

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Radka Čerychová

Vliv maternálního diabetu na embryonální vývoj srdce a fetální programování

The effect of maternal diabetes on embryonic cardiovascular development and fetal programming

Disertační práce

Školitel: RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Laboratoř molekulární patogenetiky

Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.

Praha, 2019

Čestné prohlášení

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

V Praze dne

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Gabriele Pavlínkové, Ph.D. za to, že se mě ujala, nezlomila nade mnou hůl a mnohému mě naučila. Můj dík patří také všem kolegům z Laboratoře molekulární patogenetiky za veškerou jejich pomoc, podporu a přátelství, zejména Ing. Romaně Bohuslavové, Ph.D. Také bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Korelové za časově neomezené zapůjčení knihy „Diabetologie“ a Ing. Hynkovi Svatošovi za psychickou a grafickou podporu.

Ráda bych poděkovala také všem kolegům z jiných pracovišť, kteří se podíleli na zde popisovaných publikacích, jmenovitě Ing. Pavlovi Abaffymu, RNDr. Oldřichovi Benadovi, CSc., RNDr. Vladimírovi Benešovi, CSc., Prof. RNDr. Františkovi Kolářovi, CSc., Ing. Františkovi Papouškovi, CSc. a Prof. MUDr. Davidovi Sedmerovi, DrSc.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory GAČR: 16-06825S, ERDF: BIOCEV: CZ.1.05/1.1.00/02.0109, AV ČR: RVO: 86652036, GAUK: 228416 a Hlávkovy nadace.

Abstrakt

Maternální diabetes negativně ovlivňuje embryonální vývoj a je spojen se zvýšeným rizikem vzniku vrozených vývojových vad. Vedle přímé teratogenicity dochází v diabetickém intrauterinním prostředí k tzv. procesu fetálního programování, který zvyšuje u dospělých potomků predispozice ke kardiovaskulárním chorobám, obezitě a onemocnění *diabetes mellitus*. Molekulární mechanismy embryonálních a fetálních odpovědí na maternální diabetické prostředí stále nejsou plně objasněny. Na myším modelu jsme ukázali, že maternální diabetes ovlivňuje expresi genů v srdcích vyvíjejících se embryí. Největší změny v expresi 11 vybraných genů byly detekovány v období souvisejícím s dokončováním septace, expanzí myokardu a zvýšením embryonální produkce inzulinu. Tyto geny jsou spojovány s procesem epitelo-mezenchymové tranzice, klíčového procesu ve vývoji srdce. Pomocí imunohistochemické analýzy jsme v srdcích embryí, které byly vystaveny maternálnímu diabetu, v kritickém stádiu kardiovaskulárního vývoje detekovali zvýšení hypoxie, čemuž odpovídalo navýšení exprese hypoxií indukovaného faktoru 1 α (HIF-1 α) a vaskulárního endotelového růstového faktoru A.

Na základě výsledků ukazujících zapojení signální dráhy HIF-1 v rozvoji diabetické embryopatie byl pro studium vlivu maternálního diabetu na funkci srdce dospělých potomků zvolen myší model maternálního diabetu v kombinaci s heterozygotní globální delecí genu *Hif1a* (*Hif1a*^{+/-}). Echokardiografické analýzy ukázaly, že *Hif1a*^{+/-} potomci diabetiček mají ve věku 12 týdnů významně zhoršenou funkci srdce. Pomocí RNA-sekvenování transkriptomu levých srdečních komor jsme ukázali, že *Hif1a*^{+/-} potomci diabetiček mají významné změny v expresi genů kódujících proteiny spojené s vývojovými procesy, metabolismem, apoptózou a fyziologií krevních cév. Změny v imunitních a zánětlivých procesech byly detekovány jak u mutantních, tak i u nemutantních potomků diabetických myší. Imunohistochemické analýzy levé srdeční komory ukázaly, že kombinace genotypu *Hif1a*^{+/-} a maternálního diabetu je zodpovědná za narušenou infiltraci makrofágů, zvýšené množství pokročilých produktů glykace a změny ve velkých koronárních cévách.

Ukázali jsme, že maternální diabetes ovlivňuje expresi genů v srdci v průběhu embryonálního vývoje, a také, že jedinci, kteří byli vystaveni diabetickému intrauterinnímu prostředí, mají v dospělosti zhoršenou srdeční funkci a významné změny v transkriptomu levé komory. Zároveň naše výsledky ukazují negativní vliv kombinace vývoje v diabetickém prostředí a mutace genu *Hif1a* na rozvoj kardiovaskulárních chorob v dospělosti.

Abstract

Maternal *diabetes mellitus* negatively affects embryonic development and increases the risk for congenital malformations. Besides direct teratogenicity, diabetic intrauterine milieu can predispose an individual to chronic diseases later in life, including cardiovascular diseases, obesity, and *diabetes mellitus*, in a process termed fetal programming. Molecular mechanisms of embryonic and fetal responses to maternal diabetes are still not fully elucidated. Using mouse model, we show that maternal diabetes induces gene expression changes in the hearts of developing embryos. The most significant changes in the expression of 11 selected genes were detected at the developmental stage associated with completion of cardiac septation, myocardial mass expansion, and increased insulin production in the embryonic pancreas. These affected genes encode products involved in the epithelial-to-mesenchymal transition, a crucial process in heart development. Using immunohistochemistry, we detected increased hypoxia in the diabetes-exposed hearts at the critical stage of cardiac development. Correspondingly to increased hypoxia, the expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) and vascular endothelial growth factor A was increased in the heart of diabetes-exposed embryos.

Based on our results indicating the involvement of HIF-1-regulated pathways in diabetic embryopathy, we investigated the combinatorial effects of *Hif1a* mutation and maternal diabetes exposure on the heart of the offspring of diabetic pregnancy. We analyzed the diabetes-exposed adult offspring with heterozygous deletion of *Hif1a* (*Hif1a*^{+/-}). Echocardiographic analyses showed impaired heart function in the 12 weeks old *Hif1a*^{+/-} offspring of diabetic pregnancy. Transcriptome profiling by RNA-Sequencing showed significant changes associated with development, metabolism, apoptosis and blood vessel physiology in the diabetes-exposed *Hif1a*^{+/-} offspring compared to diabetes-exposed *wild-type* mice. In contrast, immune system processes and inflammatory responses were affected in both *Hif1a*^{+/-} and *wild-type* offspring of diabetic mothers. Immunohistochemical analyses showed that the combination of *Hif1a*^{+/-} genotype and maternal diabetes leads to impaired macrophage infiltration, increased advanced glycation end products accumulation and changes in the large coronary vessels.

In summary, our results show that maternal diabetes affects gene expression in the developing heart, and that the adult offspring of diabetic pregnancy have impaired heart function and significant changes in the transcriptome of the left ventricle. Additionally, we show a negative role of the combination of maternal diabetes exposure and *Hif1a* gene mutation in the development of cardiovascular diseases in the adult offspring.

Obsah

Abstrakt

Abstract

Obsah

Seznam zkratek

1.	Úvod.....	1
2.	Cíle práce	2
3.	Literární přehled	3
3.1.	Dospělé srdce.....	3
3.1.1.	Činnost srdce.....	6
3.1.2.	Procesy vedoucí ke kardiomyopatii	8
3.2.	Vývoj srdce	10
3.2.1.	Geny účastníci se vývoje srdce	12
3.3.	Hypoxií indukovaný faktor 1	24
3.3.1.	Vliv HIF-1 na vývoj srdce.....	25
3.3.2.	HIF-1 v dospělém srdci.....	27
3.4.	Perinatální změny v srdci.....	28
3.5.	Diabetes mellitus a přidružené komplikace	30
3.5.1.	Klasifikace DM	31
3.5.2.	Hraniční poruchy glukózové homeostázy	32
3.5.3.	Diabetická kardiomyopatie	33
3.5.4.	Diabetická embryopatie	34
3.5.5.	Fetální programování	35
3.5.6.	HIF-1 a diabetes	36
4.	Materiál a metody	38

4.1. Modelový organismus <i>mus musculus</i>	38
4.1.1. Nulová alela <i>Hif1a</i>	38
4.2. Indukce diabetu	38
4.3. Izolace embryí	39
4.4. Perfuze dospělých potomků a izolace srdcí	40
4.5. Echokardiografická analýza funkce srdce	40
4.6. Izolace DNA a genotypizace	41
4.7. Izolace RNA z embryonální tkáně	42
4.8. Izolace RNA z LV dospělých srdcí	43
4.9. Reverzní transkripce RNA	43
4.10. Návrh primerů	46
4.11. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase	47
4.12. Sekvence transkriptomu	48
4.13. Histologická analýza	50
4.13.1. Příprava parafínových řezů	50
4.13.2. Příprava vibratomových řezů	50
4.13.3. Barvení hematoxylin-eosinem	50
4.13.4. Biochemická detekce kolagenu	51
4.13.5. Biochemická detekce pokročilých produktů glykace	51
4.13.6. Detekce apoptózy v tkáni	52
4.13.7. Imunohistochemie parafínových řezů	53
4.13.8. Detekce hypoxických oblastí v tkáni	53
4.13.9. Imunohistochemie vibratomových řezů	54
4.13.10. Izolace proteinů	54
4.13.11. Western blot	55

5.	Výsledky	57
5.1.	Změny během embryonálního vývoje	57
5.2.	Maternálním diabetem indukované změny v embryonální genové expresi	59
5.3.	Potomci diabetických matek	71
5.3.1.	Změny v morfologii tkáně LV	73
5.3.2.	Změny v metabolismu	85
5.3.3.	Změny v cévách	87
6.	Diskuse	99
7.	Závěr	108
8.	Seznam použité literatury	110

Seznam zkratek

Adam	a disintegrin and metalloprotease	dezintegrin a metaloproteáza
AGE	advanced glycation end products	pokročilé produkty glykace
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase	proteinová kináza aktivovaná 5' adenosin monofosfátem
ANOVA	analysis of variance	analýza rozptylu
ATP	adenosine triphosphate	adenosin trifosfát
ATP2A2	ATPase, Ca ²⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	pomalou pracující ATPáza srdečního svalu transportující Ca ²⁺ , 2
AVN	atrioventricular node	atrioventrikulární uzel
AVS	atrioventricular septum	síňokomorové septum
Baz1b	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	bromodoména přiléhající k doméně zinkového prstu, 1B
MHC	myosin heavy chain	těžký myosinový řetězec
BMI	body mass index	index tělesné hmotnosti
Ccl	chemokine (C-C motif) ligand	chemokinový ligand s C-C motivem
Cd36	CD36 molecule	molekula CD36
Ctss	cathepsin S	katepsin S
CNCC	cardiac neural crest cells	buňky srdeční neurální lišty
Cq	crossing point	přechodový bod
Ctgf	connective tissue growth factor	růstový faktor pojivové tkáně
CX43	connexin 43	konexin 43
CXADR	coxsackievirus and adenovirus receptor	receptor pro virus coxsackie a adenovirus
DEG	differentially expressed genes	odlišně exprimované geny

DiaM	diabetic mother	diabetická matka
DM	<i>diabetes mellitus</i>	<i>diabetes mellitus</i>
DM1	<i>diabetes mellitus</i> type 1	<i>diabetes mellitus</i> typ 1
DM2	<i>diabetes mellitus</i> type 2	<i>diabetes mellitus</i> typ 2
E0,5	embryonic day 0.5	embryonální den 0,5
ECC	endocardial cushions	endokardové polštáře
ECM	extracellular matrix	extracelulární matrix
Efnb2	ephrin B2	efrin B2
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition	epitelo-mezenchymová tranzice
Ephb4	Eph receptor B4	receptor pro efrin, B4
FA	fatty acids	masné kyseliny
FABPpm	plasmalemmal fatty acid binding protein	membránový vazebný protein pro masné kyseliny
FATP	fatty acid transport protein	transportní protein pro masné kyseliny
FLT1	FMS-like tyrosine kinase 1	tyrosinová kináza podobná FMS, 1
Gata4	GATA binding protein 4	protein vázající GATA motiv, 4
GDM	gestational <i>diabetes mellitus</i>	gestační <i>diabetes mellitus</i>
Gja1	gap junction protein alpha 1	protein mezibuněčných spojů, alfa 1
HNF-4 α	hepatic nuclear factor 4, α	jaterní jaderný faktor 4, α
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1	hypoxií indukovaný faktor 1
Hprt1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase-1	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
IAS	interatrial septum	mezisíňové septum

IGF-1	insulin-like growth factor 1	růstový faktor podobný inzulínu 1
IL	interleukin	interleukin
Il6st	interleukin 6 signal transducer	přenašeč signálu interleukinu 6
Isl1	ISL1 transcription factor	transkripční faktor ISL1
Itgav	integrin alpha V	integrin alfa V
IVS	interventricular septum	mezikomorové septum
KDR	kinase insert domain protein receptor	receptor s vloženou doménou kinázového proteinu
LA	left atrium	levá síň
LADA	latent autoimmune diabetes of adults	latentní autoimunitní diabetes dospělých
Ldha	lactate dehydrogenase a	laktát dehydrogenáza a
LV	left ventricle	levá komora
Mef2c	myocyte enhancer factor 2	faktor podporující myocyty, 2
Mesp1	mesoderm posterior 1	posteriovní mezoderm, 1
mFLT1	membrane-bound FLT1	membránová forma FLT1, viz. FLT1
Mmp-2	matrix metalloprotease 2	matrix metaloproteáza 2
MODY	maturity-onset diabetes of the young	diabetes mladých rozvíjející se v dospělosti
NADH/NAD ⁺	ratio of reduced and oxidized forms of nicotinamide adenine dinucleotide	poměr redukované a oxidované formy nikotinamid adenin dinukleotidu
Nkx2-5	NK2 homeobox 5	NK2 homeobox 5
OFT	outflow tract	odtoková část komor
pCX43	phosphorylated connexin 43	fosforylovaný konexin 43

PDGFR α	platelet derived growth factor receptor alpha	receptor alfa růstového faktoru odvozeného z destiček
Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 1	kináza pyruvát dehydrogenázy, izoenzym 1
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1	destičková endotelová buněčná adhezní molekula 1
PEO	proepicardial organ	proepikardový orgán
PFA	paraformaldehyde	paraformaldehyd
PHD	prolyl hydroxylase domain proteins	proteiny s prolyl hydroxylázovou doménou
PHF	primary heart field	primární srdeční pole
Plgf	placental growth factor	placentální růstový faktor
RA	right atrium	pravá síň
RNA-Seq	RNA sequencing	sekvenace RNA
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
RV	right ventricle	pravá komora
SAN	sinoatrial node	sinoatriální uzel
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
sFLT1	soluble FLT1	rozpustná forma FLT1, viz. FLT1
SHF	secondary heart field	sekundární srdeční pole
Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	přenašeč rozpuštěné látky, rodina 2 (usnadňující přenos glukózy), člen 1

Smardc3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	regulátor chromatinu závislý na aktinu, asociovaný s matrix, příbuzný SWI/SNF, podrodina d, člen 3
SR	sarcoplasmic reticulum	sarkoplasmatické retikulum
STZ	streptozotocin	streptozotocin
Tbx5	T-box 5	T-box 5
TGF- β	transforming growth factor, beta	transformující růstový faktor beta
Tgfr	transforming growth factor, beta receptor	receptor transformujícího růstového faktoru beta
Tn	troponin	troponin
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha	faktor nekrotizující tumory alfa
TNFR	tumor necrosis factor receptor	receptor faktoru nekrotizujícího tumory
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-X nick end labeling	značení zlomů DNA pomocí terminální deoxynukleotidyl transferázy
Vegf	vascular growth endothelial factor	vaskulární endotelový růstový faktor
VHL	von Hippel-Lindau protein	von Hippel-Lindauův protein
WSTF	Williams syndrome transcription factor	transkripční faktor Williamsova syndromu
wt	wild type	divoký typ
Wt1	Wilms tumor 1 homolog	homolog Wilmsova tumoru 1

1. Úvod

Diabetes mellitus je nejčastější metabolické onemocnění ovlivňující především hladinu glukózy v krvi. Hyperglykemie pak negativně ovlivňuje všechny orgány v těle. Kromě toho, že je spojován se zdravotními komplikacemi, které mohou být pro daného pacienta život ohrožující, představuje maternální diabetes významné riziko i pro vyvíjející se plod. Diabetická těhotenství jsou spojena se zvýšeným rizikem potratu a rozvoje vrozených vývojových vad (Hod *et al.*, 2008, Greene, 2001, Persson *et al.*, 2009). Nejčastěji je postižena nervová a kardiovaskulární soustava. Mezi nejčastější vrozené vývojové vady srdce patří zejména defekty atrioventrikulárního septa a velkých cév. Přestože se jedná o operabilní vady, představují zátěž do budoucího života. Vývoj v diabetickém prostředí však ovlivňuje potomka v dospělém životě i v případě, že nedojde ke vzniku vývojových defektů. Populační studie ukázaly, že potomci diabetiček mají zvýšené riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob, obezity, *diabetes mellitus* typu 2 a metabolického syndromu (Fetita *et al.*, 2006, Plagemann, 2004).

Přestože mechanismus vzniku defektů stále není přesně znám, za nejvýznamnější faktor je považována hyperglykemie, která má sama o sobě teratogenní efekt (Baack *et al.*, 2014) a je spojována s tzv. pseudohypoxií (Williamson *et al.*, 1993). Samotná hypoxie vede k podobným defektům, jaké se objevují u diabetické embryopatie (Dunwoodie, 2009). Zapojení hypoxické signalizace potvrdila studie myších embryí, která ukázala jako nejvíce ovlivněnou signalizaci hypoxií indukovaného faktoru 1 (Pavlinkova *et al.*, 2009), hlavního regulátoru odpovědi na hypoxii.

V předkládané práci je pro studium vlivu maternálního diabetu na změny v srdci embryí a potomků použit myší model. Vývoj srdce myši se od vývoje srdce člověka liší zejména v načasování jednotlivých procesů. Diabetická embryopatie se u myši projevuje stejnými typy defektů jako u člověka. Dostupnost myšího modelu s delecí genu *Hif1a* navíc umožňuje studium změn v hypoxické signální dráze a tak se přiblížit poznání procesů ovlivněných maternálním diabetem.

2. Cíle práce

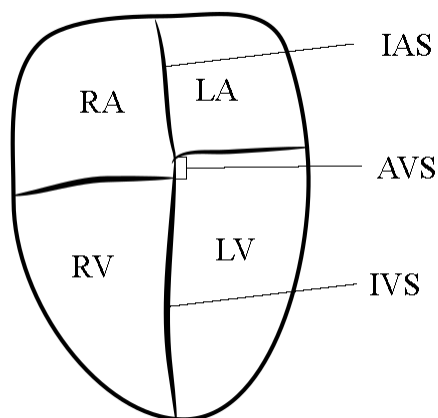
1. Morfologická analýza embryí vystavených maternálnímu diabetu.
2. Analýza změn v expresi vybraných genů během embryonálního vývoje srdce na úrovni mRNA a proteinu.
3. Analýza srdečních funkcí potomků zatížených heterozygotní delecí genu *Hif1a* a vývojem v diabetickém prostředí.
4. Analýza změn v transkriptomu levé srdeční komory potomků zatížených heterozygotní delecí genu *Hif1a* a vývojem v diabetickém prostředí.
5. Molekulární analýzy změn v srdeční tkáni mutantních potomků diabetických matek.

3. Literární přehled

3.1. Dospělé srdce

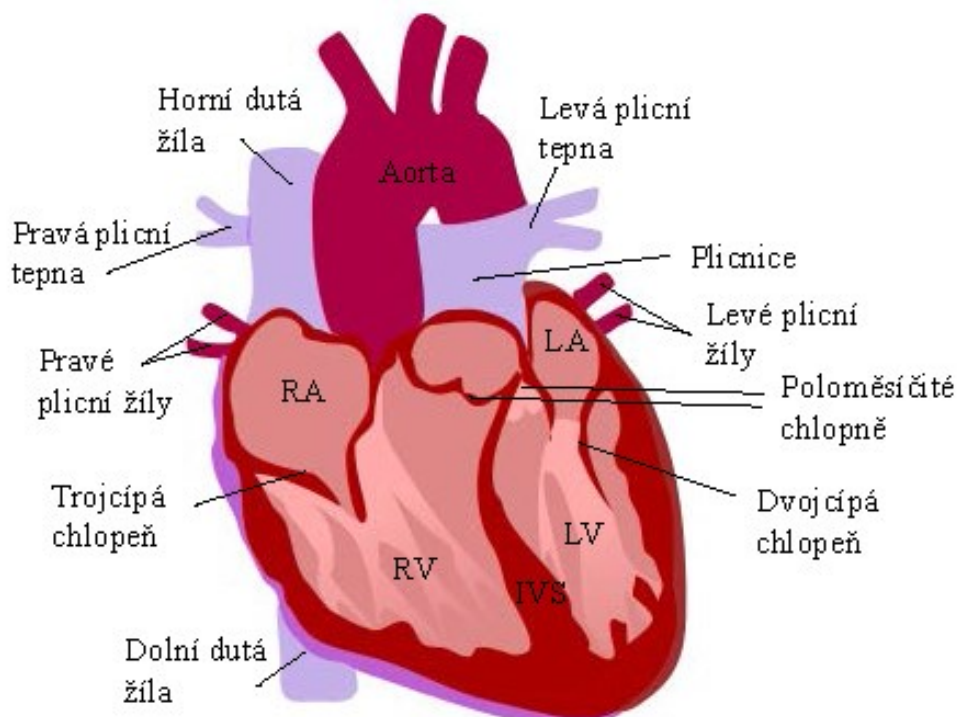
Srdce je dutý svalový orgán, jehož funkcí je vhánění krve do tělního a plicního oběhu. Lidské srdce má hmotnost 230 až 340 g (Čihák, 2004), srdce dospělé myši váží přibližně 0,2 g (Wessels a Sedmera, 2003), morfologicky se však od lidského téměř neliší. Dospělé srdce je tvořeno čtyřmi oddíly, jeho pravá a levá část je kompletně oddělena septy, jak ukazuje schéma na obrázku č.1. Mezišíňové (IAS, interatrial septum) a mezikomorové septum (IVS, interventrikular septum) mají svalovinový charakter. Síňokomorové septum (AVS, atrioventrikular septum), je v lidském srdci patrné jako vazivová membrána mezi pravou síní a odtokovou částí levé komory. U myši je AVS tvořeno svalovinou.

Mezi každou síní a komorou jsou atrioventrikulární cípate chlopně (obrázek č. 2), které



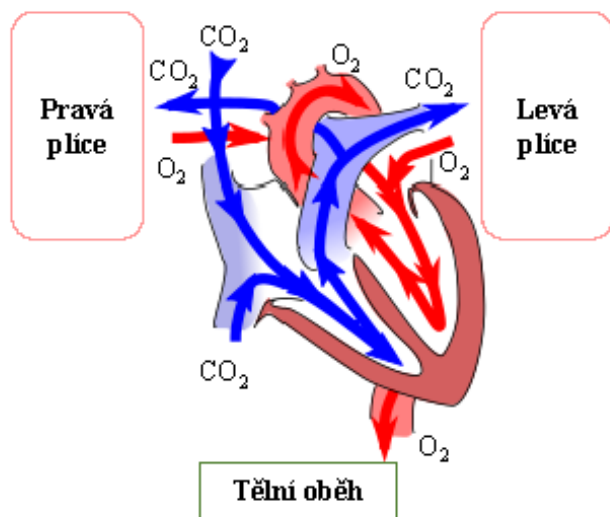
Obrázek č.1: Schematické znázornění srdečních sept. Pravá a levá síň (RA, respektive LA) jsou navzájem odděleny mezišíňovým septem (IAS), podobně jsou pravá a levá komora (RV, respektive LV) odděleny mezikomorovým septem (IVS). Mezi RA a LV je krátký úsek atrioventrikulárního septa (AVS). Podle (Čihák, 2004)

při stahu (tzv. systole) komor brání návratu krve do síní. Cípy chlopní drží ve správné poloze papilární svaly, které jsou umístěny ve stěně srdečních komor. V lidském srdci jsou tyto struktury výraznější než v myším srdci (Wessels a Sedmera, 2003). Síňe jsou od komor izolovány vazivovým skeletem, který brání přenosu signálu z myokardu síní na myokard komor. Každá komora je rozdělena na vtokovou a výtokovou část. Na hranici výtokových částí obou komor a tepenných kmenů se nachází poloměsíčitě chlopně, které brání návratu krve do srdce při relaxaci (tzv. diastole) komor. Přestože se v ústí žil, přivádějících krev do síní, chlopně nenachází, dochází při stahu síní k návratu jen malého množství krve do žil a to díky částečnému stažení žilních ústí.



Obrázek č.2: Anatomie dospělého srdce. Dospělé srdce je rozděleno na 4 oddíly: pravou a levou síně (RA, respektive LA) a pravou a levou komoru (RV, respektive LV), které jsou odděleny mezikomorovým septem (IVS). Mezi síněmi a komorami se nachází cípaté chlopně, trojcípá na pravé straně a dvojčípá na levé straně. Do RA přivádí krev horní a dolní dutá žíla, z RV krev odchází plicnicí do pravé a levé plicní tepny. Do LA je přiváděna krev z levé a pravé plicní žíly, z LV je krev vypuzována do aorty. Upraveno podle (Čihák, 2004)

Tělní, jinak také zvaný velký, krevní oběh začíná srdeční aortou odstupující z levé komory (LV, left ventricle) a do srdce se krev vrací horní a dolní dutou žílou, a to do pravé síně (RA, right atrium) (obrázek č. 3). Velký krevní oběh rozvádí okysličenou krev do všech orgánů v těle, včetně srdce (Čihák, 2004). Plicní, neboli malý, krevní oběh začíná plicnicí odstupující z pravé komory srdeční (RV, right ventricle). Plicnice se posléze rozdělí na pravou a levou plicní tepnu, které odvádí neokysličenou krev do plic. Okysličenou krev do levé síně (LA, left atrium) přivádí plicní žíly, zpravidla dvě z pravé a dvě z levé plice.

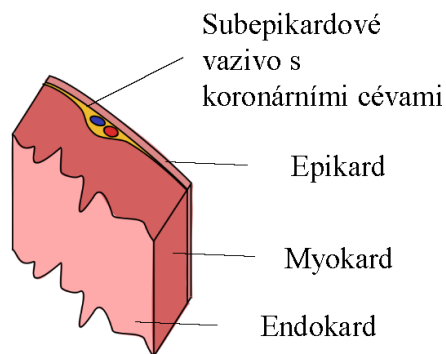


Obrázek č.3: Malý a velký krevní oběh.

Neokysličená krev (modré šipky) je do srdce přiváděna z tělního oběhu dolní a horní dutou žilou do pravé síně a z pravé komory je odváděna do plic. Okysličená krev (červené šipky) je z plic přiváděna do levé síně a z levé komory je aortou rozváděna do tělního oběhu. Podle (Čihák, 2004)

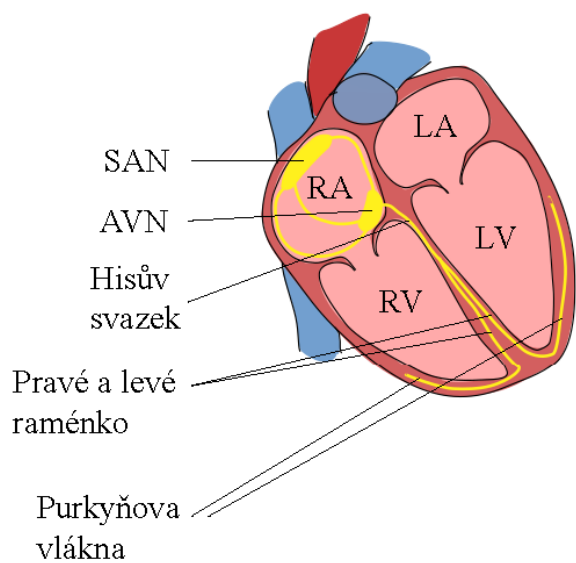
Vrstva myokardu v síních a mezisíňovém septu je výrazně tenčí a obsahuje mezi vlákny více vaziva než svalová vrstva komor a mezikomorového septa. Zároveň je svalovina LV asi třikrát silnější než svalovina RV, což je dáno rozdíly mezi tělním a plicním oběhem, jejichž krevní proudění je poháněno stahem komorové svaloviny. Vnitřní povrch srdce je vystlán tenkou lesklou blánou zvanou endokard, tu tvoří jedna vrstva endotelových buněk podložených vazivem.

Vazivový obal, ve kterém je srdce uloženo, se nazývá perikard, neboli osrdečník, a skládá se ze dvou vrstev: nástěnný list, *lamina parietalis*, a vnitřní list srostlý s povrchem srdce, *lamina visceralis*, neboli epikard (Čihák, 2004). Srdeční stěna má tři vrstvy znázorněné na obrázku č. 4, vnější vrstvu tvoří epikard, pod kterým se nachází tenká vrstva elastického vaziva přecházející v subepikardové vazivo, které pokrývá střední svalovou vrstvu, myokard.



Obrázek č. 4: Schematické znázornění srdeční stěny. Vnější povrch srdce je tvořen epikardem, pod kterým se nachází subepikardové vazivo s koronárními cévami. Prostřední vrstvu tvoří myokard a vnitřní povrch srdce je vystlán endokardem. Podle (Čihák, 2004)

3.1.1. Činnost srdce



Obrázek č. 5: Převodní systém srdeční. Signál pro kontrakci vzniká v sinoatriálním uzlu (SAN), který je umístěn v pravé komoře (RA) při ústí horní duté žíly. Ze SAN je signál veden do atrioventrikulárního uzlu (AVN), který je uložen v mezisíňovém septu na rozhraní síní a komor, odtud je Hisovým svazkem veden do mezikomorového septa, kde se svazek dělí na pravé a levé raménko a dále se větví do Purkyňových vláken. LA, levá síň, RV, pravá komora, LV, levá komora. Podle (Čihák, 2004)

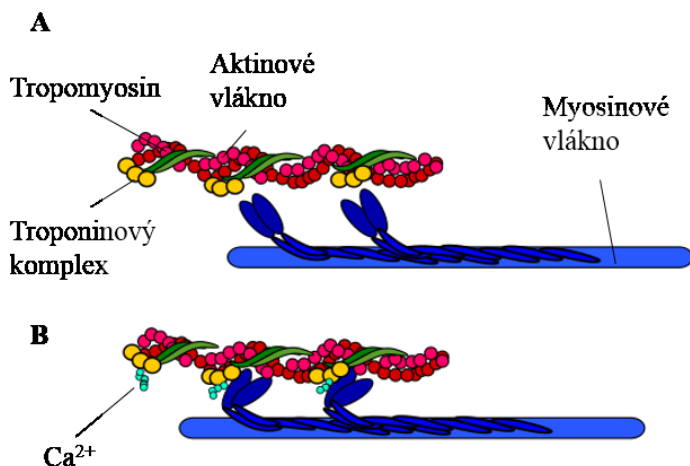
Krev je v cévách poháněna opakovanými stahy srdeční svaloviny. Signál pro kontrakci vzniká v sinoatriálním uzlu (SAN, sinoatrial node), který se nachází v pravé síni u ústí horní duté žíly a je součástí převodního systému srdečního (obrázek č. 5). (Čihák, 2004) Ten má charakter specializovaného myokardu a kromě toho, že v něm signál vzniká, jej také rozvádí myokardem. Ze SAN vedou signál internodální spoje do atrioventrikulárního uzlu (AVN, atrioventricular node), který je uložen v IAS na rozhraní síní a komor. V AVN dochází k atrioventrikulárnímu zpoždění signálu. Za výjimečných okolností může generovat signál místo SAN. Z

AVN je signál do komor veden pouze Hisovým svazkem, který prochází vazivovým skeletem srdce do IVS, kde se ihned po vstupu dělí na pravé a levé raménko. Obě raménka se dále větví na Purkyňova vlákna.

Správný průběh srdeční systoly a diastoly je nutný pro zajištění postupného plnění síní a pak i komor. Během systoly síní dochází k doplnění krve do komor, které se z větší části plní pasivně během diastoly. V první fázi systoly komor dochází k uzavření atrioventrikulárních chlopní a v druhé fázi dojde k vypuzení krve do tepen. Diastola probíhá téměř současně na síních i komorách. Dochází při ní k uzavření poloměsíčitých chlopní a plnění komor krví.

