úseků, sarkomer, o délce zhruba 2,3 μm (Obr. 4) (Keurs et al., 1980). Na příčném řezu mají obě skupiny filament pravidelné hexagonální uspořádání, které umožňuje vytvořit efektivní kontraktilní aparát.

V průběhu sarkomer rozeznáváme následující struktury - Z-disky, které ohraničují sarkomeru a kotví se v nich oboustranně aktinová vlákna přes α -aktinin. Od Z-disku na obě strany můžeme rozlišit tzv. I-pruh, který je tvořen pouze tenkými aktinovými filamenty a v polarizovaném světle se jeví izotropně. Anizotropní část sarkomery tvoří A-pruh, složený

z tenkých a tlustých myofilament. Jeho středem prochází H-pruh tvořený pouze myozinovými vlákny bez myozinových hlav (tzv. myozinové ocásky). Uprostřed H-pruhu vede M-linie tvořená myomezinem, který udržuje hexagonální uspořádání myozinových vláken (Agarkova and Perriard, 2005) M-linie sestává ze strukturně velmi podobných M-proteinů M1, M2-M9 a M2'- M9', které jsou vzájemně orientovány antiparalelně a příčně spojují myozinová vlákna. Vytváří tzv. M-můstky a nejsilnější, a nejlépe pozorovatelné, jsou však centrální M1 a párové, M4, M4', M6 a M6'. Jejich syntéza probíhá v závislosti na typu a zatížení svalového vlákna. Příkladem toho jsou jejich různá zastoupení v myokardu u živočichů s rozdílnou frekvencí kontrakce (Pask et al., 1994).

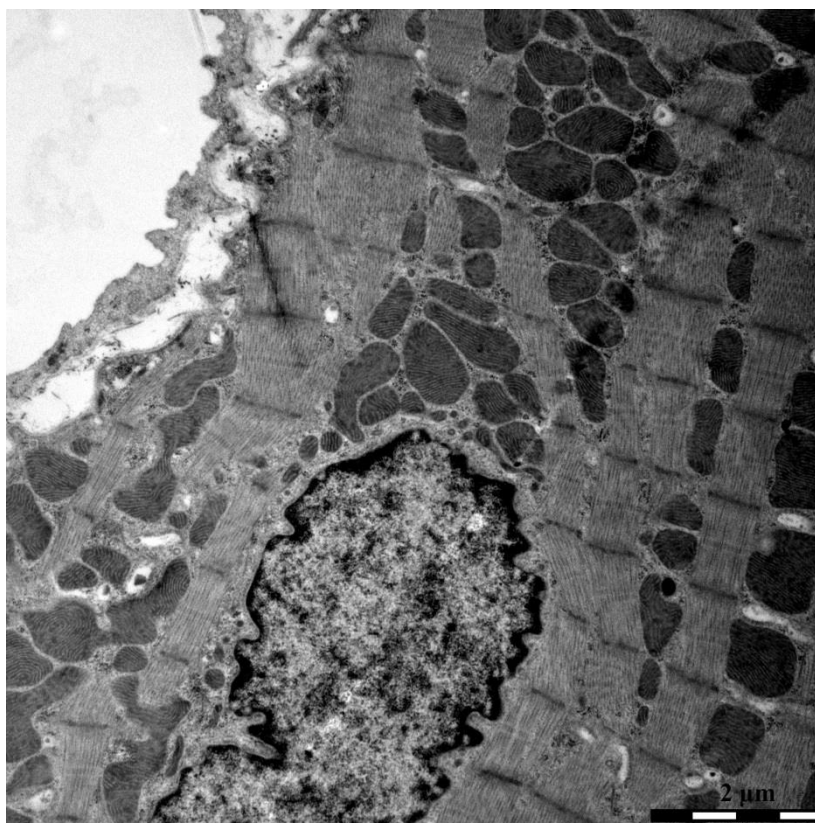
Tenká filamenta jsou tvořena vodivou strukturou tropomyozinu na nějž polymeruje G-aktin v přítomnosti ATP a Mg^{++} . Na každých 7 podjednotek G-aktinu připadá jeden trimerní troponinový komplex, který reguluje kontrakci tak, že v klidovém stavu brání nasednutí myozinové hlavy na aktin. Zvýšená koncentrace Ca^{++} v buňce způsobí konformační změnu tohoto komplexu a myozinová ATPáza se aktivuje vazbou na aktinové filamentum. Mezi dvěma Z-disky, skrze celou sarkomeru, vedou dva dlouhé řetězce titinu (též konektin) stýkající se v M-linii. Titin zajišťuje pevnost sarkomery (Maruyama et al., 1977) a má též významnou signální funkci v synchronizaci metabolických dějů s intenzitou kontrakce (Agarkova and Perriard, 2005). Délku sarkomery zajišťuje v kosterním příčně pruhovaném svalu protein nebulin (McElhinny et al., 2003), nicméně v srdečním svalu nebyl nalezen. Jeho funkci zde zastává jemu podobný protein nebulin (Moncman and Wang, 1995).



Obr. 4. Uspořádání myofilament na podélném řezu. Z – Z-disk; H – H-pruh; I - I-pruh; A - A-pruh, M – M-linie; (převzato z <http://www.uaz.edu.mx/histo/shisto/banuscal/micro94.gif>, upraveno)

4.1.4 Mitochondrie

Další výraznou strukturu srdeční buňky tvoří mitochondrie. Semiautonmní organely, vzniklé, dle současných názorů, endosymbiotickým soužitím. Mitochondrie můžeme rozdělit na tři populace dle lokalizace v buňce (Obr. 3 a 5). Subsarkolemální mitochondrie jsou lokalizované přímo pod sarkolemou a jejich primární funkcí je přímá dodávka ATP pro sarkolemální ATPázy (Na^+/K^+ ATPáza a PMCA – plasma membrane calcium atpase). Interfibrilární mitochondrie (IFM) jsou v těsném kontaktu s myofibrilami a dodávají ATP pro myozinovou ATPázu skrze kreatinkinázový systém (Wallimann et al., 2011). V postnatálním vývoji jsou mitochondrie podél myofibril uspořádány plně až ve 21. dni vývoje potkana (Piquereau et al., 2010). Perinukleární mitochondrie vytváří 2 kónické útvary na pólech jádra paralelně s myofibrilami (vlastní pozorování). V dostupné literatuře je ohledně této oblasti nedostatek informací, ale pravděpodobně slouží k energetické podpoře jaderného transportu a transkripce.



