

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kristýna Skuhrová

Mechanismus růstu převodního systému srdečního
Mechanisms of growth of the cardiac conduction system

Bakalářská práce

Školitel: Prof. MUDr. David Sedmera, D.Sc

Praha, 2015

Chtěla bych poděkovat Prof. MUDr. Davidovi Sedmerovi, D.Sc. za odborné vedení, věcné připomínky a trpělivost při konzultaci a vypracování bakalářské práce. Mé poděkování patří též Mgr. Martině Gregorovičové za spolupráci při vyhledávání zdrojů a korekturu práce. Na závěr bych chtěla poděkovat i rodině a přátelům za podporu a trpělivost.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 05. 2015

Abstrakt

Nezávislost na nervové soustavě a schopnost pravidelného rytmu jsou vlastnosti, které srdci zajišťuje převodní systém srdeční. Převodní systém se skládá ze sinoatriálního uzlu, internodálních spojů, atrioventrikulárního uzlu, atrioventrikulárního (Hisova) svazku, pravého a levého Tawarova raménka a terminální sítě Purkyňových vláken. Tento systém je však častým zdrojem poruch srdečního rytmu neboli arytmií. Okolo převodního systému stále zůstává mnoho nezodpovězeno i přes to, že jeho růst úzce souvisí se vznikem celého srdce. Během vývoje srdce dochází k výrazným změnám, kdy se lineární trubice vyvine v dospělý čtyřdutinový orgán. Stáčení a vytváření srdečních dutin ovlivňuje přesun prvotního pacemakeru z kaudálního konce lineárního srdce do oblasti pravé síně. Prenatální růst srdce je zajištěn buněčnou proliferací neboli hyperplazií. Brzy po narození dochází k prudkému zastavení buněčného dělení a buňky rostou ve svém objemu, tj. hypertrofií. U některých druhů se mohou buňky rozšiřovat výhradně hypertrofií nebo hyperplazií v brzkém postnatálním období. Právě myš je jedním z organismů, jehož růst je zajištěn kombinací proliferace a hypertrofie. Ve většině dospělých kardiomyocytů jsou obsaženy dvě jádra, dvoujadernost buněk je však dosažena až několik dní po narození. U myši může být indukce Purkyňových buněk zajištěna transkripčními faktory, jako je například endotelin či neuregulin.

Klíčová slova: myš, kardiomyocyt, proliferace, hypertrofie, hyperplazie, binukleace

Abstract

The ability to produce regular rhythm and independence of nervous system and are some of the features of the cardiac conduction system. The conduction system comprises the sinoatrial node, internodal tracts, the atrioventricular node, the atrioventricular (His) bundle, its right and left branches, and the terminal network of Purkinje fibers. However, this system is frequently the cause of the cardiac rhythm disorders, i.e., arrhythmias. There are many unanswered questions about the conduction system, even though its development is closely connected to the growth of the whole heart. The heart undergoes many dramatic changes during its development, such as modification of linear heart tube into the mature four-chamber organ. Looping and forming chambers cause change of localization first “pacemaker” from the caudal end of the heart tube to the area of the right atrium. Prenatal growth of the heart is based upon cell proliferation or hyperplasia. The cell divisions are rapidly stopped soon after birth and the cells start to grow by increase in volume, i.e., hypertrophy. The cells of some species can expand hyperplasia or hypertrophy in early postnatal period. The mouse is one of the organisms with the cell expansion provided by combination of proliferation and hypertrophy. Most of the adult cardiomyocytes contain two nuclei; however, the binucleation of the cells is achieved a few days after the birth. The induction of Purkinje cells of the mouse can be provided by the transcription factors, e.g., endothelin and neuregulin.

Key words: mouse, cardiomyocyte, proliferation, hypertrophy, hyperplasia, binucleation

Seznam zkratek

AVK – atrioventrikulární kanál

AVS – atrioventrikulární septum

AVU – atrioventrikulární uzel

ED – embryonální den

ET-1 – endotelin-1

HS – Hisův svazek

IAS – septum interatriale

IVS - septum interventriculare

NRG-1 – neuregulin-1

PD – postnatální den

PS – převodní systém

PV – Purkyňova vlákna

SAU – sinoatriální uzel

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Anatomie srdce savců.....	3
3	Embryogeneze srdce se zaměřením na vývoj myokardu.....	6
3.1	Embryogeneze srdce.....	6
3.2	Vývoj myokardu.....	9
4	Převodní systém srdeční.....	12
4.1	Uspořádání převodního systému srdečního.....	12
4.2	Vznik a šíření akčního potenciálu srdečním svalem	14
4.3	Vznik a vývoj PS.....	14
4.4	Purkyňovy buňky.....	24
5	Závěr.....	26
6	Seznam literatury.....	27
7	Seznam obrázků	34

1 Úvod

Převodní systém srdeční je tvořen sítí specializovaných myokardiálních buněk, vytváří pravidelný srdeční rytmus a zajišťuje koordinovanou propagaci elektrického impulsu ke kontrakci srdeční svaloviny. V sinoatriálním uzlu vzniká elektrický signál, dostává se internodálními spoji do atriventrikulárního uzlu, kde dochází ke zpomalení vedení. Poté pokračuje do Hisova svazku, který se rozděluje na dvě Tawarova raménka. Tato raménka se dále větví na Purkyňova vlákna, která zabíhají do srdeční svaloviny a předávají jí impuls ke kontrakci. Jedním z nejčastějších příčin úmrtí u lidí jsou onemocnění srdce a cévní soustavy. Poruchy srdečního rytmu (arytmie, dysrytmie) mohou být způsobené právě převodním systémem. Více jak sto let je známa struktura funkce a význam převodního systému, přesto ohledně jeho vzniku a vývoje zůstává stále mnoho otazníků. Prozkoumání těchto nejasností by mohlo být přínosné k objevu nových způsobů diagnostiky nebo léčebných metod těchto nemocí.

V této práci byl vybrán jako model pozorování myš. Svou velikostí srdce se od lidí velice liší, ale anatomii se srdce se velmi podobají a například se shodují i v nepřítomnosti intramurálních Purkyňových vláken. Během vývoje dochází k radikální přeměně díky různým posunům a změnám, kdy se z lineární trubice vyvine čtyřdutinové srdce. Při stáčení lineární trubice a vytváření dutin dochází i k přeměnám v převodním systému. Zprvu je signál vysílán z kaudálního konce lineárního srdce, poté stočením srdce se zdroj vzruchů přesouvá na bázi srdce, kde přetrvává až do dospělosti. Pracovní myokard a převodní systém srdeční mají shodnou buněčnou linii vzniku, proto je důležité zaměřit se na jeho růst a vývoj během kardiogeneze. Zajímavou součástí stěny myokardu jsou trabekuly, trámčité výběžky myokardu směřující do středu komory. Svou pozoruhodnou strukturou přispívají k přenosu elektrického impulsu do srdeční svaloviny. Během embryonálního vývoje nahrazují koronární cévy v zásobování srdce kyslíkem a živinami.

Předpokládá se, že v prenatalní fázi rostou buňky převážně proliferací či buněčným dělením nebo hyperplazií. Po narození nebo v brzkém postnatálním životě může dále pokračovat hyperplazie. Nebo také může nastat obrovská změna, kdy dochází k ráznému zastavení buněčné proliferace. Růst orgánu však stále pokračuje, jenom buňky nabývají na svém objemu, rostou hypertrofií. Způsoby postnatálního růstu se u jednotlivých organismů velmi liší. Existují organismy, které převážně rostou hypertrofií a některé z větší části hyperplazií. A pak jsou zde i takové, které rostou kombinací hyperplazie a hypertrofie, což je velmi obvyklé u většiny zvířecích druhů. Myš je právě jeden z těchto organismů, u kterých jde o kombinaci dvou způsobů růstu. Úzce s tímto se sleduje počet jader v buňce, dospělé kardiomyocyty většinou obsahují dvě jádra. Obvykle změna jednojaderných buněk v buňky se dvěma jádry časově koresponduje s přechodem z hyperplazie do hypertrofie. Dvoujadernosti buňky dosahují několik dní po narození.

Terminální část převodního systému - Purkyňova vlákna se skládají z Purkyňových buněk. Jde o speciální myocyty zabíhající do srdeční svaloviny. Jejich velikost a struktura je poměrně proměnlivá

u jednotlivých druhů zvířat. Transkripční faktory endotelin (ET-1) a neuregulin (NRG-1) mohou indukovat růst Purkyňových buněk z buněk srdeční svaloviny u myši a kuřat.

2 Anatomie srdce savců

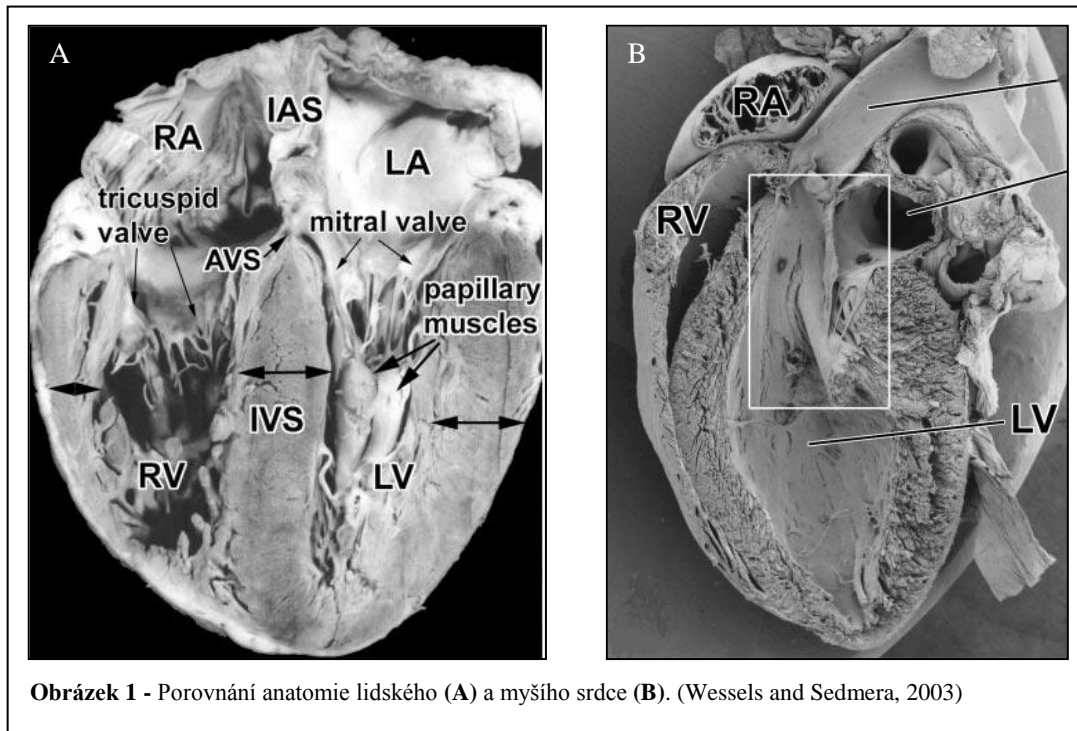
Srdce patří mezi životně důležité orgány. Jeho hlavní funkcí je zajistit cirkulaci krve v kardiovaskulárním systému. Krev umožňuje roznos dýchacích plynů, živin nezbytných pro většinu orgánů. Dohromady s odvodem odpadních látek a produktů metabolické přeměny přispívá k udržování homeostázy. Významnou funkcí je obranyschopnost vnitřního prostředí těla proti nebezpečným cizorodým nebo vlastním látkám, kterou zajišťují krevní buňky imunitního systému. Srdce, jako takové je dutý svalový orgán, jež je u všech savců a ptáků rozděleno na čtyři části – dvě předsíně a dvě komory (Crick et al., 1998).

Mezi živočišnými druhy jsou často obrovské anatomické rozdíly ve stavbě srdce, ale někdy jsou velice nepatrné. Je obvyklé, že tyto odlišnosti mají svou funkci pro daný druh. Následující text bude zaměřen na odchylky mezi srdcem myši a lidí. Prvním příkladem rozdílu je srdeční frekvence. Srdce u myši dokáže udeřit 500–700 krát za minutu, zato u lidí se srdeční frekvence pohybuje okolo 60–70 tepů za minutu (Wessels and Sedmera, 2003). Hmotnost myšího srdce je okolo 0,2 g a lidské může mít v rozmezí 250 – 300 g. Jak značí velký hmotnostní rozdíl, bude se lišit i samotná velikost srdce. S velikostí úzce souvisí tvar srdce. Rozsah protažení a vyboulení na srdci je dán tvarem hrudní dutiny (Crick et al., 1998; Wessels and Sedmera, 2003). Lidské srdce oproti myšímu má více pyramidový tvar a plochou dorsální stranu (viz Obrázek 1), což je způsobeno tím, že srdce je položeno na bránici. Naopak srdce myši má v hrudní dutině mnohem více prostoru a může se pohybovat volněji a díky čemuž má více elipsoidní tvar (Wessels and Sedmera, 2003).

Celkově jsou si obě srdce anatomicky velmi podobná, mají čtyři dutiny – dvě předsíně a dvě komory oddělené srdečními přepážkami (*septum interatriale* - IAS a *septum interventriculare* – IVS) (Čihák, 1997). Mezi oběma septy se nachází drobný septální segment nazvaný atrioventrikulární septum – AVS. U myši je AVS na rozdíl od lidského poměrně tenké a má vazivovou strukturu. Lidské AVS je výrazně muskularizované a velmi silné (Wessels and Sedmera, 2003). Na srdci je možné rozlišit bázi a hrot (*apex*) srdce. Báze je kranální širší část s předsíněmi, kudy vstupují nebo vystupují velké žíly a hlavní tepny. Hrot se vyskytuje v dolní části komorové oblasti srdce, u lidí má zaoblený tvar (Čihák, 1997), kdežto u myši je apex protažen více do špičky (viz Obrázek 1) (Savolainen et al., 2009). Lidské srdce má velmi širokou bázi, zatímco u myši není tak výrazný rozdíl v šířce mezi bází a apexem (Wessels and Sedmera, 2003).

Srdeční sval je uložen v pevném vazivovém obalu - osrdečniku (*pericardium*) se serózní dutinou, skládá se ze dvou listů *lamina visceralis* a *lamina parietalis* (Čihák, 1997). Štěrbínový prostor mezi listy osrdečniku obsahuje malé množství serózní tekutiny, která umožňuje klouzavý pohyb stěn při srdečním stahu (Čihák, 1997). Srdeční stěna je tvořena dalšími dvěma vrstvami: endokard a myokard. Endokard je složen z jedné vrstvy endotelových buněk podložené vazivem. Tato vrstva tvoří slabou lesklou blánu, která vystýlá vnitřek srdeční dutiny (Čihák, 1997; Štejfá, 2007). Nejsilnější část srdeční stěny zabírá vrstva myokardu. Základní stavební jednotkou myokardu je kardiomyocyt, neboli

srdeční buňka příčně pruhované svaloviny srdeční a specializované buňky převodního systému srdečního (Štejfa, 2007).