Stah pracovního myokardu je dán stahem jednotlivých kardiomyocytů, který je vyvolán depolarizací cytoplasmatické membrány kardiomyocytů, sarkolemy, a spotřebovává

energii ve formě ATP (adenosin trifosfát) (Trojan *et al.*, 2003, Walker a Spinale, 1999). Po



Obrázek č. 6: Stah kontraktálního aparátu.

V sarkomerách kardiomyocytů je kontraktální aparát tvořen aktinovými vlákny, na která je připojen tropomyosin s troponinovým komplexem, a myosinovými vlákny, jejichž kulovité hlavice ční do prostoru. V relaxovaném stavu (A) jsou aktinová vazebná místa pro myosinové hlavice kryta tropomyosinovým komplexem. Po depolarizaci sarkolemy dojde k vylití Ca^{2+} do cytoplasmy a jeho vazbě s troponinovým komplexem (B), které vede k odkrytí vazebných míst pro myosinové hlavice. Ty se po vazbě na aktin za spotřeby ATP ohnou a tím dojde ke zkrácení sarkomery a tedy stahu. Podle (Trojan *et al.*, 2003)

depolarizaci jsou aktivovány napětově řízené vápníkové (Ca^{2+}) kanály, takže do buňky proudí vápenaté ionty (Ca^{2+}), které zprostředkovávají spřažení excitace s kontrakcí. Malé množství Ca^{2+} iontů, které se dostává do buňky kanály v sarkolemě, aktivuje ryanodinové receptory v sarkoplasmatickém retikulu (SR), čímž dojde k otevření Ca^{2+} kanálů v SR a zvýšení koncentrace vápníku v cytosolu přibližně 100x. Ca^{2+} ionty interagují s kontraktálním aparátem a vyvolají kontrakci.

Kontraktální aparát (obrázek č. 6) je tvořen aktinovými filamenty složenými

ze dvou řetězců aktinových monomerů, které jsou okolo sebe navzájem obtočeny (Trojan *et al.*, 2003). V pravidelných rozstupech jsou na aktinová filamenta připojeny molekuly troponinu spojené s tropomyosinovými molekulami uloženými v rýze mezi aktinovými řetězci. Molekuly myosinu mají tvar vlákna s kulovitým rozšířením na jednom konci. Vlákňité části jsou seřazeny ve svazcích tvořících myosinové vlákno, ze kterého do všech stran vyčnívají kulovitá zakončení v rozstupech odpovídajících molekulám troponinu připojených na aktinová vlákna. V klidovém stavu zabraňuje tropomyosinový komplex vazbě myosinu s aktinem. Po zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů dojde k jejich vazbě na troponin a změně konformace tropomyosinového komplexu, čímž dojde k odkrytí vazebných míst pro myosin. Vazbou myosinové globulární části na aktin dojde k aktivaci její ATP-ázové aktivity a jejímu

ohnutí, což způsobí posun aktinových vláken a tedy kontrakci. Uvolnění stahu je závislé na aktivním odčerpání Ca^{2+} iontů z buňky ATP-dependentní Ca^{2+} pumpou ATP2A2 (ATPase, Ca^{2+} transporting, cardiac muscle, slow twitch 2) lokalizovanou v membráně SR. Z uvedeného vyplývá, že energii spotřebovává stah i uvolnění kardiomyocytu. Protože je stah vyvolán depolarizací sarkolemy, u větších buněk by docházelo postupným uvolňováním Ca^{2+} ze SR ke zpoždění kontrakce myofibril umístěných ve středu buňky (Junqueira *et al.*, 1997). Jednotnou kontrakci zajišťuje systém příčných (T) tubulů, což jsou invaginace sarkolemy zasahující hluboko do cytoplasmy kardiomyocytu (sarkoplasmy) spojené zpravidla s jedním SR. Tok iontů mezi jednotlivými buňkami je zajišťován kanály, které se nachází v interkalárních discích, tj. ve spojovacích komplexech mezi jednotlivými kardiomyocyty. Existence interkalárních disků umožňuje řetězcům buněk chovat se jako syncytium a kontrakční signál probíhá ve vlnách od buňky k buňce.

3.1.2. Procesy vedoucí ke kardiomyopatii

Kardiomyopatie jsou onemocnění srdce, která mohou mít různou příčinu a často vedou k hypertrofii srdečního svalu a změnám vlastností myokardu. Negativní vliv na funkci srdce má mnoho vzájemně provázaných procesů, které v konečném důsledku vedou k srdečnímu selhání. Patří sem změny v metabolismu, organizaci sarkomer, změny v toku Ca^{2+} , zánět, řídnutí kapilární sítě, buněčná smrt a fibróza (Shimizu a Minamino, 2016).

3.1.2.1. *Metabolismus*

Srdce je orgán s vysokou spotřebou energie, jejímž zdrojem jsou látky z krevního oběhu. Dospělé srdce využívá jako zdroj energie z 95 % mastné kyseliny (FA, fatty acids) (Ashrafian *et al.*, 2007). Obecně často dochází v selhávajícím srdci ke sníženému využívání FA a navýšenému využití glukózy, což vede k nižší efektivitě produkce ATP (Doenst *et al.*, 2013). Studie metabolismu v selhávajícím srdci potkanů po infarktu ukazuje sníženou expresi genů pro proteiny účastníci se oxidativního metabolismu a naopak navýšenou expresi glukózového transportéru SLC2A1 (solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1) na úrovni mRNA i proteinu (Rosenblatt-Velin *et al.*, 2001). V srdcích potkanů s experimentálním zúžením aorty vyvolávající tlakové přetížení, bylo detekováno snížení oxidativního metabolismu ještě před manifestací srdeční dysfunkce (Doenst *et al.*, 2010). V této studii nebylo změněno využití glukózy a oxidativní kapacita mitochondrií zůstala

nezměněna do doby, kdy byla detekována zhoršená funkce srdce, což naznačuje, že se rozvoje kardiomyopatie účastní také mechanismy transportu FA do buněk (van der Vusse *et al.*, 2000). Pro transport dlouhých FA do kardiomyocytů je důležitá přítomnost membránových proteinů, mezi ně patří translokáza mastných kyselin CD36 (CD36 molecule), membránový vazebný protein pro mastné kyseliny (FABPpm, plasmalemmal fatty acid binding protein), transportní protein pro mastné kyseliny (FATP, fatty acid transport protein) 1 a FATP6, specifický pro srdce (Koonen *et al.*, 2005). CD36 je pravděpodobně nejlépe prostudovaným proteinem z této skupiny. Translokace CD36 do sarkolemy, místa jeho funkce, je regulována inzulinem, AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) a kontrakcí kardiomyocytů (Samovski *et al.*, 2012). Experimenty s kardiomyocyty izolovanými z potkanů kmene Zucker ukázaly, že u obézních jedinců je CD36 trvale translokován do membrány ve vyšší míře než u štíhlých, což zvyšuje množství dlouhých FA transportovaných do buněk (Coort *et al.*, 2004). Zatímco v kardiomyocytech izolovaných ze štíhlých jedinců docházelo působením inzulinu k translokaci CD36 do membrány, kardiomyocyty z obézních jedinců byly v tomto ohledu vůči působení inzulinu odolné, což naznačuje možnou roli CD36 v inzulinové rezistenci. U dospělých myši s experimentálním zúžením aorty způsobujícím tlakové přetížení vedoucí k hypertrofii srdce, měla delece CD36 v kardiomyocytech za následek rychlejší rozvoj srdečního selhání (Sung *et al.*, 2017). Výsledky těchto studií naznačují, že ačkoli je srdce velmi flexibilní, pokud jde o využití energetického substrátu, mají tyto změny negativní vliv na jeho funkci.

3.1.2.2. ***Zánětlivé procesy***

Zánětlivé reakce lze rozdělit na akutní a chronické. Akutní zánětlivá reakce je odpovědí na poškození tkáně, jakým je například infarkt myokardu (Ertl a Frantz, 2005). Do poškozené tkáně vcestují imunitní buňky, odstraní ji a nahradí vazivovou jizvou. Důležitou roli v regulaci hojení tkáně mají makrofágy, které se zjednodušeně dělí na subtypy M1 a M2 (Pinto *et al.*, 2014, Hulsmans *et al.*, 2016). Makrofágy M1 mají prozánětlivé vlastnosti, produkují prozánětlivé cytokiny (např. TNF- α (tumor necrosis factor- α), CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2), IL (interleukin)-1 β a IL-6) a fibrolytické proteázy (např. MMP (matrix metalloproteinase)-1, -2, -7, -9 a -12), účastní se odstraňování poškozené tkáně. Naproti tomu makrofágy M2 mají protizánětlivé vlastnosti a produkují protizánětlivé faktory (např. IL-10, IGF-1 (insulin-like growth factor 1)). Na procesu hojení tkáně se podílí také produkcí

profibrotických a angiogenních faktorů (např. transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β , transforming growth factor, beta) a vaskulárního endotelového růstového faktoru A (VEGFA, vascular endothelial growth factor A)).

Chronický zánět může být způsoben dlouhotrvajícím podnětem, například obezitou (Hotamisligil, 2006). Cytokiny způsobující remodelaci myokardu mohou být produkovány přímo v srdci v kardiomyocytech, endotelových buňkách, fibroblastech, makrofázích a infiltrovaných imunitních buňkách, ale mohou pocházet i z jiných zdrojů, například z tukové tkáně, gastrointestinálního systému a lymfatických tkání (Van Linthout a Tschope, 2017). Studium vlivu zánětu na srdeční selhání komplikuje fakt, že selhávající srdce samo produkuje prozánětlivé faktory a oba procesy se tudíž navzájem potencují.

V souvislosti se srdečním selháním je často studován TNF- α , prozánětlivý cytokin vyskytující se především v solubilní formě, která se váže na jeden ze dvou receptorů TNFR (tumor necrosis factor receptor) 1 nebo TNFR2 (Feldman *et al.*, 2000). V solubilní formě jsou receptory schopny vázat TNF- α a inhibovat jeho aktivitu. Studie funkce myokardu a izolovaných kardiomyocytů ukázala, že TNF- α má negativní vliv na kontraktilitu (Yokoyama *et al.*, 1993, Eichenholz *et al.*, 1992), přispívá k remodelaci tkáně indukcí exprese metaloproteáz a jejich inhibitorů (Li *et al.*, 1999) a snižuje expresi ATP2A2, hlavního regulátoru toku Ca²⁺ (Tsai *et al.*, 2015). Potkani, kterým byl podáván TNF- α , měli zhoršenou kontraktilitu myokardu, která byla částečně reverzibilní poté, co bylo podávání TNF- α ukončeno (Bozkurt *et al.*, 1998). Robustní podmíněná exprese *Tnf* řízená promotorem genu pro těžký myosinový řetězec alfa (*Myh6*) je v případě myšího modelu po odstavu letální v důsledku srdečního selhání způsobeného vážným zánětem myokardu (Kubota *et al.*, 1997a). Snižování exprese TNF- α u stejného modelu vedlo k dilatované kardiomyopatii, která měla stejné znaky jako dilatovaná kardiomyopatie u člověka (Kubota *et al.*, 1997b). U pacientů s dilatovanou kardiomyopatií a u pacientů se selhávajícím srdcem bylo detekováno navýšení TNF- α v myokardu (Torre-Amione *et al.*, 1996). Tyto výsledky ukazují význam TNF- α při rozvoji kardiomyopatie a srdečního selhání.

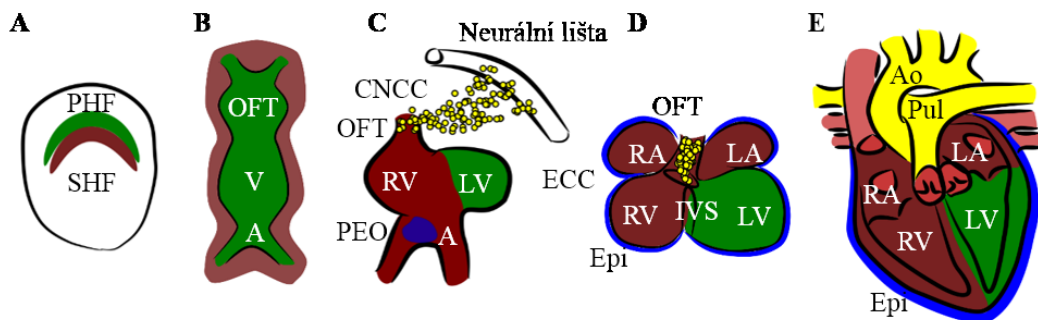
3.2. Vývoj srdce

Srdce se vyvíjí jako první funkční orgán v těle a u všech obratlovců se vyvíjí podobným způsobem, liší se zejména časovým rozložením jednotlivých dějů. Vzhledem

k tomu, že je tato práce zaměřena na myší model, budou uváděny časové údaje platné pro myší vývoj. Nejvíce poznatků bylo získáno výzkumem kuřecího a myšího modelu. V případě kuřecího modelu se embryo vyvíjí mimo tělo matky a je tedy možné vývoj přímo sledovat. Výhodou myšího modelu je velké množství geneticky modifikovaných zvířat, což umožňuje studium funkce jednotlivých genů v srdci.

Prekurzory všech srdečních buněk jsou specifikovány již ve stádiu gastruly, nachází se v mezodermu a záhy, po prvotní specifikaci, dojde k jejich rozdělení na dvě srdeční pole: primární a sekundární (PHF, respektive SHF, primary heart field, respektive secondary heart field) (Devine *et al.*, 2014) (Obrázek č.7A). PHF a SHF jsou u myši specifikovány v embryonálním dni 7,5 (E7,5) a liší se jak expresním profilem, tak svým osudem. Buňky PHF vytvoří v E8 srdeční trubici (Obrázek č.7B), do níž pak migrují buňky ze SHF (Mjaatvedt *et al.*, 2001), a to tak, že pak v srdci tvoří síně, RV, dorsální část LV a odtokovou část komor (OFT, outflow tract).

Srdeční trubice se nepravidelným růstem stáčí a v E8,5 vytváří srdeční kličku.



Obrázek č.7: Vývoj srdce. Prekurzory kardiomyocytů (A) tvoří primární (PHF) a sekundární (SHF) srdeční pole. PHF splývá a tvoří srdeční trubici (B), která je již rozlišena na budoucí odtokovou část komor (OFT) v anteriorní části, budoucí komory (V) ve střední části a budoucí síně (A) v posteriorní části. Do srdeční trubice později migrují buňky ze SHF (C), zejména do OFT, pravé komory (RV) a budoucích síní (A), tedy do její posteriorní a anteriorní části. Během ohýbání srdeční trubice (C, D) jsou vytvořeny síně a komory. Levá komora (LV) je tvořena převážně buňkami pocházejícími z PHF, RV, obě síně (RA a LA) a OFT jsou tvořeny převážně buňkami pocházejícími ze SHF. K vytvoření OFT významně přispívají také buňky pocházející z neurální lišty (CNCC). Epikard (Epi) je tvořen buňkami z proepikardového orgánu (PEO), modře (C). Během septace dochází k růstu svalové části mezikomorového septa (IVS) z báze komor, které se poté spojí s remodelovanou tkání endokardových polštářů (ECC) v atrioventrikulárním kanálu. Remodelací OFT vzniká aorta (Ao) a plicnice (Pul) dospělého srdce (E). Upraveno podle (Santini *et al.*, 2016)

Kaudální část srdeční trubice se posouvá kraniálně, tím se *sinus venosus* dostává na úroveň *truncus arteriosus* (Obrázek č.7C,D). Balonovitým růstem srdeční kličky se formují srdeční síně a komory, které se oddělují procesem septace. Mezikomorové septum vzniká růstem svalové části na rozhraní pravé a levé komory, která se v atrioventrikulárním kanálu spojuje s remodelovanými mezenchymovými endokardovými poštáři (ECC, endokardial cushions). Podobně vzniká i mezisíňové septum, svalová část je navíc kryta mezenchymovou čepičkou. Ve stejné době dochází k tvorbě velkých cév, při které hraje roli septace *truncus arteriosus* remodelací endokardových polštářů. Z ECC vznikají také chlopně. Proces septace je dokončen v E14,5, poté dochází k maturaci tkání (Obrázek č.7E).

Kromě PHF a SHF je zdrojem srdečních prekursorových buněk také proepikardiální orgán (PEO, proepicardial organ), který se vyvíjí okolo E9,5 z mezenchymu (Obrázek č.7C). Buňky z PEO migrují na povrch srdeční trubice a vytváří epikard a z něj pak procesem epitelo-mezenchymové tranzice (EMT) vycestovávají buňky do subepikardiálního prostoru, kde tvoří základ koronárních cév. Epikard je důležitý pro vývoj myokardu, pokusy na myších ukázaly, že po odstranění epikardu dochází ke ztenčení myokardu. To je dáno nejen tím, že buňky epikardu vycestovávají také do kompaktní vrstvy myokardu (Zhou *et al.*, 2008), ale především tím, že z epikardu vychází signály pro proliferaci (Chen *et al.*, 2002).

Dalším zdrojem prekursorových buněk srdce je neurální lišta, tzv. buňky srdeční neurální lišty (CNCC, cardiac neural crest cells) migrují do oblasti odtokové části komor a přispívají ke správnému utvoření velkých cév (Miyagawa-Tomita *et al.*, 1991).

Vývoj srdce je tedy proces, při kterém hraje významnou roli správné načasování signálů pro migraci a proliferaci jednotlivých skupin prekursorových buněk.

3.2.1. Geny účastníci se vývoje srdce

Při vývoji srdce se uplatňuje velké množství genů, jejichž změny exprese se mohou navzájem kompenzovat. Nicméně, bylo objeveno několik genů, které jsou pro správný vývoj srdce nepostradatelné. *Mesp1* (*mesoderm posterior 1*) je pravděpodobně první gen, který je exprimován v kardiogenním mezodermu (Saga *et al.*, 1999). Delece *Mesp1* je embryonálně letální do E10,5, pravděpodobně v důsledku kardiovaskulárních defektů. Srdce mutantních embryí vykazuje různý stupeň defektů splynutí srdeční trubice, od kompletní *cardia bifida* po částečnou bifurkaci, a náhodný proces ohýbání srdeční trubice. Jeho pravděpodobnou úlohou je ve spolupráci s *Mesp2* (*mesoderm posterior 2*) tvorba mezodermu během gastrulace a

regulace dalších genů, které se podílejí na vývoji srdce (Saga *et al.*, 2000). Samotný *Mesp2* není pro správný vývoj srdce nezbytný (Saga *et al.*, 1997), ale jeho exprese v kardiogenní oblasti je velmi podobná oblasti, ve které je exprimován *Mesp1* a přetrvává déle u myších embryí s delecí *Mesp1* (Kitajima *et al.*, 2000). Dvojitá delece *Mesp1* i *Mesp2* vede k absenci kardiogenního mezodermu.

Klonální analýza potvrdila, že buňky exprimující *Mesp1* zahrnují prekurzory srdečních buněk a objevují se i v dalších derivátech mezodermu (Devine *et al.*, 2014). Podskupina *Mesp1* buněk exprimuje *Smarcd3* (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3*), který pravděpodobně definuje srdeční prekurzory. Delece genu *Smarcd3* je embryonálně letální, závažnost fenotypu závisí na genetickém pozadí (Sun *et al.*, 2018). Většina embryí se smíšeným genetickým pozadím umírá do E14,5, v případě embryí s inbredním genetickým pozadím C57Bl/6 je fenotyp konzistentnější a embrya nepřežívají E13,5. Jejich srdce mají ztenčenou stěnu komor, v důsledku snížené proliferace kardiomyocytů, a špatně vyvinuté mezikomorové septum (IVS). Exprese *Smarcd3* předchází expresi kardiogenních markerů jako jsou např. *Mef2c* (*myocyte enhancer factor 2C*), *Tbx5* (*T-box 5*) a *Isl1* (*ISL1 transcription factor*) a je možné, že jejich expresi indukuje.

Některé geny jsou v kardiogenní oblasti exprimovány v PHF i SHF a později uniformně v celém myokardu. Patří sem např. geny pro transkripční faktory *Nkx2-5* (*NK2 homeobox 5*) (Lints *et al.*, 1993, Moses *et al.*, 2001) a *Gata4* (*GATA binding protein 4*) (Heikinheimo *et al.*, 1994). Delece každého z těchto genů je embryonálně letální. V případě delece *Nkx2-5* dojde k vytvoření lineární srdeční trubice, ale ne k jejímu ohnutí, embrya umírají mezi E9 a E10 (Lyons *et al.*, 1995). Delece *Gata4* způsobuje defekt ohýbání celého embrya, takže nemůže být uzavřeno do žloutkového váčku (Kuo *et al.*, 1997). U části mutantních embryí se vytváří dvě srdeční trubice, pokud se vytvoří jedna trubice, nedochází k jejímu ohnutí a embrya umírají v E10,5. Jak ukázaly analýzy mutantních embryí, oba geny zodpovídají spíše za správnou migraci kardiogenních prekurzorů než za specifikaci kardiomyocytů.

Jedním z genů exprimovaných v PHF a tedy ovlivňujícím především vývoj LV, je *Tbx5* (Bruneau *et al.*, 1999), jehož mutace vede u člověka k Holt-Oramovu syndromu, který je spojen mimo jiné s kardiovaskulárními defekty (Al-Qattan a Abou Al-Shaar, 2015). Tímto

syndromem trpí také myši heterozygotní pro delecii *Tbx5* (Bruneau *et al.*, 2001). Jeho kompletní delecce je embryonálně letální v důsledku zastavení vývoje srdce ve fázi lineární trubice. TBX5 interaguje s mnoha geny a tak je důležitý i pro další procesy.

Mezi geny, které jsou exprimovány v tkáních odvozených ze SHF, tedy především RV a OFT, patří *Isl1* a *Mef2c* (Engleka *et al.*, 2012, Dodou *et al.*, 2004). Delecce obou je letální do E10,5 v důsledku defektního vývoje srdce (Lin *et al.*, 1998, Cai *et al.*, 2003). Stejně jako u embryí s delecí *Tbx5*, i u těchto mutantů nedochází k ohýbání srdeční trubice. *Isl1* a *Mef2c* hrají roli při migraci kardiogenních buněk.

3.2.1.1. **Signalizace TGF- β**

Rodina genů *Tgfb* (transforming growth factor, beta) kóduje signalizační cytokiny ovlivňující mnoho signálních drah (Massague, 2000).

mRNA genu *Tgfb1* je u myši exprimována již v kardiogenním mezodermu v E7, po vytvoření srdeční trubice se v E8 jeho exprese v srdci omezuje na oblast endokardu a od E9,5 je již pouze v endokardu překrývajícím ECC v atrioventrikulárním kanálu a OFT (Akhurst *et al.*, 1990). Kromě toho byla mRNA *Tgfb1* detekována také v endotelu velkých cév a roztroušeně v epikardu, zejména v oblasti *sulcus atrioventricularis* (Molin *et al.*, 2003). Delecce genu *Tgfb1* nemá za následek vývojové defekty, nicméně homozygotní mutantní myši umírají přibližně tři týdny po narození v důsledku multifokálního zánětu (Shull *et al.*, 1992).

mRNA *Tgfb2* je také exprimována již v kardiogenních prekurzorech (Dickson *et al.*, 1993). V lineární srdeční trubici je *Tgfb2* exprimován zejména v kaudální části, rostrálním směrem jeho exprese ubývá. Během E8,5 – E9,5 byl detekován v myokardu a endokardu atrioventrikulárního kanálu a OFT, zatímco exprese v síních a komorách je nízká. Později je exprimován především v mezenchymu ECC a dále ve strukturách z nich odvozených. Také je silně exprimován v proepikardiálním orgánu a později v epikardu, kde jeho exprese od E12,5 postupně klesá (Molin *et al.*, 2003). Kromě toho je exprimován v převodním systému srdečním. Delecce *Tgfb2* je u myši perinatálně letální a projevuje se mnohočetnými vývojovými defekty, mimo jiné defekty IVS a remodelace velkých cév (Sanford *et al.*, 1997)

Tgfb3 je v srdci významněji exprimován až od E11,5 a to v hladkých svalových buňkách velkých cév a v epikardu (Molin *et al.*, 2003). V E12,5 se ve stěně velkých cév objevuje také ve fibroblastech, v epikardu se omezuje na *sulcus atrioventricularis* a od E12,5

je exprimován také v ECC atrioventrikulárního kanálu a OFT. Tento expresní vzorec přetrvává do E15,5, kdy je *Tgfb3* exprimován v chlopních a vazivovém skeletu srdce. Myši s delecí *Tgfb3* umírají krátce po narození, mají rozštěp patra a defektně vyvinuté plíce, ale normálně vyvinuté srdce (Kartinen *et al.*, 1995).

Z toho, že jsou geny *Tgfb* exprimovány zejména ve strukturách, které prochází EMT, lze předpokládat, že se jí také účastní. Pokusy s explantovanými kuřecími proepikardiálními orgány ukázaly, že jak *Tgfb1*, tak *Tgfb2* indukují EMT (Olivey *et al.*, 2006). To potvrzuje i fenotyp delece *Tgfb2*, který v srdci ovlivňuje struktury vznikající procesem EMT (Sanford *et al.*, 1997).

Přenos signálu TGF- β zprostředkovávají receptory se serin/threonin a tyrosin kinázovou funkcí, které po vazbě některého z ligandů TGF- β tvoří heterotetramerní komplexy dvou receptorů typu I a dvou receptorů typu II (Heldin a Moustakas, 2016, Nickel *et al.*, 2018). Klíčovým receptorem, který váže ligandy z rodiny TGF- β , je TGFBR1 (transforming growth factor, beta receptor I), a jeho správná funkce je nezbytná pro správný vývoj kardiovaskulárního systému (Larsson *et al.*, 2001). Systémová delece genu *Tgfb1* v myším modelu je letální do E11,5 a to v důsledku defektní vaskularizace žloutkového váčku. Studie jiného myšího modelu, u kterého byla použita tkáňově podmíněná delece *Tgfb1* v jednotlivých vrstvách srdeční stěny (epikardu, myokardu a endokardu), ukázala důležitost *Tgfb1* pro indukci EMT v buňkách epikardu a endokardu (Sridurongrit *et al.*, 2008). TGFBR1 je nezbytný také pro správné mezibuněčné interakce epikardových buněk s myokardovými buňkami, jak ukazuje fenotyp delece *Tgfb1* v epikardu, která v myším modelu vede ke ztenčení myokardu a jeho defektní vaskularizaci. Studie endotelových buněk izolovaných z myších embryí s delecí *Tgfb1* ukázala, že tyto buňky nejsou v *in vitro* podmínkách schopny měnit svou migraci v odpověď na signalizaci TGF- β (Larsson *et al.*, 2001). Tkáňově podmíněná delece *Tgfb1* v buňkách neurální lišty myších embryí měla za následek defekty OFT, způsobené zvýšenou apoptózou (Wang *et al.*, 2006).

V dospělém srdci je signalizace TGF- β spojena s remodelací tkáně, zejména s akumulací kolagenu, tedy fibrózou (Dobaczewski *et al.*, 2011). V signalizační dráze TGF β se patrně uplatňují také katepsiny (Flanagan-Steet *et al.*, 2018). Pokusy s myším modelem ukázaly, že katepsin S (kódovaný genem *Ctss*) se podílí na remodelaci tkáně (Pan *et al.*, 2012) a angiogenezi (Shi *et al.*, 2003). Během embryonálního vývoje srdce je však signalizace TGF-

β důležitá zejména pro správný průběh EMT.

3.2.1.2. *Wt1*

Wt1 (*Wilms tumor 1 homolog*) je tumor supresorový gen, který je ve vývoji srdce nezbytný pro vznik epikardu z PEO, kde je exprimován od E9 (Moore *et al.*, 1999). Buňky z PEO putují na povrch srdce a do E10,5 pokrývají myokard komor a síní. Mezi E11,5 a E12,5 dochází k vycestovávání epikardiálních buněk do subepikardiálního prostoru a dále do myokardu. V E14,5 exprimují WT1 všechny buňky epikardu, individuální pozitivní buňky byly detekovány také v IVS, subepikardiálním prostoru a komorovém myokardu, zejména v endotelových buňkách koronárních cév a endokardu (Rudat a Kispert, 2012). Slabá exprese byla detekována také v kardiomyocytech, což bylo potvrzeno v jiné studii, která ukázala, že buňky z epikardu, které exprimují WT1, mají potenciál pro diferenciaci v plně funkční kardiomyocyty (Zhou *et al.*, 2008). Nicméně, studium osudu buněk pocházejících z epikardu za pomoci Cre-rekombinázy je problematické, protože použité modely nejsou 100% účinné nebo při jejich použití dochází k náhodné rekombinaci (Rudat a Kispert, 2012). Kompletní delece genu *Wt1* je embryonálně letální okolo E13, v důsledku kardiovaskulárních defektů. Mutantní embrya mají srdce se ztenčenou stěnou komor, defektně se vyvíjejícím epikardem, subepikardem a koronárními cévami (Kreidberg *et al.*, 1993, Wagner *et al.*, 2005). Delece *Wt1* v epikardu vede k embryonální letalitě v E16,5 – E18,5 na následky srdečního selhání (Martinez-Estrada *et al.*, 2010). Některá mutantní embrya měla tenčí srdeční stěnu pravé komory s perikardiální krvácením a nebyly u nich vytvořeny koronární cévy. WT1 je klíčový pro vytvoření epikardu a koronárních cév, je otázkou, zda-li je ztenčení myokardu u mutantních embryí následkem nedostatečné vaskularizace nebo tím, že je epikard zdrojem signalizace pro proliferaci kardiomyocytů.

3.2.1.3. *Adam10*

Aktivita proteinů, které jsou součástí rodiny metaloproteáz známých pod anglickým názvem „a disintegrin and metalloprotease“ (ADAM) závisí na přítomnosti zinečnatých kationtů (Zn^{2+}) sloužících jako kofaktory (Blobel, 2005). Pravděpodobně nejlépe prozkoumanou funkcí proteinů z této rodiny je proteolytické odštěpení extracelulárních domén transmembránových proteinů. Odštěpené domény pak působí jako solubilní ligand a mohou aktivovat jiné receptory a tím ovlivňovat buňky na větší vzdálenost. Štěpeny mohou

být i samotné receptory a to jak s aktivačním tak s deaktivčním účinkem. Jedním z nejlépe prostudovaných proteinů této rodiny je ADAM10.

Delece genu *Adam10* je u myši embryonálně letální v E9,5 (Hartmann *et al.*, 2002). Největší defekty měla mutantní embrya v oblasti srdce, jehož vývoj se zastavil ve stádiu linerání srdeční trubice těsně po splynutí. Tkáňově specifická delece v endotelových buňkách má za následek buď embryonální letalitu v E10,5, nebo myši přežívají do dospělosti s orgánově specifickými defekty, v závislosti na tom, došlo-li k deleci v E7,5 nebo okolo E12,5 (Alabi *et al.*, 2016). Embryonálně letální delece *Adam10* v endotelových buňkách se u myši projevuje defekty ohýbání srdeční trubice a krevního průtoku. Histologická analýza embryonálních srdcí ukázala, že v E9,5 nebyl iniciován proces EMT a v E10,5 byly špatně vyvinuté trabekuly. Stejně tak *in vitro* kultivace srdeční tkáně izolované z mutantních embryí ukázala, že ADAM10 je nutný k iniciaci EMT. Ve všech zmíněných studiích bylo ukázáno, že delece genu kódujícího ADAM10 je nutná pro správnou aktivaci signalizace Notch, která je nezbytná pro správný vývoj srdce (Niessen a Karsan, 2008).

3.2.1.4. *Vegfa*

Vaskulární endotelový růstový faktor A je nejvýznamnějším a pravděpodobně nejlépe prostudovaným členem rodiny VEGF, která zahrnuje také placentární růstový faktor (PLGF, placental growth factor), VEGFB, VEGFC a VEGFD (Holmes a Zachary, 2005). Jejich funkci zprostředkovávají tyrosin kinázové receptory. VEGFA se váže k receptorům FLT1 (FMS-like tyrosine kinase 1, jinak nazývaný také VEGFR1) a KDR (kinase insert domain protein receptor, jinak také VEGFR2). Všechny VEGF proteiny jsou schopné regulovat angiogenezi, VEGFA je nezbytný pro embryonální vývoj a uplatňuje se také při patologických procesech.