Obr. 5. Kontrahovaný kardiomyocyt potkana, příčný řez. Lze pozorovat všechny populace mitochondrií, zkrácení sarkomer a invaginace jaderné membrány; měřítko 2 μm (Autor: Dr. Barbara Elsnicová)

Mitochondrie je tvořena vnější a vnitřní membránou, jež ji dělí na dva oddíly. Jedním oddílem je mitochondriální matrix a druhým mezimembránový prostor utvářející invaginací krystalů. Vnější membrána je svou strukturou spíše lipidická a hojně skrze ni procházejí TOM β -barely. Velikost molekul, pro které je vnější membrána propustná, se pohybuje okolo tisíce daltonů. Naopak vnitřní membrána je asi z 80 % tvořena bílkoviny, např. z komplexu respiračního řetězce (Herrmann, 2011). Na vnitřní membráně vzniká gradient vodíkových kationtů, díky kterému je poháněna ATP-syntáza.

Nejdůležitější funkcí mitochondrií je oxidace substrátu v oxidačním řetězci. V Krebsově cyklu se na vnitřní mitochondriální membráně oxidují jednotlivé meziprodukty pomocí 4 enzymatických komplexů. Přenos elektronů ze substrátů probíhá přes elektron transportní řetězec na NADH dehydrogenáze (komplex I), sukcinát dehydrogenáze (komplex II), cytochrom bc₁ komplexu (komplex III) a cytochrom oxidáze (komplex IV). V oxidačním řetězci dochází k transportu vodíkových kationtů do intermembránového prostoru. Je prokázáno, že hromadění vodíkových kationtů na konci krist je důležité pro místní zvýšení koncentrace H⁺ a tím správnou funkci ATPsyntáz, které svým uspořádáním tvoří jakýsi hřeben krist (Davies et al., 2011).

Je velmi překvapivé, že jednotlivé populace mitochondrií, se liší svým metabolismem i v rámci jedné buňky. Výzkum Palmera a jeho vědeckého týmu (1977) ukázal, že subsarkolemální mitochondrie oxidují substrát 1,4 až 1,7 krát pomaleji, než interfibrilární populace.

U kvasinek bylo prokázáno, že mitochondrie jsou také funkčně spojeny s endoplazmatickým retikulem přes komplex MINOS v mitochondrii a ERMES v endoplazmatickém retikulu. Lze předpokládat, že vzhledem k prokazatelnému toku Ca⁺⁺ iontů mezi těmito dvěma organelami, existuje obdobné spojení i v myokardu, jen mezi mitochondrií a sarkoplazmatickým retikulem (van der Laan et al., 2012). Tato problematika je v současné době intenzivně zkoumána.

Studie před dvaceti lety prokázaly, že mitochondrie nejsou morfologicky neměnné (Bereiter-Hahn and Vöth, 1994). Je naprosto běžné, že se za fyziologických podmínek mění uspořádání jejich vnitřní membrány (Mannella, 2008), i že dochází ke splývání a rozdělování samotných mitochondrií, tedy vnějších membrán procesem fusion/fission (Rizzuto et al., 1996). Přestavby membránových systémů kontrolují proteiny z rodiny dynaminů. Vnitřní membrána je schopna fúzovat díky proteinovému komplexu MINOS (mitochondrial inner

mambrane organizing system) nebo GTPáze kódované genem *Opal*. Přítomnost dvou komplexů MINOS v těsné blízkosti zodpovídá za stabilitu mitochondriálních krist (Zerbes et al., 2012). Mutace nebo delece *Opal* blokuje fúzi mitochondrií a zvyšuje pravděpodobnost k fission (Olichon et al., 2003). Byly pozorovány i rozdíly ve velikosti mitochondrií v rámci jednoho kardiomyocytu po snížení syntézy *Opal* (optical atrophy protein) (Piquereau et al., 2012). Pro splynutí vnější membrány jsou nezbytné mitofusiny *Mfn1* a *Mfn2*. Knock-out genů pro tyto dva mitofusiny byl pro organismus letální již v embryonálním vývoji. Při výzkumu na buněčných liniích byly mitochondrie při absenci těchto proteinů neschopny fúzovat (Chen et al., 2003). Splynutí dvou vnějších membrán je převážně moderováno komplexy umístěnými na vnitřní mitochondriální membráně (Olichon et al., 2003).

Pro oddělení membrány je nezbytný produkt genu *Drp1*, který je stále exprimován a jeho hladina je dána rychlostí jeho degradace. Proces fission tedy závisí na dostupnosti *Drp1*. V případě, že potenciál na vnitřní membráně je snížen, proteáza *Oma1* štěpí *Opal* na krátké fragmenty a nedostatkem dlouhé varianty *Opal* je blokována fúze (Wikstrom et al., 2014). Je zřejmé, že na fusion/fission se podílí mnoho dalších proteinů (Meeusen et al., 2006; Dorn et al., 2011), tyto jsou však nad rámec této práce.

Proměnlivost mitochondriálních membrán v závislosti na buněčných potřebách je jedním z důležitých ukazatelů buněčného stresu srdečního svalu. Pokud se se srdeční buňkou děje něco neobvyklého, adaptuje se na změnu podmínek nebo je poškozena. Prvním indikátorem bývá pozměněná biogeneze mitochondrií a změna jejich lokalizace. Dochází k jejich nadměrnému nebo nedostatečnému fusion/fission, vymezení drobnějších mitochondrií mezi myofilamenta, mění se mitochondriální kristace, nebo jsou řízeně degradovány (Novotová M., ústní sdělení).