Obrázek 1 - Porovnání anatomie lidského (A) a myšího srdce (B). (Wessels and Sedmera, 2003)

Krev postupně protéká srdečními dutinami, ze systémových žil vstupuje do pravé předsíně (*atrium dextrum*), která má v porovnání se stěnami ostatních dutin nejtenčí vrstvu myokardu. Na pravou předsíň navazuje pravá komora (*ventriculus dexter*) (Čihák, 1997). U obou komor je dutina rozdělena na dvě části: vtokovou a výtokovou část. Vtoková část pokračuje od atrioventrikulárního ústí směrem k srdečnímu hrotu. Postavení vtokové části k výtokové je v určitém úhlu, aby byl umožněn asymetrický proud krve. Pokračuje po obvodu a nikoli přímo do středu dutiny (Štejfa, 2007). Výtoková část začíná v apexu srdce a ústí v cévě vystupující ze srdce (Simões-Costa et al., 2005). Krev vracející se z plic vtéká plicními žilami do levé předsíně (*atrium sinistrum*), zde je svalovina o pár milimetrů silnější než v pravé předsíni. Krev dále pokračuje do levé komory (*ventriculus sinister*), která se může chlubit svou výraznou tloušťkou srdeční stěny, jež je nezbytná pro tvorbu silného srdečního stahu a krevního tlaku. Vnitřní stěna komor ve vtokové části obsahuje trabekuly (*trabeculae carnea*), což jsou vystouplé svalové trámce, vytvářející vzhled síťoviny a jejich obdobou jsou *musculi pectinati* – svalové trámečky v oušcích síní (Čihák, 1997). U lidí je charakteristický rozdíl v morfologii trabekul obou komor, v levé komoře jsou oproti pravé mnohem tenčí. Mezi komorami myši není rozdíl tak znatelný (Webb et al., 1996).

Srdce je zpevněno srdečním skeletem, jenž vyztužuje prstence chlopní. Skelet je uchycen v myokardu, díky čemuž dokáže elektricky oddělovat myokard síní a komor. Jediným elektricky vodivým spojením je Hisův svazek (His, 1893). Skelet je složen z hustého fibrózního vaziva a má čtyři části – prstence (*anuli fibrosi*). Přepážku mezi předsíní a komorou tvoří srdeční chlopně, které zajišťují jednostranný průtok krve srdcem a které nejsou inervované ani cévně zásobované (Štejfa, 2007).

V srdci jsou chlopně připojeny ke čtyřem fibrózním prstencům srdečního skeletu. Rozlišujeme dvě chlopně cípaté: trikuspidální chlopeň (*valva atrioventricularis dextra seu tricuspidalis*), mitrální chlopeň (*valva atrioventricularis sinistra seu bicuspidalis seu mitralis*), dvě poloměsíčité neboli pulmonální chlopně (*valva trunci pulmonalis*) a aortální chlopeň (*valva aortae*) (Čihák, 1997). Uspořádání chlopní u lidí a myši je obdobné (Webb et al., 1996). Šlašinky dvoucípé a trojcípé chlopně jsou u lidí dlouhé a je jich mnoho. Na rozdíl u myši, kde šlašinky nejsou tak výrazně protažené a je jich méně (Wessels and Sedmera, 2003).

3 Embryogeneze srdce se zaměřením na vývoj myokardu

3.1 Embryogeneze srdce

Srdce je prvním orgánem, který se vyvíjí a začíná být funkční již v embryonální fázi. Vývojový proces má složitý a je nezbytné, aby srdce svou funkci zahájilo na počátku vývoje. U myši vývoj srdce začíná již v polovině osmého embryonálního dne (ED) (Savolainen et al., 2009). Morfologie a funkce se ovlivňují vzájemně. Tento fakt vytváří mezi velmi odlišnými organismy vývojovou spojku, podle které se vývojový plán srdce z prosté trubice do plně vyvinutého čtyřdutinového srdce téměř shoduje u všech obratlovců (Savolainen et al., 2009; Sedmera, 2011). Celkový tvar je často diktován požadavky životního stylu (Sedmera, 2011).

Během vývoje se formují tři zárodečné listy: ektoderm, endoderm a mesoderm. Buňky určené k formaci srdce vznikají z mesodermální tkáně již v procesu gastrulace, která u myši nastává již sedmý den po oplodnění. Nejprve se objevuje srpek s uzlem na kraniální straně embrya, buňky z vrchní vrstvy srpku postupně migrují (Chalice and Virágh, 1973a). V tomto období se srdce skládá z promyokardiálních buněk smíchaných se svazkem endoteliálních vláken v budoucí perikardové dutině, která se objevuje jako prostor v mesodermu (Moorman et al., 2003).

V kraniální části embrya se začíná vytvářet primární endokardiální trubice. Centrální nervová soustava začíná masivně narůstat, orofaryngová membrána se dostává dopředu a srdce s perikardovou dutinou se postupně sunou do oblasti krku. Později se posouvají do oblasti hrudní dutiny a nově vzniká srdeční trubice, která prochází embryem (Moorman et al., 2003; Savolainen et al., 2009). Každá část trubicovitého srdce se skládá z vnitřního endotelu obklopeného silnější vrstvou myokardu, která ještě úplně neobklopuje endotelní trubici (Manasek, 1968; Mjaatvedt et al., 1999).

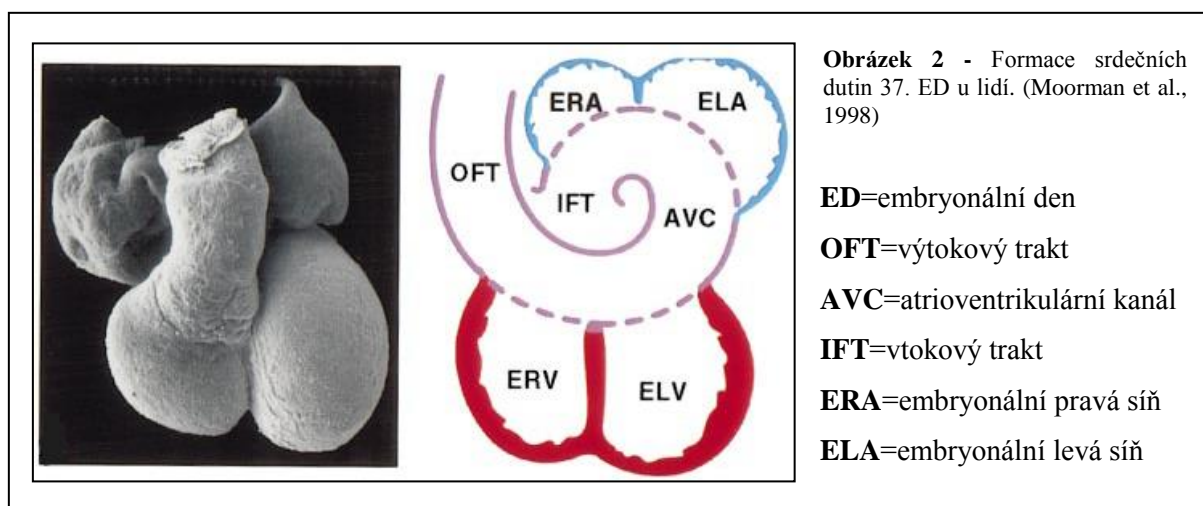
Vznikající srdce je umístěno ve středu embrya, tvarem připomíná obrácené písmeno ypsilon a je bilaterálně souměrné (Moorman et al., 2003). Ramena dávají základ budoucím předsíním a z protaženého konce se stane levá komora (de la Cruz et al., 1991). Z ramen se vytváří kromě předsíní i atrioventrikulární kanál (AVK) (Moorman et al., 2003). Postupně se začíná rozvíjet vrstva myokardu, tubulární stěna srdce se stává homogenní. Prostor mezi dvěma vrstvami srdeční trubice vyplňuje extracelulární matrix – srdeční rosol (De Haan, 1965).

Kolem osmého ED u myši vzniká první kontrakce v průběhu rozšiřování srdeční stěny. Z počátku jsou kontrakce nepravidelné a ženu krev různými směry od sinus venosus, nejkaudálnější část trubicového srdce, kraniálním směrem k výtokové oblasti. Brzy se však kontrakce synchronizují a krev začne cirkulovat rovnoměrně embryem. Kromě pacemakerových buněk není převodní systém srdeční ještě vyvinutý (Mikawa, 1999). Koronární cévy, které zajišťují cévní zásobení srdce, buňky pojivové tkáně a autonomní nervy se objevují až v pozdějších fázích (Manasek, 1968).

Srdeční trubice se postupně prodlužuje v kaudálním i kraniálním směru. Brzy po prvním srdečním úderu začíná období, kdy se srdeční trubice stáčí a přechází v esovitě stočenou trubici (De Haan,

1965). Tento proces je velmi dynamický a jde o první asymetrii v embryu a většinou nekončí pouze jediným zahnutím. Zatočení může být způsobené akumulací buněk, odlišnou buněčnou velikostí nebo i přítomností buněčných přívěsků na jedné straně, což způsobí ohnutí v jednom směru (Mjaatvedt et al., 1999). U myši tato fáze trvá přibližně od osmého do jedenáctého ED (Savolainen et al., 2009).

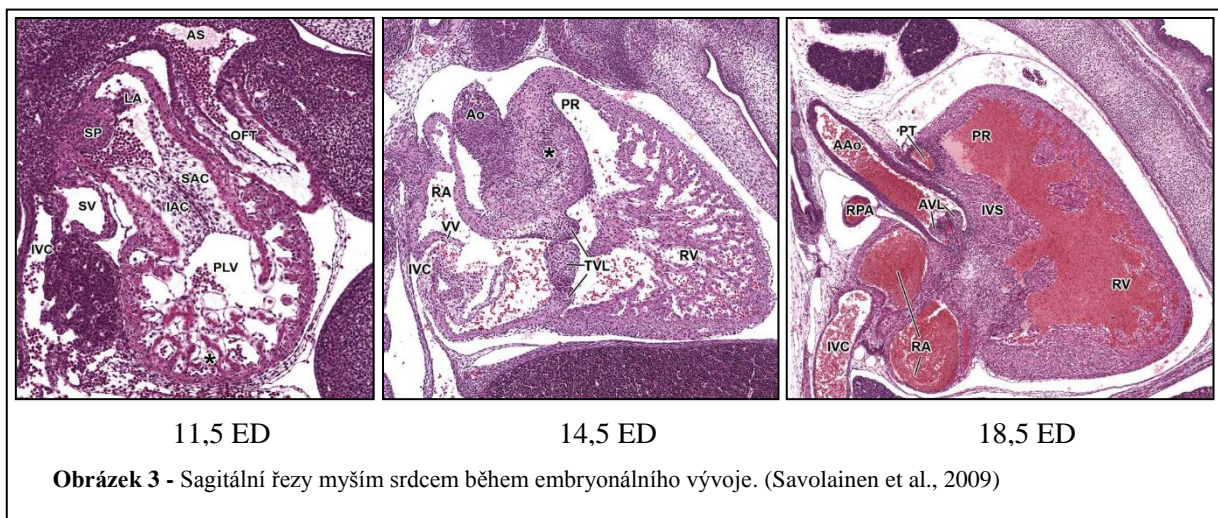
První projev levo – pravé asymetrie v embryu se objevuje jako zakřivení tubulárního srdce směrem doprava a při pohledu zepředu má tvar písmene C. U všech organismů se srdeční trubice stáčí stejně (Yost, 1995). Tato asymetrie je nezbytná pro vhodnou orientaci srdečních dutin a následné napojení cév. V tomto období mají síně a komory vyhraněné oblasti, kde se později začnou vytvářet. Po stáčení se objevuje náznak rozdělení předsíní od komor, oddělení je určeno AVK podél dočasně výrazně protaženého výtokového traktu (Moorman et al., 2003). Kraniální část výtokové oblasti se posouvá doprava a později se stane pravou komorou. Kaudální část trubice se sune doleva a z ní se stane v budoucnu levá komora (viz Obrázek 2). Toto se shoduje s konceptem druhého srdečního pole, který byl určen díky klonální analýze (Lescroart et al., 2010).



Trubicové srdce má kontrakci podobnou peristaltickým pohybům, nyní se postupně začíná měnit a funkčně připomíná dospělé srdce. Signál vzruchu je vyslán z pravé části myokardu – vtoková oblast srdce, kde se rozprostírá anteriorním směrem přes celý myokard (Mjaatvedt et al., 1999). Rychlost vzruchu je však stále ještě pomalá a krev se posouvá peristaltickým pohybem. Stočené srdce již nedosahuje stejných hodnot vypuzovací frakce jako srdce trubicové, ale srdeční objem a síla vypuzovací frakce je větší (Sedmera, 2011).

Změny v myokardu se objevují po stáčení srdeční trubice, například se odstraňuje srdeční rosol z předsíní a komor. Odlišným růstem stěn a kroucením srdeční trubice dochází k formování srdečních dutin (Moorman et al., 2010; Moorman et al., 2003). Budoucí předsíně se objevují jako ovoidní segmenty s distální částí ze dvou primordií, které ještě nevznikly jako samostatné dutiny. Oddělení předsíní od komor nastává jedenáctý ED (Savolainen et al., 2009). K úplnému vývoji levé předsíně je nezbytné, aby embryo mělo již formované plíce a plicní zásobení (Moorman et al., 2003).

Buňky komor jsou dopravovány z protaženého konce vytvořeného v trubicovém srdci. V této době již krev musí procházet dvěma částmi trubicového srdce a pomalu dosahuje výtokového traktu, jak se trubice ohýbá. Po stáčení srdeční trubice vzniká vnitřní a vnější zakřivení. Apikální část dvou komor se vyboulí z vnějšího ohnutí a výtoková část dává základ apikální části pravé komory (Moorman et al., 2003; Sedmera, 2011). Začátek vytváření apikální části levé komory se ukazuje už před stáčením srdeční trubice. Hlavním krokem je oddělení komor od předsíní, které se projevuje vyboulením sekundárního myokardu z vnějšího ohybu srdeční trubice (Moorman et al., 2003). Kompletní oddělení výtokového traktu a srdečních komor probíhá během třináctého ED, septace předsíní nastává až následující den (viz Obrázek 3). Koronární cévní zásobení se začíná vytvářet od patnáctého do osmnáctého ED (Savolainen et al., 2009).