Pomocí vložení reportérového genu pro β -galaktozidázu za sekvenci *Vegfa* byla prostudována jeho exprese během embryonálního vývoje myši. VEGFA je exprimován již v E4, v primitivním endodermu blastocysty, a až do E7,5 je přítomen pouze v extraembryonálních tkáních (Miquerol *et al.*, 1999). V této době probíhá vaskularizace žloutkového vřetku. Vaskularizace samotného embrya začíná mezi E8 a E9, což je také doba, kdy se objevuje VEGF v embryonálním endodermu. Od E8,5 je silně exprimován v myokardu a části endokardu. V E9 exprimuje VEGF endokard celé srdeční trubice, ale již v E9,5 je jeho exprese v endokardu omezena na oblasti OFT a atrioventrikulárního kanálu. V buňkách ECC, které prošly EMT již exprimován není. Po vytvoření chlopní a ECC přetrvává endokardová

exprese VEGF v OFT a ve výstupu aorty. V E14,5 je VEGF silně exprimován v komorách a slaběji v síních, v kompaktním myokardu i v trabekulech.

Význam VEGF pro vývoj embrya ukazuje delece jediné alely *Vegfa*, která vede k embryonální nekróze, abnormálně vyvinutým cévám a letalitě do E12 (Carmeliet *et al.*, 1996). V homozygotním stavu má delece za následek výraznější defekty stejného typu. Podmíněná delece *Vegfa* řízená *Mlc2v-Cre*, markerem komorových kardiomyocytů, je také embryonálně letální, a to okolo E15,5 avšak s variabilní penetrancí, 60 % mutantních potomků se dožívalo dospělosti (Giordano *et al.*, 2001). Srdce mutantů měla dilatované komory s tenčí stěnou a sníženou kontraktilitou.

Podobně i zvýšení exprese VEGFA vedlo k embryonální letalitě mezi E12,5 a E14,5 v důsledku srdečního selhání (Miquerol *et al.*, 2000). Srdce těchto embryí byla abnormálně velká s tenkou stěnou komor a větším množstvím trabekul narušujících mezikomorové septum.

Přísně regulované dynamické změny v expresi VEGF naznačují, že by mohl regulovat více procesů. Během vývoje myšího srdce je exprese VEGF v myokardu atrioventrikulárního kanálu zvýšena krátce po začátku tvorby ECC, tedy v E10,5, a buňky, které prošly EMT, neexprimují receptory pro VEGF, FLT1 a KDR (Dor *et al.*, 2001). *In vitro* experimenty s explantáty z atrioventrikulárního kanálu ukázaly, že VEGF inhibuje EMT, a toto zjištění bylo potvrzeno také *in vivo*. U přibližně poloviny embryí, kterým bylo indukováno předčasné navýšení exprese VEGF v myokardu o jeden den, tedy v E9,5, nedošlo k osídlení ECC buňkami jak v atrioventrikulárním kanálu, tak v OFT. Velká část indukovaných embryí navíc měla několikvrstevný endokard, pravděpodobně v důsledku toho, že si endokardové buňky ponechaly vlastnosti epitelu.

3.2.1.5. ***Kdr***

Delece KDR je embryonálně letální, a to do E10,5 (Shalaby *et al.*, 1995). V E9,5 byla mutantní embrya menší, ale ne vývojově opožděná, měla rozšířenou perikardovou dutinu a zcela jim chyběla organizovaná vaskulární síť, což je možná příčina nekrózy, která byla detekována pomocí histologie. V E7,5 je KDR exprimován v mezenchymových shlucích představujících základy krevních ostrůvků, ty ale chybí u embryí homozygotních pro deleci KDR. *In vitro* pokusy s myšími embryonálními kmenovými buňkami ukázaly, že z buněk exprimujících KDR mohou vznikat nejen endotelové buňky, ale také kardiomyocyty a buňky

hladké svaloviny cév (Kattman *et al.*, 2006).

3.2.1.6. ***Flt1***

Hlavní funkcí FLT1 je pravděpodobně negativní regulace KDR, protože se silně váže k VEGFA, ale jeho kinázová aktivita je slabá (Koch a Claesson-Welsh, 2012). Během embryonálního vývoje myši byla mRNA *Flt1* detekována v období organogeneze (E9,5 – E12,5), v období růstu (E14,5 – E16,5) dochází k poklesu jeho exprese, po narození je jeho exprese opět silná (Peters *et al.*, 1993). Jeho delece má za následek embryonální letalitu do E11,5, ale již v E9 vykazují mutantní embrya opožděný vývoj (Fong *et al.*, 1995). Diferenciace endotelových buněk nebyla delecí *Flt1* narušena, ale místo normálních cév se jak v extra-, tak v intraembryonálních strukturách, vyvíjely velké cévy s vloženými shluky endotelových buněk. Navíc nebyly detekovány žádné defekty vaskularizace u myší, které exprimovaly FLT1 s delecí kinázové domény (Hiratsuka *et al.*, 1998). Pravděpodobný účinek FLT1 na angiogenezi nejspíše spočívá v jeho inhibici signalizace VEGFA přes KDR (Kappas *et al.*, 2008). *In vitro* pokusy s cévami odvozenými od embryonálních kmenových buněk potvrdily výsledky *in vivo* analýz, tedy že delece *Flt1* má za následek zvýšenou proliferaci endotelových buněk a snižuje jejich schopnost organizace do cévní sítě. mRNA *Flt1* existuje ve dvou sestřihových variantách, které se překládají do solubilní (sFLT1) a membránové (mFLT1) formy receptoru (Shibuya, 2006). Indukce sFLT1 i mFLT1 částečně obnovuje normální fenotyp, pokud jde o proliferaci endotelových buněk (Kappas *et al.*, 2008). Větvení cévní sítě ale bylo lépe obnoveno po indukci sFLT1. Uvedené výsledky naznačují, že by FLT1 mohl plnit funkci inhibitoru signalizace VEGFA a tím ji modulovat pro zajištění správného vývoje cév.

3.2.1.7. ***Efnb2***

Ephrin B2 (kódovaný genem *Efnb2*) je transmembránový ligand vážící tyrosin kinázové receptory (Pasquale, 2008). V myších embryích je již od E8,25 silně exprimován v zadním mozku a somitech, slabší exprese byla detekována také v srdci a v aortě (Wang *et al.*, 1998). Jeho delece má za následek embryonální letalitu okolo E11. Ve žlutkových váčcích *wt* (*divoký typ*, z anglického *wild type*) embryí se v E8,5 formuje primární pletenec vlásečnic a od začátku vykazuje bilaterální rozdělení na část tepennou, která exprimuje *Efnb2* a část žilní, která exprimuje jeho receptor *Ephb4* (*Eph receptor B4*). Delece *Efnb2* má

za následek defekty vaskularizace žloutkového váčku, v tepenné i v žilní části cévního systému, a v oblasti hlavy. Také byl detekován špatný vývoj trabekul v srdečních komorách. Delece *Efnb2* specifická pro endotelové a endokardové buňky se projevuje stejnými defekty jako globální delece (Gerety a Anderson, 2002), což naznačuje, že je jeho exprese nutná především v těchto buňkách. Správná funkce EFNB2 je nezbytná pro aktivaci membránových receptorů odpovídajících na VEGF (Wang *et al.*, 2010, Sawamiphak *et al.*, 2010).

3.2.1.8. ***Itgav***

Integrin α V kódovaný genem *Itgav* patří do rodiny integrinů, které slouží jako receptory pro buněčnou adhezi (Barczyk *et al.*, 2010). Myší embrya s delecí *Itgav* se vyvíjejí normálně až do E9,5 (Bader *et al.*, 1998). V pozdějších stádiích jsou mutantní embrya růstově opožděná a část z nich má otok perikardu. V E11,5 mělo 80 % mutantních embryí vážné defekty vaskularizace nebo již byly absorbované. Zbývajících 20 % se narodilo s vážným krvácením do mozku a umíralo perinatálně. Myokard mutantních embryí byl ztenčený a trabekuly tvořily méně komplexní strukturu. Další studie ukázaly, že delece *Itgav* vede k porušené komunikaci endotelových buněk s okolními buňkami, což je pravděpodobně příčinou snížené integrity cév (McCarty *et al.*, 2002). *Itgav* tedy pravděpodobně není nezbytný pro vývoj cév, ale pro jejich správnou funkci ve vztahu k okolním tkáním.

3.2.1.9. ***Baz1b***

Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B (Baz1b) kóduje transkripční faktor Williamsova syndromu (WSTF, Williams syndrome transcription factor), který je součástí tří chromatin-remodelujících komplexů: WINAC, B-WICH a WICH (Barnett a Krebs, 2011). WSTF má dvojí úlohu: remodelaci chromatinu a kovalentní vazbu k histonům. Je jedním z genů, které se nachází v oblasti, jejíž delece v heterozygotním stavu je dávana do souvislosti s Williamsovým syndromem (Lu *et al.*, 1998). Pacienti s touto poruchou mají typické rysy v obličeji, které bývají označovány za elfí, výrazně sníženou inteligenci a přestože jsou typicky hypersociální a povídaví, velká část z nich splňuje diagnostická kritéria pro úzkostnou poruchu (Collins, 2013). Nejčastější příčinou smrti těchto pacientů jsou kardiovaskulární defekty. Strukturní abnormality kardiovaskulárního systému se vyskytují přibližně u 80 % pacientů s Williamsovým syndromem. Nejčastěji jde o zúžení aorty v oblasti nad chlopněmi a plicní tepny, vzácněji se zúžení tepen vyskytuje jinde, např. na koronárních tepnách či

v sestupné části hrudní aorty. U části pacientů se vyskytují i defekty mezikomorového septa, zejména v jeho svalové části, a defekty chlopní.

Snížená exprese *Baz1b* v prekurzorech neuronů měla na změny v transkripci podobný efekt jaký byl pozorován v buňkách izolovaných od pacientů s Williamsovým syndromem (Lalli *et al.*, 2016). Hlavní změnou byla deregulace signalizace Wnt, která hraje velmi důležitou roli při vývoji srdce (Marvin *et al.*, 2001). Pokusy s žabími embryi prokázaly, že je *Baz1b* důležitý pro migraci a přežití buněk z neurální lišty (Delorme *et al.*, 2016), která je zdrojem buněk důležitých pro správné dokončení vývoje srdce (Jiang *et al.*, 2000). Skupina studující vliv delece *Baz1b* na embryonální vývoj myši, včetně defektů srdce, své články stáhla, nicméně i přes chybějící validní data se lze domnívat, že *Baz1b* má vliv na vývoj velkých cév.

3.2.1.10. ***Cxadr***

Coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) je transmembránový protein, který zprostředkovává infekci coxsackie virů skupiny B (Bergelson *et al.*, 1997, Tomko *et al.*, 1997). Během embryonálního vývoje myši je silně exprimován ve vyvíjející se centrální nervové soustavě, v periferních nervech, srdci a endotelových buňkách různých orgánů (Tomko *et al.*, 2000, Dorner *et al.*, 2005). V endotelových buňkách byl detekován i v dospělosti. Experimenty se srdcem potkana ukázaly, že jeho exprese po narození klesá (Kashimura *et al.*, 2004). Zatímco u novorozenců byl lokalizován na celém povrchu kardiomyocytů, s postupující polarizací kardiomyocytů zůstával CXADR lokalizován na pólech buněk, kde byly buněčné spoje. V dospělém srdci byl tedy lokalizován především v místě interkalárních disků, kde byl koexprimován s konexinem 43 (CX43, connexin 43). Což je v souladu s jinou studií ukazující lokalizaci CXADR v oblasti těsných buněčných spojů (Cohen *et al.*, 2001). Delece *Cxadr* má u myši za následek embryonální letalitu mezi E11,5 a E13,5 (Dorner *et al.*, 2005). Mutantní embrya měla otok perikardu, menší lumen komor, zvětšené endokardové polštáře a dilatované velké cévy, avšak změny v počtu proliferujících nebo apoptotických buněk nebyly detekovány. Myofibrily v kardiomyocytech však byly špatně organizovány, svazky byly menší a kratší než v kardiomyocytech *wt* embryí. Také morfologie mitochondrií byla změněna, v kardiomyocytech mutantních embryí byly mitochondrie velké prstencovité. Myofibrily kardiomyocytů se upínají do mezibuněčných spojů (Atherton a Behnke, 1988), je tedy možné, že *Cxadr* je nezbytný pro správnou tvorbu

spojů a tím pádem organizaci myofibril, což má zásadní vliv na funkci kardiomyocytů a tím i celého srdce.

3.2.1.11. *Pdgfra*

Platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFR α), kódovaný genem *Pdgfra*, je jednou ze dvou receptorových podjednotek (PDGFR α a PDGFR β), které v reakci na vazbu ligandu tvoří homo- nebo heterodimery a procesem autofosforylace tyrosinových zbytků slouží pro vazbu adaptorových proteinů, které pak iniciují přenos signálu (Hoch a Soriano, 2003, Andrae *et al.*, 2008). Ligandy, které se váží na extracelulární doménu transmembránového receptoru, jsou čtyři: PDGF-A, -B, -C a -D. Signalizace PDGF má vliv na proliferaci, migraci a přežití buněk. PDGFR α je nezbytný pro embryonální vývoj, jeho delece je embryonálně letální ve dvou fázích (Bax *et al.*, 2010). Přibližně 60 % embryí umírá v E8,5, zbývající embrya přežívají do E16,5. Možnou příčinu úmrtí v první vlně představuje defekt tvorby srdeční trubice (Bloomekatz *et al.*, 2017). Použití reportérového zeleného fluorescenčního proteinu ukázalo, že je PDGFR α exprimován v E9,5 v PEO a žilním pólu *sinus venosus*, roztroušené pozitivní buňky byly detekovány i v myokardu síní a komor (Gallini *et al.*, 2016). V E10,5 je exprimován ve velkých cévách včetně jejich chlopní, SAN, buňkách mesenchymové čepičky mezisíňového septa a ECC v atrioventrikulárním kanálu i OFT. V síních a komorách již v tomto stadiu exprimován není. Taková exprese přetrvává až do E14,5.

Embrya s delecí genu *Pdgfra*, mají abnormální orientaci plicní žíly, kratší chlopně a menší mezenchymovou čepičku na mezisíňovém septu, která později nefúzovala s ECC v atrioventrikulárním kanálu, což bylo příčinou defektu septace (Bax *et al.*, 2010). V E9,5 byl zmenšený PEO, v pozdějším vývoji, bylo zjištěno odloučení epikardu od myokardu a nebyly detekovány vcestované buňky odvozené z epikardu.

U kuřecích embryí, která jsou často používána pro studium PEO, bylo zjištěno, že mechanická inhibice migrace buněk z PEO má stejný efekt na vývoj epikardu jako chemická inhibice signalizace PDGF, tedy chybějící subepikardovou vrstvu mezenchymových buněk (Bax *et al.*, 2009).

K vývoji velkých cév přispívají také buňky odvozené ze srdeční neurální lišty (Miyagawa-Tomita *et al.*, 1991), *Wnt1-Cre* řízená delece *Pdgfra* je perinatálně letální a projevuje se defekty oblouku aorty a mezikomorového septa a vážnými rozštěpy patra

(Tallquist a Soriano, 2003). Mezi defekty remodelace velkých cév byl detekován např. perzistující *truncus arteriosus* a dvojodtoková LV. Nebyla však zjištěna příčina defektů, protože diferenciaci do hladkých svalových buněk, migrace, proliferace i apoptóza byly beze změny. Uvedené výsledky ukazují, že PDGFR α je důležitý zejména pro proces EMT.

3.2.1.12. **Cx43**

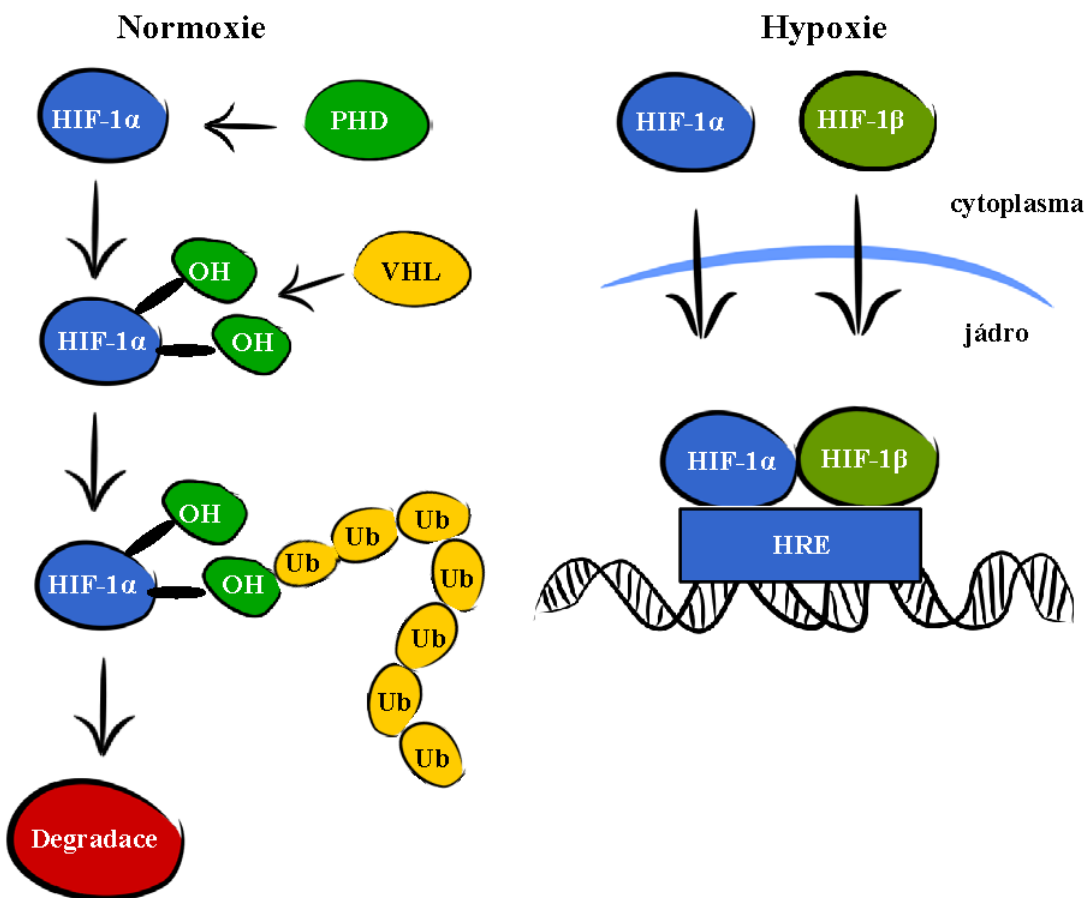
Konexin 43, znám také jako GJA1 (gap junction protein alpha 1), patří do rodiny konexinů z nichž 3 (CX43, CX40 a CX 45) jsou exprimovány v kardiomyocytech (Gros *et al.*, 2004). CX43 je hlavní konexin savčího srdce, kromě SAN, AVN, Hisova svazku a proximálních částí ramének převodního systému je uniformně exprimován ve všech částech srdce. Myši s delecí genu *Cx43* umírají krátce po porodu na udušení způsobené obstrukcí odtokové části RV (Reaume *et al.*, 1995). Ačkoli je *Cx43* exprimován v celém srdci, defekty spojené s jeho delecí jsou omezené na část spojující OFT a RV. To je způsobeno opožděným průběhem ohýbání srdce mutantních embryí, které vede k nesprávnému prostorovému umístění RV ve vztahu k OFT (Ya *et al.*, 1998). Kromě toho bylo ukázáno, že CNCC, které přispívají k remodelaci OFT, exprimují *Cx43* (Lo *et al.*, 1997) a delece *Cx43* v neurální liště má za následek narušenou migraci CNCC do srdce a tedy defekty OFT (Liu *et al.*, 2006).

Během raného embryonálního vývoje, v období, kdy myokard silně exprimuje *Cx43* i *Cx40*, nemá delece *Cx43* vliv na rychlost vedení signálu myokardem (Vaidya *et al.*, 2001). V pozdějších stádiích, kdy klesá exprese *Cx40*, a tedy vzrůstá význam *Cx43*, dochází v srdci k významnému snížení rychlosti vedení signálu. V E16,5 je pokles ještě omezen na RV, a od E18 již postihuje obě komory. V heterozygotním stavu má delece *Cx43* za následek sníženou rychlost vedení signálu pouze v RV i po porodu. Pro studium role CX43 v srdcích dospělých myši byla použita podmíněná delece *Cx43* řízená α -*Mhc-Cre*, která vedla k letalitě do dvou měsíců po porodu v důsledku náhlé spontánní arytmie (Gutstein *et al.*, 2001). Srdce myši s podmíněnou delecí *Cx43* byla náchylná k arytmii a měla sníženou rychlost vedení signálu.

CX43 je tedy nezbytný pro správné ohýbání srdeční trubice, komunikaci CNCC migrujících do OFT a přenos signálu v srdci dospělých jedinců.

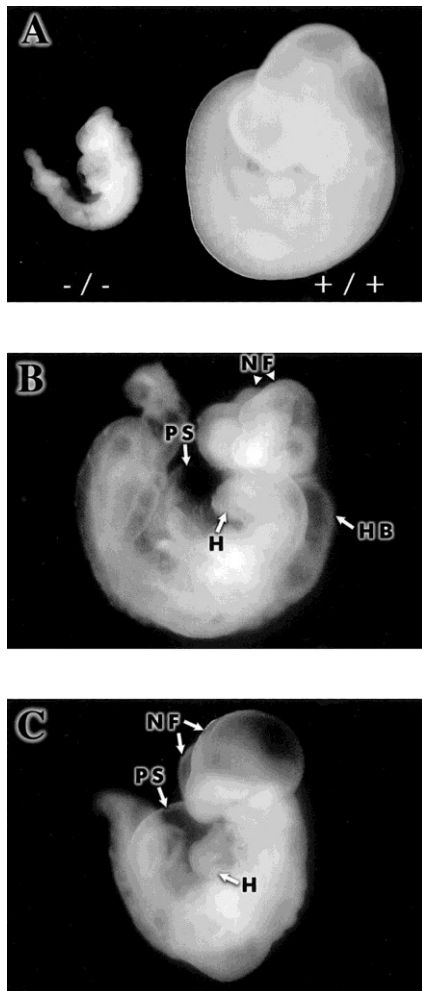
3.3. Hypoxií indukovaný faktor 1

Hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF-1, Hypoxia-inducible factor 1) je hlavním regulátorem odpovědi na hypoxii. Skládá se ze dvou podjednotek HIF-1 α a HIF-1 β , které jsou kódovány geny *Hif1a*, respektive *Hif1b*. Obě podjednotky jsou exprimovány konstitutivně, ale stabilita podjednotky HIF-1 α je regulována přítomností kyslíku (Kaluz *et al.*, 2008). V normoxickém prostředí je HIF-1 α degradován, jak ukazuje schéma na obrázku č.8. Nejdříve jsou pomocí proteinů s prolyl hydroxylázovou doménou (PHD) hydroxylovány



Obrázek č. 8: Regulace HIF-1 α přítomností kyslíku.

V podmínkách normoxie, tedy za přítomnosti kyslíku, je HIF-1 α rozpoznáván proteiny s prolyl hydroxylázovou doménou (PHD), které hydroxylují proliny v degradační doméně závislé na kyslíku. Hydroxylované proliny (OH) jsou rozpoznávány von Hippel-Lindauovým proteinem (VHL) a ubiquitinovány (Ub). Ubiquitinace označuje HIF-1 α pro degradaci v proteazomu. V hypoxických podmínkách nedochází k hydroxylaci a obě podjednotky, HIF-1 α a HIF-1 β jsou transportovány do jádra, kde tvoří dimer rozpoznávající HRE sekvenci na DNA (tzv. hypoxia-responsive element) a plní funkci transkripčního faktoru. Upraveno podle (Ruthenborg *et al.*, 2014)



Obrázek č.9. Delece *Hif1a*. Srovnání *wt* embrya (+/+) a živého embrya s delecí genu *Hif1a* (-/-) v E10 (A) ukazuje defektní vývoj mutantních embryí, včetně opožděného růstu. Detailní zobrazení mutantních embryí (B,C) ukazuje spektrum defektů zahrnující otok perikardu (PS, pericardial sac), špatně stočené srdce (H, heart), defektní vývoj nervové soustavy: neurálních valů (NF, neural folds) a zadního mozku (HB, hindbrain) (Iyer *et al.*, 1998).

proliny v oblasti degradační domény závislé na kyslíku. Hydroxylované proliny pak rozpoznává von Hippel-Lindau protein (VHL), který plní funkci E3 ubiquitin ligázy a značí HIF-1 α pro degradaci v proteozomu 26S. V hypoxických podmínkách nedochází k hydroxylaci, obě podjednotky jsou translokovány do jádra, kde tvoří heterodimer, váže se na HRE úseky DNA (z anglického hypoxia-responsive elements) a aktivují transkripci genů účastnících se odpovědi na hypoxii. HIF-1 reguluje několik set genů, mnohé z nich nepřímo (Semenza, 2011). Mezi hlavní procesy regulované signalizací HIF-1 patří přechod z oxidativní fosforylace na glykolýzu, angiogeneze, erythropoéza a přežívání buněk. HIF-1 reguluje také geny důležité pro vývoj srdce, např. *Mef2c*, *Tbx5*, *Nkx2-5*, *Isl1*, *Gata4*, *Vegfa*, *Wt1*, *Tgfb1*, *Pdgfra* a *Cx43* (Krishnan *et al.*, 2008, Yuan *et al.*, 2017, Nagao *et al.*, 2008, Manalo *et al.*, 2005, Wagner *et al.*, 2003, Han *et al.*, 2013, Chang *et al.*, 2018, Tittarelli *et al.*, 2015)

3.3.1. Vliv HIF-1 na vývoj srdce

Fakt, že funkční dimer proteinů HIF-1 α a HIF-1 β je lokalizován v jádře, je třeba zohlednit při studiu jeho funkce v srdci. Nukleární lokalizace proteinu HIF-1 α je v myším embryonálním srdci detekována od E8 (Krishnan *et al.*, 2008). V E9,5 starém embryu je nukleární lokalizace proteinu HIF-1 α uniformně detekována v myokardu komor, síní i OFT, ale ne v perikardu (Menendez-Montes *et al.*, 2016). Během dalšího vývoje, v E10,5 – E11,5, je jeho lokalizace v jádře postupně omezována v trabekulech,

v kompaktním myokardu klesá až v E14,5. V tomto stadiu je v jádrech v ojedinelých shluků buněk v kompaktním myokardu a IVS. Podle jiné studie je však v E9,5 HIF-1 α téměř výlučně v cytoplasmě a v jádře je detekován až v pozdějších vývojových stádiích (v E12,5 a E14,5), ovšem pouze na rozhraní kompaktního myokardu a trabekul (Guimaraes-Camboa *et al.*, 2015). S tím, jak postupuje vaskularizace myokardu, mizí i exprese HIF-1 α a zároveň přestává být transportován do jádra. Rozdíly mezi výsledky jednotlivých studií mohou být dány tím, že HIF-1 α je známý pro svou komplikovanou detekovatelnost imunohistochemickými metodami. Je však zřejmé, že s postupujícím vývojem cévního systému význam HIF-1 α klesá. Pokusy s delecí genu *Hif1a* ukazují jeho nezbytnost pro správný vývoj srdce v časných stádiích.

Globální delece *Hif1a* (*Hif1a*^{-/-}) byla vytvořena nahrazením exonu 2, který kóduje bHLH doménu mající hlavní podíl na vazbě k DNA, genem pro rezistenci k neomycinu (Compernelle *et al.*, 2003, Iyer *et al.*, 1998, Kotch *et al.*, 1999). V homozygotním stavu je delece *Hif1a* embryonálně letální do E10,5 v důsledku kardiovaskulárních defektů (obrázek č.9) (Iyer *et al.*, 1998), které zahrnují celé spektrum od špatně vytvořené srdeční trubice, což vede ke vzniku *cardia bifida*, po defektní proces ohýbání srdeční kličky a tedy abnormální morfologii komor (Compernelle *et al.*, 2003). Jiná studie ukázala, že myokard *Hif1a*^{-/-} vyvíjejícího se srdce je hyperplastický (Iyer *et al.*, 1998). Kromě toho mají mutantní embrya defekty nervové trubice a žaberních oblouků, příčinou je pravděpodobně zvýšená apoptóza a narušená migrace buněk z neurální lišty. V heterozygotním stavu nemá delece *Hif1a* na embryonální vývoj vliv, *Hif1a*^{+/-} embrya se morfologicky neliší od *wt* embryí. Stejně tak i embrya s delecí *Hif1a* specifickou pro kardiomyocyty (*Mlc2v-Cre/Hif1a*^{lox/lox}) se vyvíjejí normálně (Huang *et al.*, 2004). Avšak kombinace této tkáňově specifické delece s globální delecí, tedy tkáňově specifická delece na pozadí globální heterozygotní delece (*Mlc2v-Cre/Hif1a*^{-/lox}), je embryonálně letální do E12 (Krishnan *et al.*, 2008). Podobně jako embrya s úplnou delecí, mají tato embrya defekty ohýbání srdeční kličky a hyperplastický myokard. Detekovaná zvýšená exprese mRNA genů důležitých pro průchod buněčným cyklem a snížená mRNA inhibitorů buněčného cyklu naznačuje roli signalizace HIF-1 v regulaci buněčné proliferace. U dalšího myšního modelu využívající tkáňově specifické delece v srdci v kombinaci s globální delecí *Hif1a* (*Nkx2-5-Cre/Hif1a*^{-/lox}) proběhla delece účinně pouze u 73 % mutantních embryí, ta nepřeživala E17,5 (Guimaraes-Camboa *et al.*, 2015). Na rozdíl

od výše zmíněných studií měla embrya *Nkx2-5-Cre/ Hif1a^{-flox}*, u kterých proběhla účinná delece, kromě defektů IVS, které v předchozích studiích nemohly být detekovány z důvodu letality před ukončením septace, také hypoplastický myokard v důsledku snížené proliferace kardiomyocytů. Tyto protikladné výsledky by mohly být dány druhem použité nulové alely. Myší modely s hyperplastickým myokardem využívají pro globální deleci *Hif1a^{tm1.Jhu}*, která je ve všech buňkách pocházejících ze zygoty, ovlivňuje tedy jak embryonální, tak extraembryonální tkáň. Naproti tomu model s hypoplastickým myokardem využívá pro vytvoření nulové alely *Meox2-Cre*, pomocí něhož je *Hif1a* deletován v epiblastu, to znamená, že neovlivňuje extraembryonální tkáň (Tallquist a Soriano, 2000). Myší embrya exprimující v endotelových buňkách dominantně negativní mutaci, která inhibuje signalizaci řízenou jak HIF-1, tak HIF-2 nepřežívají E11,5 (Licht *et al.*, 2006). Mutantní embrya mají ztenčený myokard a špatně vyvinuté trabekuly, jde tedy o další příklad narušení signalizace HIF-1 mající za následek hypoplasii myokardu. Tyto studie naznačují, že pro vývoj srdce je důležitá také komunikace intraembryonálních a extraembryonálních tkání.

Delece genu *Vhl*, která vede ke zvýšené stabilitě proteinu HIF-1 α , je embryonálně letální mezi E10,5 a E12,5 v důsledku defektního vývoje placenty (Gnarra *et al.*, 1997). Zpoždění účinku delece *Vhl* pomocí indukce tamoxifenem v E10,5 vedlo ke zpoždění letality (Hong *et al.*, 2006). Mutantní embrya umírala mezi E14,5 a E15,5, pravděpodobně v důsledku poškozené cévní sítě žloutkového vāčku, a vykazovala silné krvācení, jaterní nekrózu a rozšířené cévy.

Tyto experimenty ukazují nejen to, že aktivní signalizace HIF-1 je nezbytná pro embryonální vývoj, ale také to že její nadměrná aktivace má za následek embryonální letalitu.