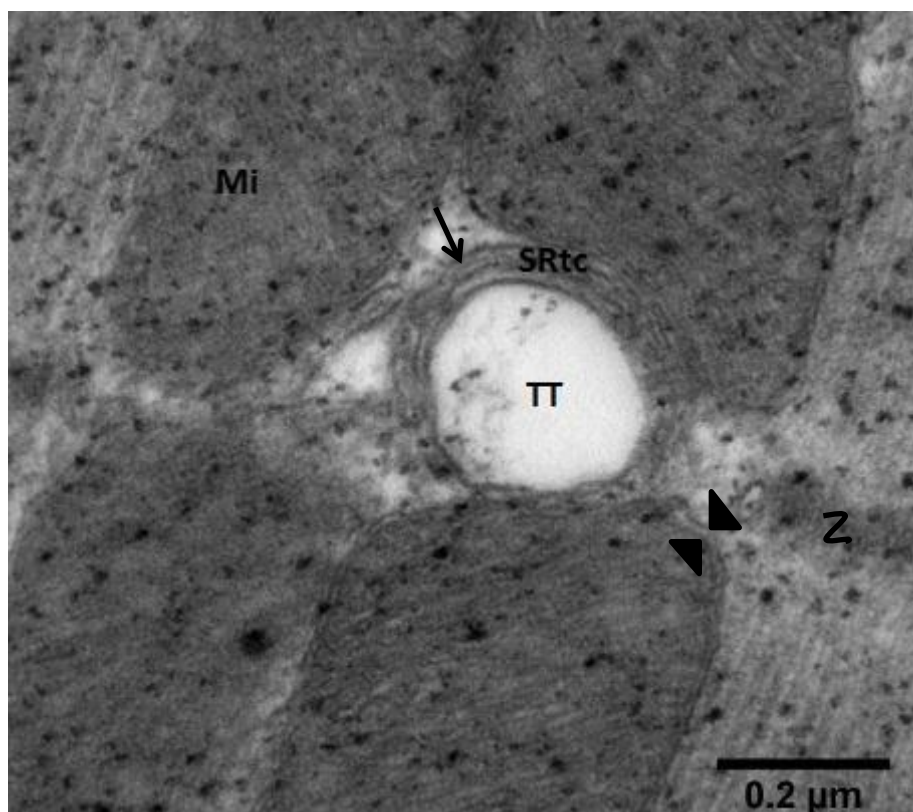
4.1.5 Sarkoplazmatické retikulum

Významnou membránovou strukturu kardiomyocytu tvoří sarkoplazmatické retikulum (SR). SR je specializované endoplazmatické retikulum buněk srdečního svalu. Jeho hlavní funkcí je skladování, masivní vypouštění a následné vycytávání buněčného vápníku v závislosti na cyklu kontrakce a relaxace.

SR tvoří komplikovanou síť tubulů a cisteren. SR se rozpíná po celém buněčném objemu. Tubuly SR se rozkládají okolo myofibril a vycytávají pomocí *SERCA2a* Ca^{++} uvolněný při svalové kontrakci (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007), zatímco terminální

cisterny Ca^{++} ionty především uvolňují a jsou lokalizovány v těsné blízkosti t-tubulů, se kterými tvoří dyády (obr. 6). V terminálních cisternách se vyskytuje kalsekvestrin, jenž na sebe váže ionty Ca^{++} a snižuje tak jejich volnou koncentraci uvnitř retikula. V membráně terminálních cisteren se nacházejí ryanodinové receptory typu 2 (RyR2). Aby jejich rozmístění mělo svůj funkční význam pro ECC, je důležité jejich párování s napěťově ovládanými dihydropyridinovými receptory (DHPR) v membráně t-tubulu, což znamená, že od sebe mohou být vzdáleny maximálně 15 nm (Franzini-Armstrong et al., 1999). Membrány t-tubulu a SR drží při sobě protein junctophilin 2 (Scriven et al., 2013).

Srdce může být zatěžováno mnoha faktory od objemového přetěžování, přes hypoxii, až po různé vrozené kardiomyopatie (Holmgren et al., 2003). Na změny podmínek reaguje také membránový systém buňky. Běžně dochází k přestavbám t-tubulů, mohou se větvit, měnit průřez nebo zanikat. Reakcí na stres může být i rozpad dyád. Jde o proces, kdy se terminální cisterna sarkoplazmatického retikula odchlípne od t-tubulu kvůli snížené syntéze junctophilinu 2. To má za následek oddálení RyR2 receptorů SR od DHPR sarkolemy do vzdálenosti větší než 15 nm a tím se stává dyáda nefunkční (Zhang et al., 2013).



Obr. 6. Dyáda na podélném řezu kardiomyocytem. Z – Z-disk, Mi – mitochondrie, SRtc – terminální cisterna sarkoplazmatického retikula, TT – lumen t-tubulu, šipka ukazuje kalsekvestrin, trojúhelníky vnější a vnitřní mitochondriální membránu; měřítko 0,2 μm (Autor: Dr. Barbara Elsnicová)

5 MIKROSKOPICKÉ METODY

Mikroskopy můžeme rozdělit, dle principů, na kterých stojí zobrazení preparátu, na dva typy – světelné a elektronové. Světelnou mikroskopii dělíme na klasickou a fluorescenční, fluorescenční dále na epifluorescenční, konfokální a superrezoluční metody. Elektronová mikroskopie je dělena podle způsobů detekce elektronů na transmisní elektronovou mikroskopii a skenovací elektronovou mikroskopii.