Myokard komor se rozšiřuje a začíná se rozprostírat do lumen dutiny srdeční (Challice and Virágh, 1973a). Kardiomyocyty se specializují do trabekul od desátého do čtrnáctého ED vývoje u myši (Savolainen et al., 2009). Komorové trabekuly zabírají většinu tloušťky komory a zprvu se objevují jako houbovitá síť dobře diferenciovaného svalu (viz Obrázek 3). Umožňují tak difuzi kyslíku a živin v myokardu, který ještě v tuto dobu není opatřen cévním zásobením koronárních tepen ; Mjaatvedt et al., 1999). Síť trabekul v komorové stěně má velký význam pro převodní systém srdeční (de Jong et al., 1992) a u myši vznikají desátý ED (Sedmera and McQuinn, 2008) a ukazuje morfologickou diferenciaci mezi pravou a levou komorou (Moorman et al., 2003).

Převodní systém srdeční po formování srdečních dutin postupně dozrává. Mezi vedením v předsíních a komorách se objevuje zpoždění, které je způsobené pomalým vedením vzruchů skrz AVK (Sedmera, 2011; Sedmera et al., 2000). V této fázi, vyboulení dutin, je stupeň buněčné proliferace nejvyšší, poté se již jen snižuje (van den Berg et al., 2009). Trabekulované srdce je v podstatě srovnatelné se srdcem dospělým, dojde již jen k drobným modifikacím (Sedmera, 2011; Sedmera et al., 2000).

3.2 Vývoj myokardu

Myokard, příčně pruhovaná svalovina srdeční, ve stěně srdeční zabírá největší prostor. Z jedné strany ho obklopuje vnitřní endokard a z druhé vazivový obal srdce – epikard (Čihák, 1997). Skládá se ze srdečních buněk – kardiomyocytů a specializovaných buněk převodního systému. Svalovina komor má tři vrstvy: zevní, střední a vnitřní. Myokard je dále rozdělen na pracovní myokard a převodní systém srdeční. Srdeční skelet funguje jako elektrická izolace mezi myokardem síní a komor. O původu myokardu se dříve velmi spekulovalo, ale dnes je již známo, že pochází ze splachnického epitelu neboli splachnopleury. Kubické splachnické buňky formují zhuštěnou vrstvu splachnického mesodermu (Challice and Virágh, 1973b). S tímto souhlasí studie, ve které byly zkoumané buňky myokardu a buněk hladkého svalstva určeny geneticky značeny Nky2.5. Dohromady s embryonální transplantační studií podporují přístup, který určuje vznik ze společného buněčného prekurzoru (Wu et al., 2006).

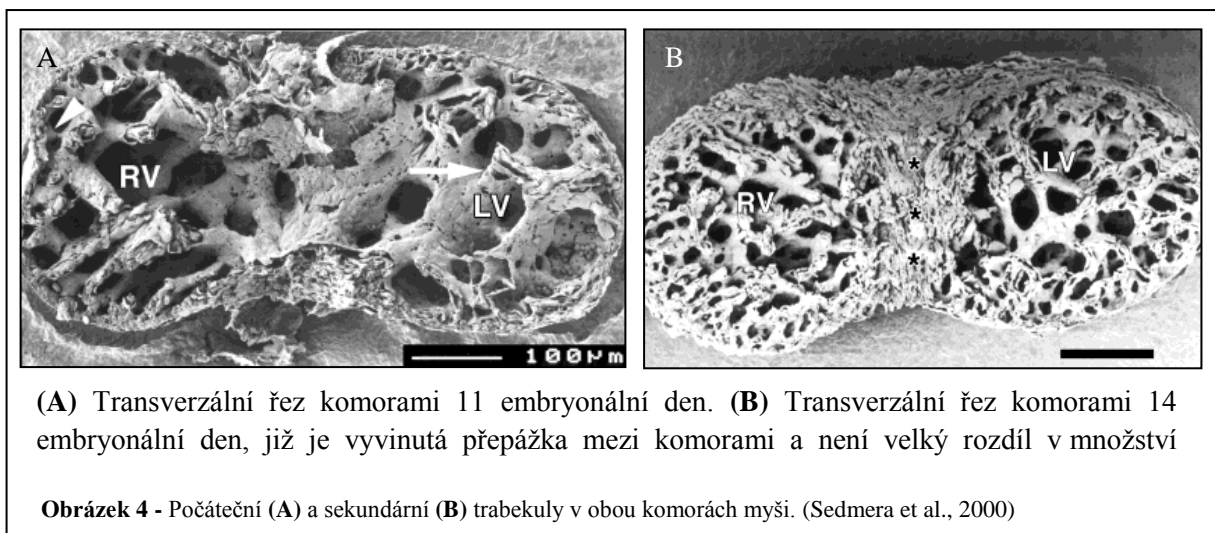
Dříve jsme se domnívali, že myokard vzniká pouze z jednoho zdroje myokardiálních prekurzorů. Nyní je jisté, že vzniká ze dvou odlišných srdečních polí myokardu. Rozlišení mezi dvěma typy srdečních polí je upevněno díky studii buněčných linií v myších. Toto zkoumání je založeno na značení β -galaktosidázy v retrospektivní klonální analýze (Meilhac et al., 2004). V polovině devátého ED se objevují dvě kategorie klonů s odlišným umístěním v trubicovém srdci (Buckingham et al., 2005; Meilhac et al., 2004). První linie obsahuje obě komory, AVK a obě síně. Pod druhou linií spadá výtokový trakt a všechny ostatní srdeční oblasti bez levé komory. Obě linie jsou tedy přítomny v pravé komoře, AVK a v obou předsíních. Výtokový trakt vzniká pouze z druhé linie a levá komora se vytváří jen z první srdeční linie. Myokardiální příspěvek první a druhé srdeční linie se shoduje hypotézou vzniku myokardu ze dvou srdečních polí (Buckingham et al., 2005).

Poté co se v buňkách projeví prvotní kontrakce, nejsou buňky ještě plně specializované a mají stále málo rozlišené intracelulární struktury (Challice and Virágh, 1973b). Vznik myokardu začíná do devátého ED v dorsálním mesokardiu, současně se myocyty dostávají do AVK a výtokového traktu. Existují dva způsoby myokardové formace: myokardizace a diferenciacce. První se projevuje růstem kardiomyocytů do mesenchymu a druhý způsob je převod nesvalových buněk na srdeční svalové buňky. Většina kardiomyocytů vzniká z již vytvořených myokardiálních buněk (Kruithof et al., 2003).

Přeměna kardiomyocytů z původních nesvalových buněk se vyskytuje pouze v některých částech srdce. Například dorsální strana sinus venosus vzniká čistě ze splachnického epitelu. Naopak ve ventrální ploše a kaudální části se objevují rozptýlené shluky buněk z mesenchymu, postupně se v nich začínají vyvíjet myofilamenty a jsou propojeny s vyvinutou epiteliální vnější vrstvou. V této fázi není rozeznatelný rozdíl ve tvaru a struktuře mezi rozprostřenými shluky buněk a epiteliálním mesenchymem (Challice and Virágh, 1973b).

Dále srdeční buňky doprovází další specializace, které je odliší od ostatních epiteliálních buněk. Prvním procesem je fibrilogeneze, kde je mechanismus velmi podobný jako u kosterní svaloviny. Spojení aktinu a myosinu se u myši objevuje už od sedmého do osmého ED, ale samotná buňka je zatím velmi málo diferenciovaná. Počáteční embryonální svalová buňka má jednodušší buněčnou membránu, cytoplazma je tvořená pouze amorfním materiálem s filamentovým podkladem (Challice and Virágh, 1973b).

Architektura myokardu prochází během vývoje několika kroky. Nejdříve má myokard epiteliální charakter uspořádaný do dvou vrstev. V další části vývoje se začínají tvořit trabekuly, srdeční trámčina, která zasahuje do lumen srdce (Sedmera, 2011). Následujícím krokem je zpevnění basálního podkladu trabekul, které se obdobím shoduje s vývojem koronárního cévního systému z epikardu. Poslední fází je vývoj vícevrstevnatého spirálního systému komor (Sedmera et al., 2000). V tubulárním srdci existují pouze minimální regionální rozdíly ve struktuře stěny, jež je složena z jedné nebo dvou vrstev buněk, srdečního rosolu a endokardu (Sedmera and McQuinn, 2008).



Trabekuly se tvoří na vnitřní vrstvě srdeční stěny a začínají být viditelné v blízkosti největšího stočení srdeční trubice v oblasti primitivní komory (Challice and Virágh, 1973a). Rostou od apexu dorzoventrálně a postupně dosahují středu komory, poté se listy primitivních trabekul mění ve fenestrované lamely. Rozdíl mezi pravou a levou komorou je dobře viditelný (viz Obrázek 4). Na rozdíl od ptáků není stále tak výrazný, trabekuly myšního srdce jsou v levé komoře robustnější a plošší než v pravé komoře, kde jsou mnohem jemnější a kratší. Po skončení septace komor dostávají trabekuly apiko-basální orientaci a ovlivňují definitivnímu tvar komor - cylindrický tvar levé komory a tvar vlaštovčího hnízda u pravé komory (Sedmera et al., 2000).

Předsíňové hřebenité svaly, obdoba trabekul v komorách, se začínají vyvíjet v budoucích oušcích předsíní poté, co se zahájí oddělování předsíní. Vedení vzruchu se objevuje současně s vývojem předsíně, přenáší impuls rychle z pravostranného sinoatriálního uzlu (SAU) do levé předsíně. Pozdější zrychlení impulsu vzniká podél lišty (*crista terminalis*) vytvořeného z hřebenitých svalů, které se větví z koncového vrcholu směrem k síňokomorovému žlábků. Tyto svaly mají dvě hlavní funkce: zpevnění

poměrně tenké síňové stěny a vytvoření morfologického podkladu hlavních cest převodního systému (PS). Tyto cesty PS se zde vyskytují, aby zajistily synchronní aktivaci a kontrakci předsíní a zároveň rychlý převod impulsu od síňoatriálního uzlu k atrioventrikulárnímu uzlu (Sedmera and McQuinn, 2008).

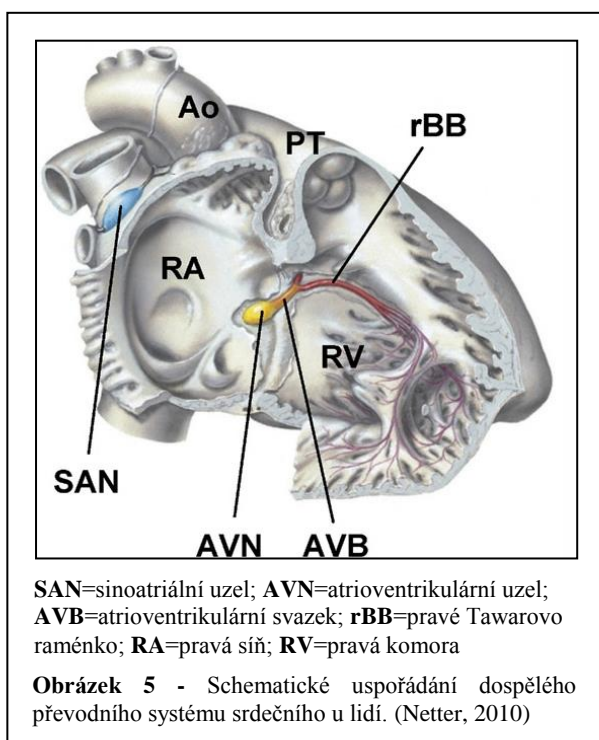
Trabekuly v komorách jsou velmi hustě rozvětvené, vizuálně vypadají jako voštinovitá struktura. Je zajímavé, že v pravé komoře se objevuje bohatší apikální trabekulace než v levé komoře. Trabekuly nabývají točité konfigurace a obracejí se levotočivě, jak běží od apexu k bázi (viz Obrázek 4) (Sedmera et al., 2000). Další změnou ve fetálním období je kompaktizace myokardu kompaktní vrstvou. Většinu šíře komorové stěny tvoří komorové trabekuly, chybí jim však cévní zásobení. Dutinu ohrazují vnější myokardovou vrstvou, ale k samotné kontraktilní aktivitě moc nepřispívají. Kompaktní vrstva je přítomna v srdcích všech savců, ale obvykle se u jednotlivých druhů vyskytuje s pozměněnou strukturou (Sedmera and McQuinn, 2008; Sedmera et al., 2000). Existence kompaktní vrstvy se objevuje souběžně se vznikem srdce. Vrstva zprvu roste poměrně pomalu, rychlost růstu závisí hlavně na buněčné proliferaci. Růst srdce je dán přibýváním buněk na okraji, buňky ve vnitřní straně se posouvají do trabekul, kde pokračují s proliferací v pomalejším měřítku (Sedmera et al., 2000).

4 Převodní systém srdeční

Buňky převodního systému srdečního jsou specializované buňky schopné vytvářet vzruchy. Vedou je rychle celým srdcem, a tím dokážou aktivovat buňky pracovního myokardu ke koordinované kontrakci srdce (Čihák, 1997). Jednotlivé části PS jsou od pracovního myokardu izolovány pojivovou tkání až na terminální část PS, Purkyňova vlákna. Systém vyniká třemi hlavními vlastnostmi – autonomie, automacie a rytmicita. Autonomie zajišťuje srdci částečnou nezávislost, což je velmi odlišné od ostatních svalových orgánů. Kontrakce v srdci vznikají nezávisle na centrální nervové soustavě a humorálních mechanismech, vegetativní nervový systém ovlivňuje pouze frekvenci a sílu srdečních stahů. Automacie srdce je schopnost samostatně si vytvářet opakující se impulsy k jeho vlastní kontrakci. Poslední vlastnost – rytmicita zajišťuje, že ke vzruchům dochází s určitou pravidelností (Moorman et al., 1998; Trojan, 2003).

4.1 Uspořádání převodního systému srdečního

Celý systém se skládá z několika částí: sinoatriální uzel (SAU), internodální síňové spoje, atrioventrikulární uzel (AVU), Hisův svazek (HS), Tawarova raménka a Purkyňova vlákna (PV) (viz Obrázek 5). Propojení Hisova svazku a Purkyňových vláken do jediného systému bylo poprvé popsáno Sunao Tawarou v roce 1906 (Tawara, 1906). Vzruch se vytváří v oblasti sinoatriálního uzlu (Keith-Flackův uzel), který je brán jako hlavní pacemaker (zdroj vzruchů) srdce, je lokalizovaný v pravé předsíni subendokardiálně u vstupu horní duté žíly (Davies, 1942). Oválně protažený SAU je uložen napříč ve stěně pravé síně a obklopen pracovním myokardem (Čihák, 1997; Sedmera and Gourdie,

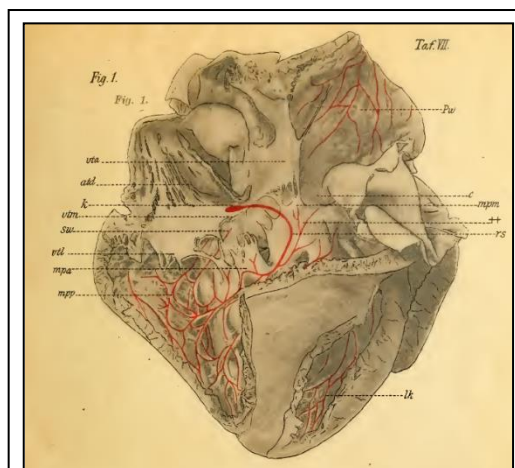


2014). Zde se objevují tři typy buněk. Prvním typem jsou nodální myocyty. Oproti buňkám pracovního myokardu jsou bledé, mají méně organel a často velmi proměnlivý tvar, považujeme je za zdroj rytmicity. Dalším druhem jsou myocyty převodního typu, oproti nodálním myocytům jsou menší a kratší. Jsou na hranici mezi nodálními myocyty a buňkami pracovního myokardu, strukturu mají velmi variabilní. Přebírají vzruch od nodálních myocytů, samy ho vedou pomalu a předávají buňkám typu Purkyňových vláken, což je poslední typ buněk. Tyto myocyty jsou o trochu kratší a širší než nodální, nemají mnoho fibril, ale mají mnoho mitochondrií, glykogenu a dobře vyvinutý tubulární systém. Ve srovnání s ostatními kardiomyocyty vedou impuls rychle (Čihák, 1997).