3.3.2. HIF-1 v dospělém srdci

V dobře prokrveném srdci, které není vystaveno hypoxii, význam signalizace HIF-1 klesá, ale nezaniká, jak ukazují studie změny exprese *Hif1a* v dospělém srdci. Specifická delece *Hif1a* v kardiomyocytech má negativní vliv na kontraktilitu a expresi genů důležitých pro metabolismus glukózy (Huang *et al.*, 2004). Konstitutivně navýšená exprese *Hif1a* v srdci naopak vede k navýšení využití glukózy a kardiomyopatii u stárnoucích myší (Holscher *et al.*, 2012). Změny v metabolismu glukózy a srdečních funkcích jsou detekovatelné už tři dny po aktivaci exprese transgenu kódujícího stabilní protein HIF-1 α (Bekeredjian *et al.*, 2010). Uvedená studie zároveň ukazuje, že změny způsobené krátkodobým zvýšením exprese HIF-

1 α jsou reverzibilní. Další možností, jak konstitutivně zvýšit stabilitu proteinu HIF-1 α v kardiomyocytech, je tkáňově specifická delece genů *Phd2* a *Phd3*, nebo delece genu *Vhl* (Moslehi *et al.*, 2010, Lei *et al.*, 2008). Oba tyto myší modely vykazují srdeční dysfunkci, předčasnou úmrtnost a v souladu s výše uvedenými studiemi u nich bylo potvrzeno hromadění glykogenu a lipidů. Ačkoli je zdravé dospělé srdce dobře zásobeno kyslíkem a jako energetický substrát využívá převážně volné mastné kyseliny, je zřejmé, že zachování schopnosti využívat glukózu je pro jeho správnou funkci nezbytné. Nadměrné využívání glukózy má však na srdeční funkci také negativní vliv. Dosavadní poznatky naznačují, že HIF-1 α má v procesu zachování metabolické rovnováhy klíčovou úlohu.

3.4. Perinatální změny v srdci

Fetální srdce se od dospělého významně liší, během maturace tkání dochází ke změnám v energetickém metabolismu a v morfologii kardiomyocytů, které zajišťují maximální efektivitu při využití zvýšeného příjmu ATP. Současné poznatky naznačují, že hlavním regulátorem těchto změn by mohl být HIF-1 (Iruretagoyena *et al.*, 2014, Menendez-Montes *et al.*, 2016). Dospělá srdeční svalovina kombinuje vlastnosti příčně pruhovaných a hladkých svalových buněk, takže může pracovat rychle a bez nutnosti odpočinku. Dospělé kardiomyocyty na rozdíl od kosterní svaloviny netvoří soubuní, místo toho mají jedno až dvě jádra v důsledku nedokončeného buněčného dělení. Kontraktilní proteiny jsou však v cytoplasmě organizovány do sarkomer, které se na histologických preparátech jeví jako příčné pruhování.

Během embryonálního vývoje jsou v kardiomyocytech myofibrilární proteiny neuspořádané a mezibuněčné spoje obklopují buňky po celém jejich obvodu (Hirschy *et al.*, 2006). Po porodu jsou mezibuněčné spoje organizovány v místech připojení myofibrilárních proteinů, které jsou organizovány podél dlouhé osy buněk. Dochází také k proměně izoform proteinů sarkomer, která souvisí se zvýšenou citlivostí k přenosu signálu pomocí Ca²⁺ a zvýšenou efektivitou stahu (Siedner *et al.*, 2003). U myši roste citlivost k Ca²⁺ již během druhého embryonálního týdne a pravděpodobně souvisí zejména se změnou izoform troponinových proteinů. Změna kosterní izoformy troponinu (Tn) T na srdeční probíhá především před E16,5, kdy již srdeční forma převládá. Naproti tomu změna kosterní izoformy TnI na srdeční probíhá až v období okolo porodu. Podobně je β izoforma těžkého myosinového řetězce (MHC, myosin heavy chain), která převládá v období okolo porodu,

nahrazena izoformou α -MHC a celkový poměr myosinových proteinů k aktinovým se po porodu zvyšuje. Možnou souvislost těchto změn se signalizací HIF-1 naznačuje studie ukazující, že *in vitro* kultivované kardiomyocyty vystavené hypoxii nebo farmakologickému stabilizátoru HIF-1 α vykazují zvýšenou expresi genu *Myh7*, který kóduje β -MHC (Bino *et al.*, 2017). Tento efekt navíc chybí v buňkách postrádajících HIF-1 α .

Činnost vláken obsahujících α -MHC je rychlejší, než u vláken s β -MHC (Galler *et al.*, 2002) a také vyžaduje větší množství ATP (Wang *et al.*, 2013). Větší spotřebu ATP umožňuje přechod na oxidativní fosforylaci, která využívá především lipidy a produkuje víc energie. Embryonální metabolismus je relativně neprobádaná oblast, nicméně několik studií bylo provedeno a za hlavní zdroj energie pro embryo je považována glykolýza, protože vývoj probíhá v relativně hypoxickém prostředí (Jauniaux *et al.*, 2001, Rodesch *et al.*, 1992). Během prvních fází vývoje využívá embryo jako hlavní zdroj energie pyruvát a glykolýza není detekovatelná (Houghton *et al.*, 1996). Ve stádiu blastocysty narůstá spotřeba kyslíku, což je pravděpodobně impulsem pro zahájení aerobní glykolýzy a omezení spotřeby pyruvátu. Tato změna metabolismu na glykolytický vede k normalizaci spotřeby kyslíku a chrání tak embryo před nefyziologickou hypoxií. Během embryonálního vývoje se však i nadále uplatňuje i fyziologická hypoxie, omezená na určité oblasti, jako je například nervová trubice nebo srdce (Lee *et al.*, 2001). Glykolýza by ale mohla mít i jiný význam, než je jen ochrana před hypoxií. Je známo, že vysoce proliferující rakovinné buňky využívají aerobní glykolýzu i v dobře cévně zásobených nádorech (Bartrons a Caro, 2007, Vander Heiden *et al.*, 2009). Jde o energeticky méně výhodnou strategii, nicméně proliferující buňky nepotřebují pouze ATP, ale také stavební materiál (Vander Heiden *et al.*, 2009). Využití aerobní glykolýzy umožňuje přeměrování části uhlovodíků do jiných metabolických drah, které zajišťují syntézu základních stavebních kamenů, jako jsou nukleotidy a aminokyseliny. Analýza embryonálního metabolomu skutečně prokázala využití uhlovodíků odvozených z glukózy v pentózovém cyklu (Miyazawa *et al.*, 2017).

Perinatální změna ve využití energetického substrátu je dána také dostupností živin. Zatímco glukóza je hlavním zdrojem energie, který přechází přes placentu do fetálního oběhu (Herrera a Amusquivar, 2000), díky kojení mateřským mlékem se zvýší dostupnost lipidů (Ascutto a Ross-Ascutto, 1996). Metabolismus se mění především v období po porodu do odstavu, ale jak ukazuje studie lidských fetálních srdcí, první změny v expresi genů důležitých

pro metabolismus se objevují již ve 2. trimestru (Iruretagoyena *et al.*, 2014). Metabolické změny jsou závislé nejen na čase, ale také na konkrétní tkáni. Jak bylo zmíněno výše, studie myšího embryonálního srdce ukázala, že je HIF-1 α v počátečních stádiích vývoje uniformně v celém srdci lokalizován v jádře buněk, ale postupně je jeho množství v jádře snižováno (Menendez-Montes *et al.*, 2016). Nejdříve mizí v trabekulech a od E14,5 je jeho nukleární lokalizace snižována v celém srdci. Změny v jaderné lokalizaci HIF-1 α korelují se změnami exprese cílových genů signalizace HIF-1, které jsou zároveň důležité pro metabolismus glukózy, jako jsou SLC2A1, *Ldha* (*lactate dehydrogenase A*) a *Pdk1* (*pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1*). V oblastech s klesající jadernou lokalizací HIF-1 α byly detekovány také změny v počtu a morfologii mitochondrií, které jsou také důležitou součástí přechodu na oxidativní fosforylaci, neboť jsou zdrojem 95 % ATP v dospělém srdci (Ashrafian *et al.*, 2007). Fetální mitochondrie jsou malé a kulaté, zatímco v perinatálním období mitochondrie fúzí, rostou a kristy jejich vnitřní membrány jsou hustší a uniformnější (Neary *et al.*, 2014). Celkově se oblast obsazená mitochondriemi mezi E16,5 a postnatálním dnem 10 ztrojnásobuje. U myši s podmíněnou konstantní aktivací signalizace HIF-1, pomocí *α MHC-Cre/VHL^{lox/lox}*, se mitochondrie jeví jako nematurované a buňky jsou více závislé na glykolýze než u *wt* myši. To dále podporuje hypotézu, že snížení vlivu signalizace HIF-1 se podílí na maturaci srdeční svaloviny a jejím přechodu na oxidativní fosforylaci.

3.5. Diabetes mellitus a přidružené komplikace

Onemocnění *diabetes mellitus* (DM) se projevuje zvýšenou hladinou glykémie v důsledku absolutního či relativního nedostatku inzulínu, jehož příčiny jsou značně různorodé (Škrha, 2009).

Až do objevení inzulínu na počátku 20. století bylo onemocnění diabetem neléčitelné (Karamitsos, 2011). Přestože již diabetes není neléčitelným onemocněním, stále je to onemocnění nevléčitelné, velmi vážné a jsou s ním spojeny vážné zdravotní komplikace postihující všechny orgánové systémy v těle, jako například kardiovaskulární systém, ledviny, zrak a nervy, včetně vyvíjejícího se plodu, pokud je žena těhotná. Podle údajů International Diabetes Federation bylo v roce 2015 na celém světě odhadem 415 miliónů lidí trpících diabetem (Rahelic, 2016). Počet diabetiků stále roste, zejména v důsledku rozšiřujícího se západního životního stylu. Do roku 2040 je predikován nárůst počtu pacientů o více než 50 %, a to jak u DM typu 1, tak zejména u DM typu 2.

3.5.1. Klasifikace DM

Podle etiologie lze DM klasifikovat do čtyř základních skupin: DM typ 1 (DM1), DM typ 2 (DM2), gestační DM (GDM) a další specifické typy (American Diabetes, 2014). Diagnostickým kritériem DM je, podle zprávy světové zdravotnické organizace z roku 2016, glykémie nalačno 7 mmol/l a vyšší (World Health, 2016).

3.5.1.1. DM typ 1

DM1 byl dříve znám jako inzulin-dependentní diabetes, protože je charakteristický destrukcí B-buněk v Langerhansových ostrůvcích pankreatu a tudíž nedostatkem inzulinu, který je nutno podávat externě (Škrha, 2009, American Diabetes, 2014, Bartoš, 2000). Typicky se jedná o autoimunitní onemocnění, u kterého je možné detekovat autoprotilátky. Predispozice k jeho rozvoji jsou dědičné, sama genetická složka však tvoří pouze 1/3 rizika. Je známa asociace s geny kódujícími lidské leukocytové antigeny. Pro vyvolání autoimunitního procesu je nutný styk s virovou infekcí či jiným exogenním nebo endogenním agens.

DM1 je diagnostikován u 5 – 10 % všech diabetických pacientů. Průběh onemocnění závisí na agresivitě inzulitidy. Zanikají-li B-buňky velmi rychle, projeví se onemocnění zpravidla v dětství nebo dospívání. Při pomalejší ztrátě B-buněk dochází k manifestaci onemocnění až v pozdějším věku, které pak bývá často zaměňováno s DM2, je však možná detekce autoprotilátek. Tento typ je nazýván latentní autoimunitní diabetes dospělých (LADA, latent autoimmune diabetes of adults).

V africké a asijské populaci se vyskytuje idiopatický DM1, jehož etiologie není známa. Nejsou u něj detekovány autoprotilátky, pacienti jsou však závislí na podávání inzulinu.

3.5.1.2. DM typ 2

DM2 je spojen s polygenní genetickou predispozicí a řadou dalších rizikových faktorů jako je obezita, stres, malá fyzická aktivita a kouření. Hyperglykemie vzniká v důsledku inzulinové rezistence, která je doprovázena poruchou sekrece inzulinu (Škrha, 2009, American Diabetes, 2014, Bartoš, 2000). Samotná inzulinová rezistence znamená sníženou citlivost periferních tkání na působení inzulinu. Léčba inzulinem obvykle není pro přežití nutná.

Příčiny vzniku nejsou přesně známy, nicméně obezita spojená s nedostatkem pohybu je významným rizikovým faktorem. Vzhledem k nárůstu obezity v populaci proto není překvapením, že 90 – 95 % diabetických pacientů trpí DM2 a zároveň je tato forma nejrychleji se rozšiřujícím typem diabetu (Rahelic, 2016).

3.5.1.3. **Gestační DM**

GDM se rozvíjí v průběhu těhotenství, typicky ve druhém a třetím trimestru, po porodu spontánně mizí (Škrha, 2009). Za GDM je považován stav projevující se jako DM i jako porušená glukózová tolerance. Vzhledem k teratogenitě neléčeného DM bez ohledu na typ, provádí se u těhotných žen orální glukózový toleranční test.

3.5.1.4. **Další specifické typy DM**

Možných příčin rozvoje poruchy glukózové homeostázy je velké množství (Škrha, 2009, Bartoš, 2000). Do této obsáhlé skupiny jsou zahrnovány:

- monogenně podmíněné defekty funkce B-buněk: MODY (maturity-onset diabetes of the young) (např. MODY1 – defekt v genu pro HNF-4 α (hepatic nuclear factor 4, α), MODY2 – defekt v genu pro glukokinázu)
- genetické defekty účinku inzulínu (např. leprechaunismus, typ A inzulínové rezistence, lipoatrofický diabetes)
- pankreatický DM vyvolaný poškozením exokrinního pankreatu (např. pankreatitida, neoplasie, cystická fibróza, pankreatomie)
- endokrinopatie (např. akromegalie, Cushingův syndrom, hyperthyreóza)
- chemikáliemi a léky indukovaný diabetes (např. pentamidin, kyselina nikotinová, glukokortikoidy)
- diabetes provázející genetické syndromy (např. Downův syndrom, Klinefelterův syndrom, Turnerův syndrom)

3.5.2. **Hraniční poruchy glukózové homeostázy**

Stojí mimo kategorii DM, ale představují riziko rozvoje onemocnění DM (Škrha, 2009). Patří sem hraniční glykémie nalačno (6,1 – 6,9 mmol/l (World Health, 2016)) a porušená glukózová tolerance zjištěná při orálním glukózovém tolerančním testu (7,8 – 11,1 mmol/l ve 120. minutě, při glykemii na lačno pod 7 mmol/l (World Health, 2016)). Kromě rizika vzniku diabetu jsou hraniční poruchy glukózové homeostázy také rizikovým faktorem

pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, protože jsou asociovány se syndromem inzulinové rezistence (Bartoš, 2000).

3.5.3. Diabetická kardiomyopatie

Hlavní příčinou úmrtí diabetiků jsou kardiovaskulární komplikace (Rybka, 2007, Gleissner *et al.*, 2007). DM zhoršuje průběh aterosklerózy a zvyšuje tak riziko vzniku ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu a cerebrovaskulárních příhod. Postihuje ale také srdeční svalovinu, pojivové tkáně, převodní systém srdeční a koronární cévy.

Diabetická kardiomyopatie je definována jako ventrikulární dysfunkce za nepřítomnosti postižení koronárních cév a hypertenze (Boudina a Abel, 2010, Bugger a Abel, 2009, Rybka, 2007). Charakteristickým projevem je diastolická dysfunkce u asymptomatických osob, v pozdějším stádiu dochází také k systolické dysfunkci. Změny ve struktuře myokardu vedoucí k rozvoji diabetické kardiomyopatie zahrnují zvýšenou fibrózu, akumulaci lipidů, tvorbu pokročilých produktů glykace (AGE, advanced glycation end products), změny myosinových izoform, zvýšenou apoptózu v tkáni, mitochondriální dysfunkci a změny ve využití energetického substrátu. Za normálních podmínek využívá srdce především oxidativní fosforylaci volných FA s malým příspěvkem glykolýzy (Ashrafian *et al.*, 2007). Za určitých podmínek jsou však myokardem jako energetický substrát využívány také laktát, ketony nebo dokonce acetát (Kodde *et al.*, 2007). Hlavním zdrojem energetického substrátu je krev, protože dospělé srdce má jen velmi malou kapacitu pro skladování energetických zásob. Hyperglykémie má však za následek snížení využívání glukózy, a zvýšení oxidace mastných kyselin, které vede ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) (Lorenzo *et al.*, 2013). Jejich produkce je zvýšena také v důsledku zvýšeného množství AGE zprostředkované jejich receptory (Goldin *et al.*, 2006). ROS i AGE modifikují proteiny v intra- i extracelulárním prostředí, což vede ke zvýšené rigiditě tkáně a změnám mechanických vlastností. Kromě toho ale také zvyšují oxidativní stres, který aktivuje zánětlivé procesy. Chronický zánět sám o sobě vede k srdeční dysfunkci (Mann, 2015).

3.5.4. Diabetická embryopatie

Diabetes v těhotenství má teratogenní účinky a představuje zvýšené riziko perinatální mortality a onemocnění diabetem v dospělosti (Hod *et al.*, 2008). Novorozenci vystavení maternálnímu diabetu často trpí makrosomií, která komplikuje porod přirozenou cestou (Mitanchez *et al.*, 2015). Méně častou komplikací je intrauterinní růstová retardace, což znamená, že mají novorozenci podprůměrnou tělesnou hmotnost nebo délku vzhledem ke svému gestačnímu stáří. Ze studií na zvířatech vyplývá, že makrosomie je spojená spíše s dobře kontrolovanou glykemií během těhotenství, zatímco těžká trvalá hyperglykemie vede k růstové retardaci (Fetita *et al.*, 2006).

Riziko vzniku vrozených vývojových vad je u diabetických těhotenství až desetkrát vyšší než u nediabetických (Casson *et al.*, 1997). Kritický obdobím je první trimestr, to je doba, kdy dochází k vývoji orgánů plodu. To je pravděpodobně důvodem, proč bylo v nedávné populační studii provedené v Dánsku zjištěno, že pregestační diabetes je pro rozvoj defektů srdce mnohem rizikovější než gestační diabetes, který vzniká ve druhém a třetím trimestru (Oyen *et al.*, 2016). Postiženy mohou být všechny orgánové systémy, nejčastější jsou však defekty nervové, kardiovaskulární a kosterní soustavy (Gabbay-Benziv *et al.*, 2015, Farrell *et al.*, 2002). Mezi nejčastější kardiovaskulární defekty patří defekty mezikomorového septa, velkých cév a chlopní (Kumar *et al.*, 2007, Wren *et al.*, 2003). Mechanismus teratogenního působení stále nebyl přesně objasněn, avšak hyperglykemie je považována za nejvýznamnější faktor. Samotná hyperglykemie bez maternálního diabetu má teratogenní efekt (Baack *et al.*, 2014). Glukóza je pro vyvíjející se embryo hlavním zdrojem energie, prochází placentární bariérou usnadněnou difuzí (Lager a Powell, 2012). Maternální hyperglykemie tedy vede k hyperglykémii embryonální. Teratogenní procesy zahrnují změny v metabolismu inositolu, sorbitolu, arachidonové kyseliny, reaktivních kyslíkových radikálů, stejně jako změny v aktivaci proteinkinázy C (Hod *et al.*, 2008). Analýza metabolomu plodové vody žen s gestačním diabetem ukázala změny nejen v metabolismu glukózy, ale také mastných kyselin a aminokyselin (O'Neill *et al.*, 2018). Tyto změny navíc byly závislé na pohlaví plodu.

Analýza celých embryí v E10,5 ukázala, že jednou z drah významně ovlivněných maternálním diabetem je signalizace HIF-1 (Pavlinkova *et al.*, 2009). Vzhledem k tomu, že hypoxie sama o sobě vede k podobným defektům, jaké jsou typické pro diabetickou

embryopatii (Ornoy *et al.*, 2010), zdá se pravděpodobné, že regulace HIF-1 hraje klíčovou roli. To je podpořeno experimenty s myšími embryi *in vitro*, které ukázaly, že hyperglykemie vede k zvýšené spotřebě kyslíku (Li *et al.*, 2005). Naše laboratoř již dříve publikovala studii ukazující u embryí s globální delecí genu *Hif1a* v heterozygotním stavu zvýšenou letalitu a náchylnost k defektům srdce a nervové trubice indukovaných maternálním diabetem (Bohuslavova *et al.*, 2013). Kromě toho byla srdce těchto embryí výrazně hypoplastická v důsledku snížené proliferace kompaktního myokardu a měla změněnou expresi genů důležitých pro vývoj srdce, mezi nimi *Tbx5*, *Nkx2-5*, a *Mef2c*. Jedním z deregulovaných genů byl *Vegfa*, jehož deregulace je embryonálně letální (Carmeliet *et al.*, 1996, Giordano *et al.*, 2001, Miquerol *et al.*, 2000) a je známým cílem signalizace HIF-1 (Manalo *et al.*, 2005). U embryí s vysokou hyperglykemií byla exprese *Vegfa* snížena (Bohuslavova *et al.*, 2013). Diabetes tedy ovlivňuje expresi genů nezbytných pro správný vývoj srdce.

3.5.5. Fetální programování

Kromě toho, že maternální diabetes způsobuje vrozené vývojové vady, mají potomci diabetických matek zvýšené riziko zdravotních komplikací v pozdějším životě. Vývoj v prostředí maternálního diabetu zvyšuje riziko kardiovaskulárních chorob, obezity, DM2 a metabolického syndromu (Fetita *et al.*, 2006, Plagemann, 2004). Meta-analýza populačních studií dává do souvislosti s maternálním diabetem také zhoršený mentální a psychomotorický vývoje dítěte (Camprubi Robles *et al.*, 2015).

Jedinci, kteří se narodili matkám poté, co se u nich rozvinul diabetes, mají v dospělosti vyšší riziko rozvoje DM2 a vyšší BMI (body mass index), než jejich sourozenci, kteří se narodili ještě před vznikem choroby (Dabelea *et al.*, 2000). U dětí ve věku šest až devět let bylo naopak BMI následkem vystavení maternálnímu diabetu sníženo. V prvních 18 měsících života je dokonce přírůstek potomků diabetiček snížený oproti potomkům nevystavených maternálnímu diabetu (Touger *et al.*, 2005). Po krátkém období je však růst dohnán a přírůstek na váze dokonce předčí potomky z nediabetických těhotenství. Novorozenci vystavení maternálnímu diabetu často trpí hyperinzulinémií, jako reakcí na vývoj v hyperglykemickém prostředí (Westgate *et al.*, 2006), která je spojována s trvalými změnami v hypotalamu vedoucími k přejídání a obezitě (Plagemann, 2004). Ke zvýšenému riziku obezity a rozvoje onemocnění DM není nutné, aby byl plod vystaven maternálnímu diabetu po celou dobu vývoje, jak ukázala studie soustředující se pouze na GDM (Abokaf *et al.*,

2018), který se typicky vyvíjí ve druhém a třetím trimestru.

Jednou z vážných komplikací u potomků diabetických matek je riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob. Zhoršená funkce srdce a hypertrofie myokardu byla u dětí diabetických matek detekována již během prenatálního vývoje a byla dána do souvislosti s hladinou glykemie v době početí (Gardiner *et al.*, 2006). Maternální diabetes také vede již v dětském věku k vyššímu krevnímu tlaku (Tam *et al.*, 2008) a vyšší hladině cirkulujících markerů narušené funkce endotelových buněk, které by mohly souviset s nejranějšími stádii preklinické aterosklerózy (West *et al.*, 2011). U potkanů narozených diabetickým matkám byla ve věku 5 měsíců detekována zvýšená fibróza v myokardu a snížená exprese CX43 (Musikant *et al.*, 2018), který je nezbytný pro správný přenos signálu mezi kardiomyocyty (Vaidya *et al.*, 2001). Zvýšená fibróza u těchto potomků by mohla souviset s detekovanou zvýšenou expresí *Mmp-2* (matrix metaloprotease 2) a *Ctgf* (connective tissue growth factor) (Musikant *et al.*, 2018). Nicméně, u těchto potomků byla detekována také zvýšená glykemie, inzulinemie a hladina triglyceridů v krvi, což jsou rizikové faktory zatěžující kardiovaskulární systém (O'Donnell a Elosua, 2008). Fetální programování zahrnuje rozsáhlý soubor změn v organismu, které jsou stále předmětem výzkumu.

3.5.6. HIF-1 a diabetes

Hlavním znakem diabetu je hyperglykemie, která bývá spojována s tzv. pseudohoxyí (Williamson *et al.*, 1993), charakterizovanou zvýšeným poměrem NADH/NAD⁺ (poměr redukované a oxidované formy nikotinamid adenin dinukleotidu) způsobeným zvýšeným tokem glukózy přes polyolovou dráhu (Gleissner *et al.*, 2007). V prostředí hypoxie k tomuto jevu dochází v důsledku narušené oxidace NADH (Williamson *et al.*, 1993). Zapojení hypoxie do patologických procesů indukovaných diabetem podporuje také to, že byla detekována zvýšená hypoxie v tkáních diabetických myší (Sada *et al.*, 2016). Hypoxie sama o sobě navíc způsobuje podobné vývojové defekty srdce jako diabetes (Dunwoodie, 2009), kritické je zejména období septace (Ream *et al.*, 2008, Kenchegowda *et al.*, 2014). Působení hypoxie v tomto období vede ke snížené proliferaci buněk a s tím spojenému ztenčení myokardu, časté jsou také defekty septace a remodelace OFT.

Na úrovni mRNA byla u diabetických potkanů detekována navýšená exprese *Hif1a* (Marfella *et al.*, 2002). V případě proteinu HIF-1 α je však situace daleko složitější. HIF-1 α je stabilizován v hypoxickém prostředí, ale také produkty aerobní glykolýzy, především

pyruvátem (Lu *et al.*, 2002). Hyperglykemie vede k modifikaci jeho koaktivátoru p300 a tím snižuje transkripční aktivitu HIF-1 (Thangarajah *et al.*, 2009) bez toho, aby byla ovlivněna stabilita proteinu HIF-1 α (Thangarajah *et al.*, 2010). Pokud však hyperglykemie a hypoxie působí zároveň, dochází k degradaci HIF-1 α , jak ukázaly pokusy s buněčnými kulturami (Catrina *et al.*, 2004, Ramalho *et al.*, 2017). Diabetes tedy kromě jiného způsobuje hypoxii, ale zároveň narušuje signalizaci HIF-1.

4. Materiál a metody

4.1. Modelový organismus *mus musculus*

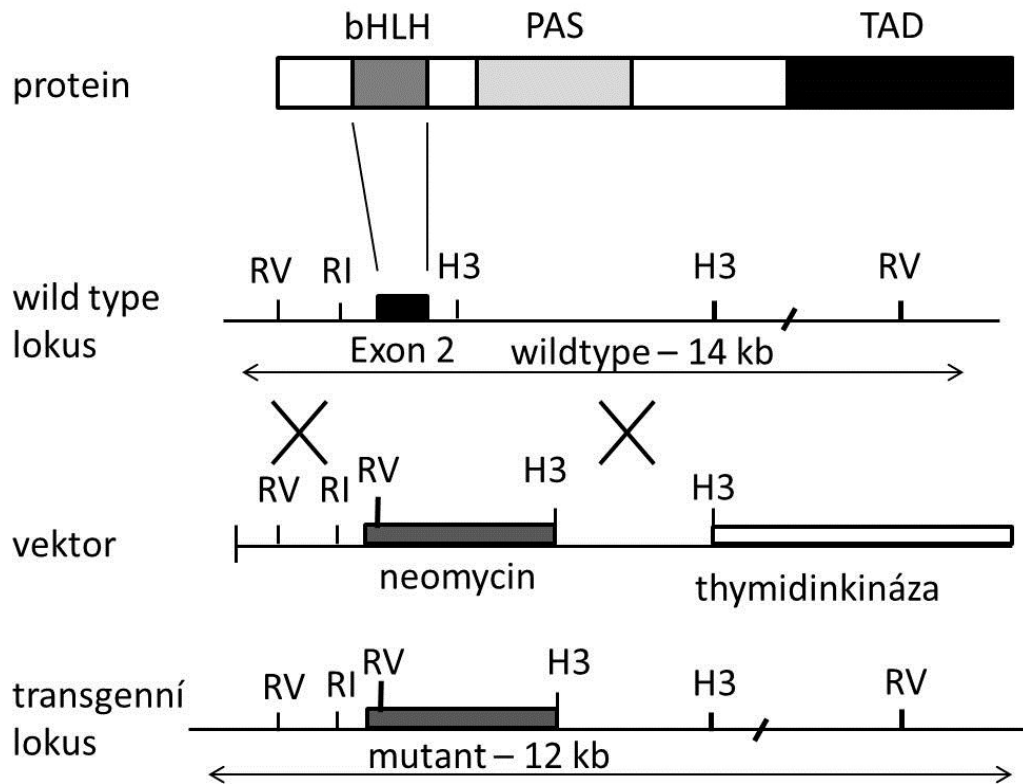
Experimentální práce se zvířaty proběhla v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. ve znění jeho následných novel a vyhlášky č. 39/2009 Sb. Experimentální *diabetes mellitus* byl vyvolán u samic inbredního kmene FVB (číslo 207, Charles River, USA) (*wt*, *Hif1a*^{+/+}). Diabetické a nediatetické samice byly kříženy s nediatetickými *wt* samci, za účelem získání *wt* embryí, nebo s nediatetickými samci heterozygotními pro nulovou alelu *Hif1a*^{tm1jhu} (*Hif1a*^{+/-}) (Iyer *et al.*, 1998) na geneticky definovaném pozadí FVB, za účelem získání mláďat s genotypem *wt* a *Hif1a*^{+/-}. Mutantní *Hif1a*^{+/-} myši byly získány od prof. Gregga L. Semenzky z Johns Hopkins University School of Medicine, USA.

4.1.1. Nulová alela *Hif1a*

Pro studium signální dráhy HIF-1 byla použita embrya heterozygotní pro nulovou alelu *Hif1a*^{tm1jhu} (*Hif1a*^{+/-}). Konstrukce transgenní alely je znázorněna na obrázku číslo 10. Za použití virového vektoru byl v genu *Hif1a* nahrazen exon 2, který je překládán jako bHLH (basic helix loop helix) DNA vazebná doména, genem pro rezistenci k neomycinu s opačnou orientací transkripce, v důsledku čehož nedochází k produkci funkčního proteinu HIF-1 α .

4.2. Indukce diabetu

Diabetes byl indukován *wt* samicím ve věku 6 - 9 týdnů pomocí dvou intraperitoneálních injekcí streptozotocinu (STZ, Sigma-Aldrich, USA), který selektivně ničí B buňky v pankreatu a vyvolává tak DM1. Před aplikací STZ byla samicím změřena hladina glukózy v krvi odebrané z hlavní ocasní tepny pomocí glukometru Contour TS (Bayer, Švýcarsko) a myši byly zváženy. STZ byl aplikován v množství 100 mg/kg tělesné hmotnosti rozpuštěný v 10 mM citrátovém pufru, druhá injekce následovala 1 týden po první aplikaci. Po 2 týdnech od první injekce byla změřena hladina glukózy v krvi. Za diabetické byly považovány samice, u nichž byla naměřena hladina glukózy větší nebo rovna 13,9 mmol/l. Jako kontrolní skupina byly použity stejně staré FVB samice.



Obrázek č. 10: Konstrukce transgenní alely *Hif1a^{tm1jhu}*

Na obrázku je znázorněna struktura proteinu, wild type lokusu, vektoru a transgenního lokusu. Ve struktuře proteinu jsou důležitými funkčními doménami bHLH a PAS domény, které jsou nutné pro dimerizaci a vazbu na DNA, a transaktivační doména TAD. Ve struktuře DNA reprezentuje exon 2 doménu bHLH. Homologní rekombinací (kříže) byl zaměněn exon 2 za gen pro rezistenci k neomycinu s opačnou orientací směru transkripce. Upraveno podle (Iyer *et al.*, 1998)

4.3. Izolace embryí

Jako počátek březosti byl stanoven den nalezení vaginální zátky. Tento den je označován jako E0,5. Březí samice byly v poledne E8,5 – E18,5 po nalezení vaginální zátky zváženy a byla jim změřena hladina glukózy v krvi. Samice byly usmrceny cervikální dislokací, embryonální vajíčky byly vyjmuty, spočítány a umístěny do ledového PBS 1x. Izolace embryí a zjištění počtu absorbovaných embryí probíhalo okamžitě po vyjmutí embryonálních vajíček pod stereomikroskopem SMZ 1500 (Nikon, Japonsko) v PBS 1x pufru.