Podstatou mikroskopie je zvětšení objektu rozměrů, na které nestačí rozlišovací schopnost našeho oka, která je asi 0,25 mm. Zvětšení je v případě světelné mikroskopie možno dosáhnout soustavou čoček okuláru a objektivu, v případě elektronové mikroskopie soustavou elektromagnetických čoček. Rozlišovací schopnost mikroskopu je stanovena Abbeho kriteriem a je definována vzorcem, podle kterého je dosažitelné rozlišení přímo úměrné vlnové délce použitého světla a nepřímo úměrné numerické apertuře objektivu (Abbe, 1873).

$$R = 0,61 \cdot \lambda / n \cdot \sin \theta$$

R (zvětšení)

λ (vlnová délka světla)

n (index lomu)

θ (polovina vrcholového úhlu kužele paprsků vstupujících do objektivu)

Precizně seřízený fluorescenční mikroskop s vysokou numerickou aperturou objektivu dosahuje maximálně zvětšení 2000x a rozlišení kolem 250nm. Elektronový mikroskop dosahuje zvětšení až 10 000 000x a je schopen dosáhnout rozlišení až 50pm. Důvodem vysoké rozlišovací schopnosti je, že elektronový svazek má vlnovou délku řádově sto tisíckrát kratší než paprsek viditelného světla

5.1 Světelná (optická) mikroskopie

Světelná mikroskopie využívá k zobrazení preparátu svazek světla. Světelné mikroskopy můžeme rozdělit z mnoha hledisek, např. dle typu zdroje světla. Preparát může být osvětlen, či prosvětlen světlem bílým, světlem s energií v rozmezí definovaných vlnových délek nebo laserem o jedné vlnové délce. Teoretické zvětšení je až 2000x, nicméně je limitováno rozlišovací schopností mikroskopu.

5.1.1 Klasická světelná mikroskopie

Klasická světelná mikroskopie, představuje nejpůvodnější metodu studia morfologie tkání. Tato metoda se využívá především při výzkumu embryonálního vývoje nebo při histologických rozborech myokardu v medicínálních vědách. Při klasické optické mikroskopii se uplatňují nejčastěji techniky barvení preparátu čtyřmi metodami - Hematoxylin-eosinem, Weigert van Giesonem, trichromem a AZANem. Hematoxylin je bazický a barví buněčná jádra modrofialovou barvou, eosin je kyselý a barví růžově cytoplasmu. Wegert van Giesonova barva barví jádra hnědočerně, vazivo červeně a svalstvo žlutě. Trichromová barviva jsou tři. Žluté, zelené a modré a každé barví struktury jinou barvou, jádra však každé z nich vždy tmavě modrou. AZAN barví jádra červeně a kolagenní vazivo modře.

Jakkoli jsou klasické histologické techniky stále spolehlivé v lékařské diagnostice, v oblasti základního výzkumu dnes zažíváme obrovský rozvoj vysoce sofistikovaných mikroskopických technik, které dřívější metody staví do ústraní.

5.1.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je v současnosti jednou ze základních metod zkoumání mikrosvěta v experimentální biologii, především, co se týče výzkumu lokalizace proteinů (Chen et al., 2003).

Fluorescenční mikroskopické techniky jsou založené na detekci fotoluminiscenčních látek, tedy látek schopných po excitaci na vyšší energetickou hodnotu vyzářit (emitovat) absorbovanou energii ve formě fotonů. Tyto látky mohou být zkoumanému objektu vlastní nebo uměle dodané. Vlastní fluorescenci vykazují například chloroplasty nebo lysosomy obsahující organické sloučeniny, jež jsou samy fluorochromem. Fluorescenční techniky však můžeme použít i pro studium struktur bez vlastní fluorescence. Hovoříme pak buď o metodách tzv. přímé fluorescence, kdy se fluorochrom váže přímo do studované struktury, nebo o metodách fluorescence nepřímé, kdy fluorochrom do studovaných struktur vážeme přes specifickou sondu, ligand nebo protilátku. Příkladem přímé fluorescence jsou modře emitující DAPI, vážající se přímo na DNA nebo faloidin, jed muchomůrky zelené, specificky se vážající na polymerovaný aktin. Nejhojněji využívanou metodou nepřímé fluorescence je pak immunoafinitní značení pomocí specifických protilátek. Ty se s vysokou afinitou vážou na studovanou strukturu a lze je fluorescenčně detekovat. I zde rozlišujeme dvě základní metody. Fluorochrom je buď přímo navázán na molekule protilátky (přímá

imunofluorescence), nebo se na strukturu váže specifická (primární) protilátka bez značky a fluorochrom nese až protilátka sekundární, nasedající na primární (nepřímá imunofluorescence). K pozorování fluorescenčně značených preparátů se dnes nejčastěji užívá buď epifluorescenčních mikroskopů nebo mikroskopů konfokálních.