Z SAU se vlna depolarizace šíří internodálními síňovými spoji neboli preferenčními dráhami pracovního myokardu pravé předsíně, kterými jsou Wenckebachův svazek, Jamesův svazek a Thorelův svazek (Čihák, 1997). Zde vedou impuls rychleji než obyčejný pracovní myokard předsíně a vzruch se dostává do atrioventrikulárního uzlu (Aschoff-Tawarův uzel). Nepravidelně oválný AVU se nachází sagitálně položený na přepážce předsíní a komor pod endotelem (Davies, 1942). Zde se vyskytují pouze dva typy myocytů, hlouběji uložené nodální myocyty a na periferii uzlu buňky typu Purkyňových vláken (Čihák, 1997). Hlavní funkcí AVU je zpomalit rychlost vedení signálu do komor, čímž vzniká zpoždění mezi aktivací síní a komor (Bakker et al., 2010). Toto zpomalení umožňuje nejen naplnění komor krví, ale také tím brání vzniku komorových tachyarytmií (Sedmera and Gourdie, 2014). V případě poškození SAU jako primárního pacemakeru, může AVU přebrat funkci hlavního udavače rytmu (Bakker et al., 2010).

Na AV uzel navazuje Hisův svazek (HS) neboli atrioventrikulární svazek, který tvoří převodní cestu mezi síní a komorou. Obklopuje ho vrstva vaziva, jež brání signálům, aby se šířily jinou cestou nebo aby nezanikly (Sedmera and Gourdie, 2014). Skládá se z myocytů převodního typu a buněk podobných Purkyňovým vláknům. Kaudálním směrem buněk typu Purkyňových vláken přibývá (Čihák, 1997). Hisův svazek se větví na dvě raménka: pravé a levé Tawarovo raménko. Obě raménka a HS sdílí podobnou charakteristiku: rychlý převod signálu a fibrózní izolace od pracovního myokardu (Sedmera and Gourdie, 2014). Mezi oběma raménky je prokazatelná asymetrie. U myši má pravé raménko úzkou strukturu a směrem k apexu srdce se jen málo větví. Naopak levé raménko se skládá z jemných svazků a cestou k hrotu se hojně větví. Rozdíl se objevuje i v množství fascikul anebo v aktivaci raménka vzruchem. Pravé raménko se prokazovalo vždy vyšší rychlostí vedení než levé raménko (Miquerol et al., 2004).

Koncovou částí jsou Purkyňova vlákna (PV), která vznikají větvením Tawarových ramének a rozprostírají se do pracovního myokardu (viz Obrázek 6). Tímto způsobem získávají signál ke kontrakci komor ve směru od apexu k bázi srdce. Jednotlivá vlákna jsou složená pouze z velkých buněk s typem Purkyňových vláken (Čihák, 1997). Síť PV se skládá ze dvou druhů: subendokardiální vlákna, které mají propojení s raménky a zajišťují aktivaci komor od hrotu k bázi a druhým typem je proměnlivá vnitřní (intramurální) síť PV. Subendokardiální vlákna se liší svou morfologií u jednotlivých druhů. Oproti tomu vnitřní síť Purkyňových vláken se u některých druhů vyskytuje a u jiných chybí. Mezi ty druhé patří například myš a člověk (Sedmera and Gourdie, 2014).

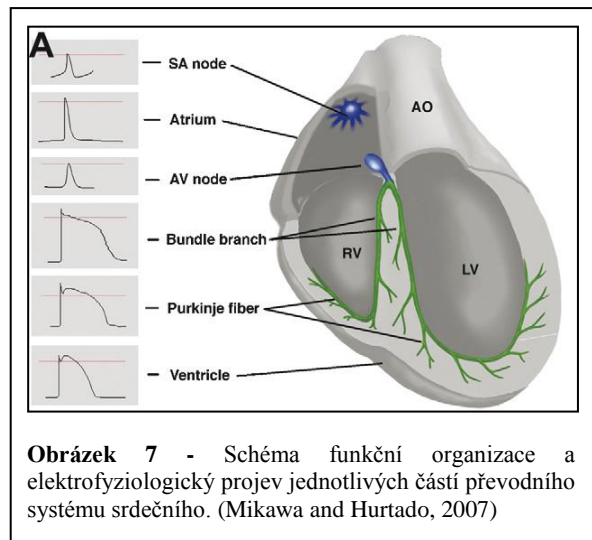


Obrázek 6 - Rozkreslení Purkyňových vláken ve stěně pravé komory u lidí dle Tawary v roce 1906 (Tawara, 1906)

4.2 Vznik a šíření akčního potenciálu srdečním svalem

Buňky PS jsou schopny samovolně tvořit vzruch, ten si postupně předávají, až tím aktivují buňky pracovního myokardu, který dokáže vyvolat kontrakci. Srdeční sval označujeme jako vzrušivou tkáň, která umí při dostatečném podráždění vyvolat elektrickou odpověď, nazývanou akční potenciál (Sedmera and Gourdie, 2014). Vzrušivá tkáň má schopnost změnit svůj akční potenciál. Jde o depolarizaci nebo repolarizaci membrány. V srdci má akční potenciál výrazně delší trvání než v jiných vzrušivých tkáních. Klidová polarizace (klidový akční potenciál) je vlastnost všech buněk v těle, jde o rozdíl mezi vnější a vnitřní stranou buňky. Vnitřní strana membrány je negativní, pohybuje se v rozmezí -50 a -90 mV a liší se podle toho, zda jde o buňku pracovního myokardu nebo buňku PS (Trojan, 2003).

Klidový membránový potenciál SA uzlu se pohybuje okolo -50 mV. Práh ke spuštění depolarizace je asi okolo -45 mV, fáze depolarizace je rychlá. Akční potenciál se při ní dostává až na kladné hodnoty. Důvodem této změny je otevření sodíkových kanálů a tok iontů do buňky. Původní napětí membrány se nevrací ihned, ale setrvává ve fázi plató, která je typická pro srdeční buňky a liší se délkou podle jejího typu. Fázi plató udržují Ca^{2+} kanály, které umožní tok iontů do buňky. Napomáhají k tomu i otevřené Na^{+} kanály s tokem iontů dovnitř. Dále nastává fáze repolarizace, kdy uzavírají se kanály Ca^{2+} a membrána zvýší svou propustnost pro ionty K^{+} , které proudí ven z buňky. Během repolarizace nelze srdeční buňku polarizovat. Tuto fázi nazýváme absolutní refrakterní perioda. Opakované podráždění



můžeme vyvolat pouze nadprahovým podnětem, a pokud klesne napětí membrány na -40 mV a. Toto je období relativní refraktivní fáze, jež nastává po absolutní refraktivní fázi. Toto uspořádání tak brání vzniku arytmií zamezením rychle opakované aktivace. Pracovní myokard se liší od buněk PS klidovým membránovým napětím okolo -90 mV a často mívá konstantní hodnotu. Má rychlejší depolarizaci, po níž nastává krátká fáze repolarizace a až poté je fáze plató. Nižší hodnoty klidového potenciálu, pomalá depolarizace a absence částečné repolarizace je typická pro SAU a AVU (viz Obrázek 7) (Trojan, 2003).

4.3 Vznik a vývoj PS

Dříve probíhalo mnoho debat ohledně původu PS. Otázkou bylo, zda je neurogenního či myogenního původu. V roce 1998 se Moorman a kol. (Moorman et al., 1998) domnívali, že PS roste z populace myogenních a neurogenních prekurzorů, přičemž vycházeli z přítomnosti neurálních proteinů. Nepodali však žádné důkazy, že by PS byl extrakardiálního původu. K neurogennímu

původu se přikláněli hlavně díky faktu, že svalové buňky převodního systému obsahují proteiny, které se téměř shodují s neurofilamenty (Gorza et al., 1988; Vitadello et al., 1998). Nejasnosti o původu PS urovnaly retrovirové a adenovirové studie buněčných linií (Cheng et al., 1999; Mjaatvedt et al., 1999). Tyto výzkumy tvrdí, že všechny srdeční buňky vychází ze tří embryonálních původů, které se od sebe velmi liší (Mjaatvedt et al., 1999). PS vzniká z kardiomyocytů a žádný jiný typ srdeční buňky nemůže podnítit vznik buněk PS (Cheng et al., 1999; Gourdie et al., 1995). Což potvrzuje i důkaz, že samostatný prekursor myocytu produkuje sérii dceřiných myocytů, kteří proliferují spíše svisle než horizontálně vzhledem k plánu myokardiální stěny a rozšiřují se celou tloušťkou stěny (Mikawa and Hurtado, 2007).

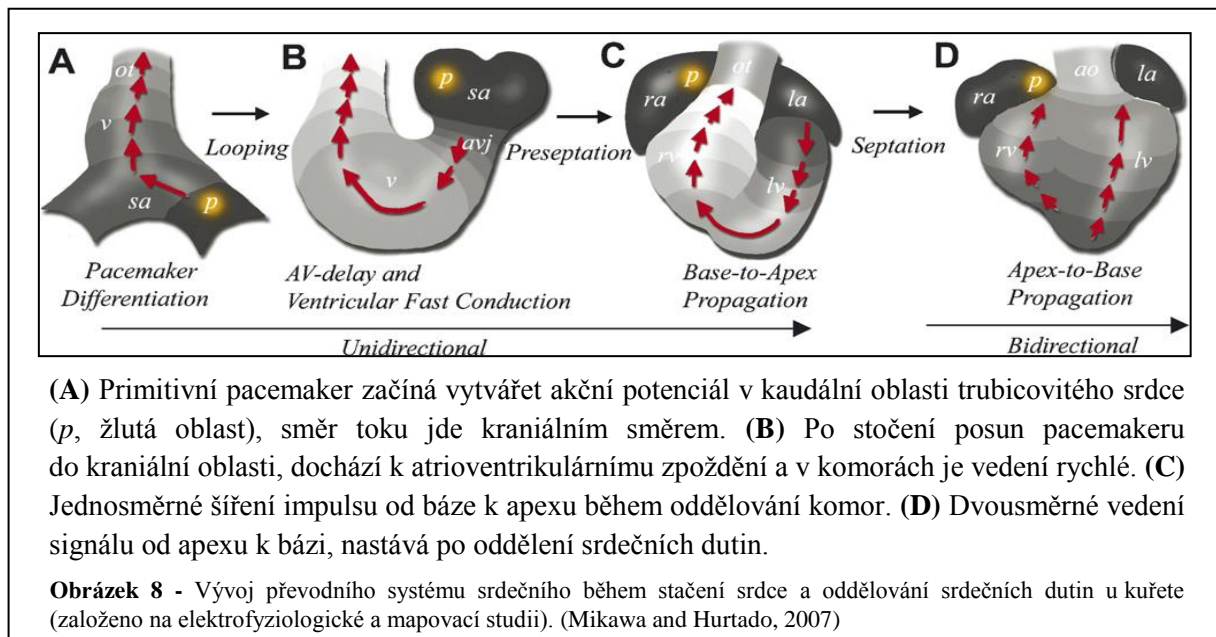
Myogenní původ terminální části PS je znám již delší dobu. Vychází se z jejich schopnosti měnit se v kontraktilní myocyty, které jsou již přítomny v embryonálním tubulárním srdci. Nebyl však prokázán myogenní původ pro centrální PS. Buněčná populace spojená s formací krevních cév indukuje vznik kontraktilních myocytů, u kterých začne docházet ke změně na převodní typ tkáně (viz Obrázek 12) (Gourdie et al., 1995). Spekulovalo se, zda stupeň proliferace stačí na množství prekursorů centrálního PS, a proto musí být doplňovány z řad sousedních myocytů (Cheng et al., 1999). Ale již je stanoveno, že stupeň proliferace je dostatečný k formování myocytů v převodní ose PS (Aanhaanen et al., 2010).

Utváření PS má více hypotéz, které se snaží modelovat vznik PS. Prvním je mnohonásobný prstencový model, který předpokládá, že prstence tkáně PS jsou přítomny už v tubulárním srdci před vytvářením dutin srdce (Wenink, 1976). Tato zúžení byla přiřazena uzlovité tkáni neboli tkáni PS a prekursorům PS. Různé metody mapování původu a analýzy molekulární linie ukázaly, že lineární srdce se skládá převážně z prekursorů levé komory a ostatní části jsou přidány později (Bakker et al., 2010; Buckingham et al., 2005). Na základě tohoto zjištění tento model nemůže být přijat pro formování celého srdce (Bakker et al., 2010). Dalším modelem je „verbování sousedních buněk“, části PS vznikají induktivním převodem multipotentních kardiomyocytů do počáteční sítě buněk PS, byl navržen hlavně pro vývoj buněk PV (Cheng et al., 1999; Gourdie et al., 2003; Gourdie et al., 1995). Tato představa je založená na třech objevech: struktura genové exprese, jako například *Msx2*, jež značí přítomnost specifických buněk PS v brzce embryonálním srdci. Druhým jsou pracovní myocyty a buňky PS vznikající ze sdíleného prekursoru. Posledním důvodem je, že budoucí embryonální buňky PS velmi brzy zastavují svůj buněčný cyklus (Bakker et al., 2010; Thompson et al., 1990). Pro AVU byla tato představa vyvrácena pomocí liniové a proliferační analýzy. AVK dává vznik AVU, proliferační aktivita AVK je nižší než terminálních částí PS, ale dostatečná pro vytvoření všech částí AV převodní osy (Aanhaanen et al., 2010). U buněk AVK se objevuje model rychlé specifikace a růstu (Bakker et al., 2010; Christoffels et al., 2010).