4.4. Perfuze dospělých potomků a izolace srdcí

Pro molekulární analýzy potomků diabetických matek byla použita srdce 12 týdnů starých samců.

Srdce určená pro histologické analýzy byla před izolací perfuzována, aby došlo k odstranění krevních buněk z tkáně. Myši byly před úkonem uspány inhalací chloroformu, poté bylo pomocí injekční jehly a peristaltické pumpy (TP-50 Tubing pump, JND ADVANCED, Čína) do tělního cévního systému přes LV vpraveno 15 ml PBS 1x a 15 ml 4% paraformaldehydu (PFA) pro lepší fixaci tkáně. Srdce byla vyjmuta z hrudního koše a fixována 1 hod ve 4% PFA při pokojové teplotě. Poté byla přenesena do 0,4% PFA (w/v) a uložena ve 4 °C.

Pro molekulární analýzy mRNA a proteinů byla použita neperfuzovaná srdce, která byla ihned po vyjmutí z hrudního koše přenesena do ledového PBS 1x a pod stereomikroskopem SMZ 1500 (Nikon, Japonsko) byla oddělena LV. Izolovaná LV byla ihned přenesena do 1 ml Trizolu (Trizol Reagent, Invitrogen, USA), pro izolaci RNA, nebo zvážena a přenesena do RIPA pufru v množství odpovídajícím 1000 µl/100 mg tkáně.

4.5. Echokardiografická analýza funkce srdce

Analýza srdečních funkcí byla provedena u potomků diabetických a nediabetických matek obou pohlaví ve věku 1 týdně a ve věku 12 týdnů bylo měření opakováno. Funkce a rozměry LV byly měřeny pomocí GE Vivid 7 Dimension (GE Vingmed Ultrasound, Norsko) s lineární sondou typu matrix M12L při 12 MHz. Pro anestezii 12 týdnů starých zvířat byla použita inhalace 2% isofluranu (Aerrane, Baxter), tělesná teplota byla měřena v konečníku a v průběhu měření byla udržována mezi 36.5 - 37.5 °C pomocí ohřívacího stolku. Mláďata stará 1 týden byla analyzována bez anestezie. Analyzovány byly následující systolické a diastolické rozměry LV: tloušťka posteriorní a anteriorní stěny a průměr dutiny v diastole a v systole (LVD_D, respektive LVD_S, left ventricle diameter, diastolic, respektive systolic). Z těchto rozměrů byl podle následující rovnice vypočítán funkční parametr frakční zkrácení (FS, fractional shortening): $FS [\%] = 100 \times (LVD_D - LVD_S) / LVD_D$.

4.6. Izolace DNA a genotypizace

Pro zjištění genotypu odstavených myší byla odebrána část ocasní tkáně k izolaci DNA metodou vysrážení izopropanolem z vodného roztoku. Tkáň byla přes noc inkubována s 600 μ l lyzačního pufru (50 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS (w/v), pH 8,0) a 12 μ l proteinázy K ([20 mg/ml], Sigma-Aldrich, USA) v rotační hybridizační peci při 55 °C. Zlyzovaná tkáň byla vortexována a následně centrifugována 12 min při 14 000 g, 18 °C. Supernatant byl přenesen do čisté sterilní mikrozkušavky. K supernatantu bylo přidáno 600 μ l izopropanolu a pomalým převrácením mikrozkušavky byla vysrážena DNA. Po centrifugaci 1 min při 14 000 g, 18 °C byla peleta odsolena v 500 μ l 70% (v/v) ethanolu a následně odvodněna 500 μ l absolutního ethanolu. Peleta DNA byla vysušena a následně rozpouštěna přes noc v termostatu při 55 °C v 50 μ l vody. Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru N1000 (NanoDrop Technologies, USA) při 260 nm a měření bylo vyhodnoceno pomocí počítačového programu ND-1000 V.3.3.0 (NanoDrop Technologies, USA).

Genotypizace byla prováděna pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction) (Dalgaard *et al.*, 2016) za použití specifických primerů umožňujících detekci alely *Hif1a^{tm1jhu}*. Primery detekují vložený gen pro rezistenci k neomycinu. Reagencie pro PCR a sekvence primerů *Neo-R* a *Neo-F* jsou uvedeny v tabulce č. 1. Celkový objem reakční směsi byl 20 μ l.

Tabulka č. 1: Složení PCR reakční směsi

Složka	V [μ l]
PCR mastermix 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load with 10 mM MgCl ₂ (04-25-02020, Solis BioDyne, Německo)	4
primer <i>Neo-F</i> : 5' ACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTG 3' (10 μ M)	1
primer <i>Neo-R</i> : 5' GTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAG 3' (10 μ M)	1
voda	13
DNA	1,0

PCR reakce probíhala v termocyklerech BIOER (Genepro, Čína) a Biometra TRIO (Analytik Jena, Německo) podle protokolu uvedeného v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Schéma PCR reakce

Krok	Teplota [°C]	Doba [min]	Opakování
aktivace polymerázy	95	5	1
denaturace DNA	95	0,5	34
nasedání primerů	63	0,5	
elongace	72	0,5	
konečná elongace	72	5	1

Produkty PCR reakce byly detekovány pomocí horizontální elektroforézy na 2% (w/v) agarózovém gelu s přidavkem ethidia bromidu (0,01 µl/ml) v 0,5x TBE pufru (45 mM Tris, 45 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA, pH 8,0). Jako velikostní marker byl použit GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas, Kanada). Elektroforéza byla prováděna při konstantním napětí 130 V. PCR produkty byly vizualizovány pod UV světlem.

Pozitivní výsledek PCR reakce představuje genotyp *Hif1a*^{+/-} a negativní výsledek představuje genotyp *Hif1a*^{+/+}, příklad agarózového gelu je na obrázku č. 11.



Obrázek č. 11: Produkty PCR genotypizace vizualizované na agarózovém gelu

Pozitivní signál představuje genotyp *Hif1a*^{+/-}, negativní signál představuje genotyp *Hif1a*^{+/+}
M: velikostní marker 50 bp, 1 – 6: vzorky DNA, P: pozitivní kontrola, N: negativní kontrola

4.7. Izolace RNA z embryonální tkáň

K izolaci embryonální RNA metodou fenol/chloroformové extrakce byla použita celá embrya ve věku E8,5 a embryonální srdce stará E9,5 – E18,5.

V Trizolu (Trizol Reagent, Invitrogen, USA) zmrazené vzorky byly rozpuštěny a poté homogenizovány pomocí sterilní jehly. Zhomogenizovaná tkáň byla 3 x temperována 3 min při 55 °C a vortexována. Do každé zkumavky byl přidán chloroform v množství odpovídající 1/5 objemu Trizolu, ve kterém byl vzorek homogenizován. Vzorky byly promíchány převrácením 3 x 15 s a poté inkubovány 5 min při pokojové teplotě a následně centrifugovány 15 min při 14 000 g, 4 °C. Po centrifugaci byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující RNA

a přenesena do čisté mikrozkušavky. K vodné fázi bylo přidáno 0,5 µl glykogenu (G1767-1VL, Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 20 mg/ml a izopropanol vytemperovaný na -20 °C v množství odpovídající 1/2 objemu Trizolu, ve kterém byl vzorek homogenizován. Převrácením mikrozkušavky byla vysrážena RNA a vzorky byly inkubovány 30 min v -80 °C. Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány 10 min při 14 000 g, 4 °C. Získaná peleta byla promyta v 500 µl 75% (v/v) ethanolu vytemperovaném na -20 °C a centrifugována 5 min při 7 500 g, 4 °C. Kroky promytí a centrifugace byly opakovány 3 x. Peleta byla ponechána v 75% (v/v) ethanolu a uskladněna v -80 °C.

4.8. Izolace RNA z LV dospělých srdcí

Srdce určená pro izolaci RNA nebyla promyta, aby byla minimalizována možnost degradace RNA. Pod stereomikroskopem byla oddělena LV od zbytku srdce a přenesena do 1 ml Trizolu (Trizol Reagent, Invitrogen, USA) a uložena v -80 °C. V den izolace byly vzorky rozmrazeny a tkáň byla důkladně zhomogenizována elektrickým homogenizátorem, poté byly vzorky ponechány 30 min při pokojové teplotě a stočeny 15 min při 12 000 g a 2 °C. Ke staženému supernatantu bylo přidáno 0,2 ml chloroformu a vzorky byly promíchány na vortexu. Po 5 min stání při pokojové teplotě byly vzorky stočeny 15 min při 12 000 g a 2 °C a byla odebrána vodná fáze, ke které bylo přidáno 0,5 ml izopropanolu vytemperovaného na -20 °C a jemným mícháním byla vysrážena RNA. Po 10 min stání při pokojové teplotě byly vzorky stočeny 10 min při 12 000 g a 2 °C. Peleta byla 3 x promyta v 0,5 ml 75% (v/v) ethanolu vytemperovaného na -20 °C a uložena v posledním oplachovém roztoku do -80 °C.

4.9. Reverzní transkripce RNA

Metoda reverzní transkripce umožňuje přepis sekvence RNA do sekvence kódující DNA (cDNA) za pomoci enzymu reverzní transkriptázy.

Mikrozkušavka s peletou RNA v 75% (v/v) ethanolu byla centrifugována 5 min při 7 500 g, 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant slit a peleta byla vysušena. RNA byla rozpouštěna 20 min ve 12 µl nebo 100 µl vody v závislosti na tom, pocházela-li RNA z embryonálního, nebo dospělého srdce. K rozpuštěné RNA byl přidán 1 µl DNasy (1 u/µl, #EN0525, Fermentas) pro odstranění možné kontaminace DNA. DNasa působila 30 min při 37 °C a poté byla inaktivována přidáním 1 µl EDTA a působením 65 °C, 10 min. Koncentrace RNA byla změřena pomocí spektrofotometru N1000 (NanoDrop Technologies, USA) při

vlnové délce 260 nm a měření bylo vyhodnoceno pomocí počítačového programu ND-1000 V.3.3.0 (NanoDrop Technologies, USA).

Tabulka č. 3: Složení reakční směsi pro 2-krokovou reverzní transkripci

	Reagencie	Množství (celkový objem 12 μl)
1. krok	RNA	500 ng
	primer: oligo(dT) ₁₈ (0,5 μ g/ μ l)	1 μ l
	primer: náhodné hexamery (0,2 μ g/ μ l)	1 μ l
	Voda	doplněno do 12 μ l
	Reagencie	Množství (celkový objem 20 μl)
2. krok	5x reakční pufr	4 μ l
	RiboLock RNAs Inhibitor (20 u/ μ l)	1 μ l
	dNTP Mix (10mM)	2 μ l
	RevertAid H Minus M-MuLV reverzní transkriptáza (200 u/ μ l)	1 μ l

Pro reverzní transkripci byly použity termocyklery BIOER (Genepro, Čína) a Biometra TRIO (Analytik Jena, Německo).

Reverzní transkripce RNA izolované z embryonálních srdcí probíhala ve 2 krocích za použití RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit (Fermentas, Kanada). V prvním kroku byla RNA inkubována s primery 5 min při 65 °C. Složení reakční směsi ukazuje tabulka č. 3. Během inkubace došlo k denuraci sekundárních struktur RNA. Po ukončení inkubace byla směs rychle ochlazená na ledu, v této fázi došlo k nasednutí primerů na RNA. Ve 2. kroku reverzní transkripce byla syntetizována cDNA v reakční směsi podle tabulky č. 3 při teplotě 42 °C po dobu 60 min s následnou inkubací při teplotě 70 °C, 5 min.

Reverzní transkripce RNA izolované z LV srdcí dospělých myší probíhala v 1 kroku za použití TATAA GrandScript cDNA Supermix (TATAA Biocenter AB, Švédsko). Do reakce byly pipetovány 4 μ l reakčního mixu obsahující 5x koncentrovaný roztok pufru, MgCl₂, oligo(dT) primery a náhodné primery, dNTP, inhibitor RNasy, reverzní transkriptázu a stabilizátory. Objem přidávané vody byl dopočítán tak, aby bylo jejím přidáním k 1 μ g RNA získáno 16 μ l a celkový objem reakční směsi měl 20 μ l. Reakční směs byla inkubována v termocykleru 5 min při 25 °C, 30 min při 42 °C, 5 min při 85 °C a poté byla zchlazená.

Získaná cDNA z obou reakcí byla naředěna vodou 20 x a uložena při -80 °C.

Tabulka č. 4. Sekvence primerů pro qPCR

Název genu	Sekvence (5'→3')
<i>Hprt1</i> 996 F	GTTGGGCTTACCTCACTGCT
<i>Hprt1</i> 996 R	TCTACCAGAGGGTAGGCTGG
<i>Hprt1</i> F	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG
<i>Hprt1</i> R	CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT
<i>Adam10</i> F	AAGCAGTGCAGTCCGAGTCAA
<i>Adam10</i> R	GGATCAGATGCTGGGCAAAG
<i>Axl</i> F	CATCCTCAAGGTCGCTGTGA
<i>Axl</i> R	CATGACGTTGGGGTGGTCAA
<i>Baz1b</i> F	GTTTGAGGCCCGGGTTCAT
<i>Baz1b</i> R	CTGCTTAGGCGCCATAAATCC
<i>Ccl9</i> F	AGCCTTTTCATACTGCCCTCT
<i>Ccl9</i> R	CAATTTCAAGCCCTTGCTGTG
<i>Cd248</i> F	GCAGCCTTACAGGGGTACAG
<i>Cd248</i> R	TGTGGTCTCAGCCATGTGTC
<i>Cd36</i> F	GCTCGTTTCAACTCTCACACAC
<i>Cd36</i> R	TACGTGGCCCGGTTCTACTA
<i>Cfp</i> F	CCATGTAGTCCCAACGCCAC
<i>Cfp</i> R	TCTCACCTGACCTTCAACC
<i>Ctss</i> F	CGCCAGCCATTCCCTCCTT
<i>Ctss</i> R	ATGATTACATTGCCCGTACAG
<i>Cxadr</i> F	CCTGGGGTTGCAAATAAGAA
<i>Cxadr</i> R	GATCCATCCACGAAGCATCT
<i>Efnb2</i> F	AGATGCAAGTTCTGCTGGATCAG
<i>Efnb2</i> R	TGCCATCGGTGCTAGAACCT
<i>Fbn1</i> F	GCAGAAACACGATTGGCTCC
<i>Fbn1</i> R	GTTCCCGTTTCCAGTTGCAC
<i>Flt1</i> F	GAGGAGGATGAGGGTGTCTATAGGT
<i>Flt1</i> R	GTGATCAGCTCCAGGTTTGACTT
<i>Herc3</i> F	TTGAAGGAACTGTCACCAACTG
<i>Herc3</i> R	TGTCTTCACCGGGTAATCT
<i>Icam</i> F	GAGACGCAGAGGACCTTAACA
<i>Icam</i> R	ACAGTACTTGGCTCCCTTCC
<i>Il6st</i> F	GTTCTGATCCTTCCAAGAGTCAT
<i>Il6st</i> R	CACAACGCTTACATCAGTGAAATTG

Tabulka č. 4. pokračování

Název genu	Sekvence (5' → 3')
<i>Itgav</i> F	TTCGCCGTGGACTTCTTC
<i>Itgav</i> R	CTGGGTCGTGTTTCGCTTT
<i>Kdm3a</i> F	GGAATGTCAACAAGGAGAATAA
<i>Kdm3a</i> R	TTGTTTCAGAGGGGGCAAG
<i>Ldha</i> F	GCACTGACGCAGACAAGG
<i>Ldha</i> R	TGATCACCTCGTAGGCACTG
<i>Lrp1</i> F	ACTGGACTAACTGGCACACG
<i>Lrp1</i> R	CGATACCCCTCGGCATCTTC
<i>Msr1</i> F	GGAAGTGGATAAATCAGTGCT
<i>Msr1</i> R	CCTCTTGTTTCATGAGGGCAGA
<i>Mylk3</i> F	ACTTTGGTAGGGTCCACATTCC
<i>Mylk3</i> R	CTAGAGGCGTCAGCTTGCAC
<i>Pdgfra1</i> F	GTCCCATGCTTGAAAGGAA
<i>Pdgfra1</i> R	CATCGTCCGAAAGGAGGTTTT
<i>Pi16</i> F	TGGCACGAGGAGCATGAGTA
<i>Pi16</i> R	GGGAGCCACAGCCAATTCTC
<i>Tgfb1</i> F	GCTGAACCAAGGAGACGGAA
<i>Tgfb1</i> R	ATGTCATGGATGGTGCCAG
<i>Tgfb1</i> F	CGCGCTGACATCTATGCAAT
<i>Tgfb1</i> R	AGGTACAAGATCATAATAAGGCAACTGA
<i>Tgfb2</i> F	CGATTACATCATCTTTTCGGAAG
<i>Tgfb2</i> R	TGGACACGGTAGCAGTAGAAGA
<i>Timp1</i> F	GGCATCTGGCATCCTCTTGT
<i>Timp1</i> R	TGGTCTCGTTGATTTCTGGGG
<i>Vegfa</i> F	ACTGGACCCTGGCTTTACTG
<i>Vegfa</i> R	TGGGACTTCTGCTCTCCTTC

4.10. Návrh primerů

Sekvence primerů byly navrženy pomocí nástroje Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a Primer Blast tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) tak, aby jejich délka byla 18 – 24 nukleotidů, teplota tání mezi 58 a 60 °C, obsah guaninu a cytosinu 40 – 60 %. Pro vyloučení amplifikace potenciální kontaminace genomickou DNA byly primery navrženy na rozhraní dvou exonů.

Účinnost jednotlivých párů primerů byla stanovena pomocí ředící řady PCR produktu. Testovaný pár primerů byl použit pro PCR se stejnými reagensy a podmínkami jako kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR, quantitative real-time PCR). 2 µl produktu reakce

byly použity pro výchozí roztok ředící řady ve výsledném objemu 200 μ l (ředění 100x). Z výchozího roztoku byla vytvořena ředící řada s ředěním 10x. Ředění 10^6 – 10^9 byly použity pro qPCR s testovaným primerem podle standardního protokolu v technických duplikátech. Výsledná účinnost byla vypočítána pomocí programu Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Biorad, USA). Pro qPCR byly použity pouze primery s účinností vyšší než 80 %.

4.11. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Pomocí metody qPCR bylo zjišťováno relativní množství molekul daného genu přepsaných z DNA do RNA. Jako templát pro qPCR byla použita získaná cDNA. Množství cDNA sledovaných genů bylo normalizováno k množství cDNA konstitutivně exprimovaného genu *Hprt1* (*hypoxanthine - guanine phosphoribosyltransferase 1*), který byl vybrán jako nejlepší referenční gen z panelu 12 kontrolních genů (TATAA Biocenter AB, Švédsko).

Použité primery pro qPCR vybraných genů jsou uvedeny v tabulce č. 4. Reakce probíhala v termocykleru s detekčním systémem pro real time PCR: CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad, USA) podle schématu uvedeného v tabulce č. 6. Pro analýzy embryí byl použit SYBR®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, USA), pro analýzy srdcí dospělých myši byl použit TATAA SYBR® GrandMaster® Mix (TATAA Biocenter AB, Švédsko). Reakční směs byla připravena podle tabulky č. 5.

Tabulka č. 5: Reakční směs pro qPCR

Reagencie	Objem [μ l]
cDNA, 20 x	4
primer F (10 μ M)	0,25
primer R (10 μ M)	0,25
voda	0,5
2x Syber®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™/2x TATAA SYBR® GrandMaster® Mix	5

Z výsledků qPCR byly pomocí programu Bio-Rad CFX Manager 3.0 vypočítány hodnoty C_q (přechodový bod, crossing point). Z technických duplikátů byly vypočítány průměrné hodnoty C_q, které byly normalizovány ke kontrolnímu genu *Hprt1* podle vzorce: $\Delta Cq = Cq_{gen} - Cq_{Hprt1}$.

Relativní změna exprese genu byla určena na základě účinnosti (E) reakce qPCR a difference (Δ) přechodového bodu (C_q) experimentálního vzorku vůči kontrole podle vzorce č. 1.

Hodnoty získané pomocí PCR byly analyzovány programem GenEX5 (<http://www.multid.se/genex/>, MultiD Analyses AB, Švédsko). Výsledné hodnoty pocházející z analýz embryí byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, USA) dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem. Pro vyhodnocení výsledků analýz potomků diabetických matek byla použita dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA, Analysis of Variance) s následným post hoc Tukeyho-testem.

Tabulka č. 6: Schéma qPCR reakce

Krok	Teplota [°C]	Doba [s]	Počet opakování
aktivace polymerázy	95	600	1
denaturace	95	15	40
nasedání primerů + elongace	60	60 (embryonální vzorky)/ 30 (dospělá srdce)	

$$\text{relativní exprese} = \frac{E_{gen}^{\Delta Cq_{gen}} (\text{průměr kontrola} - \text{průměr EXP})}{E_{Hprt1}^{\Delta Cq_{Hprt1}} (\text{průměr kontrola} - \text{průměr EXP})}$$

Vzorec č. 1: Výpočet relativní exprese. Kontrola: nediabetický *wt*; EXP: diabetický *wt*, nediabetický *Hif1a*^{+/-}, diabetický *Hif1a*^{+/-}, ΔCq , difference přechodového bodu, E, účinnost reakce

4.12. Sekvence transkriptomu

Pro zjištění změn v transkriptomu potomků diabetických myší byla použita metoda sekvenace RNA (RNA-Seq). Celková frakce RNA byla izolována z LV 12 týdnů starých samců. Kvalita izolované RNA byla zkontrolována za pomoci kapilární elektroforézy (Bioanalyzer 2100, Agilent, USA). Funkční test sestával z reverzní transkripce s oligodT

primery a následné qPCR v reálném čase detekující 996 bp dlouhý produkt genu *Hprt1* detekovaný párem primerů uvedeným v tabulce č. 4 pod označením *Hprt1 996*. Tři vzorky RNA od každé skupiny, skládající se z biologických replikátů z různých vrhů, byly zaslány do Genomics Core Facility (EMBL Heidelberg, Německo), kde byly podle návodu od výrobce připraveny 3'-seq knihovny a provedeno sekvenování nové generace na přístroji Illumina NextSeq sequencer (HiSeq2000, Illumina, USA) při nastavení, které umožňuje jednosměrnou detekci 75 bp a indexů. Průměrný počet čtení byl 42 milionů (minimum 32 milionů a maximum 72 milionů), sekvence s nízkou kvalitou a indexy byly odfiltrovány pomocí TrimmomaticPE v. 0.36 (Bolger *et al.*, 2014) s nastavenými parametry: "CROP:75 HEADCROP:12 ILLUMINACLIP:~/TruSeq-PE3.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36". Ribozomální a mitochondriální RNA byly odfiltrovány pomocí SortMeRNA v. 2.1b (Kopylova *et al.*, 2012) za použití základního nastavení. Očištěná čtení (průměrný počet 28 milionů, minimum 20 milionů a maximum 48 milionů čtení) byla pomocí STAR v. 2.5.2b (Dobin *et al.*, 2013) přiřazena ke genomu *Mus musculus*, verze GRCm38 anotovaná verze M8. Tabulka počtů sekvencí byla vytvořena pomocí python script htseq-count v. 0.6.1p1, (Anders *et al.*, 2015) s nastaveným parametrem „-m union“. Nezpracovaná data byla uložena do veřejné databáze Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Seřazené sekvence byly analyzovány pomocí DESeq2 v. 1.15.51 (Love *et al.*, 2014) s nastavenými parametry: test = c("Wald"), fitType = c("parametric"), betaPrior = FALSE, full = ~ Condition, minReplicatesForReplace = 7, modelMatrixType = "standard", parallel = FALSE. Seznam odlišně exprimovaných genů (DEG, differentially expressed genes) byl vytvořen z genů, jejichž exprese byla signifikantně změněna (padj < 0.1) vůči alespoň jedné skupině.

Funkční klasifikace byla provedena pomocí on-line nástroje DAVID Functional Annotation tool (<https://david.ncifcrf.gov/>). Pro vytvoření Vennova diagramu byly použity DEG, jejichž exprese byla změněna alespoň o 30 % ve srovnání s *wt* potomky nediabetických matek. Analýza obohacení transkriptomu o specifické procesy byla v jednotlivých skupinách provedena pomocí g:GOST Gene Group Functional Profiling; g:Profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>). Pro analýzu obohacení transkriptomu ve skupině *Hif1a*^{+/-} potomků diabetických matek o savčí fenotypové termíny byl použit on-line nástroj Mammalian phenotype ontology enrichment analysis of MGI (www.informatics.jax.org). Pro

identifikaci přímých a předpokládaných cílových genů signalizace HIF-1 byla provedena analýza literatury a databáze Harmonizome (Rouillard *et al.*, 2016).

4.13. Histologická analýza

4.13.1. Příprava parafinových řezů

Pro histologickou analýzu byla izolovaná embrya a perfuzovaná srdce fixována ve 4% (w/v) PFA. Následně byla tkáň omyta v PBS 1x pufru pro odstranění fixativa z tkáně, odvodněna ethanolovou řadou (25%, 50% a 70% (v/v) ethanol), převedena do xylenu a prosycena parafinem. Odvodnění, převedení do xylenu a prosycení parafinem proběhlo v odvodňovacím tkáňovém automatu ASP 200 (Leica, Německo). Vzorky byly poté zalévány do parafínu pomocí zalévacího automatu EG 1150 (Leica, Německo). Parafinové bločky byly krájeny pomocí mikrotomu RM2255 (Leica, Německo) na řezy o tloušťce 7 μm (embrya) a 8 μm (dospělá srdce). Jednotlivé řezy byly napínány na hladině vodní lázně vytemperované na 39 °C a přenášeny na podložní skla s nábojem (Superfrost® PLUS, Thermo scientific, USA). Konečná fixace řezů na sklech byla provedena inkubací na vyhřívaném napínacím stolku při 42 °C.

4.13.2. Příprava vibratomových řezů

Perfuzovaná srdce byla po fixaci 4% (w/v) PFA omyta v PBS 1x a zalita do 4% (w/v) agarózového gelu. Zalitá srdce byla ponechána 20 min při 55 °C, aby došlo k prosycení tkáně. Po ztuhnutí byly bločky vychlazeny při 4 °C a ponořené v PBS 1x krájeny na vibratomu VT1000 S (Leica, Německo) na 100 μm tlusté řezy. Řezy byly skladovány v 0,4% (w/v) PFA při 4 °C.

4.13.3. Barvení hematoxylin-eosinem

Před barvením byly řezy zbaveny parafínu omýváním v xylenu (15 min) a poté alkoholovou řadou (100%, 96%, 90%, 80% a 70% ethanol, po 5 min) převedeny do destilované vody. Po odparafinování byly řezy barveny hematoxylin-eosinem dle schématu, které je uvedeno v tabulce č. 7. Po odvodnění tkání v alkoholové řadě (70%, 80%, 90% a 96% ethanol po 10 s, 100% ethanol 5 min) a převedení do xylenu (2 x 3 min) byly připraveny trvalé preparáty nanesením DPX „Mountant for histology“ (Sigma-Aldrich, USA) a přiložením krycího skla.

Tabulka č. 7: Schéma barvení H-E

Číslo kroku	Činidlo	Čas
1	hematoxilin	40 s
2	tekoucí voda	5 min
3	kyselý ethanol	5 s
4	voda z vodovodu	5 min
5	eosin	5 s
6	destilovaná voda	10 s

Obarvené transversální řezy hrudníkem embryí E14,5 byly použity k analýzám embryonálního srdce a derivátů OFT za pomoci světelného mikroskopu Nikon Eclipse 50i (Nikon, Japonsko). Počty defektů byly statisticky porovnány Fisherovým testem v programu GraphPad Prism 5.04.

Obarvené sagitální řezy embryí E14,5 byly použity k vyhodnocení relativní velikosti orgánů k tělu za pomoci světelného mikroskopu Nikon Eclipse 50i (Nikon, Japonsko) a programu NIS-elements podle (van Dijk *et al.*, 2016). Od každého ze 3 embryí ve skupině byly analyzovány 2 po sobě jdoucí řezy.

4.13.4. Biochemická detekce kolagenu

Kolagen v myokardu byl detekován pomocí Picosirius Red Stain Kit (24901-250, Polysciences, USA), který detekuje kolagen typu I a III (Rittie, 2017). Transversální parafinové řezy srdcem 12 týdnů starých potomků diabetických matek byly odparafinovány v xylenu (15 min) a alkoholovou řadou (100%, 96%, 90%, 80% a 70% ethanol, po 5 min) převedeny do destilované vody. Jádra byla obarvena hematoxylinem (5 min hematoxylin, 5 min oplach tekoucí vodou), skla byla opláchnuta v destilované vodě. Poté byly řezy kývány 2 min v kyselině fosfomolybdenové, opláchnuty destilovanou vodou a 60 min kývány v barvicím roztoku „Picosirius Red F3BA Stain“. Následně byly řezy 2 min v 0.1 N kyselině chlorovodíkové, opláchnuty v 70% (v/v) ethanolu a po dehydrataci v alkoholové řadě (70%, 80%, 90% a 96% ethanol po 10 s, 100% ethanol 5 min) a převedení do xylenu (2 x 3 min) byly připraveny trvalé preparáty nanesením DPX „Mountant for histology“ (Sigma-Aldrich, USA) a přiložením krycího skla.

4.13.5. Biochemická detekce pokročilých produktů glykace

Pokročilé produkty glykace byly u 12 týdnů starých myši detekovány pomocí barvení kyselinou perjodistou a Schiffovým činidlem (Periodic Acid-Schiff (PAS) Kit, 395B, Sigma-

Aldrich, USA). Odparafinované řezy (xylen 15 min) byly alkoholovou řadou (100%, 96%, 90%, 80% a 70% ethanol, po 5 min) převedeny do deionizované vody, kde byly 15 min oplachovány, následně byly 5 min inkubovány s kyselinou perjodistou a 3 x 5 min oplachovány v deionizované vodě. Následovalo 15 min barvení Schiffovým činidlem, 5 min oplachování pod tekoucí vodou, 60 s barvení hematoxylinem a 5 minut oplach pod tekoucí vodou. Po odvodnění řezů v alkoholové řadě (70%, 80%, 90% a 96% ethanol po 10 s, 100% ethanol 5 min) a převedení do xylenu (2 x 3 min) byly připraveny trvalé preparáty nanesením DPX „*Mountant for histology*“ (Sigma-Aldrich, USA) a přiložením krycího skla.

4.13.6. Detekce apoptózy v tkáni

Detekce apoptotických buněk byla provedena enzymatickým značením zlomů DNA pomocí terminální deoxynukleotidyl transferázy, která přidává na konce DNA modifikované nukleotidy (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling, TUNEL, #1684795, Roche). Transversální parafinové řezy 12 týdnů starými srdci potomků diabetických matek byly odparafinovány pomocí xylenu a převedeny alkoholovou řadou do PBS 1x. Poté byly vzorky inkubovány při 37 °C ve vlhké komůrce s proteinázou K (20 mg/ml, EO0492, Fermentas) v 10 mM-tris-HCl, pH 8. Jako pozitivní kontrola byl použit řez inkubovaný 12 min při pokojové teplotě s 1,5 µl DNasy I (1 u/µl, #EN0525, Fermentas) v 50 µl reakčního pufru s MgCl₂ a 450 µl Sigma vody. Poté byly řezy 2 x 15 min omyty v PBS 1x. Pro samotnou reakci byl namíchán čerstvý reakční roztok ve složení 5 µl Tunel-Enzyme a 45 µl Tunel-Label na 1 sklo. Vzorky s reakčním roztokem byly inkubovány 60 min v temnu při 37 °C. Jako negativní kontrola byl použit řez inkubovaný s Tunel-Label roztokem bez Tunel-Enzyme. Jádra byla obarvena Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, USA). Apoptotické buňky byly v jednotlivých částech srdce (LV, RV a septum) manuálně počítány ve 3 po sobě jdoucích řezech od každého ze 4 jedinců na skupinu za použití fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse 400 (Nikon, Japonsko). Celé řezy byly vyfoceny s pomocí fluorescenčního stereomikroskopu Leica MZFLIII (Leica, Německo) a plocha jednotlivých částí srdce byla změřena pomocí programu NIS Elements D 3.2 (Nikon, Japonsko). Počty apoptotických buněk byly normalizovány k ploše.