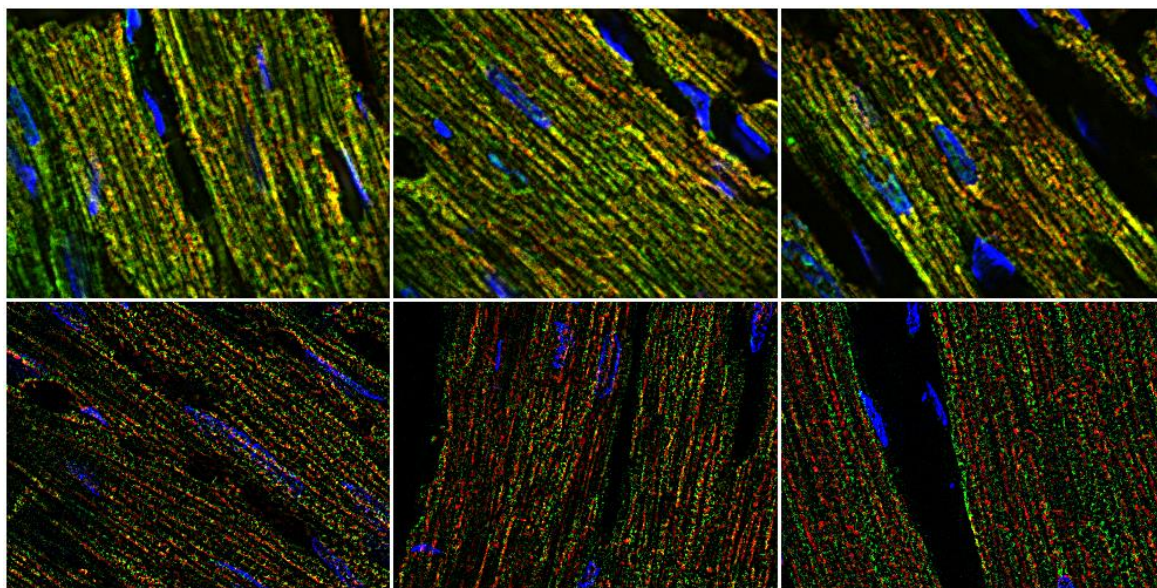
5.1.2.1 Epifluorescenční mikroskop

Pojem epifluorescence odkazuje na optickou cestu, kterou urazí světlo při průchodu zobrazovací soustavou (mikroskopem). V klasickém optickém mikroskopu jde od zdroje světla skrz kondenzor, preparát a objektiv do okuláru nebo kamery. Zdrojem světla v epifluorescenčním mikroskopu je halogenová výbojka, emitující bílé světlo o celém spektru vlnových délek, tzv. „wide-field“ mód. Ze zdrojového bílého světla je následně třeba pomocí soustavy filtrů získat pouze úzké, tzv. excitační spektrum vlnových délek, odpovídající použitému fluorochromu. V epifluorescenčním mikroskopu prochází excitační záření od zdroje shora objektivem na preparát, zde excituje fluorochrom a emitované sekundární záření (tj. fluorescence) prochází opět objektivem do okuláru (kamery). Aby se zabránilo mísení excitačního a emisního záření, vkládá se do optické cesty polopropustné (dichroické) zrcadlo, které excitační záření (s kratší vlnovou délkou) odrazí na preparát a emisní záření (s delší vlnovou délkou) propustí do objektivu (kamery). Excitační filtr, dichroické zrcadlo a emisní filtr bývají konstrukčně spojeny do tzv. fluorescenční kostky, jejíž charakteristiky odpovídají vždy konkrétnímu fluorochromu

5.1.2.2 Konfokální mikroskop

Konfokální mikroskopy mohou také využívat „wide-field“ módu, stejně jako epifluorescenční mikroskopy, k přímému pozorování preparátu. Nicméně zpravidla při ostrém snímání obrazu, je preparát prosvěcován laserovým paprskem o specifické excitační vlnové délce. Dnes je možné využívat komerčně dostupné akusto-optické laditelné filtry, které umožňují jemnou modulaci vlnové délky laserového svazku. Nejpodstatnější výhodou konfokálního mikroskopu je však schopnost skenovat pomocí laseru pouze jedinou rovinu ostrosti, aniž by do výsledného obrazu zasahoval signál z rovin mimo rovinu zaostření. Tuto schopnost zajišťuje speciální clona tzv. „pine hole“, která odcloní emitující světlo z nezaostřených rovin preparátu (Patel and McGhee, 2007). Konfokální mikroskopy tak

dosahují výrazně vyšší ostrosti obrazu. Na obrázku (Obr. 7) lze vidět rozdíl mezi ostroty klasického a konfokálního fluorescenčního mikroskopu.



Obr. 7. Ilustrace rozdílu mezi epifluorescenční a konfokální mikroskopií. Horní řada obrázků z epifluorescenčního mikroskopu, spodní řada konfokální mikroskopie. Modře jádra barvená DAPI, zeleně hexokináza1 barvená anti HK1 + sekundární protilátka Alexa 488, červeně mitochondrie barvené Blue native oxphos WB + Alexa 647; (Autor: Dr. Barbara Elsnicová)

5.1.2.3 Superrezoluční metody

Jak bylo výše popsáno, rozlišení ve světelné mikroskopii je omezeno vlnovou délkou světla. V současné době jsou však k dispozici mikroskopické metody umožňující nasnímaní obrazu s výrazně vyšším rozlišením, než by odpovídalo difrakčnímu limitu. Lze je rozlišit na tzv. pravé a funkční superrezoluční metody (SRM).

Pravé superrezoluční metody

Pravé SRM zachycují informaci obsaženou v evanescentních vlnách, které vznikají na hranici prostředí s různým indexem lomu. Do prostředí s nižším indexem lomu světlo neproniká, evanescentní vlna však ano. Toho principu se využívá například při metodě pozorování fluorescence v totální interní reflexi (TIRFM, total internal reflection fluorescence microscopy). Excitační paprsek se v tupém úhlu odrazí od krycího skla a excitaci preparátu tak zajišťuje pouze evanescentní vlna. Evanescentní vlna proniká pouze do omezené hloubky preparátu, tato metoda je proto vhodná např. ke studiu buněčných membrán (Axelrod, 1981).

Mezi pravé SRM můžeme také zařadit 4Pi mikroskopii, která využívá dvou stejných objektivů, každý na protilehlé straně vzorku, zaostřené na stejné místo. Obrazy z nich se skládají a ve výsledku tak fungují jako jeden objektiv s dvojnásobnou numerickou aperturou, což vede ke zlepšení rozlišení (Schrader et al., 1998).

Dalším typem pravých SRM je mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SIM, Structured illumination microscopy), která využívá difrakce světla na mřížce, přes kterou je vzorek snímán. Interferencí s detaily vzorku vzniká „moiré“ efekt. Jeho následným počítačovým zpracováním lze vyhodnotit, jak vypadaly struktury, jež ho způsobily, a získat tak obrázek obsahující jemnější detaily s rozlišením okolo 100 nm (Gustafsson, 2005).