Myogenní původ PS je brán jako jednoznačný, ale stále nebylo vysvětleno, jak se formuje PS v celistvou síť v průběhu vývoje srdce. Byly navrženy dva modely, které se snaží simulovat růst PS (Mikawa and Hurtado, 2007). První model „out-growth“ byl navržen kvůli velmi nízkému nebo

nulovému stupni DNA – syntézy, která se objevuje v buňkách vyvíjejícího se PS (Cheng et al., 1999). Buňky diferenciované do PS se objevují uvnitř individuálních klínů rostoucích myocytů, růst jde od proximálního směru k distálnímu konci, kde jsou převážně PV. Další model je nazván “in-growth“, ve kterém jsou buňky PS rekrutovány uvnitř klonálních oblastí a spojeny dohromady se základem sítě PV. Tento model se skládá z propojení subendokardiálních a periarteriálních PV (Mikawa and Hurtado, 2007). Druhý model je podpořen studii předvádějící nezávislý vznik Hisova svazku a Tawarových ramének a jejich pozdější propojení ve vývoji (Chuck and Watanabe, 1997; Mikawa and Hurtado, 2007).

Před prvním úderem srdce PS zdaleka není dotvořen a všechny myocyty ještě nejsou elektricky aktivní (Mikawa and Hurtado, 2007). U obrázku 8 je vidět, že jako první funkční část PS vzniká



pacemaker ve vtokové oblasti v distální části trubcovitého srdce (myš ED 7,5). Vedení vzruchu je pomalé a EKG se projevuje sinusoidou (de Jong et al., 1992; Mikawa and Hurtado, 2007). Přesun iniciace vzruchu z prvotního pacemaku do SA uzlu je přisuzován morfologickému dotvoření SA uzlu, což je u myši dvanáctý ED (Virágh and Challice, 1983). U linie myši s knock-in Cx40 byla zkoumána jeho role v síňovém PS a byly objeveno, že vzruch je vedený z SA uzlu již po jedenáctém ED (Benes et al., 2014; Sankova et al., 2012). Akční potenciál prochází podél buněk trubcového srdce velmi pomalu. Během procesu zakřivení se převodní rychlost zvětšuje a vzniká pomalu vedoucí AVK, který separuje rychlejší vedení v komorách a předsíních (de Jong et al., 1992). Zpoždění v AVK je u myši prokazatelné již devátý ED (Rentschler et al., 2001). AV zpoždění není jen funkcí membránových kanálů. Akční potenciál se z buňky na buňku šíří kanály, nazvanými gap junction, jež vytváří propojení mezi myocyty (Lo, 2000). Rychlý PS komor je poslední částí, která se vytváří v průběhu vývoje PS. Nedospělý způsob vedení vzruchu od báze k hrotu se mění ve vedení od apexu k bázi. Nevyzrálá forma se objevuje v období stáčení tubulárního srdce a v dospělou formu přechází současně s kompletním oddělením komor u většiny savců (Gourdie et al., 2003). Překvapivě u myši

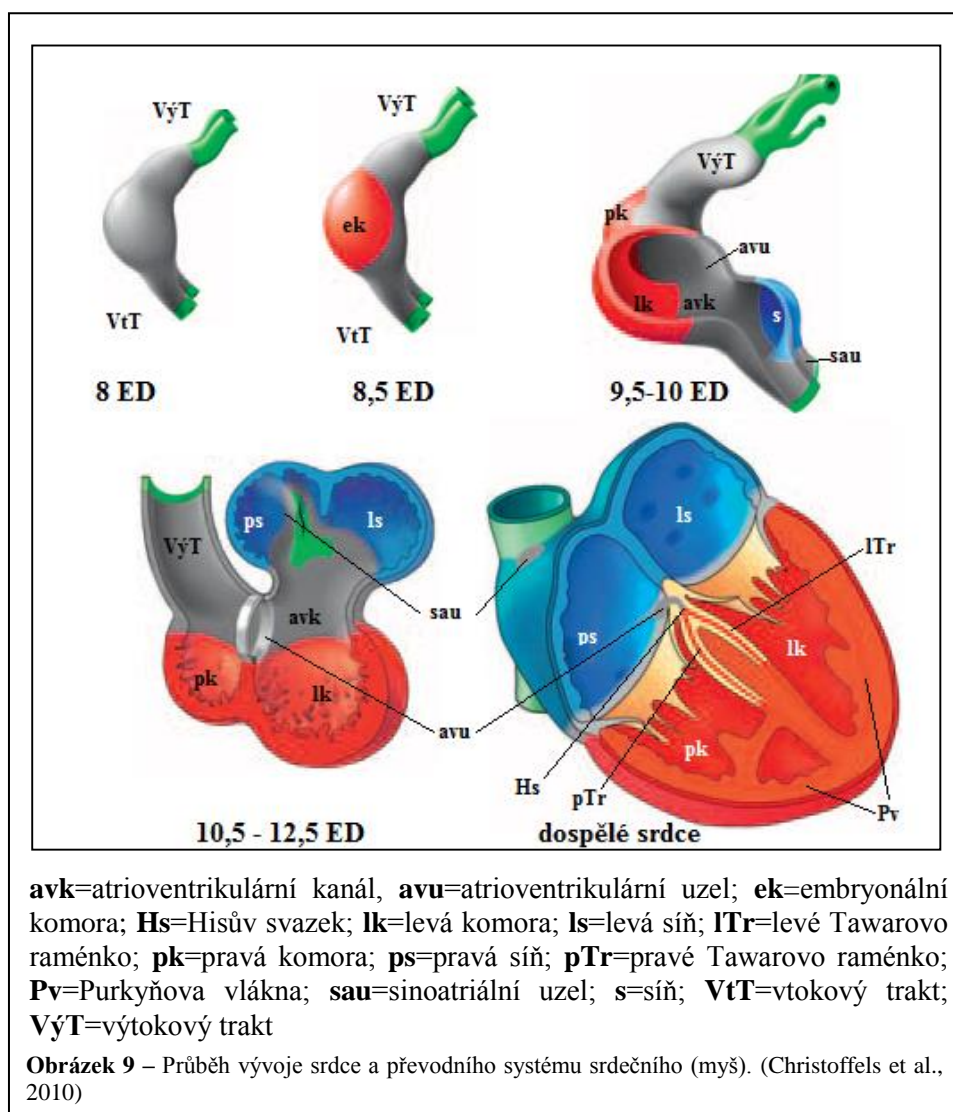
tato změna (ED 10,5) časově výrazně předchází definitivní septaci komor (ED 14) (Rentschler et al., 2001; Sankova et al., 2012)

Původ převodních buněk nás vede k modelu, ve kterém buňky PS vznikají ze srdečních myocytů. Zde je implikováno několik signálních a transkripčních kaskád v počátcích, vyhrávání a v dotváření struktury PS (Pennisi et al., 2002). Mezi signální molekuly patří Notch (Milan et al., 2006), endotelin nebo neuregulin (Gourdie et al., 2003) a Wnt (Bond et al., 2003). Transkripční faktory jsou například *Hop* (Ismat et al., 2005), *Tbx* a *GATA* genetické rodiny (Christoffels et al., 2004), *Msx* (Chan-Thomas et al., 1993) a *Nkx* (Jay et al., 2004).

SAU je první částí z dozrálého PS, která vzniká ve vyvíjejícím se embryu (viz Obrázek 9). Okolo jeho vývoje a funkce je stále ještě mnoho otázek. Málo se ví o mechanismu vzniku a diferenciaci prvotního pacemakeru, který plynule přejde v plně funkční SAU (Mikawa and Hurtado, 2007). Uzel má velmi heterogenní strukturu, v jejímž středu převažují speciální pacemakerové buňky vhodné k iniciaci impulsu. Tyto speciální myocyty jsou obalené částečně odlišnými buňkami na hranici mezi buňkami SA uzlu a pracovního myokardu (Verheijck et al., 2001). Okrajová část funguje jako izolace od síňového myokardu, aby nedocházelo k aktivaci SA uzlu vzruchem ze síňového myokardu (Christoffels et al., 2010). Existují dvě možnosti, jak může být popsán vznik buněčné heterogenity v SAU. Prvním je klasický nebo gradientní model, při kterém dochází k postupné změně v uzlovité buňky od periferní části uzlu do středu. Mozaikový model navrhuje namixované buňky z SAU a ze síně, které se uspořádají od okraje do středu. Stále není známo, kterou metodou je dosaženo heterogenity tohoto uzlu (Mikawa and Hurtado, 2007). SAU se objevuje v oblasti sinus venosus jako primordium SAU v ED 10,5 u myši a začíná se vytvářet z mezenchymálních buněk perikardiální stěny o den později (Virágh and Challice, 1983). Růst primordia SA uzlu se odehrává pomalou proliferací (Christoffels et al., 2010).

AV uzlovité primordium se objevuje jako skupinka malých svalových buněk, které proliferují v nezpevněné tkáni z mesenchymu (Virágh and Challice, 1983). Stejně jako SAU jde o heterogenní tkáň, jež se skládá z mnoha částí a odlišných buněčných typů. Myocyty z oblasti AVU se rozprostírají od AVU až k trojčipé chlopni a mitrální chlopni (viz Obrázek 9). Buňky AVU mají funkční fenotyp téměř stejný jako jiné části PS, například exprese speciálních membránových kanálů, receptorů a Ca^{2+} regulujících proteinů, ale stále si zanechávají jistou podobu s primárními myocyty (Mikawa and Hurtado, 2007). O původu AVU se dříve velmi diskutovalo, ale nyní je dokázáno, že AVK obsahuje prekurzory AVU. AVK a AVU sdílí společné místo, funkci i projev, které dokazují návaznost AVU na AVK (Eichna and DeHaan, 1961). Počáteční srdeční trubice se převážně skládá z prekurzorů levé komory a AVK (Buckingham et al., 2005). Časný AVK je vytvořen ze srdečního srpku, který je z primárního srdečního pole. Elektrický impuls přechází myokardem AVK ze síně do komory (de Jong et al., 1992). Studie na lokalizaci konexinu v AVU u hlodavců prokázala, že formace AVU musí vznikat několikastupňovým mechanismem. Proces vzniku musí být mnohem složitější, než bylo předpokládáno (Mikawa and Hurtado, 2007).

Hisův svazek je vytvářen ze srpku vyvíjejícího se komorového septa, pravého a levého Tawarova raménka a jeho větve se vznikají ze subendokardiálních myocytů podél komorového septa (Virágh and Challice, 1983). V srdci se vyskytují dva typy PV: subendokardiální a intramurální. Subendokardiální jsou nezávislé na druhu a naopak intramurální jsou velmi variabilní u jednotlivých druhů (Moorman et al., 1998). Subendokardiální PV vznikají přeměnou individuálních klonů myocytů (Gourdie et al., 1995). Hisův svazek a síť PV nemají stejný původ jako AV kanál, dle sledování jejich prekurzorů jsou od sebe odděleny brzy ve vývoji (Christoffels et al., 2010). Do šestnáctého ED je zahájen vyrovnaný růst postupující od Hisova svazku do větvících se PV a jejich splnutí s pracovním myokardem (Virágh and Challice, 1983).



O vyvíjející se tkáni PS u kuřat se traduje, že má výrazně nižší proliferaci, než má okolní tkáň pracovního myokardu (Cheng et al., 1999). U myši byla prokázána podobná situace. Byly nalezeny oblasti s nižší proliferací v místech síně i komory, kde studie značení DNA odlišila nově vznikající Hisův svazek a PV od pracovního myokardu. Tato informace značí, že spojení oblastí pomalé proliferace s PS může mít unikátní postavení ve vývoji vyšších obratlovců (Sedmera et al., 2003). Avšak tato představa byla upravena výsledky klonální analýzy kardiomyocytů u transgenní myši, kde

autoři prokázali proliferační historii buněk v odlišných částech srdce. Zároveň s tímto popsali i dvoufázový vznik komorového PS, ve kterém buňky PS začínají vznikat ze společného předka s pracovním myokardem a jsou následovány omezeným proliferačním růstem (outgrowth) (Miquerol et al., 2010). Dvoufázový model byl podpořen nenulovou proliferační aktivitou buněk, které se přidávají k linii PS (Moorman et al., 2010)

Doposud bylo vše řečené zaměřeno pouze na prenatální vývoj, ale růst a vývoj buněk pokračuje dále i v postnatální fázi života. Proliferace a růst buněčného objemu jsou dva možné způsoby buněčného růstu (Li et al., 1996). Růst během prenatálního období je převážně zajištěn buněčnou proliferací nebo jinak nazývanou hyperplazií. Alternativou k hyperplazii je hypertrofie, která se projevuje růstem buněčného objemu (Leu et al., 2001). Po narození u většiny sledovaných živočichů dochází ke změně způsobu růstu buněk, proliferační růst buněk se vymění za hypertrofický růst. Tento přechod se většinou objeví na počátku novorozeneckého období (Leu et al., 2001; Li et al., 1996). Obvykle je způsoben ztrátou schopnosti buňky proliferovat. Kdy přesně dochází k zastavení proliferace, se zkoumá již mnoho let a u vyšších obratlovců se, zpravidla velmi liší (Li et al., 1996).

V tomto výzkumu byly použity metody inspirované skupinou Prof. Gerdes. Myocyty byly enzymaticky izolovány z novorozeneckých srdcí potkanů pomocí Langendoffovy aparatury pro zpětnou cévní perfuzi. Srdce bylo rozděleno na drobné kousky a z nich byly enzymaticky odděleny jednotlivé myocyty, které byly poté zafixovány. Buněčný objem byl získán díky Coulter Channelyzer (Gerdes et al., 1986), jenž měří změny elektrického odporu v buňce procházející otvorem přístroje (Li et al., 1996). Délka buňky byla určena klasicky z přímého měření v mikroskopu a z těchto dvou údajů pak byly vypočítány ostatní parametry. Pro určení počtů jednojaderných a dvoujaderných buněk se použilo barvení DAPI, které se váže v jádře. Průměrný počet myocytů v komoře byl spočítán z výsledků buněčného objemu a objemu tkáně komory (Gerdes et al., 1983).

Postnatální růst myocytů u potkanů je možné rozdělit do tří fází dle výzkumu Clubba a Bishopa z roku 1984. Od narození do čtvrtého postnatálního dne (PD) převažuje fáze hyperplazie. Srdeční buňky stále pokračují v syntéze DNA a většina buněk je pouze jednojaderná. Od šestého do čtrnáctého PD je prokazatelná jak hyperplazie, tak i hypertrofie. Jádra myocytů se dále dělí, ale celkový počet buněk není vyšší než v předchozí fázi, většina buněk má dvě jádra stejně jako myocyty dospělého srdce. Během poslední fáze od čtrnáctého do dvacátého prvního PD (poslední zkoumaný den) se objevuje hlavně hypertrofický růst. Srdce nadále nabývá na váze, syntéza DNA je velice nízká a množství dvoujaderných buněk je podobné druhé fázi postnatálního růstu (Clubb and Bishop, 1984). Rozvržení do tří fází bylo podpořeno dalšími studiemi a ve výzkumu Li a kol. byl určen ostřejší přechod z hyperplazie do hypertrofie, který se objevuje mezi třetím a čtvrtým PD. Bylo to i podpořeno faktem, kdy mezi prvním a třetím PD dojde k nárůstu počtu buněk o 68% a poté počet buněk výrazně nepřibývá. Během prvních tří dnů se velikost buněčného objemu nemění, ale od čtvrtého dne buňky začínají nabývat na objemu, jejich objem se zdvojnásobí do desátého PD. Do třetího PD množství

dvoujaderných buněk nepřesáhne 4%, čtvrtý PD je počet okolo 17% a dvanáctý PD počet buněk se dvěma jádry vzroste na 90% u potkanů Sprague-Dawley (Li et al., 1996).