4.13.7. Imunohistochemie parafinových řezů

Odparafinované řezy byly převedeny alkoholovou řadou do PBS 1x, pH 7,4 a omyty 2 x 15 min. Poté byla provedena tepelná indukce obnovení antigenů. Řezy byly 20 min vařeny v tlakovém hrnci v citrátovém pufru 1x, pH 6. Pouze řezy určené pro detekci PECAM1 byly vařeny v Tris-EDTA pufru (10mM Tris Base, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0). Po vyjmutí z tlakového hrnce byly vzorky 15 min omývány v PBT (PBS 1x, 0,1% Tween) a 60 min předinkubovány při pokojové teplotě ve vlhké komůrce v blokačním roztoku (kozí sérum v PBT, 1:10). Poté byla aplikována primární protilátka zředěná v blokačním roztoku (anti-VEGFA, zředění 1:50, #sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, anti-WT1, zředění 1:200, #CA1026, Calbiochem a anti-PECAM-1, zředění 1:50, Ab28364, Abcam). Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při 4 °C.

Druhý den byly řezy omyty v PBT (0,1% Tween, PBS 1x), 3 x 10 min při pokojové teplotě a 90 min inkubovány v temnu při pokojové teplotě se sekundární protilátkou zředěnou v blokačním roztoku 1:500 (Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 115-545-146, Jackson ImmunoResearch, Alexa Fluor® 594 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 111-585-144, Jackson ImmunoResearch). Po skončení inkubace byly řezy opláchnuty 3 x 12 min v PBT, zamontovány do montovacího media DAPI Fluoromount-G™ (#17984-24, Electron Microscopy Sciences, USA) a analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse 400 (Nikon, Japonsko) a konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 880 (Zeiss, Německo). Změny v expresi byly kvantifikovány pomocí programu NIH ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) (Schneider *et al.*, 2012)).

4.13.8. Detekce hypoxických oblastí v tkáni

Diabetickým a nediabetickým samicím byl 10 dní po nalezení vaginální zátky intraperitoneálně podán Pimonidazole HCl (Hypoxyprobe, USA) v množství 60 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Samice byly usmrceny 2 hod po podání Pimonidazole HCl a byla izolována embrya ve věku E10,5, která byla přes noc při 4 °C fixována ve 4% PFA v PBS 1x, pH 7,4 a podle standardního protokolu zalita do parafínu a na mikrotomu RM2255 (Leica, Německo) nakrájena na 7 µm tlusté řezy. Hypoxické oblasti byly detekovány pomocí imunohistochemické reakce (podle protokolu v kapitole 4.13.7. Imunohistochemie parafinových řezů) s primární protilátkou proti Pimonidazole HCl (CCI-103F, Hypoxyprobe, USA) ve zředění 1:250. Jádra byla obarvena Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, USA).

4.13.9. Imunohistochemie vibratomových řezů

Vibratomové řezy byly odtučněny v 70% ethanolu, 1 hod a rehydratovány postupným ředěním odtučňovacího roztoku PBS 1x (1:1, 3 x 30 min) a následnou inkubací s PBS 1x, 30 min. Rehydratované řezy byly 1 hod, při pokojové teplotě blokovány v blokačním roztoku (2,5% kozí sérum, 0,5% Tween, PBS 1x). Následovala inkubace s primární protilátkou zředěnou v blokačním roztoku (anti-F4/80, zředění 1:500, MCA497R, Biorad), 3 dny, 4 °C.

Po inkubaci s primární protilátkou byly řezy omyty PBS 1x (6 x 30 min, při pokojové teplotě) a opět 1 hod, při pokojové teplotě blokovány v blokačním roztoku. Následovala inkubace se sekundární protilátkou zředěnou v blokačním roztoku (Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Rat IgG (H+L), zředění 1:400, 712-547-003, Jackson ImmunoResearch), která probíhala přes noc, v temnu při 4 °C.

Druhý den byly řezy omyty v PBS 1x, 5 x 30, jádra byla obarvena Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, USA). Po promytí PBS 1x (3 x 1 hod) byly řezy zamontovány pomocí antifade (21,2% (w/v) N-propylgalát, 0,2M Tris pufr pH 8, 90% (v/v) glycerol) a analyzovány pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 880 (Zeiss, Německo). Změny v expresi byly kvantifikovány pomocí programu NIH ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html> (Schneider *et al.*, 2012)).

4.13.10. Izolace proteinů

Pro izolaci celkové frakce proteinů byla použita metoda homogenizace tkáně v RIPA pufru s inhibitory proteáz a s inhibitory fosfatáz (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholát sodný, 1% NP40, 1 mM fenylmetansulfonyl fluorid, Protease Inhibitor Cocktail (P8340, Sigma-Aldrich, USA)). Embryonální srdce byla ihned po izolaci homogenizována v 25 µl pufru a uložena v -80 °C. LV komory z dospělých srdcí byly homogenizovány v množství RIPA pufru, které odpovídalo 1000 µl na 100 mg tkáně a 2 hodiny inkubovány na kývačce při 4 °C. Poté byly vzorky stočeny 15 min při 12 000 g a 4 °C, a uloženy v -80 °C. Před western blotem byla změřena koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích pomocí „Protein Assay Kit II“ (Bio-Rad, USA), dle protokolu výrobce. Koncentrace proteinů byla určena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm pomocí činidla Coomassie® Brilliant Blue G-250 podle Bradfordové (Bradford, M. M., 1976). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) (Bio-Rad, USA).

4.13.11. Western blot

Elektroforetické rozdělení proteinů izolovaných z embryonální a dospělých srdcí proběhlo v 8%, respektive v 10% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). K 25 µg embryonálních proteinů, respektive k 50 µg proteinů z dospělých srdcí v 10 µl bylo přidáno 10 µl Laemmli vzorkovacího pufru (Bio-Rad, USA). Takto připravené vzorky byly zahřáty na 99 °C po dobu 5 min, poté byly ochlazeny na 4 °C. Pro SDS-PAGE byla použita elektroforetická aparatura Mini PROTEAN® Tetra systém (Bio-Rad, USA). Na gel byly nanесeny vzorky a komerční proteinový standard (Bio-Rad, USA). Rozdělení proteinů probíhalo při 200 V po dobu 2 h v elektroforetickém pufru (Tris-glycin-SDS pufr 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný, pH 8,3).

Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu byl proveden v prostředí přenosového pufru (Tris-glycinový pufr, 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3) při 30 V po dobu 2 h v aparatuře Mini PROTEAN® Tetra systém. Po přenosu byla membrána obarvena barvicím roztokem Ponceau (Sigma-Aldrich, USA) a zdokumentována. Toto barvení slouží ke kontrole přenosu proteinů na membránu. Po dokumentaci byl barvicí roztok z membrány omyt oplachem 3 x 10 min v TBST (50 mM Tris, 150 mM chlorid sodný, 0,05% (v/v) Tween®20, pH 7,6). Dále byla membrána blokována po dobu 60 min v roztoku 5% (w/v) mléka v TBST. Po blokaci byla membrána inkubována přes noc s primární protilátkou při 4 °C (anti-HIF1α 1:750 (#NB100-105; Novus Biologicals), UK, anti-CX43 1:6000 (C6219, Sigma), anti-pCX43 1:1000 (3511, Cell Signaling) a anti-TNFR2 at 1:1000 (sc-7862, Santa Cruz Biotechnology)) v 5% (w/v) BSA v TBST). Poté byla membrána 3 x oplachována po dobu 10 min při 4 °C. Následovala inkubace se sekundární protilátkou (1:10000 „Anti-Mouse IgG-Peroxidasa“ (Sigma-Aldrich, USA) v 1% (w/v) mléce v TBST) po dobu 60 min při 4 °C, poté byla 3 x oplachována po dobu 10 min v TBST. Po ukončení omývání bylo na membránu nanесeno 750 µl chemiluminiscenčního substrátu komerční soupravy SuperSignal* West 300 Dura Chemiluminescent Substrate (#PIA34075; Thermo Scientific, USA) a SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (#34095; Thermo Scientific, USA) pro detekci proteinů embryonálního, respektive dospělého srdce. Postup odpovídal protokolu od výrobce. Chemiluminiscenční signál byl detekován a zdokumentován pomocí LAS4000 (GE Healthcare and Life Science, Švédsko). Intenzita signálu byla vyhodnocena denzitometricky v počítačovém programu ImageJ software

(<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Jako kontrola množství proteinů nanesených na gel, byl použit pro embryonální srdce β -actin (anti- β -actin, zředění 1:5000, #5125, Cell Signaling Technology, USA) a hodnota pozitivního signálu k němu byla vztažena. Pro kontrolu nanesených proteinů izolovaných z dospělých srdcí bylo použito barvení Ponceau (0,1% (v/v) ponceau v 1% (v/v) kyselině octové) (Lalli *et al.*, 2016, Lee *et al.*, 2016). Denzitometricky byly hodnoceny proteiny o velikosti 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa a 50 kDa. Takto získané hodnoty byly sečteny a součet byl použit k normalizaci množství proteinu, které bylo nanášeno na gel. Hodnota pozitivního signálu byla vztažena k tomuto součtu.

5. Výsledky

5.1. Změny během embryonálního vývoje

Pro studium vlivu maternálního diabetu na embryonální vývoj byl použit široce užívaný inbrední kmen FVB a model STZ indukovaného DM1 (Pavlinkova *et al.*, 2009, Salbaum *et al.*, 2011, Bohuslavova *et al.*, 2013). Pro porovnání vnějších morfologických změn ve vývoji diabetických a nediabetických embryí byla izolována embrya ve věku E10,5 až E18,5. Nebyl pozorován významný rozdíl mezi množstvím absorbovaných embryí v diabetických (15 %) a v nediabetických vrzích (12 %, $P = 0,5451$, Fisherův test), stejně tak nebyl diabetem ovlivněn průměrný počet embryí ve vrhu. Avšak, jak ukazuje obrázek č. 12, u diabetických embryí se již ve věku E10,5 vyskytovalo množství externě viditelných defektů, které zahrnovaly defekty nervové trubice (Obrázek č.12E, F), kardiovaskulární defekty projevující se krvácením a otoky (Obrázek č.12B, C, D, E) a opožděný vývoj (Obrázek č.12B). U embryí ve věcích E10,5, E12,5, E14,5 a E18,5 byl změřením temeno-kostrční délky ve všech skupinách detekován opožděný růst diabetických embryí (Tabulka č. 8). Relativní velikost srdce vůči tělu byla však u diabetických embryí v E14,5 větší, zatímco játra byla v porovnání k velikosti těla menší (Obrázek č. 13). Relativní velikost ledvin nebyla rozdílná.

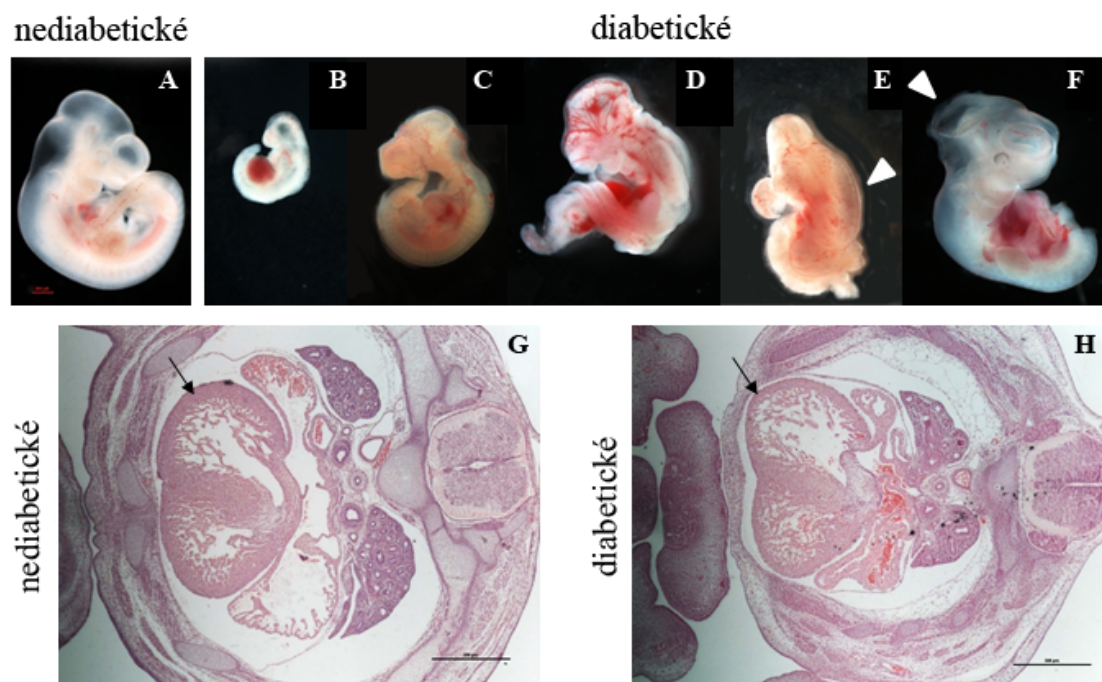
Tabulka č. 8: Změny v růstu embryí

věk	E10.5	E12.5	E14.5	E18.5
nediabetické	4.64 ± 0.09 N=28	8.96 ± 0.23 N=8	11.09 ± 0.10 N=22	20.83 ± 1.0 N=6
diabetické	4.11 ± 0.12 N=22	7.74 ± 0.17 N=15	10.38 ± 0.10 N=43	17.41 ± 0.34 N=6
t-test	P=0.0009	P=0.0004	P<0.0001	P=0.0075

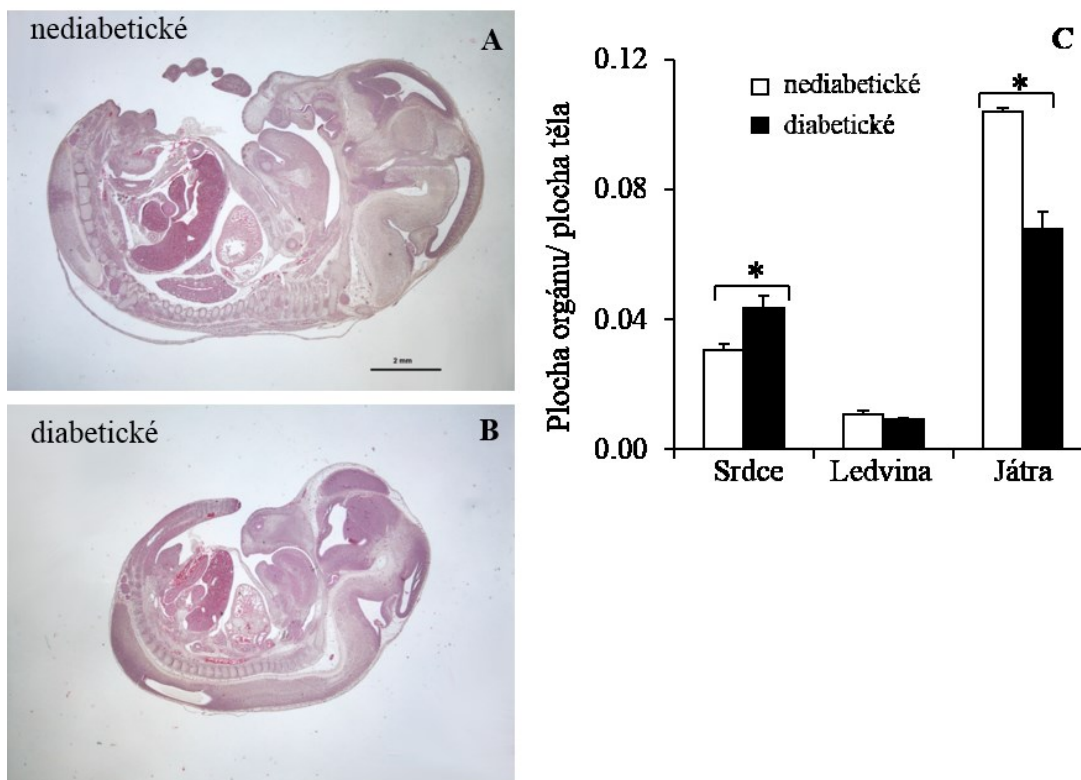
Změny v temeno-kostrční délce mezi nediabetickými a diabetickými embryi byly porovnány pomocí nepárového dvoucestného *t*-testu.

Již dříve publikovaná studie ukazuje, že kardiovaskulární defekty se vyskytují v diabetické embryopatii nejčastěji a projevují se krvácením, otoky a v některých případech také anémií (Bohuslavova *et al.*, 2013). V E14,5 jsou vytvořeny všechny struktury embryonálního srdce, včetně velkých cév a sept mezi komorami a síněmi (Savolainen *et al.*, 2009), byly proto analyzovány transversální řezy embryonálním hrudníkem právě v E14,5. U embryí vyvíjejících se v prostředí maternálního diabetu byly ve 28 % případů (5 embryí z 18

analyzovaných) detekovány defekty srdce, což je signifikantní navýšení oproti 15 nediabetickým embryím bez identifikovaného defektu srdce ($P = 0,048$, Fisherův test). Ve většině případů se jednalo o defekty IVS (80 %) (Bohuslavova *et al.*, 2013). Všechna srdce embryí vystavených maternálnímu diabetu měla ztenčenou vrstvu kompaktního myokardu v komorách (Obrázek č.12G, H).



Obrázek č.12. Morfologické změny u diabetických embryí starých E10,5 a E14,5. Porovnání embryí z nediabetických vrhů (A) s embryi z diabetických vrhů (B-F) v E10,5 ukazuje, že s maternálním diabetem byly nejčastěji spojeny kardiovaskulární defekty a defekty nervové trubice. Defekty nervové trubice se projevily jako poruchy uzavření trubice (E,F, šipka) a kardiovaskulární defekty se projevily krvácením (B, C, D) a otoky (E, šipka). Některá embrya byla viditelně růstově a vývojově opožděná (B). Transversální řez hrudníkem v E14,5 ukazuje, že diabetická embrya (H) měla oproti nediabetickým (G) ztenčený myokard (G, H, šipka). Měřítko představuje 2,5 mm (A-F) a 500 μm (G, H) (Bohuslavova *et al.*, 2015).



Obrázek č.13: Relativní velikost orgánů. Sagitální řezy nediabetickým (A) a diabetickým (B) embryem byly použity pro analýzu plochy jednotlivých orgánů a jejich porovnání vůči ploše těla v E14,5. Graf (C) ukazuje, že srdce bylo vlivem maternálního diabetu v porovnání k tělu zvětšené a játra byla zmenšená. Relativní velikost ledvin nebyla ovlivněna. Hodnoty v grafu ukazují průměr \pm SEM, N = 2 řezy/3 embrya ve skupině. Pro statistické vyhodnocení byl použit dvoucestný nepárový *t*-test: *, P < 0,05, měřítko: 2 mm (Bohuslavova *et al.*, 2015).

5.2. Maternálním diabetem indukované změny v embryonální genové expresi

Pro analýzy změn na molekulární úrovni bylo vybráno 11 genů, které se účastní transkripční modulace (*Baz1b*), regulace přenosu signálu (*Pdgfra*, *Tgfbr1*, *Adam10*, *Itgav*, *Cxadr*, *Efnb2*, *Il6st*, *Vegfa* a *Flt1*) a remodelace tkáně (*Ctss*). Analýza exprese v embryonálních stádiích od E10,5 do E18,5 umožnila sledování jednotlivých změn v čase (Obrázek č.15). Jednotlivé výsledky ukazují, že geny *Cxadr* a *Ctss* jsou maternálním diabetem ovlivněny relativně málo. Naproti tomu ostatní studované geny jsou výrazně deregulované, křivky ukazující změny v čase naznačují, že výkyvy objevující se v normálně se vyvíjejícím srdci jsou vlivem maternálního diabetu potlačeny. Specifickým případem je *Itgav*, jehož exprese v diabetickém srdci přibližně odpovídá profilu u normálně se vyvíjejícího se srdce, ale od E13,5 se změny

dějí o jeden den dříve. Grafické znázornění intenzity změn na obrázku č. 14 ukazuje vliv diabetu a je z něj patrné, že největší změny proběhly v E13,5, E14,5 a E18,5. Také ukazuje rozdělení genů do dvou skupin podle změn v jejich expresi. V jedné skupině jsou geny *Baz1b*, *Efnb2*, *Il6st*, *Tgfb1*, *Cxadr*, *Pdgfra*, *Itgav* a *Ctss*, ve druhé skupině pak jsou geny *Vegfa*, *Flt1* a *Adam10*. Zajímavé je, že všechny geny, které byly signifikantně změněné v diabetických srdcích, měly v E13,5 sníženou expresi a v E14,5 byla jejich exprese naopak navýšena (Obrázek č.16).

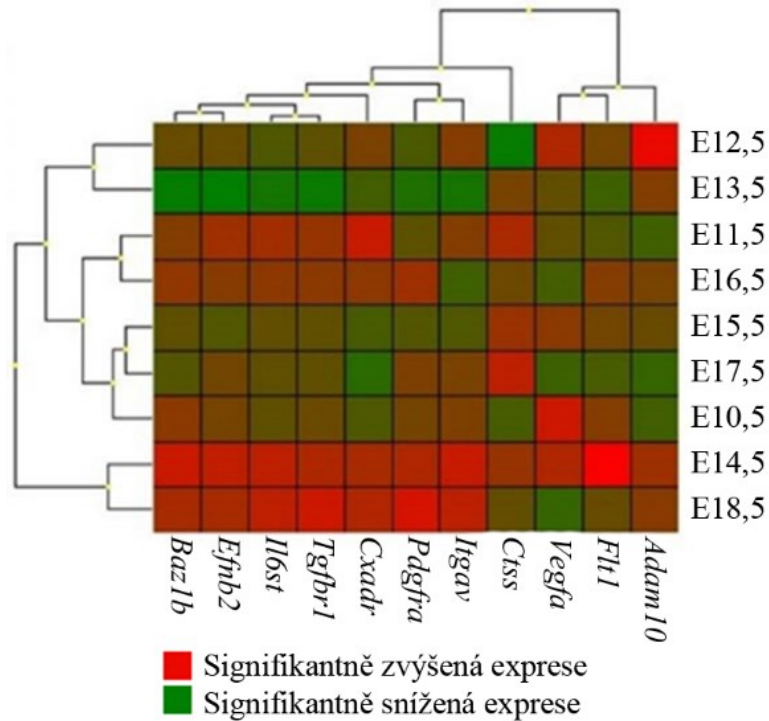
Analýza expresních změn v srdcích embryí s kardiovaskulárními defekty či dysfunkcemi v E14,5 (Obrázek č. 17) ukázala poněkud jiný obrázek. V těchto srdcích byly deregulovány také geny, které nebyly signifikantně změněny v srdcích stejně starých diabetických embryí bez detekovaných defektů, patří sem *Cxadr*, *Adam10*, *Ctss*, *Vegfa* a *Pdgfra*. Naopak beze změny byly geny *Baz1b*, *Il6st* a *Flt*. Kromě toho, geny deregulované v srdcích obou skupin diabetických embryí (*Efnb2*, *Tgfb1* a *Itgav*) měly sníženou expresi u embryí s kardiovaskulárními defekty, zatímco v srdcích diabetických embryí bez defektů byla jejich exprese navýšena. Nejvýraznější změna byla v expresi genu *Vegfa*, která byla navýšena a zároveň vykazovala variabilitu. Obrázek č.18 ukazuje, že embrya s nejmenšími externími defekty měla nejmenší změny v expresi *Vegfa*, zatímco embryo s 4,9 násobnou expresí (obrázek č. 19C) mělo největší otok a krvácení ukazující závažnou dysfunkci kardiovaskulárního systému.

Uvedené výsledky naznačují, že by změny v expresi *Vegfa* u diabetických embryí mohly souviset s kardiovaskulárními defekty, neboť jakákoli deregulace tohoto genu vede k embryonální letalitě v důsledku kardiovaskulárních defektů (Zhang *et al.*, 2016, Holler *et al.*, 2016, Karaca *et al.*, 2016) . Zároveň byla u tohoto genu jako u jediného detekována signifikantně změněná exprese v srdcích E10,5 starých embryí vystavených maternálnímu diabetu (Obrázek č.16). V pozdějších stádiích nebyla změna statisticky signifikantní. Z toho důvodu byly doplněny analýzy z předchozích věků (Obrázek č.18). V E8,5 byla exprese *Vegfa* vlivem diabetu snižena, nicméně analyzováno bylo celé embryo a tyto změny zahrnují také ostatní tkáň, zejména nervovou trubici. V srdci byla o den později, tedy v E9,5, exprese *Vegfa* vlivem diabetu velmi variabilní.

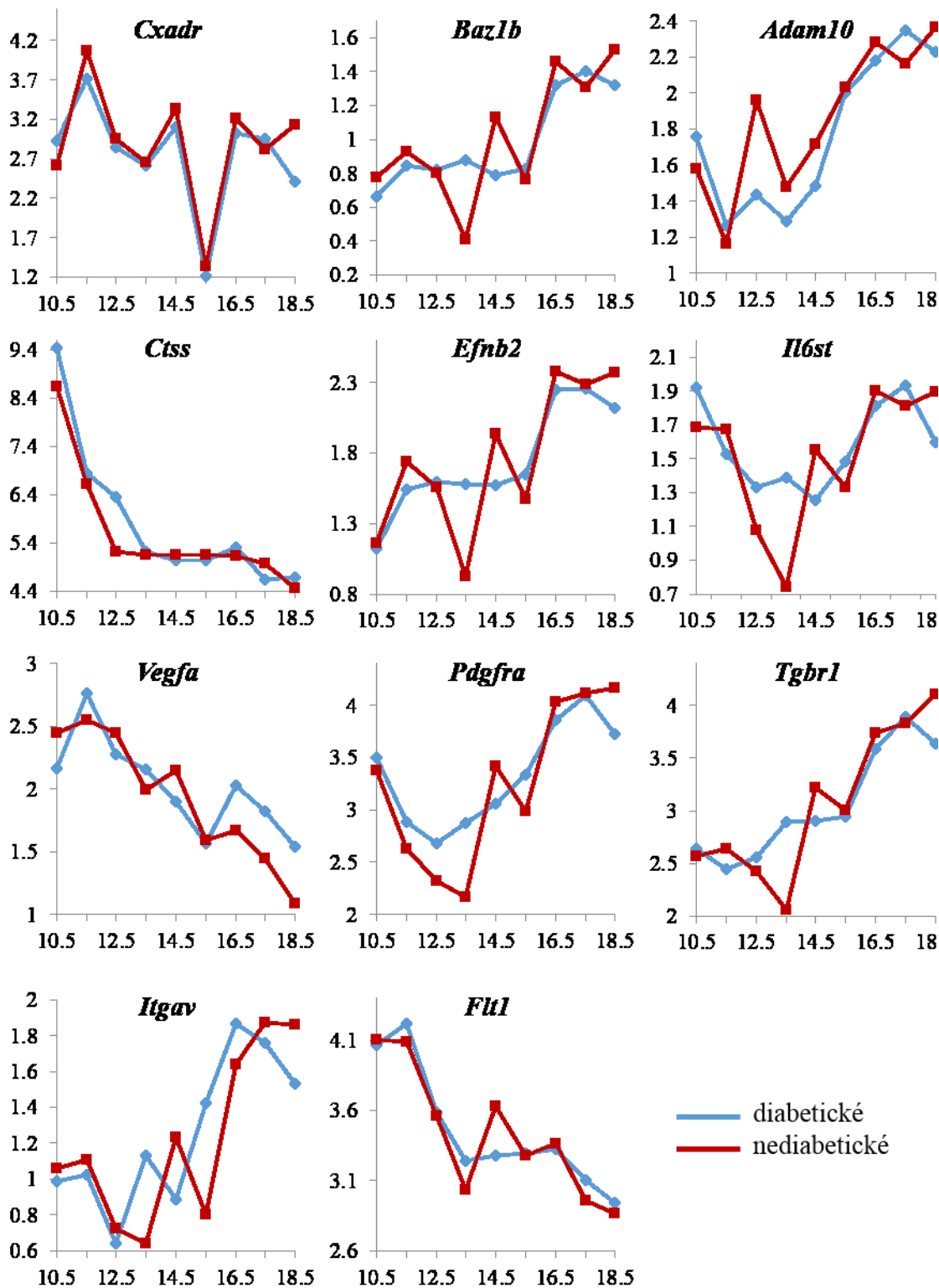
Jako další krok byla provedena imunohistochemická detekce VEGFA v srdci v E10,5, která potvrdila, že zvýšená exprese mRNA se překládá do proteinu (Obrázek č.20A-E). Jak

LV, tak RV byly analyzovány zvlášť, nicméně v obou komorách byl stejný trend. Nebyla detekována ani žádná specifická oblast se zvýšenou expresí VEGFA. Vzhledem k tomu, že mají diabetická embrya ztenčený myokard (Bohuslavova *et al.*, 2013), byl analyzován také WT1, který se účastní vývoje epikardu a epikardiální EMT. V expresi WT1 nebyly detekovány rozdíly (Obrázek č.20A, B, F).

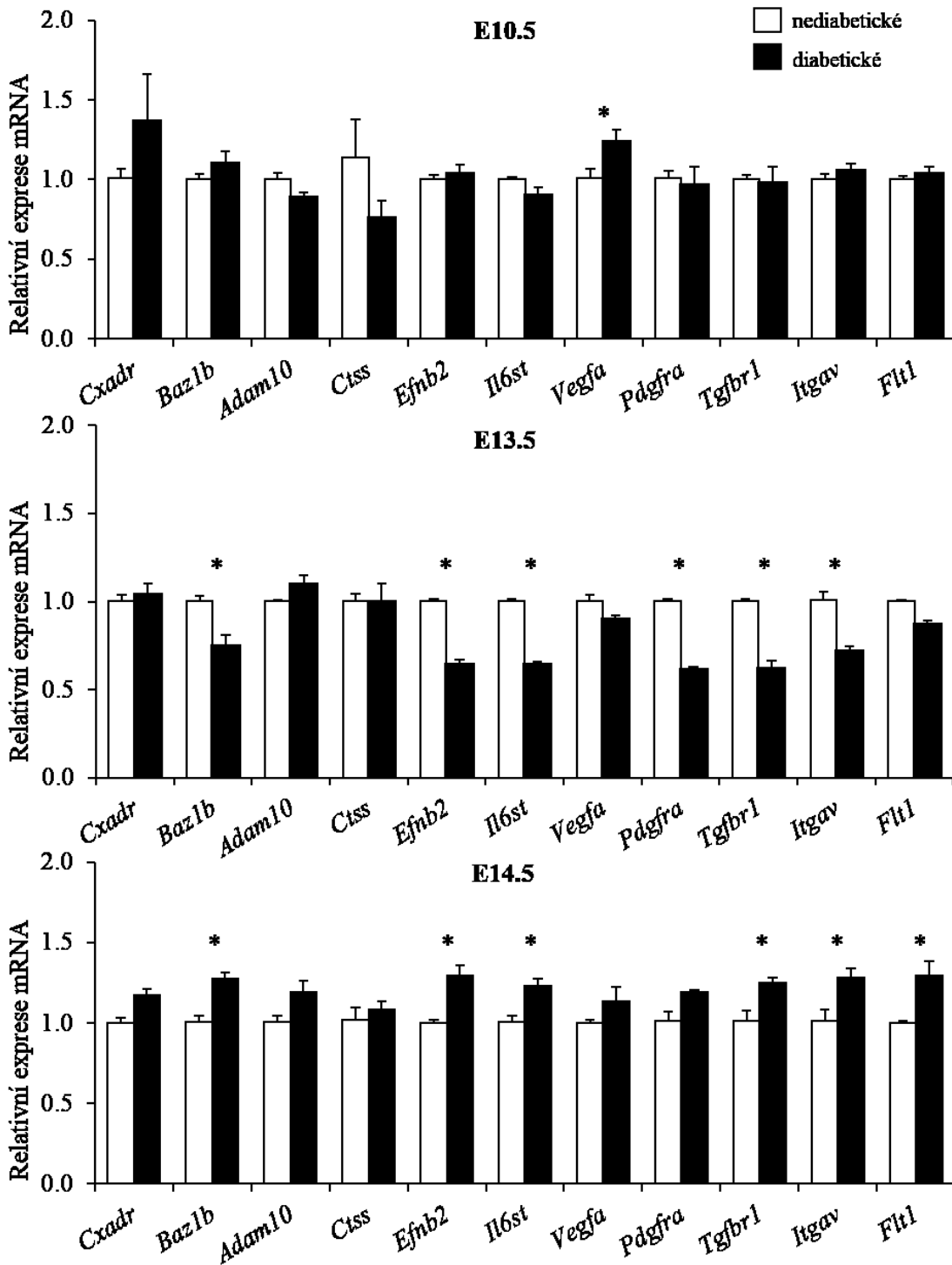
Jedním z hlavních regulátorů *Vegfa* je HIF-1, hlavní regulátor transkripčních odpovědí na hypoxii (Semenza, 2011). Hypoxie je dáována do souvislosti s patologickými změnami souvisejícími s diabetem (Williamson *et al.*, 1993), a signalizace HIF-1 je deregulována vlivem maternálního diabetu (Pavlinkova *et al.*, 2009, Bohuslavova *et al.*, 2013). Byla proto provedena detekce hypoxie v embryonálním srdci ve věku E10,5 (Obrázek č.21 A - C), která potvrdila navýšení hypoxie vlivem maternálního diabetu. Tomu odpovídaly i výsledky analýzy HIF-1 α , která byla provedena pomocí western blotu (Obrázek č. 21D, E). Jak hladina hypoxie, tak množství HIF-1 α jsou tedy v embryonálním srdci signifikantně navýšeny vlivem maternálního diabetu.