Funkční superrezoluční metody

Funkční SRM využívají k překročení difrakčního limitu buď specifické konstrukční prvky v zobrazovací soustavě, nebo zvyšují rozlišení softwarovou rekonstrukcí již nasnímaného obrazu. Naprostá většina SRM spadá do této kategorie.

Jako zástupce funkčních SRM je možné uvést metodu vyčerpání stimulovanou emisí (STED, Stimulated emission depletion). Fluorofor se osvětlí excitačním zářením a zároveň také světlem s delší vlnovou délkou. V místě působení toho světla je fluorescence preparátu zhasána. Paprsek laseru s vyšší vlnovou délkou má na průřezu tvar mezikruží, takže ke zhasání fluorescence dochází pouze u okraje oblasti osvětlené excitačním laserem. Fluorescenční záření tak vzniká pouze v nezhasané oblasti uvnitř mezikruží, čímž dochází ke zlepšení rozlišení (Patterson, 2009). V případě metody STED hovoříme také o deterministickém typu SRM.

Další skupinou funkčních SRM představují metody stochastické, do které můžeme zařadit metody STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (PhotoActivation Localization Microscopy) a FPALM (Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy). Tyto metody jsou založeny na stejném principu. Fluorochromy pro tyto techniky mají dva stavy, jeden schopný fluorescence a druhý fluorescence neschopný. Tyto dva stavy se stochasticky přepínají. Fluorochromů schopných fluorescence je v daném okamžiku jen malé množství. Jejich signál se nasnímá, fluorochromy jsou během snímání vyběleny a v dalším okamžiku již dochází ke snímání další skupiny aktivních fluorochromů. Tento postup se opakuje, dokud není nasnímán dostatečné množství fluorochromů. Fotony nasnímané z jednoho fluorochromu jsou detekovány podle rozptylové funkce (PSF, point

spread function). Matematicky se určí střed PSF a danému fluorochromu se přiřadí tato spočítaná souřadnice. Stochastickými metodami SRM lze dosáhnout rozlišení až v jednotkách nm (Rust et al., 2006). Pro detailní popis i uvedených metod včetně ilustračních snímků vyhledejte review autora Huanga a jeho spoluautorů (2009).

5.2 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie využívá jako zdroj záření elektrony, které jsou vyslány proti vzorku urychlovacím napětím. V závislosti na způsobu detekce elektronů můžeme rozlišit dva typy elektronových mikroskopů.

5.2.1 Rastrovací elektronový mikroskop

Rastrovací elektronový mikroskop se používá především ke skenování trojrozměrných povrchových struktur. K základním principům této metody patří potažení vzorku vrstvou zlata, čímž se dosáhne výborné odrazivosti elektronů, potřebné pro zobrazení 3D struktury. Detekují se buď sekundární elektrony, nebo elektrony odražené.

5.2.2 Transmisní elektronový mikroskop

Transmisní elektronový mikroskop (TEM) na rozdíl od rastrovacího elektronového mikroskopu funguje na bázi přímého průchodu elektronů vzorkem, nikoliv na jejich odrazivosti. V principu je velmi podobný mikroskopům světelným, s tím rozdílem, že jeho zvětšení může být až milion násobné. Ultrastrukturální morfologie pozorovaná na úrovni TEM umožňuje v současné době nejpodrobnější pohled do nitra buněk (Piquereau et al., 2010).

Speciální TEM techniky umožňují také imunoafinitní značení, které využívá nanometrové partikule koloidního zlata a umožňuje sledovat lokalizaci jednotlivých proteinů, případně kolokalizaci dvou proteinů na ultrastrukturální úrovni (Hainfeld and Furuya, 1992). Tato technika má velmi specifické úskalí. Pokud používáme k imunoafinitnímu značení tzv. „sendviče“ primární a sekundární protilátky, partikule koloidního zlata se na elektronmikroskopickém preparátu může nacházet kdekoli v poloměru 15-30nm od vlastního epitopu. Je tedy poměrně náročné určit přesnou lokalizaci sledovaného proteinu.

Speciálními technikami TEM, v poslední době stále častěji používanými, jsou kryoelektronová mikroskopie a korelační elektronová mikroskopie, která je kombinací TEM a konfokální mikroskopie (Sartori et al., 2007). Obě přinášejí detailní znalosti o subcelulární lokalizaci makromolekul a představují absolutní špičku vývoje mikroskopických technik.

Příprava preparátů pro elektronovou respektive korelační mikroskopii je poměrně složitá. Zahrnuje precizní fixaci, odvodnění preparátu, kontrastování těžkými kovy, krájení velmi tenkých řezů od 10 do 70 nm. Pokročilé techniky elektronové mikroskopie jako imunoafinitní značení, kryoelektronová mikroskopie a korelační elektronová mikroskopie vyžadují zcela specifické postupy přípravy preparátu. Složitá příprava vzorků proto odrazuje mnoho badatelů od masivnějšího využívání elektronové mikroskopie.

6 ZÁVĚR

Ultrastruktura srdeční buňky je dynamická, mění se v závislosti na stavu buňky a odráží na funkčnosti celého srdce. Poruchy metabolických drah a neschopnost správného sestavení buněčných organel způsobené genovými mutacemi, či vnitřní přestavby v rámci adaptace na změnu fyziologických podmínek nebo například hypoxický stres při infarktu jsou faktory působící na funkci kardiomyocytu. Buňka je pomocí interní komunikace a zároveň komunikace s extracelulárním prostředím a sousedními buňkami schopna rychle reagovat a kompenzovat změny prostředí. Vizualizace morfologie myokardu je důležitým doplňkem výzkumu postaveném na molekulárních analýzách a naopak. Je proto přínosné orientovat se v mikroskopických metodách a znát jejich výhody, nevýhody a omezení. Nevhodný výběr zobrazovací techniky může při obrazové analýze znehodnotit nebo výrazně prodloužit celý výzkum, pokud má užitý mikroskop malé rozlišení nebo je naopak zbytečně předimenzovaný.