Dříve se uvažovalo o třech možnostech vzniku dvoujaderných myocytů: splynutí jednojaderných buněk (Przybylski and Chlebowski, 1972), karyokineze bez cytokineze (Katzberg et al., 1977) a amitotické jaderné dělení (Grimm et al., 1970). Při splynutí buněk by mělo dojít k zdvojnásobení počtu zrn v jádře, ale množství zrn dvoujaderných buněk bylo stále stejné jako před binukleací. Což vyvrací hypotézu, že by dvoujaderné buňky mohly vznikat tímto způsobem, ale podporuje další dvě možnosti původu dvoujadernosti buněk (Clubb and Bishop, 1984). Amitotické rozdělení polyploidního jádra se objevuje u některých buněk organismu. Kdyby tento způsob měl podnítit vznik dvoujadernosti buněk, musela by být prokázána polyploidie během prvních čtrnácti PD (Clubb and Bishop, 1984). V tomto období dochází pouze k přechodu buněk s jedním jádrem k dvoujaderným myocytům, do desátého PD je 80% buněk dvoujaderných (Li et al., 1996). Jde tedy o nepravděpodobný způsob vzniku binukleace. Karyokineze bez cytokineze se jeví jako pravděpodobný způsob vzniku dvoujaderných myocytů u potkanů (Clubb and Bishop, 1984). Bylo to podpořeno i dalšími výzkumy, které potvrzují nárůst počtu dvoujaderných buněk během prvních čtrnácti dnů po narození. Když proběhne DNA syntéza a jaderné dělení bez následující cytokineze, počet buněk zůstane nezměněný (Li et al., 1996).

Existují i různé výzkumy u potkanů, které se zaměřují na rozdíly ve věku, v různých rychlostech růstu nebo mezi pohlavími. Redukce novorozenecké výživy způsobuje prokazatelné změny v srdečním růstu, nedostatečně živěni potkani byly prokazatelně menšího vzrůstu a jejich srdce vážilo o 100 mg méně v dvacátém prvním PD než srdce normálně živěného potkana (Bai et al., 1990). Tyto rozdíly byly prokazatelné u samců, ale ne u samic. Současně špatně živěni potkani měli o 21% méně myocytů než velmi dobře živěni potkani v dvacátém prvním PD a rozdíl přetrvával do dospělosti. Rozdíly v pohlaví do jednadvacátého PD nebyly znatelné ve velikosti jednotlivých myocytů ani v množství buněk. U dospělých potkanů samčí váha celého těla a váha srdce byla prokazatelně větší. S tímto souvisel objem buněk zkoumaný v komorách a IVS, který byl znatelně větší u samčích potkanů. V délce samostatných myocytů nebyl již tak rapidní rozdíl, ale delší buňky se nacházely u samců. Zato počet buněk u obou pohlaví byl téměř shodný v dvacátém prvním PD i v dospělosti (Bai et al., 1990).

Podobně jako u potkanů byl přechod mezi hypertrofií a hyperplazií zkoumán u novorozeneckých selat. V tomto výzkumu byla použita upravená izolační metoda dle Kozlovskis a kol. (Kozlovskis et al., 1991), která využívá cévní zpětné perfuze obdobně jako u potkanů (Gerdes et al., 1986). V této metodě byl tvar buněk vyjmutých a fixovaných převážně tyčkovitý. Pro určení počtu jader v buňce bylo využito upravené Wrightovo barvení. Objem buněk byl určen dvěma způsoby. V prvním případě byla délka a šířka buněk změřena zobrazovacím systémem, vzniklé údaje umožnily spočítat buněčný objem. Druhou možností k určení buněčného objemu je Coulter Channelyzer (Beinlich et al., 1995), podobně jako u potkanů a kuřat. Počet myocytů v komorové tkáni byl vypočítán shodným způsobem jako u předešlé studie (Gerdes et al., 1986). Bylo zjištěno, že rychlý růst během prvních čtrnácti dnů

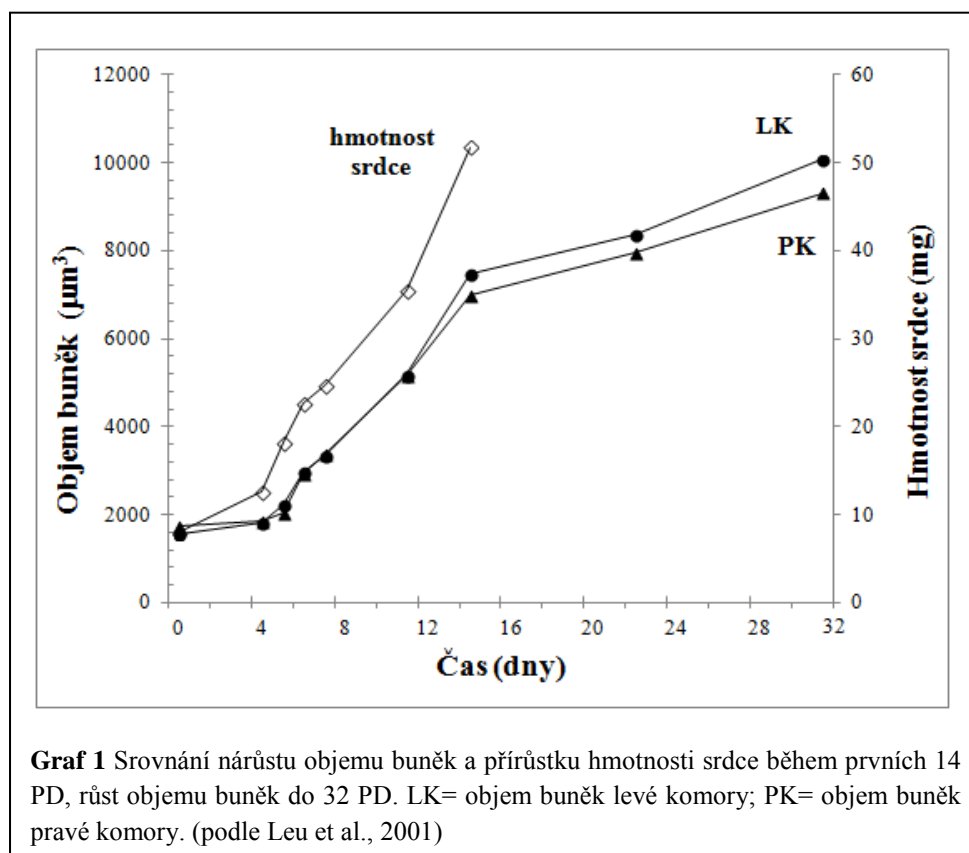
PD je způsoben převážně hypertrofií. Myokard levé komory vzrostl téměř pětinašobně a myokard pravé komory se zvětšil skoro dvakrát. Zároveň kardiomyocyty nabyly na objemu z $1075 \mu\text{m}^3$ na $3688 \mu\text{m}^3$ u levé komory a v pravé komoře se zvětšily z $1511 \mu\text{m}^3$ na $2454 \mu\text{m}^3$. Během tohoto období se počet myocytů v pravé komoře skoro nezměnil, ale levé komoře vzrostl o 28%. Myocyty obou komor byly do 4-5 PD z 90% jednojaderné, do čtrnáctého PD bylo 67% buněk vícejaderných u levé komory a 53% v pravé komoře (Beinlich et al., 1995).

Růst kuřecího srdce po vylíhnutí se rovněž odehrává kombinací hypertrofie a hyperplazie. Zde byl použit stejný způsob izolace kardiomyocytů pomocí Langendorffovy aparatury, zjištění jadernosti přes DAPI barvení a určení počtu myocytů ve tkáni jako u potkanů (Gerdes et al., 1983; Gerdes et al., 1986). Buněčná délka a další buněčné rozměry byly získány měřením v mikroskopu a obrazovou analýzou (Gerdes et al., 1986). Kardiomyocyty u kuřat mají schopnost replikovat se až do čtyřicátého druhého PD, což je poslední den prováděné studie. Buňky srdečního svalu pokračují pravděpodobně s proliferací, dokud kuře nedosáhne stabilní tělesné váhy. Počet buněk stále přibývá a myocyty jsou schopny proliferovat až šest týdnů. Tato schopnost se velmi odlišuje od savčích kardiomyocytů, což rapidně mění představu, že myocyty savců a ptáků ztrácí schopnost dělení brzy po narození nebo vylíhnutí (Li et al., 1997).

U myších srdcí nemohla být použita obvyklá izolační metoda měření objemu kardiomyocytů používající zpětnou perfúzi kolagenázou a Langendorffovu aparaturu (Li et al., 1996). Tato metoda je špatně aplikovatelná na malé srdce myši a nelze ji použít u novorozeného srdce. Proto byla využita metoda používající se pro izolaci hladkých svalových buněk (Draeger et al., 1989). Pomocí této metody je umožněno měřit růstové parametry v brzkém postnatálním vývoji a můžeme rozlišit kardiomyocyty pravé a levé komory. Části stěny levé a pravé komory byly vyříznuty a rozděleny na malé kusy. Drobné části byly nataženy a přivázány na plastové destičce bavlněnou nití, data byla získána pomocí imunofluorescenčního barvení a konfokálního mikroskopu. Díky této metodě zůstaly kardiomyocyty stejně tvarované jako v srdci, což souhlasilo se srovnáním z rekonstrukce sériových řezů novorozeného myšího srdce. Tuto metodu je možno aplikovat na pozdější postnatální období vývoje a dospělé srdce (Leu et al., 2001).

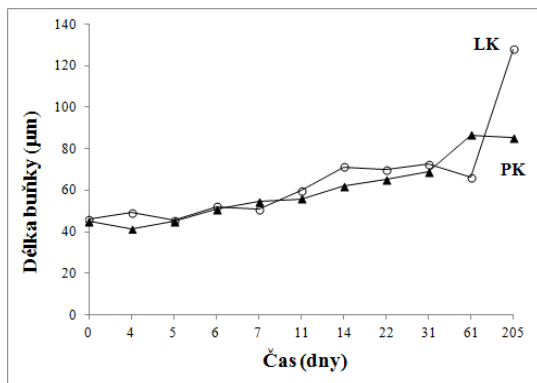
V Grafu 1 je velmi dobře vidět konstantní růst objemu buněk v průběhu prvních čtyř dnů, nicméně váha srdce neustále pozvolně narůstá. Lze tedy usuzovat, že jde o růst hyperplazií, buněčnou proliferaci. Poté dochází k rapidnímu růstu objemu jednotlivých buněk, který pokračuje po dobu deseti dnů. Zde nastává rychlý přechod od hyperplazie k hypertrofickému růstu (Leu et al., 2001). Zároveň je zřejmé, že nárůst objemu buněk se shoduje i s pozitivním zlomem růstu v hmotnosti srdce. Úsudek ohledně růstu hypertrofií je podpořen analýzou postnatálního dělení kardiomyocytů, během prvního týdne ubyl značný počet buněk označených Bromo-deoxyuridem (BrdU). Kdyby pokračovala buněčná proliferace dál, počet označených buněk BrdU by byl větší než původní (Machida et al., 1997). Přeskok od hyperplazie k hypertrofii a celkový styl růstu se velmi podobá způsobu růstu u potkanů (Li et al., 1996) a zase se velmi liší počátečním způsobem růstu u kuřat, jejichž buňky jsou

schopny proliferovat až do šestého týdne (Li et al., 1997). Po 14 PD rychlý růst objemu ustává a zpomaluje se. Objem buněk narůstá srovnatelně jak pravé, tak i v levé komoře. Na konci měření jsou myocyty levé komory o nepatrný rozdíl větší (Leu et al., 2001).

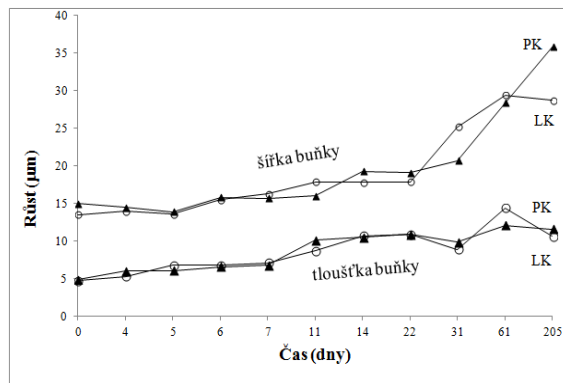


Růst objemu myocytů je srovnatelný v obou komorách, ale je zajímavé, jakým způsobem bylo dosaženo tohoto zvětšení objemu. Průběh růstu buněk v délce, šířce a tloušťce je obdobný u pravé a levé komory během vývoje od narození do půl roku, což je možno vidět v grafu 2 a 3. Na grafu 2 je zřetelné, že během prvního měsíce buňky rostou ve své délce zvolna. Po druhém měsíci od narození se dostávají na dvojnásobnou délku buněk ve srovnání s délkou buněk v den narození. V půl roce života se objevuje prokazatelný rozdíl v délce mezi myocyty pravé a levé komory, kde myocyty levé komory dosahují délky $128 \pm 33,6 \mu\text{m}$ a v pravé komoře mají myocyty $85,2 \pm 11,7 \mu\text{m}$ (Leu et al., 2001).

V jiné studii zaměřené na myši s dilatační kardiomyopatií (Milner et al., 2000) měly izolované myocyty průměrnou délku $142,6 \mu\text{m}$. Tyto myši byly porovnávány s kontrolami myši, jejichž hodnoty byly v průměru $139,7 \mu\text{m}$. Dle předchozích údajů jsou buňky zkoumané Leu a kol. prokazatelně kratší. Jednou z možností, proč je rozdíl mezi myocyty tak výrazný, je částečná kontrakce během fixace, která vede k většímu rozšíření kardiomyocytů, ale nemění velikost objemu buněk. Různé odchylky mohou být způsobeny odlišnými fixačními roztoky, různými fixačními technikami anebo jiným způsobem určení objemu. V metodě použité Leu a kol. byly hodnoty částí srdce čerstvě narozených myši srovnatelné s kontrolou zamrazených částí srdce dospělých zvířat. Tato metoda pravděpodobně umožnila získat velmi různorodá data z odlišných částí obou komor, proto jsou hodnoty nižší.