Obrázek č.14: Změny v genové expresi v srdcích diabetických embryí. Grafické znázornění intenzity změn v expresi genů v srdcích diabetických embryí na úrovni mRNA. Ve sloupcích jsou znázorněny změny exprese jednotlivých genů, v řádcích jsou studovaná vývojová stádia. Červená a zelená barva představuje zvýšení, respektive snížení exprese na úrovni mRNA izolované z celého embryonálního srdce. Shluková analýza byla provedena metodou Wardova shlukování s využitím výsledků qPCR, nediabetická embrya, n = 4, diabetická embrya, n = 6 – 10 (Bohuslavova *et al.*, 2015).

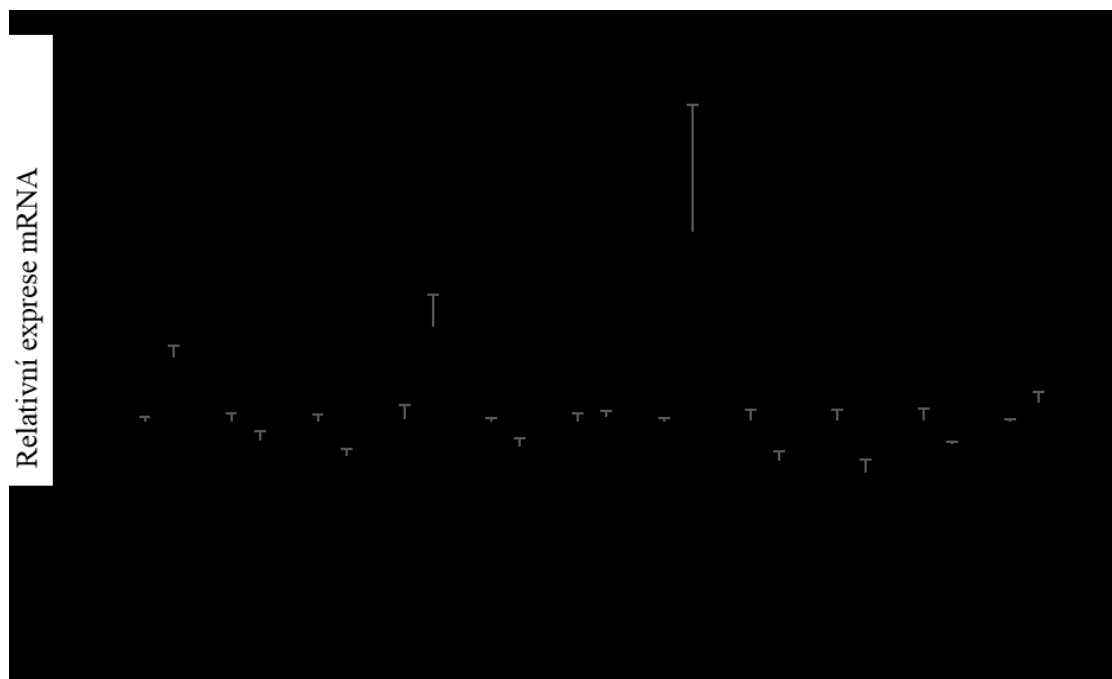


Obrázek č. 15: Časový průběh změn v expresi genů v embryonálních srdcích vystavených maternálnímu diabetu. Grafy zobrazují průměrné hodnoty Delta Cq získané pomocí qPCR v jednotlivých věcích od E10,5 do E18,5. Nediabetická embrya, n = 4, diabetická embrya, n = 6 – 10 (Bohuslavova *et al.*, 2015).

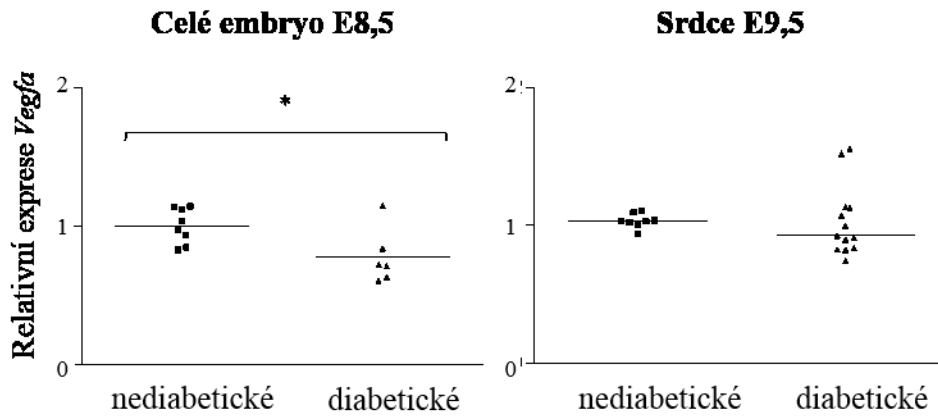


Obrázek č. 16: Změny v expresi genů v srdcích diabetických embryí ve věcích E10,5, E13,5 a E14,5. (Bohuslavova *et al.*, 2015)

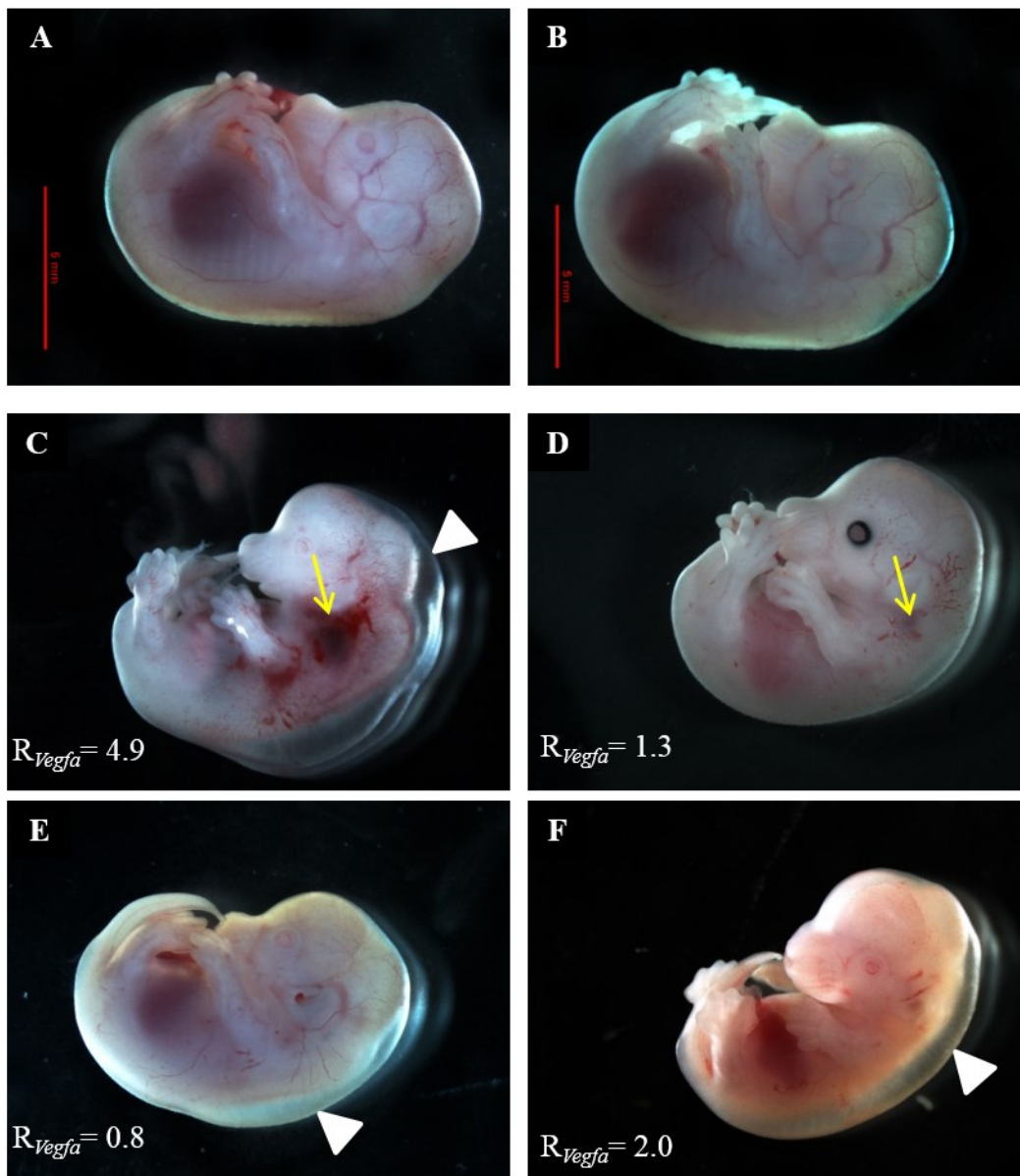
Obrázek č. 16: Změny v expresi genů v srdcích diabetických embryí ve věcích E10,5, E13,5 a E14,5. Hodnoty představují průměrnou relativní změnu v srdcích diabetických embryí \pm SEM. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvoucestný nepárový t – test, nediabetická embrya, $n = 4$, diabetická embrya, $n = 6 - 10$, * $P < 0,05$.



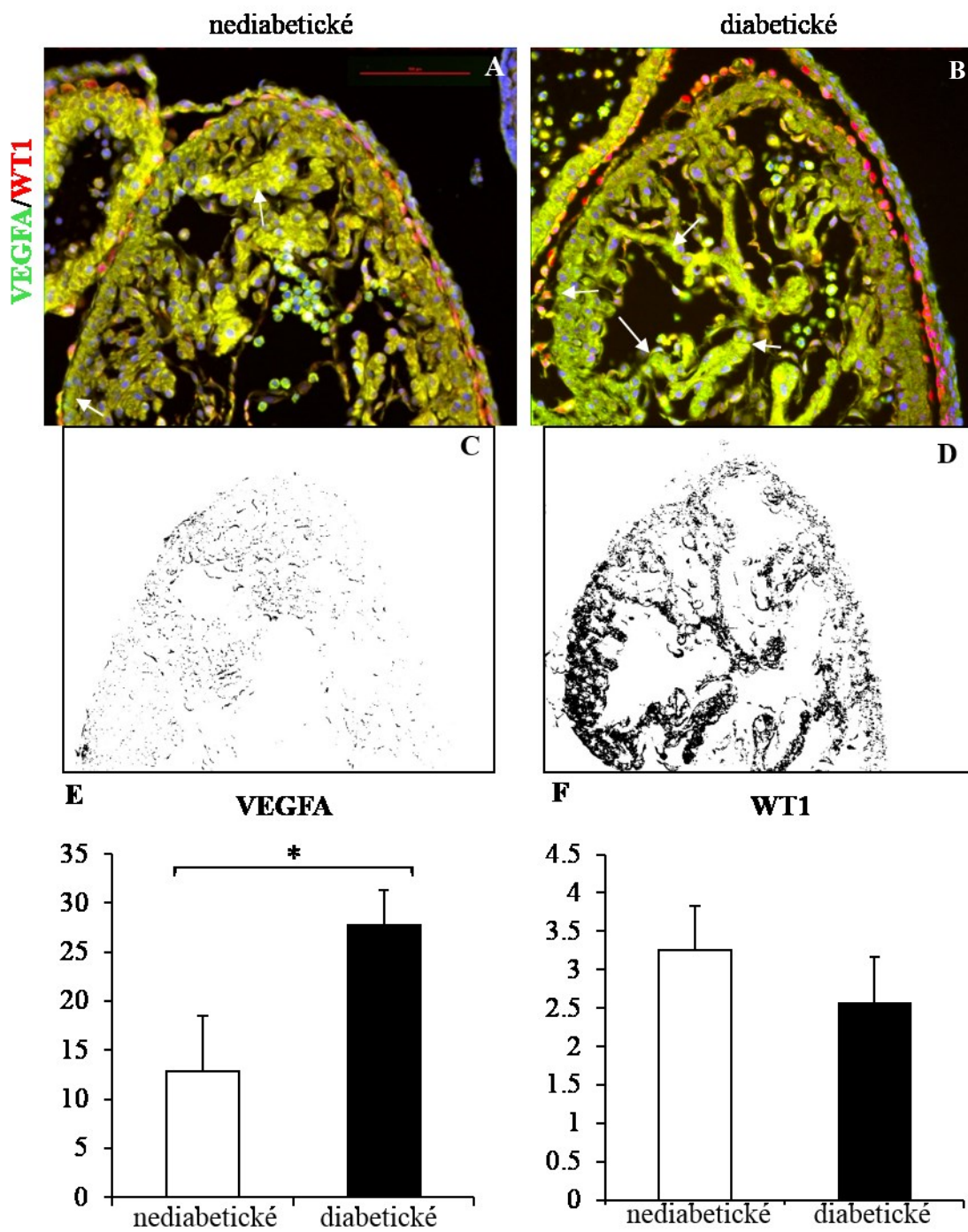
Obrázek č. 17: Změny v expresi genů v srdcích diabetických embryí s kardiovaskulárními defekty v E14,5. Hodnoty představují průměrnou relativní změnu v srdcích diabetických embryí \pm SEM. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvoucestný nepárový t – test, $n = 4$, * $P < 0,05$ (Bohuslavova *et al.*, 2015).



Obrázek č. 18: Změny v rané expresi *Vegfa*. Změny v expresi mRNA *Vegfa* v E8,5 v celém embryu a v E9,5 v celém embryonálním srdci byly analyzovány pomocí qPCR. Grafy ukazují průměrnou změnu a individuální hodnoty. Celé embryo E8,5: n = 8 nediabetických, n = 6 diabetických embryí; srdce E9,5: n = 8 nediabetických, n = 13 diabetických embryí. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvoucestný nepárový *t*-test, *, $P < 0.05$ (Bohuslavova *et al.*, 2015).

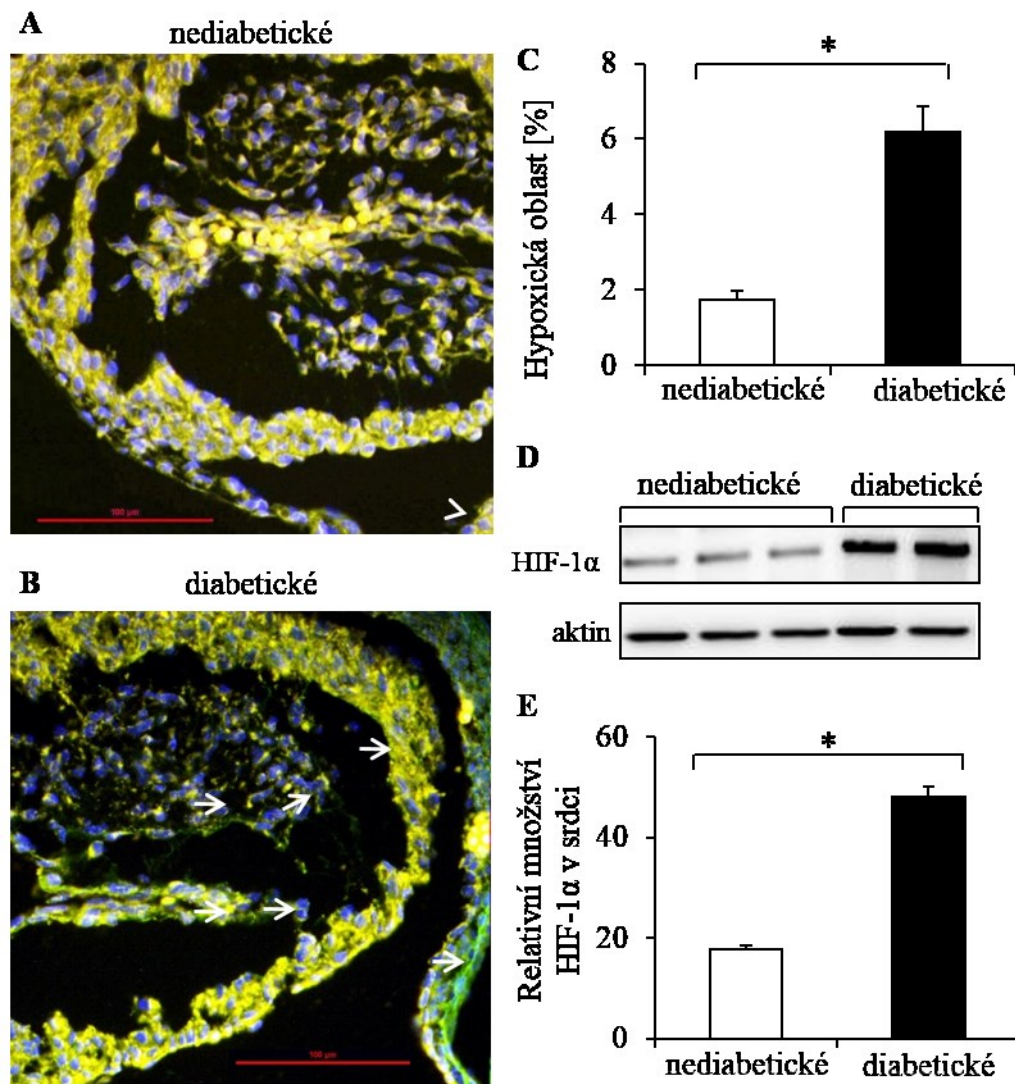


Obrázek č. 19: Změny v externí morfologii diabetických embryí E14,5 použitých pro qPCR. Porovnání normálně se vyvíjejících embryí z nediabetických vrhů v E14,5 (A ,B) s diabetickými embryi s kardiovaskulárními defekty (C-D) projevujícími se otoky (C, E, F, bílé šipky) a krvácením (C, D, žluté šipky). R_{Vegfa} , relativní exprese *Vegfa*, měřítko: 5 mm (Bohuslavova *et al.*, 2015).



Obrázek č. 20: Expres VEGFA a WT1 v embryonálním srdci. (Bohuslavova *et al.*, 2015)

Obrázek č. 20: Expresse VEGFA a WT1 v embryonálním srdci. Transversální řezy embryonálním srdcem nediabetických embryí (A) a diabetických embryí (B) v E10,5 byly použity pro imunohistochemickou detekci VEGFA (zelená) a WT-1 (červená), buněčná jádra byla obarvena pomocí Hoechst (modrá). Vlivem diabetu byla zvýšena exprese VEGFA (E) v srdci diabetických embryí (B) v porovnání se srdci nediabetických embryí (A). LV i RV byly analyzovány zvlášť, stejně tak myokard a trabekuly, trend změny byl ve všech oblastech stejný, nebyla identifikována specifická oblast s vyšší expresí VEGF-A. Detekovaná oblast exprese VEGF-A byla analyzována pomocí ImageJ v diabetických (D) a nediabetických (C) embryích. Expresse WT-1 nebyla změněna (A, B, F). Hodnoty v grafech představují průměr ± SEM, pro statistické vyhodnocení byl použit dvoucestný nepárový *t*-test, *, $P < 0,05$.



Obrázek č. 21: Detekce hypoxických oblastí a proteinu HIF-1α v srdci v E10,5.

Transversální řez LV embryonálního srdce v E10,5 ukazuje hypoxické oblasti (zeleně, šipky) v nediabetických (A) a diabetických (B) embryích. Jádra byla obarvena pomocí Hoechst (modrá), autofluorescence je žlutá. V diabetických srdcích byla detekována zvýšená hypoxie (C), $n = 2$ řezy/4 embrya/ skupina, měřítko: 100 μm . Western blotem (D,E) bylo detekováno zvýšení celkového množství HIF-1 α v diabetických embryonálních srdcích v E10,5 normalizované k množství β -aktinu, nediabetická embrya, $n = 8$, diabetická embrya, $n = 2$, hodnoty v grafech představují průměr \pm SEM, pro statistické vyhodnocení byl použit dvoucestný nepárový t -test, C,*, $P < 0,0007$, E, *, $P < 0,05$ (Bohuslavova *et al.*, 2015).

5.3. Potomci diabetických matek

Další výzkum byl zaměřen na vliv maternálního diabetu na potomky a proces zvaný fetální programování. Vystavení maternálnímu diabetu během intrauterinního vývoje vede v dospělosti mimo jiné ke zvýšenému riziku rozvoje metabolického syndromu, diabetu a kardiovaskulárních onemocnění (Fetita *et al.*, 2006, Plagemann, 2004). Vzhledem k tomu, že předchozí výzkum ukázal, že maternální diabetes dereguluje HIF-1 α a že embrya heterozygotní pro delecii *Hif1a* (*Hif1a*^{+/-}) mají vyšší náchylnost k rozvoji defektů (Bohuslavova *et al.*, 2013), byly analyzováni *wt* i *Hif1a*^{+/-} potomci diabetických myší. *Wt* samice, kterým byl pomocí STZ indukován diabetes, byly kříženy se samci *Hif1a*^{+/-}, čímž bylo zamezeno možnému vlivu maternálního genotypu.

Průměrný počet narozených *Hif1a*^{+/-} mláďat vystavených maternálnímu diabetu byl snížený (obrázek č. 22A), což je v souladu s výsledky předchozí studie ukazující zvýšenou embryonální letalitu mutantních embryí z diabetických vrhů (Bohuslavova *et al.*, 2013). Obě skupiny potomků vyvíjejících se v diabetickém prostředí měly nižší tělesnou hmotnost (obrázek č. 22B), avšak hmotnost srdce měly sníženou pouze *wt* potomci diabetických matek (DiaM) (obrázek č. 22C), což znamená, že poměr hmotnosti srdce k tělesné hmotnosti, ukazatel zvětšení srdce, byl u *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM signifikantně zvýšen (obrázek č. 22D). Morfologie hlavních srdečních struktur zůstala nezměněna (obrázek č. 22E-H), pouze srdce *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM byla kulatější, jak vyplývá z poměru pravo-levé a apiko-bazální osy, tedy šířky a délky, která u *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM činila průměrně 1,03, zatímco u *wt* a *Hif1a*^{+/-} potomků kontrolních matek a *wt* potomků DiaM byly průměrné hodnoty 1,38, 1,39, respektive 1,38.

Echokardiografická analýza ukázala, že zatímco ve věku 1 týdne nebyla funkce srdce, vyjádřená jako FS, ovlivněna, ve věku 12 týdnů bylo FS sníženo u obou skupin potomků DiaM vůči kontrolním skupinám (obrázek č.23D). Zároveň byla detekována zhoršená funkce srdce *Hif1a*^{+/-} vůči *wt* v kontrolních skupinách. FS vyjadřuje rozdíl mezi diastolickým a systolickým rozměrem dutiny LV a tedy intenzitu srdečního stahu. Diastolické rozměry nebyly změněny, rozdíl ve FS tedy byl dán především většími rozměry dutiny při systole (tabulka č.9) a souvisel jak s diabetem, tak s genotypem. Vlivem diabetu byla ve věku 12 týdnů snížena také tepová frekvence (obrázek č.23F), což naznačuje možné změny v autonomní regulaci srdce (Jordan a Tank, 2014). Změny detekované echokardiografickou

analýzou byly podobné u samců i samic (tabulka č.9, 10), pro další analýzy byli použiti pouze samci.

Fetální programování je poměrně nová a neprobádaná oblast, proto bylo pro analýzu molekulárních změn v LV srdcí 12 týdnů starých potomků diabetických matek zvoleno sekvenování transkriptomu. Grafické znázornění intenzity změn v expresním profilu (obrázek č.24A) ukazuje, že nejodlišnější jsou *Hif1a*^{+/-} potomci DiaM a potomci kontrolních matek jsou si navzájem nejpodobnější. Signifikantně změněné geny (P_{adj} < 0,1) ve skupině *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM v porovnání s jinými skupinami patří do kategorií „Gene Ontology“ kódující proteiny účastníci se vývojových, metabolických a imunitních procesů, regulace buněčné proliferace, angiogeneze, odpovědi na stres, mezibuněčné komunikace a dalších, jak ukazuje graf na obrázku č. 24B. Jednotlivé geny pro uvedené kategorie jsou vypsány v tabulce č. 11. Pro další analýzy byla uplatněna hranice 30% změny ve všech skupinách vůči *wt* potomkům kontrolních matek (tabulka č.13). Vennův diagram (obrázek č. 24C) ukazuje, že z celkových 144 bylo nejvíce genů (95, tabulka č. 12) změněno pouze u *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM. Z celkových 135 genů změněných ve skupině *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM bylo 53 % genů pomocí databáze Harmonizome (Rouillard *et al.*, 2016) a vyhledávání v literatuře identifikováno jako přímé nebo předpovězené cíle HIF-1 (tabulka č. 14). Analýza obohacení kategorií biologických procesů pomocí programu gProfiler (Reimand *et al.*, 2016) ukázala, že změněné geny v obou skupinách potomků DiaM byly navýšeny v kategoriích souvisejících s imunitními procesy (obrázek č. 24D). Ve skupině *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM byly navíc obohaceny kategorie biologických procesů související s vývojem, odpovědi na stres, apoptózou, buněčnou proliferací a komunikací a angiogenezí (tabulka č. 15). Kategorie savčích fenotypových ontologií (tabulka č. 16) byly obohaceny o kategorie související s homeostázou a metabolismem (63 genů), imunitním systémem (60 genů) a abnormální vrozenou imunitou (25 genů). Kromě toho byly obohaceny kategorie spojené s abnormální fyziologií krevních cév (17 genů,) a s fyziologií hladké svaloviny cév (9 genů). Změny v expresi vybraných genů zjištěné pomocí RNA-Seq byly ověřeny pomocí qPCR (obrázek č. 25).

5.3.1. Změny v morfologii tkáně LV

Změny ve funkci LV mohou být spojené se změnami v myokardu. Jednou z takových změn je zvýšená apoptóza, která byla detekována u obou skupin potomků diabetických matek jak v LV, tak v RV a v septu (obrázek č. 26).

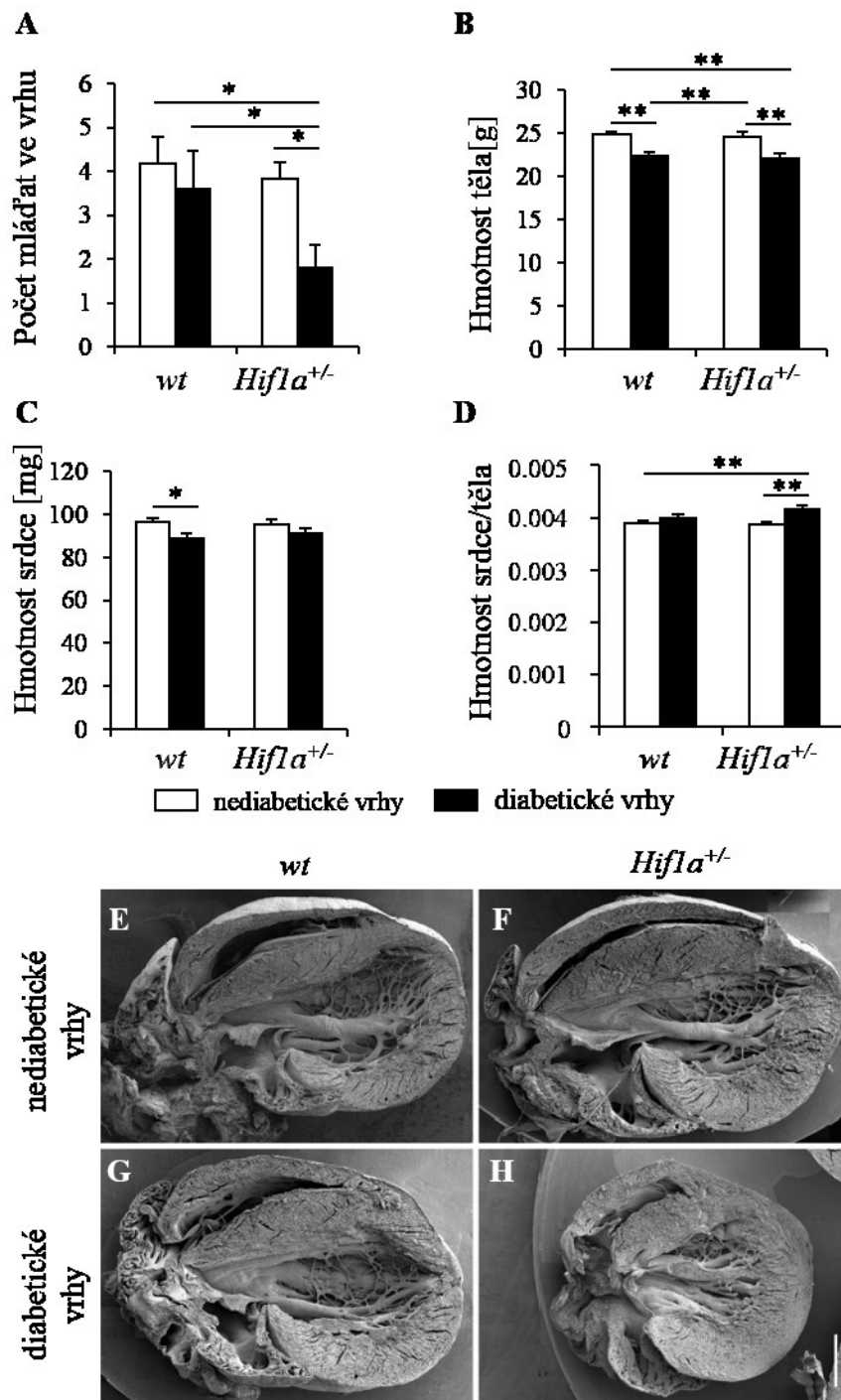
Protože jsou makrofágy nezbytné při opravě poškozených tkání, včetně srdce (Zhou *et al.*, 2016), byla analyzována jejich infiltrace do myokardu. Počet makrofágů, detekovaných imunohistochemicky jako buňky exprimující F4/80, byl navýšen v myokardu LV *wt* potomků DiaM, nikoli však v myokardu LV *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM (obrázek č. 27A-E). Tomuto zjištění odpovídala i snížená exprese TNFR2 v LV *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM (obrázek č. 27F,G), neboť delece TNFR2 má za následek sníženou infiltraci makrofágů (Defer *et al.*, 2007, Luo *et al.*, 2006).

Dalším významným faktorem ovlivňujícím funkci myokardu jsou změny v extracelulární matrix (ECM). Mezi proteiny ECM převažuje kolagen, v srdeční tkáni je to především kolagen typu I (Bashey *et al.*, 1992). Přítomnost fibrózy je významným ukazatelem probíhajících patologických procesů (Travers *et al.*, 2016). Biochemická detekce kolagenu však ukázala snížený obsah kolagenu v tkáni v obou skupinách potomků vystavených diabetu a také u *Hif1a*^{+/-} potomků kontrolních matek (obrázek č. 28A-I). Produkce kolagenu v tkáni je spojena se signalizací TGFβ (Frangogiannis, 2014). Exprese *Tgfb1* na úrovni mRNA odpovídala svým trendem množství detekovaného kolagenu v tkáni (obrázek č. 28J).

V hyperglykemickém prostředí dochází k tvorbě AGE, které ovlivňují vlastnosti jak intracelulárních, tak extracelulárních proteinů a lipidů a tím vlastnosti myokardu (Vlassara a Striker, 2011). Biochemická detekce ukázala zvýšené množství AGE v LV *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM (obrázek č. 29A-I).