7 Použitá literatura

Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* 9, 413–418.

Agarkova, I., and Perriard, J.-C. (2005). The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol.* 15, 477–485.

Alsan, B.H., and Schultheiss, T.M. (2002). Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Dev. Camb. Engl.* 129, 1935–1943.

Ayettey, A.S., and Navaratnam, V. (1978). The T-tubule system in the specialized and general myocardium of the rat. *J. Anat.* 127, 125–140.

Bereiter-Hahn, J., and Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198–219.

Van den Berg, G., and Moorman, A.F.M. (2011). Development of the Pulmonary Vein and the Systemic Venous Sinus: An Interactive 3D Overview. *Plos One* 6, e22055.

Biben, C., and Harvey, R.P. (1997). Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene *eHand* during murine heart development. *Genes Dev.* 11, 1357–1369.

Bossen, E.H., Sommer, J.R., and Waugh, R.A. (1978). Comparative stereology of the mouse and finch left ventricle. *Tissue Cell* 10, 773–784.

Von Both, I., Silvestri, C., Erdemir, T., Lickert, H., Walls, J.R., Henkelman, R.M., Rossant, J., Harvey, R.P., Attisano, L., and Wrana, J.L. (2004). Foxh1 Is Essential for Development of the Anterior Heart Field. *Dev. Cell* 7, 331–345.

Campione, M., Ros, M.A., Icardo, J.M., Piedra, E., Christoffels, V.M., Schweickert, A., Blum, M., Franco, D., and Moorman, A.F.M. (2001). Pitx2 Expression Defines a Left Cardiac Lineage of Cells: Evidence for Atrial and Ventricular Molecular Isomerism in the iv/iv Mice. *Dev. Biol.* 231, 252–264.

Capetanaki, Y. (2000). Desmin cytoskeleton in healthy and failing heart. *Heart Fail. Rev.* 5, 203–220.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189–200.

ČIHÁK, R. *Anatomie 3. 2., upr. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2004, 673 s. ISBN 80-247-1132-X.

Čihák, R., Grim, M., Druga, R., Med, M., and Helekal, I. (2001b). *Anatomie* (Praha: Grada).

Daniel Axelrod (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* 89, 141–145.

Davies, K.M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J.H., Osiewacz, H.D., Rycovska, A., Zickermann, V., and Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Dorn, G.W., Clark, C.F., Eschenbacher, W.H., Kang, M.-Y., Engelhard, J.T., Warner, S.J., Matkovich, S.J., and Jowdy, C.C. (2011). MARF and Opa1 Control Mitochondrial and Cardiac Function in *Drosophila*. *Circ. Res.* 108, 12–17.

Franco, D., and Campione, M. (2003). The role of Pitx2 during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 157–163.

Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., and Ramesh, V. (1999). Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* 77, 1528–1539.

Garita, B., Jenkins, M.W., Han, M., Zhou, C., VanAuker, M., Rollins, A.M., Watanabe, M., Fujimoto, J.G., and Linask, K.K. (2011). Blood flow dynamics of one cardiac cycle and relationship to mechanotransduction and trabeculation during heart looping. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 300, H879–H891.

GILBERT, S. F. *Developmental biology*. 7th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, c2003, xvii, 838 p. ISBN 978-80-247-1132-4.

Gourdie, R.G., Kubalak, S., and Mikawa, T. (1999). Conducting the embryonic heart: Orchestrating development of specialized cardiac tissues. *Trends Cardiovasc. Med.* 9, 18–26.

Grosskurth, S.E., Bhattacharya, D., Wang, Q., and Lin, J.J.-C. (2008). Emergence of Xin Demarcates a Key Innovation in Heart Evolution. *PLoS ONE* 3.

Gustafsson, M.G.L. (2005). Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13081–13086.

Hainfeld, J.F., and Furuya, F.R. (1992). A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 177–184.

Herrmann, J.M. (2011). MINOS is plus: a Mitofilin complex for mitochondrial membrane contacts. *Dev. Cell* 21, 599–600.

Holmgren, D., Wåhlander, H., Eriksson, B.O., Oldfors, A., Holme, E., and Tulinius, M. (2003). Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease Clinical course and cardiological findings. *Eur. Heart J.* 24, 280–288.

Huang, B., Bates, M., and Zhuang, X. (2009). Super resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 993–1016.

Hüser, J., Lipsius, S.L., and Blatter, L.A. (1996). Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* *494*, 641–651.

Keurs, H.E. ter, Rijnsburger, W.H., Heuningen, R. van, and Nagelsmit, M.J. (1980). Tension development and sarcomere length in rat cardiac trabeculae. Evidence of length-dependent activation. *Circ. Res.* *46*, 703–714.

Koshiba-Takeuchi, K., Mori, A.D., Kaynak, B.L., Cebra-Thomas, J., Sukonnik, T., Georges, R.O., Latham, S., Beck, L., Beck, L., Henkelman, R.M., et al. (2009). Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature* *461*, 95–98.

De La Cruz, M.V., Sanchez-Gomez, C., and Palomino, M.A. (1989). The primitive cardiac regions in the straight tube heart (Stage 9-) and their anatomical expression in the mature heart. *J. Anat.* *165*, 121–131.

Van der Laan, M., Bohnert, M., Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2012). Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends Cell Biol.* *22*, 185–192.

Lapidos, K.A., Kakkar, R., and McNally, E.M. (2004). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ. Res.* *94*, 1023–1031.

Linask, K.K. (1992). N-cadherin localization in early heart development and polar expression of Na⁺,K⁺-ATPase, and integrin during pericardial coelom formation and epithelialization of the differentiating myocardium. *Dev. Biol.* *151*, 213–224.