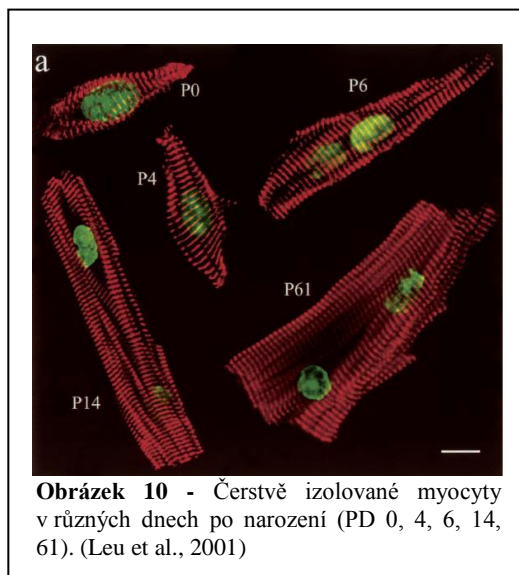
Graf 2 Nárůst buněčné délky od narození do šestého měsíce. LK=levá komora; PK=pravá komora. (podle Leu et al., 2001)



Graf 3 Nabývání velikosti buněk v šířce a tloušce během 0 – 205 PD. LK=levá komora; PK=pravá komora. (podle Leu et al., 2001)

Dle Grafu 3 je vidět počáteční pozvolný růst v šířce buňky, v období od prvního měsíce až do půl roku se myocyty rozšíří více jak dvojnásobně. Naměřené hodnoty buněčné šířky jsou $28,7 \pm 7,8 \mu\text{m}$ pro levou komoru a $35,8 \pm 4,2 \mu\text{m}$ pro pravou komoru (Leu et al., 2001). Výsledky jsou podobné naměřeným hodnotám u myši s dilatační kardiomyopatií, ve které měly tyto hodnoty $29,7 \mu\text{m}$ a $29,9 \mu\text{m}$ pro kontrolní myši (Milner et al., 2000). Z průběhu grafu růstu tloušťky buněk je viditelné, že se zde neobjevují žádné dynamické změny v růstu (Leu et al., 2001).

Obrázek 10 zobrazuje kardiomyocyty čerstvě izolované v den narození, čtvrtý, šestý, čtrnáctý a šedesátý první PD u myšního srdce. Buňky vyjmuté první dny po narození mají vřetenovitý tvar a pouze jedno jádro. Mezi čtvrtým a šestým PD se buňky začínají prodlužovat a mají tyčovitý tvar. Objevuje se jaderné dělení a některé myocyty mohou mít dvě jádra (Leu et al., 2001). Dvoujaderné kardiomyocyty jsou pro hlodavce typické v dospělém srdci (Li et al., 1996). Myocyty ve čtrnáctém PD jsou již výrazně protažené a sarkomery jsou doplňovány převážně v podélném směru. Dvouměsíční myocyty mají plně dotvořené pruhování a vykazují morfologii dospělých buněk, mají tedy podlouhlý tvar a dvě jádra. Tvar čerstvě izolovaných buněk se velmi podobá reálnému tvaru kardiomyocytů ve tkáni srdce novorozenců a dospělých myši (Leu et al., 2001).

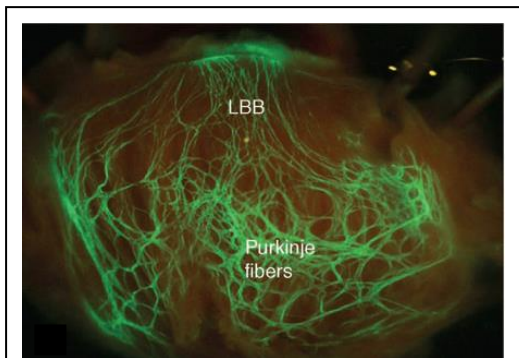


Obrázek 10 - Čerstvě izolované myocyty v různých dnech po narození (PD 0, 4, 6, 14, 61). (Leu et al., 2001)

4.4 Purkyňovy buňky

Český vědec Jan Evangelista Purkyně byl první, kdo objevil buňky PS. V roce 1845 je popsal jako síť šedých plochých želatinových vláken schovaných pod membránou ve vnitřní srdeční stěně ovce. Podobná vlákna našel i u krávy a prasete, ale u lidí, psa nebo králíka je neobjevil. Purkyně však ještě nevěděl, k čemu jsou v srdci užitečné. Pouze spekuloval, zda nejde o buňky z embryonálního období či patologické buňky nebo buňky pomáhající k srdeční aktivitě (Suma, 2001). Proti těmto názorům byl Tawara, který je určil jako terminální část PS a odhalil tak i jejich funkci (Tawara, 1906).

Buňky PS se od buněk pracovního myokardu odlišují anatomickou strukturou (viz Obrázek 11), biochemickým obsahem a fyziologií. Buňky PS na histologickém řezu jsou popisovány ve srovnání s pracovním myokardem jako síťovina světlejších buněk s kulatými jádry. Mají kulovitý nebo oválný



Obrázek 11 - Síť Purkyňových vláken je formována 1-3 buňkami protaženými v jejich délce oproti buňkám pracovního myokardu, uspořádání v levé komoře myši. (Miquerol et al., 2004)

tvár a často se vyskytují ve skupinách nebo provazcích (viz Obrázek 12). Strukturální nedokonalostí často připomínají spíše embryonální buňky, buněčné organely mají nepravidelně roztroušené v buňce. Obsahují málo myofibril různě směřovaných oproti buňkám pracovního myokardu, které jsou bohaté na množství myofibril organizovaných paralelně (Eichna and DeHaan, 1961; James, 1967). Myocyty PS obsahují mnoho glykogenu a jsou závislé na glykolytickém metabolismu. Jsou rozdíly ve vedení elektrického signálu. V Purkyňových buňkách je signál

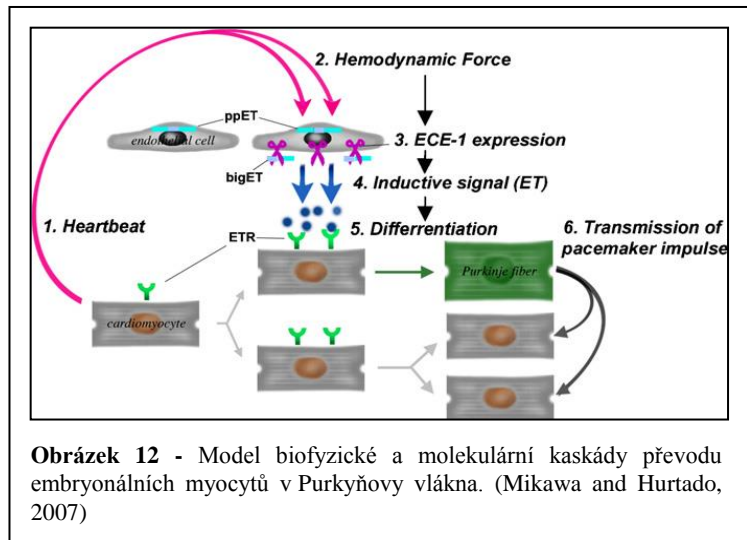
veden rychlostí až 2-3 m/s a srdeční myocyty akční potenciál vedou okolo 0,5-0,6 m/s (Eichna and DeHaan, 1961).

Pomocí světelné a elektronové mikroskopie byly zkoumány morfologické rozdíly v Purkyňových vlákních u odlišných skupin zvířat a lidí. Byly vytvořeny tři skupiny. První skupina zahrnovala kopytníky (vzorek: ovce, koza), do dalšího oddílu patřily masožravci a všežravci (vzorek: člověk, makak, pes, tuleň, delfin a velryba) a do poslední skupiny spadaly hlodavci (vzorek: potkan) (Ono et al., 2009). Byly srovnávány rozdíly v délce buněk pracovního myokardu komor a Purkyňových buněk. U potkanů Purkyňovy buňky (8-10 μm) byly prokazatelně kratší než myocyty komor (18-20 μm). Autoři této studie se domnívají, že u myši jsou poměry velikosti buněk a odlišnosti mezi buňkami obdobné výsledkům u potkanů a jsou tedy zahrnuty do skupiny hlodavců. U většiny ostatních organismů, až na makaky, byly výsledky přesně opačné, Purkyňovy buňky byly mnohem větší než komorové myocyty. Je již stanoveno, že převodní rychlost je úměrná velikosti svalové buňky, jejich typu a distribuci gap junction, což je způsob spojení dvou buněk. Větší Purkyňovy buňky nebo buňky s větším počtem gap junction budou mít lepší schopnost vedení signálu. Dále se lišilo pořadí sítě Purkyňových vláken podle druhu zvířete. Purkyňovy buňky u potkanů měly cylindrický tvar a běžely

rovnoběžně ve svalových trabekulách. U potkanů se Purkyňovy buňky s kardiomyocyty spojovaly v endokardu, občas vytvářely boční propojení se sousedícími buňkami. U ostatních zkoumaných zvířat nebylo toto spojení obvyklé, buňky se spojovaly přes interkalární disky na jejich konci.

Bylo zjištěno, že endotelin (ET-1) jako signální molekula může indukovat přeměnu pracovních myocytů do PV u kuřat (viz Obrázek 12) (Gourdie et al., 1998). U transgenních myši byla objevena obdobná vlastnost s neuregulinem (NRG-1), který je schopen zajistit přerod pracovních myocytů do PV (Rentschler et al., 2002). NRG-1 byl brán jako nejdůležitější část ve formaci PS u myši.

Zároveň je nyní již prokázáno, že jak NRG-1, tak i ET-1 dokážou indukovat expresi markerů pro PS u myši (Patel and Kos, 2005). Oba regulují mnoho faktorů, které jsou nezbytné v počáteční kardiogenezi. Ovlivňují expresi transkripčního faktoru Nkx2.5, která je nezbytná pro expresi Cx 40 v gap junctions (Komuro and Izumo, 1993; Patel and Kos, 2005). Stejně jako Nkx2.5 i tyto



dvě signální molekuly pozitivně regulují GATA4, což je další důkaz podporující důležitost těchto dvou transkripčních faktorů během počátečního vývoje PS. Zdá se, že alespoň část transkripčního genetického programu PS se shoduje s vývojem běžných komorových kardiomyocytů. Je však stále nejasné, zda exprese těchto genů je odpovědná za diferenciaci PS nebo jestli vznikají nové interakce mezi těmito či dalšími faktory nezbytnými k zahájení tohoto procesu (Patel and Kos, 2005). Použití ET-1 v embryonálních myocytech izolovaných ze stáječícího se tubulárního srdce vede k regulaci exprese Wnt7 a Wnt11. Tyto Wnt prokazují odlišnou strukturu exprese v embryonálním srdci, která zahrnuje i komponenty vyvíjejícího se PS. Wnt signalizace může mít i roli v následující srdeční morfogenezi, ale podstata těchto rolí zůstává nejasná (Bond et al., 2003).

5 Závěr

Myš je oblíbený genetický model ve studiu lidských kardiovaskulárních onemocnění, a přesto současná literatura v oblasti srdečního vývoje byla nedostačující. Je až překvapivé, jak málo je studií zaměřených na převodní systém srdeční. O jeho vývoji je pouze jasné, kdy jsou jeho části morfologicky detekovatelné a případně, kdy začnou být plnohodnotně funkční. Jak vzniká nebo jak se propojuje tato síť důkladně naplánovaných vláken, není známo. Přitom rozšíření znalostí souvisejících s převodním systémem, který stojí často za vznikem srdečních arytmií, by mohlo být velmi přínosné. S Purkyňovými buňkami je to obdobné. Neexistují výzkumy, které by se zabývaly velikostí, přesnou strukturou, vzhledem či kdy dochází k indukci v buňky převodního systému v jednotlivých částech převodního systému nebo jak generují elektrický signál. Je zajímavé, že u lidí a u myši chybí intramurální Purkyňova vlákna, ale u většiny ostatních druhů zvířat se vyskytují. Nemůže je tento deficit lišit ve způsobu vedení elektrického signálu nebo nemůže způsobovat časté arytmie u lidí? Anebo mohou také mít jinou strukturu či se velice podobat okolním buňkám? Proto bych se ráda v navazujícím studiu zaměřila na převodní systém. Výzkum by se zabýval mechanismem růstu převodního systému v prenatální i postnatální fázi, množstvím jader v buňce, charakteristikou tvaru těchto buněk a porovnáním velikosti Purkyňových buněk s běžnými kardiomyocyty.

6 Seznam literatury

- Aanhaanen, W.T., Mommersteeg, M.T., Norden, J., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., Anderson, R.H., Kispert, A., Moorman, A.F., Christoffels, V.M.**, 2010. Developmental origin, growth, and three-dimensional architecture of the atrioventricular conduction axis of the mouse heart. *Circulation research* 107, 728-736.
- Bai, S., Campbell, S.E., Moore, J.A., Morales, M.C., Martin Gerdes, A.**, 1990. Influence of age, growth, and sex on cardiac myocyte size and number in rats. *The Anatomical Record* 226, 207-212.
- Bakker, M.L., Moorman, A.F., Christoffels, V.M.**, 2010. The atrioventricular node: origin, development, and genetic program. *Trends in cardiovascular medicine* 20, 164-171.
- Beinlich, C.J., Rissinger, C.J., Morgan, H.E.**, 1995. Mechanisms of rapid growth in the neonatal pig heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 27, 273-281.
- Benes, J., Ammirabile, G., Sankova, B., Campione, M., Krejci, E., Kvasilova, A., Sedmera, D.**, 2014. The role of connexin40 in developing atrial conduction. *FEBS letters* 588, 1465-1469.
- Bond, J., Sedmera, D., Jourdan, J., Zhang, Y., Eisenberg, C.A., Eisenberg, L.M., Gourdie, R.G.**, 2003. Wnt11 and Wnt7a are up-regulated in association with differentiation of cardiac conduction cells in vitro and in vivo. *Developmental dynamics* 227, 536-543.
- Buckingham, M., Meilhac, S., Zaffran, S.**, 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics* 6, 826-837.
- Chalice, C., Virágh, S.**, 1973b. The embryologic development of the mammalian heart, Ultrastructure of the mammalian heart. *Academic Press New York*, pp. 91-126.
- Chalice, C.E., Virágh, S.**, 1973a. The architectural development of the early mammalian heart. *Tissue & cell* 6, 447-462.
- Chan-Thomas, P.S., Thompson, R.P., Robert, B., Yacoub, M.H., Barton, P.J.**, 1993. Expression of homeobox genes Msx-1 (Hox-7) and Msx-2 (Hox-8) during cardiac development in the chick. *Developmental dynamics* 197, 203-216.
- Cheng, G., Litchenberg, W.H., Cole, G.J., Mikawa, T., Thompson, R.P., Gourdie, R.G.**, 1999. Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development* 126, 5041-5049.
- Christoffels, V.M., Hoogaars, W.M., Moorman, A.F.M.**, 2010. Patterning and Development of the Conduction System of the Heart: Origins of the Conduction System in Development, in:

Rosenthal, N., Harvey, R.P. (Eds.), Heart development and regeneration. Elsevier, London, p. 172.