Lindner, E. (1957). Die submikroskopische Morphologie des Herzmuskels. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* *45*, 702–746.

Lu, W., Seeholzer, S.H., Han, M., Arnold, A.-S., Serrano, M., Garita, B., Philp, N.J., Farthing, C., Steele, P., Chen, J., et al. (2008). Cellular nonmuscle myosins NMHC-IIA and NMHC-IIB and vertebrate heart looping. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 3577–3590.

Mannella, C.A. (2008). Structural Diversity of Mitochondria: Functional Implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1147*, 171–179.

Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., and Kimura, S. (1977). Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and Function. *J. Biochem. (Tokyo)* *82*, 317–337.

McElhinny, A.S., Kazmierski, S.T., Labeit, S., and Gregorio, C.C. (2003). Nebulin: The Nebulous, Multifunctional Giant of Striated Muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* *13*, 195–201.

McNutt, N.S. (1975). Ultrastructure of the myocardial sarcolemma. *Circ. Res.* *37*, 1–13.

Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2006). Mitochondrial Inner-Membrane Fusion and Crista Maintenance Requires the Dynamin-Related GTPase Mgm1. *Cell* *127*, 383–395.

Moncman, C.L., and Wang, K. (1995). Nebulette: a 107 kD nebulin-like protein in cardiac muscle. *Cell Motil. Cytoskeleton* 32, 205–225.

Nascone, N., and Mercola, M. (1995). An inductive role for the endoderm in *Xenopus* cardiogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 121, 515–523.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743–7746.

Palmer, J.W., Tandler, B., and Hoppel, C.L. (1977). Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 252, 8731–8739.

Pask, H.T., Jones, K.L., Luther, P.K., and Squire, J.M. (1994). M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15, 633–645.

Patel, D.V., and McGhee, C.N. (2007). Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 35, 71–88.

Patterson, G.H. (2009). Fluorescence microscopy below the diffraction limit. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 886–893.

Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430–442.

Perni, S., Iyer, V.R., and Franzini-Armstrong, C. (2012). Ultrastructure of cardiac muscle in reptiles and birds: optimizing and/or reducing the probability of transmission between calcium release units. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 33, 145–152.

Piquereau, J., Novotova, M., Fortin, D., Garnier, A., Ventura-Clapier, R., Veksler, V., and Joubert, F. (2010). Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J. Physiol.* 588, 2443–2454.

Piquereau, J., Caffin, F., Novotova, M., Prola, A., Garnier, A., Mateo, P., Fortin, D., Huynh, L.H., Nicolas, V., Alavi, M.V., et al. (2012). Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 94, 408–417.

Post, J.A., Verkleij, A.J., and Langer, G.A. (1995). Organization and function of sarcolemmal phospholipids in control and ischemic/reperfused cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 749–760.

Protonotarios, N., Tsatsopoulou, A., Anastasakis, A., Sevdalis, E., McKoy, G., Stratos, K., Gatzoulis, K., Tentolouris, K., Spiliopoulou, C., Panagiotakos, D., et al. (2001). Genotype-phenotype assessment in autosomal recessive arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (Naxos disease) caused by a deletion in plakoglobin. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 1477–1484.

Rizzuto, R., Brini, M., Giorgi, F.D., Rossi, R., Heim, R., Tsien, R.Y., and Pozzan, T. (1996). Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo. *Curr. Biol.* *6*, 183–188.

Rust, M.J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006). Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution. *Nat. Methods* *3*, 793–795.

Sartori, A., Gatz, R., Beck, F., Rigort, A., Baumeister, W., and Plitzko, J.M. (2007). Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *J. Struct. Biol.* *160*, 135–145.

Schneider, V.A., and Mercola, M. (2001). Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* *15*, 304–315.

Schrader, M., Bahlmann, K., Giese, G., and Hell, S.W. (1998). 4Pi-confocal imaging in fixed biological specimens. *Biophys. J.* *75*, 1659–1668.

Scriven, D.R.L., Asghari, P., and Moore, E.D.W. (2013). Microarchitecture of the dyad. *Cardiovasc. Res.* *98*, 169–176.

Severs, N.J., Bruce, A.F., Dupont, E., and Rothery, S. (2008). Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc. Res.* *80*, 9–19.

Sheikh, F., Ross, R.S., and Chen, J. (2009). Cell-Cell Connection to Cardiac Disease. *Trends Cardiovasc. Med.* *19*, 182–190.

Stalsberg, H., and DeHaan, R.L. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev. Biol.* *19*, 128–159.

Tam, P.P.L., and Behringer, R.R. (1997). Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech. Dev.* *68*, 3–25.

TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. přepr. a dopl. Praha: Grada Publishing, 2003, 771 s. ISBN 80-247-0512-5.

Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., and Schlattner, U. (2011). The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* *40*, 1271–1296.

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., and 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. *Circ. Res.* *105*, 431–441.

Wikstrom, J.D., Mahdavian, K., Liesa, M., Sereda, S.B., Si, Y., Las, G., Twig, G., Petrovic, N., Zingaretti, C., Graham, A., et al. (2014). Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO J.* *33*, 418–436.

Xin, M., Olson, E.N., and Bassel-Duby, R. (2013). Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 529–541.

Zerbes, R.M., van der Klei, I.J., Veenhuis, M., Pfanner, N., van der Laan, M., and Bohnert, M. (2012). Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol. Chem.* 393, 1247–1261.

Zhang, H.-B., Li, R.-C., Xu, M., Xu, S.-M., Lai, Y.-S., Wu, H.-D., Xie, X.-J., Gao, W., Ye, H., Zhang, Y.-Y., et al. (2013). Ultrastructural uncoupling between T-tubules and sarcoplasmic reticulum in human heart failure. *Cardiovasc. Res.* 98, 269–276.

Internetové zdroje:

[online]. [cit. 2014-04-12]. Dostupné z:

<http://www.uaz.edu.mx/histo/shisto/banuscal/micro94.gif>