Christoffels, V.M., Hoogaars, W.M., Tessari, A., Clout, D.E., Moorman, A.F., Campione, M., 2004. T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Developmental dynamics* 229, 763-770.

Christoffels, V.M., Smits, G.J., Kispert, A., Moorman, A.F., 2010. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circulation research* 106, 240-254.

Chuck, E.T., Watanabe, M., 1997. Differential expression of PSA-NCAM and HNK-1 epitopes in the developing cardiac conduction system of the chick. *Developmental dynamics* 209, 182-195.

Čihák, R., 1997. *Anatomie 3*. Grada Publishing, Praha.

Clubb, F., Bishop, S., 1984. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 50, 571-577.

Crick, S., Sheppard, M., Ho, S., Gebstein, L., Anderson, R., 1998. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J. Anat.* 193, 105-119.

Davies, F., 1942. The conducting system of the vertebrate heart. *British heart journal* 4, 66.

De Haan, R.L., 1965. *Morphogenesis of the vertebrate heart*. Holt, Rinehart & Winston, New York.

de Jong, F., Opthof, T., Wilde, A.A., Janse, M.J., Charles, R., Lamers, W.H., Moorman, A.F., 1992. Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts. *Circ Res* 71, 240-250.

de la Cruz, M.V., Gómez, C.S., Cayre, R., 1991. The developmental components of the ventricles: their significance in congenital cardiac malformations. *Cardiology in the Young* 1, 123-128.

Draeger, A., Stelzer, E., Herzog, M., Small, J., 1989. Unique geometry of actin-membrane anchorage sites in avian gizzard smooth muscle cells. *Journal of Cell Science* 94, 703-711.

Eichna, L.W., DeHaan, R.L., 1961. Differentiation of the atrioventricular conducting system of the heart. *Circulation* 24, 458-470.

Gerdes, A., Kriseman, J., Bishop, S., 1983. Changes in myocardial cell size and number during the development and reversal of hyperthyroidism in neonatal rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 48, 598-602.

- Gerdes, A.M., Moore, J.A., Hines, J.M., Kirkland, P., Bishop, S.P.,** 1986. Regional differences in myocyte size in normal rat heart. *The Anatomical Record* 215, 420-426.
- Gorza, L., Schiaffino, S., Vitadello, M.,** 1988. Heart conduction system: a neural crest derivative? *Brain research* 457, 360-366.
- Gourdie, R.G., Harris, B.S., Bond, J., Justus, C., Hewett, K.W., O'Brien, T.X., Thompson, R.P., Sedmera, D.,** 2003. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 69, 46-57.
- Gourdie, R.G., Mima, T., Thompson, R.P., Mikawa, T.,** 1995. Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development* 121, 1423-1431.
- Gourdie, R.G., Wei, Y., Kim, D., Klatt, S.C., Mikawa, T.,** 1998. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6815-6818.
- Grimm, A.F., de la Torre, L., LA PORTA, M.,** 1970. Ventricular nuclei-DNA relationships with myocardial growth and hypertrophy in the rat. *Circulation research* 26, 45-52.
- His, W.,** 1893. Die Tätigkeit des embryonalen Herzens und seine Bedeutung für die Lehre der Herzbewegung beim Erwachsenen. *Arch. med. Klin. Leipzig*, 14.
- Ismat, F.A., Zhang, M., Kook, H., Huang, B., Zhou, R., Ferrari, V.A., Epstein, J.A., Patel, V.V.,** 2005. Homeobox protein Hop functions in the adult cardiac conduction system. *Circulation research* 96, 898-903.
- James, T.N.,** 1967. Anatomy of the cardiac conduction system in the rabbit. *Circulation research* 20, 638-648.
- Jay, P.Y., Harris, B.S., Maguire, C.T., Buerger, A., Wakimoto, H., Tanaka, M., Kupersmidt, S., Roden, D.M., Schultheiss, T.M., O'Brien, T.X.,** 2004. Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *Journal of Clinical Investigation* 113, 1130.
- Katzberg, A.A., Farmer, B.B., Harris, R.A.,** 1977. The predominance of binucleation in isolated rat heart myocytes. *American Journal of Anatomy* 149, 489-499.
- Komuro, I., Izumo, S.,** 1993. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8145-8149.
- Kozlovskis, P., Gerdes, A., Smets, M., Moore, J., Bassett, A., Myerburg, R.,** 1991. Regional increase in isolated myocyte volume in chronic myocardial infarction in cats. *Journal of molecular and cellular cardiology* 23, 1459-1466.

- Kruithof, B., van den Hoff, M.J., Wessels, A., Moorman, A.F.,** 2003. Cardiac muscle cell formation after development of the linear heart tube. *Developmental dynamics* 227, 1-13.
- Lescroart, F., Kelly, R.G., Le Garrec, J.-F., Nicolas, J.-F., Meilhac, S.M., Buckingham, M.,** 2010. Clonal analysis reveals common lineage relationships between head muscles and second heart field derivatives in the mouse embryo. *Development* 137, 3269-3279.
- Leu, M., Ehler, E., Perriard, J.-C.,** 2001. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anatomy and embryology* 204, 217-224.
- Li, F., McNelis, M.R., Lustig, K., Gerdes, A.M.,** 1997. Hyperplasia and hypertrophy of chicken cardiac myocytes during posthatching development. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 273, R518-R526.
- 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, 1737-1746.
- Lo, C.W.,** 2000. Role of Gap Junctions in Cardiac Conduction and Development Insights From the Connexin Knockout Mice. *Circulation research* 87, 346-348.
- Machida, N., Brissie, N., Sreenan, C., Bishop, S.P.,** 1997. Inhibition of Cardiac Myocyte Division in c-myc Transgenic Mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 1895-1902.
- Manasek, F.J.,** 1968. Embryonic development of the heart: A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo. *J. Morphol.* 125, 329-366.
- Meilhac, S.M., Esner, M., Kelly, R.G., Nicolas, J.-F., Buckingham, M.E.,** 2004. The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Developmental cell* 6, 685-698.
- Mikawa, T.,** 1999. Cardiac lineage, in: Harvey, R.P., Rosenthal, N. (Eds.), *Heart development*. Harcourt Brace & Company, USA, pp. p. 19-33.
- Mikawa, T., Hurtado, R.,** 2007. Development of the cardiac conduction system, *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier, pp. 90-100.
- Milan, D.J., Giokas, A.C., Serluca, F.C., Peterson, R.T., MacRae, C.A.,** 2006. Notch1b and neuregulin are required for specification of central cardiac conduction tissue. *Development* 133, 1125-1132.
- Milner, D.J., Mavroidis, M., Weisleder, N., Capetanaki, Y.,** 2000. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *The Journal of cell biology* 150, 1283-1298.

- Miquerol, L., Meysen, S., Mangoni, M., Bois, P., van Rijen, H.V., Abran, P., Jongsma, H., Nargeot, J., Gros, D.,** 2004. Architectural and functional asymmetry of the His–Purkinje system of the murine heart. *Cardiovascular research* 63, 77-86.
- Miquerol, L., Moreno-Rascon, N., Beyer, S., Dupays, L., Meilhac, S.M., Buckingham, M.E., Franco, D., Kelly, R.G.,** 2010. Biphasic development of the mammalian ventricular conduction system. *Circulation research* 107, 153-161.
- Mjaatvedt, C.H., Yamamura, H., Wessels, A., Ramsdell, A., Turner, D., Markwald, R.R.,** 1999. Mechanisms of segmentation, septation, and remodeling of the tubular heart: endocardial cushion fate and cardiac looping, in: Harvey, R.P., Rosenthal, N., al., e. (Eds.), *Heart development*. Harcourt Brace & Company, USA, pp. p. 159-177.
- Moorman, A., Van den Berg, G., Anderson, R.H., Christoffels, V.M.,** 2010. Early cardiac growth and the ballooning model of cardiac chamber formation, in: Rosenthal, N., Harvey, R.P. (Eds.), *Heart development and regeneration*. Elsevier, London, pp. 219-236.
- Moorman, A., Webb, S., Brown, N.A., Wouter, L., Anderson, R.H.,** 2003. Development of heart: (1) Formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart* 89, 806-814.
- Moorman, A.F., De Jong, F., Denyn, M.M., Lamers, W.H.,** 1998. Development of the cardiac conduction system. *Circulation research* 82, 629-644.
- Netter, F.H.,** 2010. *Atlas of human anatomy* 5th. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Ono, N., Yamaguchi, T., Ishikawa, H., Arakawa, M., Takahashi, N., Saikawa, T., Shimada, T.,** 2009. Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Archives of histology and cytology* 72, 139-149.
- Patel, R., Kos, L.,** 2005. Endothelin-1 and Neuregulin-1 convert embryonic cardiomyocytes into cells of the conduction system in the mouse. *Developmental dynamics* 233, 20-28.
- Pennisi, D.J., Rentschler, S., Gourdie, R.G., Fishman, G.I., Mikawa, T.,** 2002. Induction and patterning of the cardiac conduction system. *International Journal of Developmental Biology* 46, 765-776.
- Przybylski, R.J., Chlebowski, J.S.,** 1972. DNA synthesis, mitosis and fusion of myocardial cells. *Journal of morphology* 137, 417-431.
- Rentschler, S., Vaidya, D.M., Tamaddon, H., Degenhardt, K., Sassoon, D., Morley, G.E., Jalife, J., Fishman, G.I.,** 2001. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development* 128, 1785-1792.

- Rentschler, S., Zander, J., Meyers, K., France, D., Levine, R., Porter, G., Rivkees, S.A., Morley, G.E., Fishman, G.I.,** 2002. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10464-10469.
- Sankova, B., Benes, J., Krejci, E., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Miquerol, L., Sedmera, D.,** 2012. The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. *Cardiovascular research*, cvs210.
- Savolainen, S., Foley, J., Elmore, S.,** 2009. Histology atlas of the developing mouse heart with emphasis on E11. 5 to E18. 5. *Toxicologic pathology* 37, 395-414.
- Sedmera, D.,** 2011. Function and form in the developing cardiovascular system. *Cardiovascular research* 91, 252-259.
- Sedmera, D., Gourdie, R.,** 2014. Why do we have Purkinje fibers deep in our heart? *Physiological Research* 63, S9-S18.
- Sedmera, D., McQuinn, T.,** 2008. Embryogenesis of the Heart Muscle. *Heart Failure Clin* 4, 235-245.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R.P., Anderson, R.H.,** 2000. Developmental patterning of the myocardium. *The Anatomical Record* 258, 319-337.
- Sedmera, D., Reckova, M., DeAlmeida, A., Coppén, S.R., Kubalak, S.W., Gourdie, R.G., Thompson, R.P.,** 2003. Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 274, 773-777.
- Simões-Costa, M., Vasconcelosa, M., Sampaioa, A., Cravo, R., Linhares, V., Hochgreba, T., Yanb, C., Davidsonc, B., Xavier-Neto, J.,** 2005. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Developmental Biology* 277, 1-15.
- Štejfa, M.,** 2007. *Kardiologie*. Grada Publishing, Praha.
- Suma, K.,** 2001. Sunao Tawara: a father of modern cardiology. *Pacing and Clinical Electrophysiology* 24, 88-96.
- Tawara, S.,** 1906. *Das reizleitungssystem des Säugetierherzens*. Fischer.
- Thompson, R., Lindroth, J., Wong, Y.,** 1990. Regional differences in DNA-synthetic activity in the pre-septation myocardium of the chick. *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*, 219-234.
- Trojan, S.,** 2003. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, a.s., Praha.

- van den Berg, G., Abu-Issa, R., de Boer, B.A., Hutson, M.R., de Boer, P.A., Soufan, A.T., Ruijter, J.M., Kirby, M.L., van den Hoff, M.J., Moorman, A.F.,** 2009. A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube. *Circulation research* 104, 179-188.
- Verheijck, E.E., van Kempen, M.J., Veereschild, M., Lurvink, J., Jongma, H.J., Bouman, L.N.,** 2001. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovascular research* 52, 40-50.
- Virágh, S., Challice, C.,** 1983. The development of the early atrioventricular conduction system in the embryonic heart. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 61, 775-792.
- Vitadello, M., Vettore, S., Lamar, E., Chien, K.R., Gorza, L.,** 1998. Neurofilament M mRNA is expressed in conduction system myocytes of the developing and adult rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 128, 1833-1844.
- Webb, S., Brown, N., Aderson, R.,** 1996. The structure of the mouse heart in late fetal ages. *Anat Embryol (Berl)* 194, 37-47.
- Wenink, A.,** 1976. Development of the human cardiac conducting system. *Journal of anatomy* 121, 617.
- Wessels, A., Sedmera, D.,** 2003. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiological Genomics* 15, 165-176.
- Wu, S.M., Fujiwara, Y., Cibulsky, S.M., Clapham, D.E., Lien, C.-I., Schultheiss, T.M., Orkin, S.H.,** 2006. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 127, 1137-1150.
- Yost, H.J.,** 1995. Vertebrate left-right development. *Cell* 82, 689-692.

7 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Porovnání anatomie lidského (A) a myšního srdce (B). (Wessels and Sedmera, 2003)	4
Obrázek 2 - Formace srdečních dutin 37. ED u lidí (Moorman et al., 1998).	7
Obrázek 3 - Sagitální řezy myším srdcem během embryonálního vývoje. (Savolainen et al., 2009)	8
Obrázek 4 - Počáteční (A) a sekundární (B) trabekuly v obou komorách myši. (Sedmera et al., 2000)	10
Obrázek 5 - Schematické uspořádání dospělého převodního systému srdečního u lidí. (Netter, 2010)	12
Obrázek 6 - Rozkreslení Purkyňových vláken ve stěně pravé komory u lidí dle Tawary v roce 1906 (Tawara, 1906).....	13
Obrázek 7 - Schéma funkční organizace a elektrofyziologický projev jednotlivých částí převodního systému srdečního. (Mikawa and Hurtado, 2007)	14
Obrázek 8 - Vývoj převodního systému srdečního během stačení srdce a oddělování srdečních dutin u kuřete (založeno na elektrofyziologické a mapovací studii). (Mikawa and Hurtado, 2007)	16
Obrázek 9 – Průběh vývoje srdce a převodního systému srdečního (myš). (Christoffels et al., 2010).	18
Obrázek 10 - Čerstvě izolované myocyty v různých dnech po narození (PD 0, 4, 6, 14, 61) (Leu et al., 2001)	23
Obrázek 11 - Síť Purkyňových vláken je formována 1-3 buňkami protaženými v jejich délce oproti buňkám pracovního myokardu, uspořádání v levé komoře myši. (Miquerol et al., 2004)	24
Obrázek 12 - Model biofyzické a molekulární kaskády převodu embryonálních myocytů v Purkyňovy vlákna. (Mikawa and Hurtado, 2007)	25