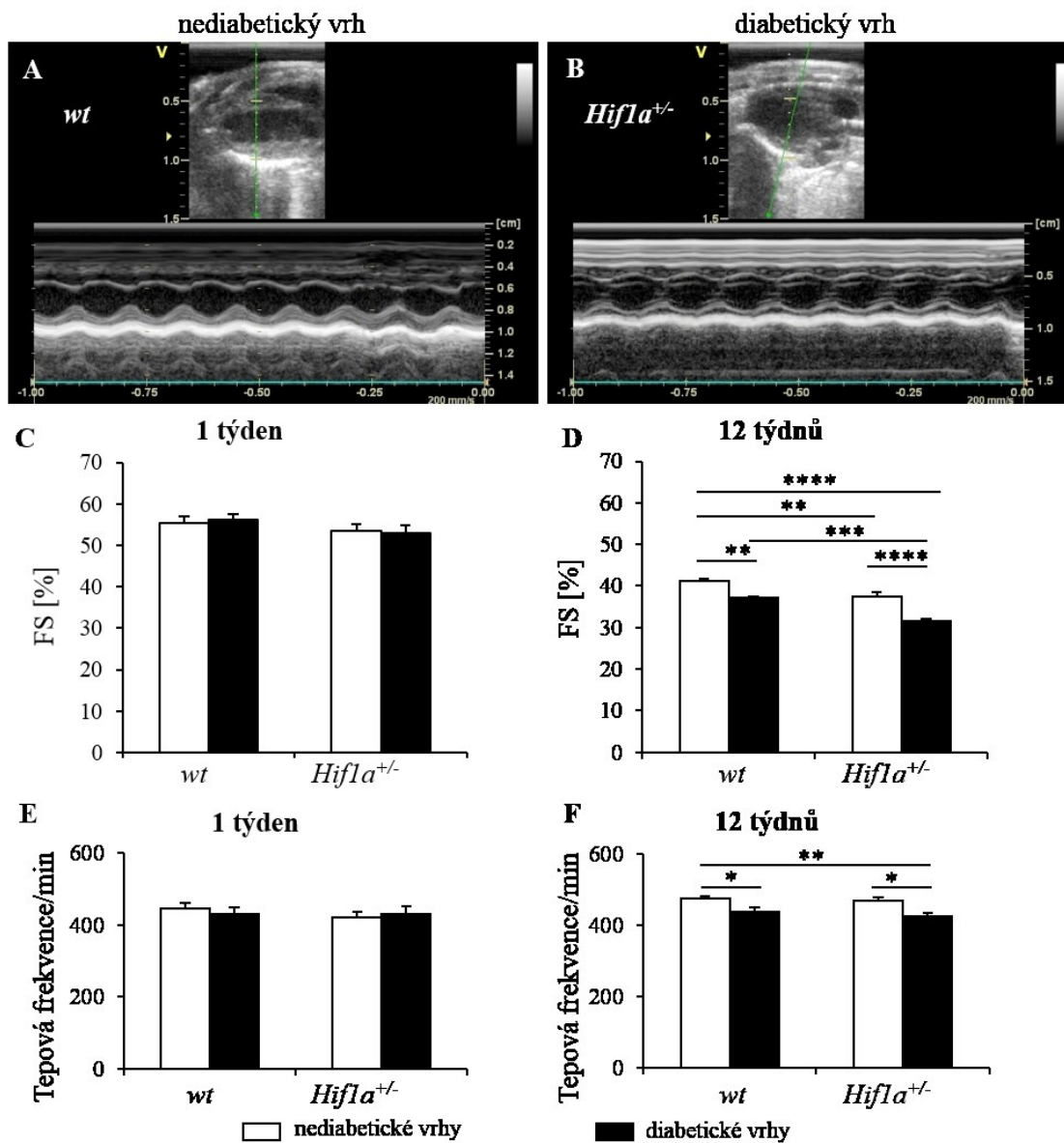
Významnou součástí správné funkce myokardu je také správný přenos signálu. Jedním z hlavních proteinů tvořících mezibuněčné spoje mezi kardiomyocyty je CX43 a jeho dysfunkce je spojena se špatnou funkcí myokardu (Gutstein *et al.*, 2001). Exprese CX43 je regulována signalizací HIF-1 (Waza *et al.*, 2014) a v hypoxickém prostředí má kardioprotektivní funkci (Tittarelli *et al.*, 2015). Kromě toho se působením diabetu mění poměr fosforylované a nefosforylované izoformy CX43 v tkáni (Sato *et al.*, 2002). V LV *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM bylo snížené množství obou izoform, fosforylované (pCX43) i nefosforylované (obrázek č. 29J,K). Fosforylace serinu na pozici 368 je důležitá pro funkci

CX43 (Benes *et al.*, 2011), detekované snížené množství pCX43 by tedy mohlo mít zásadní vliv na funkci srdce.



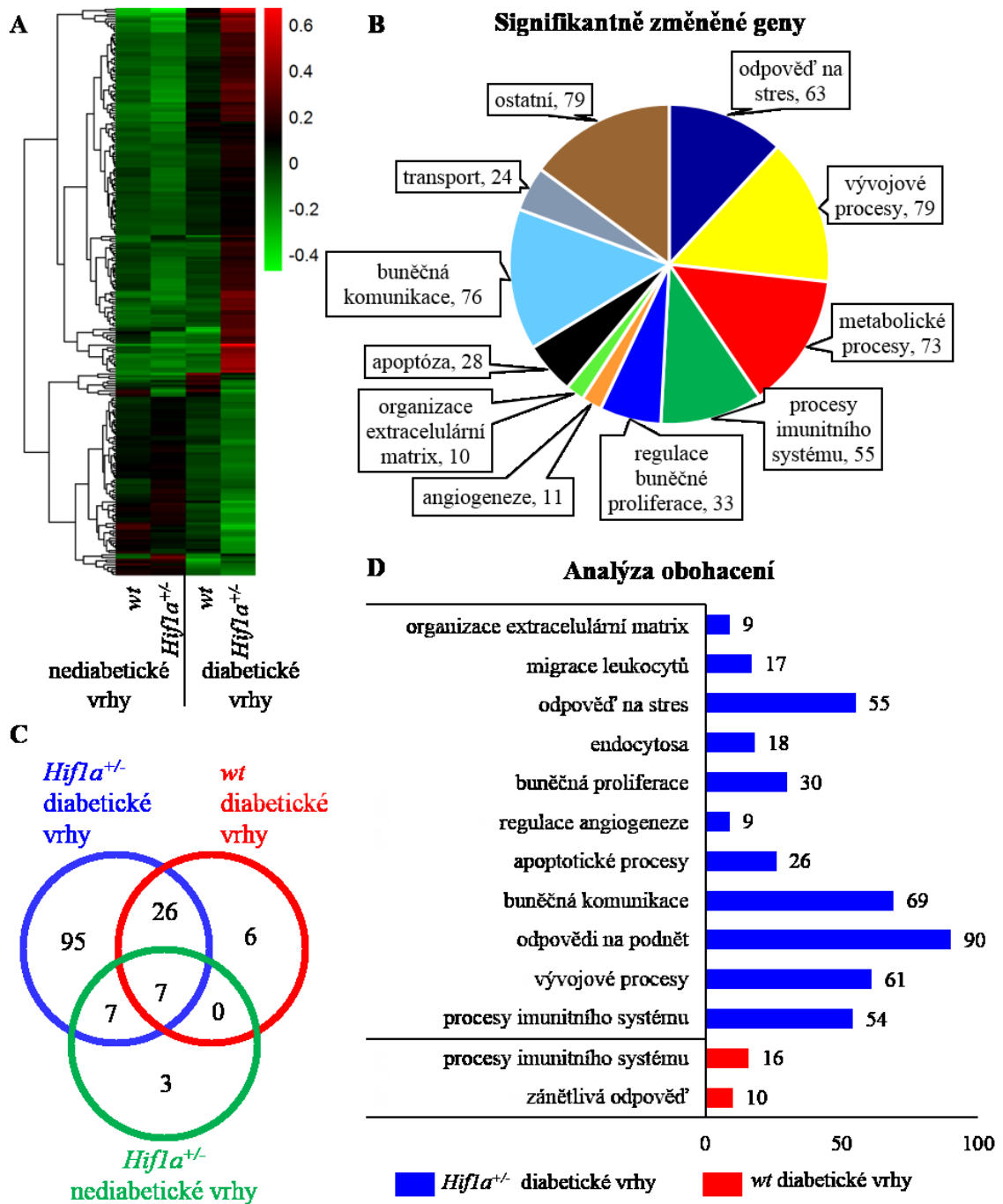
Obrázek č. 22: Vliv mutace a maternálního diabetu na přežití a váhu srdce potomků.
(Cerychova *et al.*, 2018)

Obrázek č. 22: Vliv mutace a maternálního diabetu na přežití a váhu srdce potomků. Průměrný počet *Hif1a*^{+/-} mláďat ve vrzích diabetických matek byl výrazně snížen ve srovnání s ostatními skupinami (A). Ve věku 12 týdnů měli potomci z diabetických vrhů menší hmotnost, nezávisle na genotypu (B). Sníženou hmotnost srdce však měli jen *wt* potomci diabetických matek (C), což se projevilo zvýšeným poměrem hmotnosti srdce k hmotnosti těla (D). Hodnoty představují průměr ± SEM, A: n = 11 nediabetických vrhů, n = 10 diabetických vrhů; B-D: n = 20 *wt* z nediabetických vrhů, n = 15 *wt* z diabetických vrhů, n = 15 *Hif1a*^{+/-} z nediabetických vrhů, n = 10 *Hif1a*^{+/-} z diabetických vrhů. Statistické vyhodnocení pomocí dvoufaktorové ANOVA ukázalo vliv diabetu na: počet mláďat ve vrhu, P = 0.0391; tělesná hmotnost, P < 0.0001; hmotnost srdce, P = 0.0124; hmotnost srdce/těla, P = 0.0003; vliv interakce genotypu s diabetem na: poměr hmotností srdce/těla, P = 0.0362. * značí statistickou signifikanci detekovanou pomocí post hoc Tukeyho testu, *P < 0.05, **P < 0.01. E-H: Reprezentativní mikrofotografie posteriorní poloviny srdce 12 týdnů starých myši ze skenovacího elektronového mikroskopu ukazují všeobecně porovnatelnou strukturu všech srdcí, pouze *Hif1a*^{+/-} potomci diabetiček měli srdce kulatější.



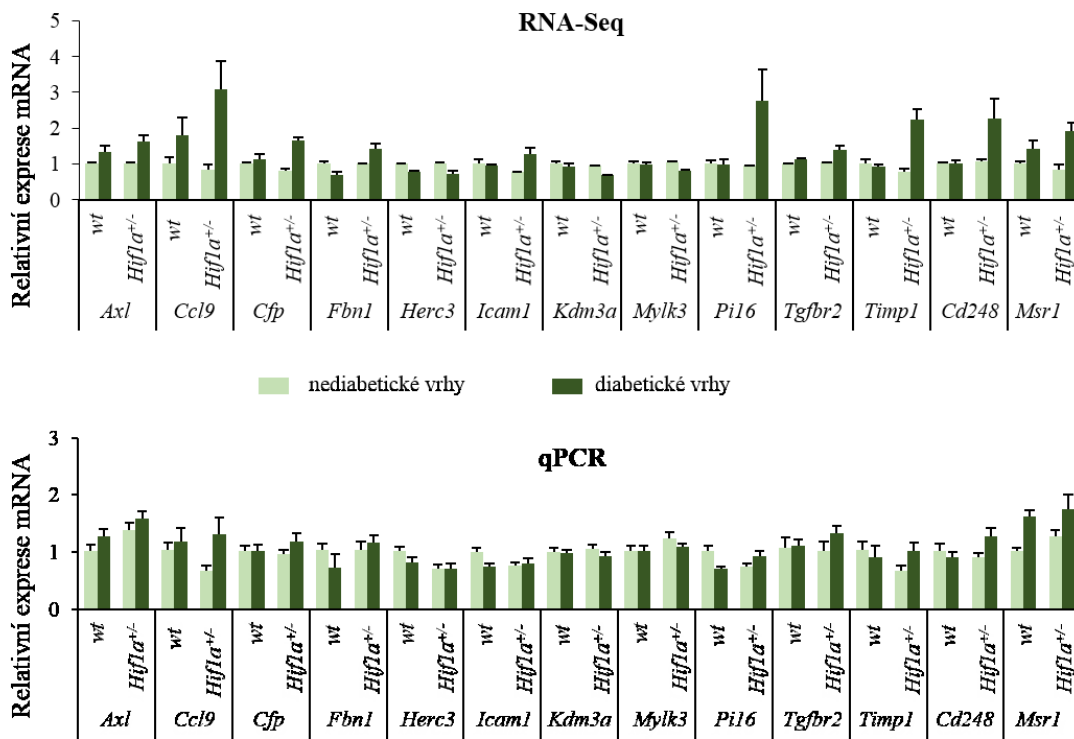
Obrázek č. 23: Echokardiografická analýza funkce srdce. (Cerychova *et al.*, 2018)

Obrázek č. 23: Echokardiografická analýza funkce srdce. Reprezentativní záznam struktur LV v M-modu, podélný pohled na srdce *wt* samce z nediabetického vrhu (A) a *Hif1a^{+/-}* samce z diabetického vrhu (B). Frakční zkrácení (FS) samčích potomků ve věku 1 týdne (C) nebylo ovlivněno diabetem ani genotypem. Ve věku 12 týdnů (D) bylo FS sníženo ve všech skupinách v porovnání s *wt* samci z nediabetických těhotenství. Tepová frekvence nebyla u samců změněna ve věku 1 týdne (E), ve věku 12 týdnů (F) byla snížena u samců obou genotypů pocházejících z diabetických vrhů. v porovnání s *wt* samci z nediabetických vrhů. Hodnoty představují průměr ± SEM, stáří 1 týden: n = 20 *wt* z nediabetických vrhů; n = 14 *wt* z diabetických vrhů; n = 17 *Hif1a^{+/-}* z nediabetických vrhů; n = 9 *Hif1a^{+/-}* z diabetických vrhů; stáří 12 týdnů: n = 20 *wt* z nediabetických vrhů; n = 15 *wt* z diabetických vrhů a *Hif1a^{+/-}* z nediabetických vrhů; n = 10 *Hif1a^{+/-}* z diabetických vrhů. Statistické vyhodnocení pomocí dvoufaktorové ANOVA ukázalo vliv genotypu na FS, P < 0.001, a vliv diabetu na: FS, P < 0.0001, tepovou frekvenci, P < 0.0001. * značí statistickou signifikanci detekovanou pomocí post hoc Tukeyho testu, , *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, **** P < 0.0001.



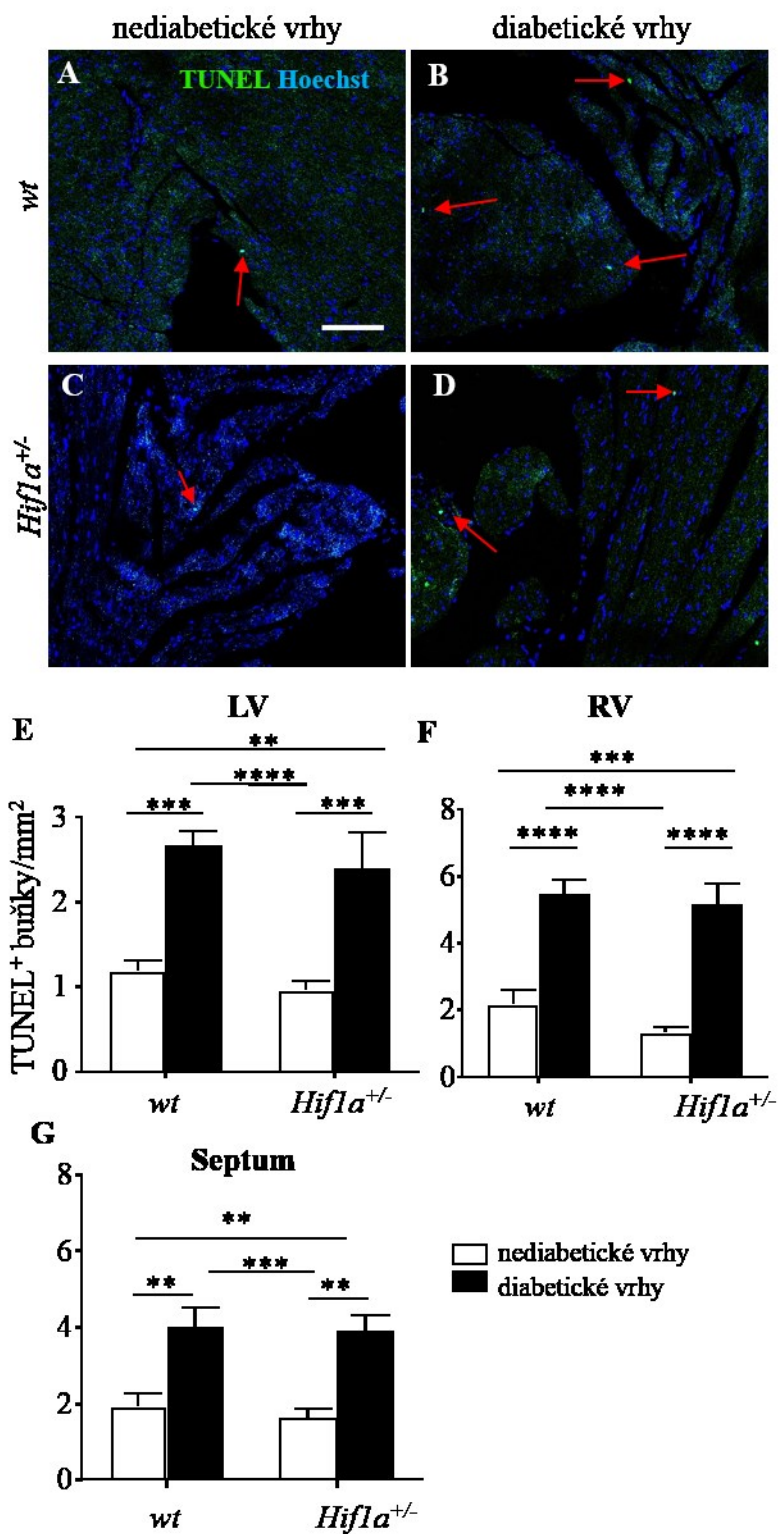
Obrázek č. 24: Kombinace maternálního diabetu a mutace *Hif1a* ovlivňuje transkriptom v LV dospělých potomků.
(Cerychova *et al.*, 2018)

Obrázek č. 24: Kombinace maternálního diabetu a mutace *Hif1a* ovlivňuje transkriptom v LV dospělých potomků. Grafické znázornění výsledků RNA-Seq analýzy ukazuje intenzitu celkových změn v transkriptomu LV *wt* a *Hif1a*^{+/-} potomků z nediabetických a diabetických vrhů a hierarchické shlukování změněných genů (n = 3) (A). Geny se změněnou expresí ve skupině *Hif1a*^{+/-} z diabetických těhotenství byly klasifikovány pomocí webového nástroje DAVID (B), hodnoty představují počet genů v jednotlivých kategoriích. Pro vytvoření Vennova diagram (C) byly použity geny, jejichž změna byla v jednotlivých skupinách ve srovnání s *wt* z nediabetických vrhů $\geq 30\%$. Analýza obohacení kategorií biologických procesů (D) byla provedena pomocí webového nástroje g:Profiler. Hodnoty představují počet genů v jednotlivých kategoriích biologických procesů.



Obrázek č. 25: Validace výsledků RNA-Seq pomocí qPCR.

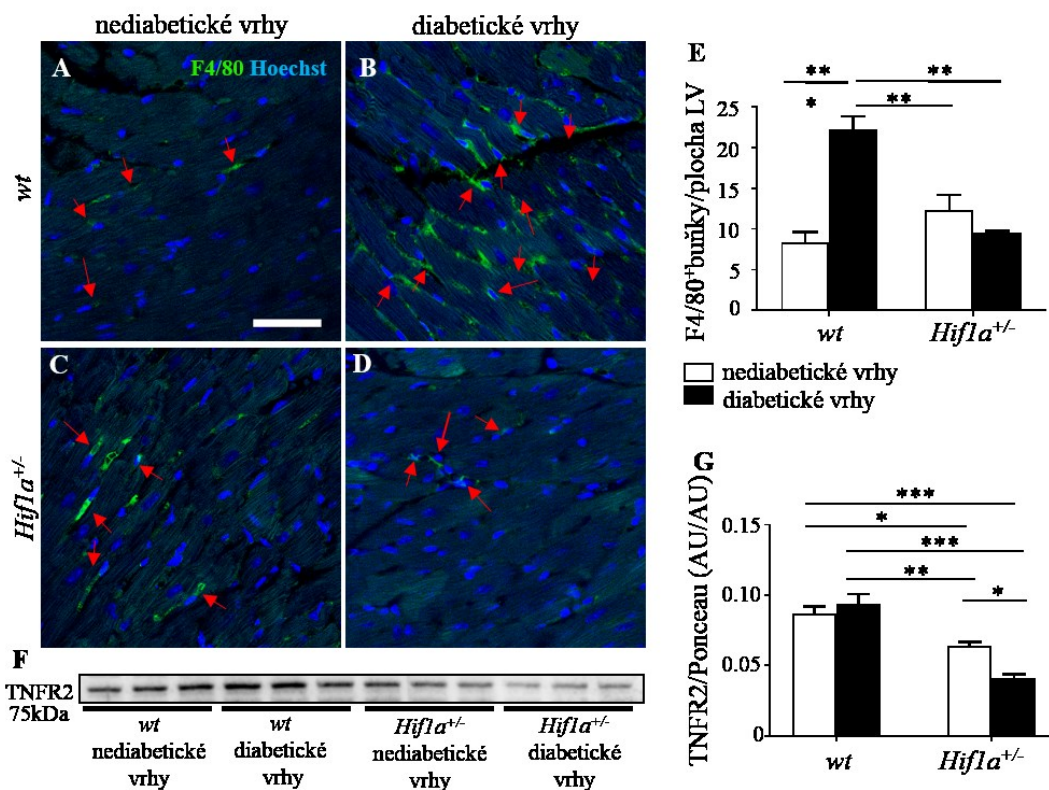
Vybrané odlišně exprimované geny byly analyzovány pomocí qPCR. Hodnoty představují průměr \pm SEM, RNA-Seq, n = 3, qPCR, n = 8 (Cerychova *et al.*, 2018).



Obrázek č. 26: Diabetes zvyšuje apoptózu v tkáni 12 týdnů starých potomků. (Cerychova *et al.*, 2018)

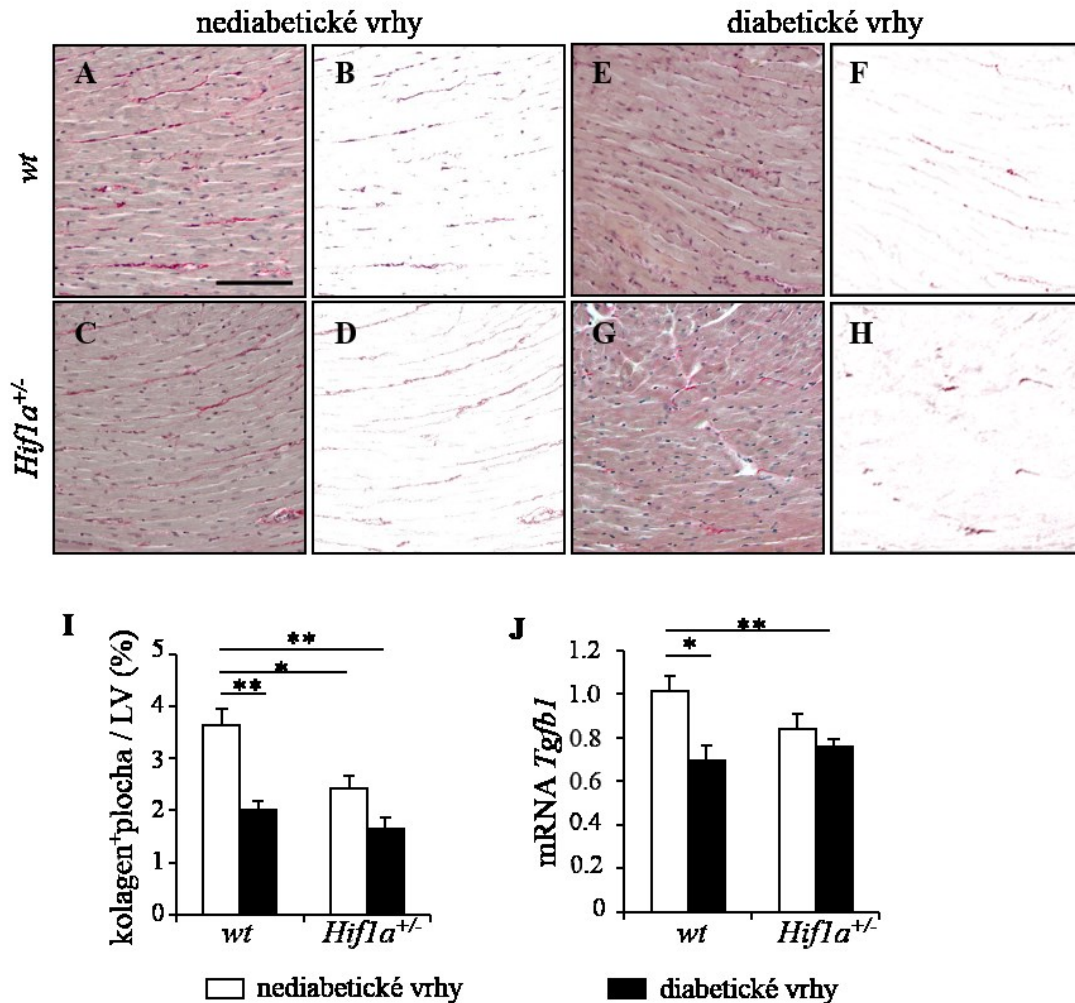
Obrázek č. 26: Diabetes zvyšuje apoptózu v tkáni 12 týdnů starých potomků.

Apoptotické buňky byly detekovány metodou TUNEL (červené šipky ukazují apoptotické buňky, zelená), buněčná jádra byla obarvena pomocí Hoechst (modrá) (A-D), měřítko: 100 μ m. Grafy (E-G) ukazují zvýšený počet apoptotických buněk na plochu tkáně v jednotlivých částech srdce. Hodnoty představují průměr \pm SEM, n = 4 jedinci/ 3 řezy. Statistické vyhodnocení pomocí dvoufaktorové ANOVA ukázalo vliv interakce diabetu a genotypu v LV, P = 0.016, a vliv diabetu v RV, P < 0.0001 a septu: P < 0.0001. * značí statistickou signifikanci detekovanou pomocí post hoc Tukeyho testu, **P < 0.01, ***P < 0.001.



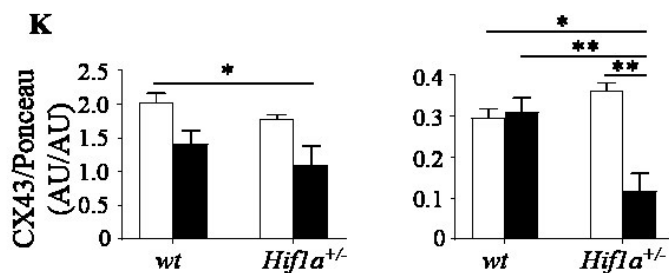
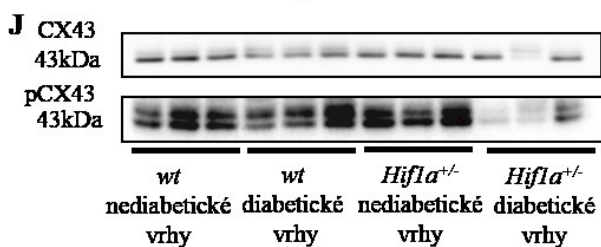
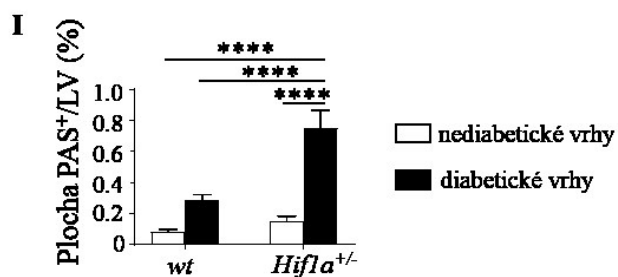
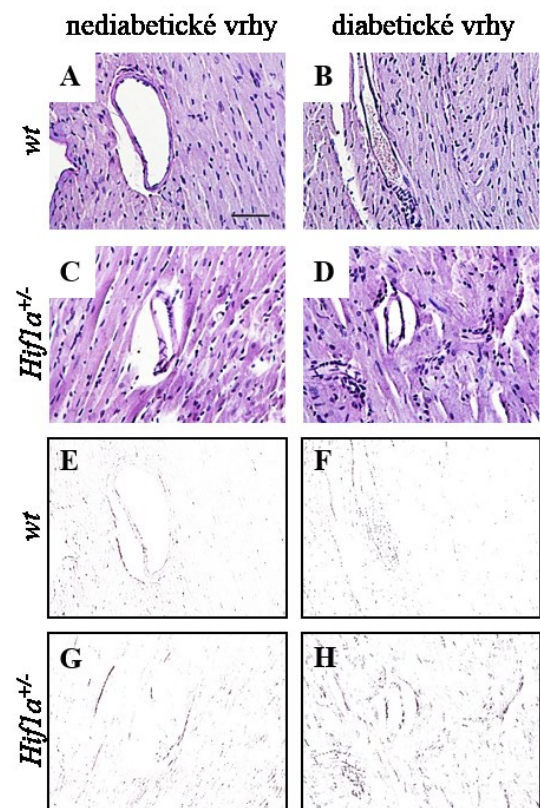
Obrázek č. 27: Infiltrace makrofágů do myokardu a změny v expresi TNFR2.

A-D: Makrofágy byly ve vibratomových řezech myokardem imunohistochemicky detekovány pomocí markeru F4/80 (zelená, červené šipky), jádra byla obarvena pomocí Hoechst (modrá), měřítko: 50 μ m. E: Kvantifikace F4/80⁺ buněk v zobrazené oblasti myokardu LV. Hodnoty představují průměr \pm SEM, n = 1 řez/2-5 z-rovin/4 jedinci/skupina. F, G.: Reprezentativní western blot a kvantifikace exprese TNFR2 v myokardu LV. Hodnoty představují průměr \pm SEM, n = 3. Statistické vyhodnocení pomocí dvoufaktorové ANOVA ukázalo vliv interakce diabetu a genotypu na: F4/80, P = 0.0002, TNFR2, P = 0.0133, vliv genotypu na F4/80, P = 0.0159 a vliv diabetu na F4/80, P = 0.0042. * značí statistickou signifikanci detekovanou pomocí post hoc Tukeyho testu, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. AU, arbitrární jednotky (Cerychova *et al.*, 2018).



Obrázek č. 28: Obsah kolagenu v myokardu.

A-H: Reprezentativní mikrofotografie barvení picrosirius red, které detekuje kolagen v tkáni. Vyznačená oblast kolagenu pomocí programu Adobe Photoshop je na obrázcích B, D, F, H. Měřítka: 100 μ m. I: Relativní kvantifikace kolagenu v tkáni stanovena jako procentuální podíl kolagenu v ploše řezu pomocí programu ImageJ. Hodnoty představují průměr \pm SEM, n = 4. J: Relativní exprese *Tgfb1* v myokardu LV stanovena pomocí qPCR. Hodnoty představují průměr \pm SEM, n = 8. Data jsou normalizována k expresi mRNA kontrolního genu *Hprt1*. Statistické vyhodocení pomocí dvoufaktorové ANOVA ukázalo vliv genotypu na obsah kolagenu v tkáni, P = 0.0089 a vliv diabetu na obsah kolagenu, P = 0.0007; *Tgfb1*, P = 0.0079. * značí statistickou signifikanci detekovanou pomocí post hoc Tukeyho testu, *P < 0.05, **P < 0.01 (Cerychova *et al.*, 2018).

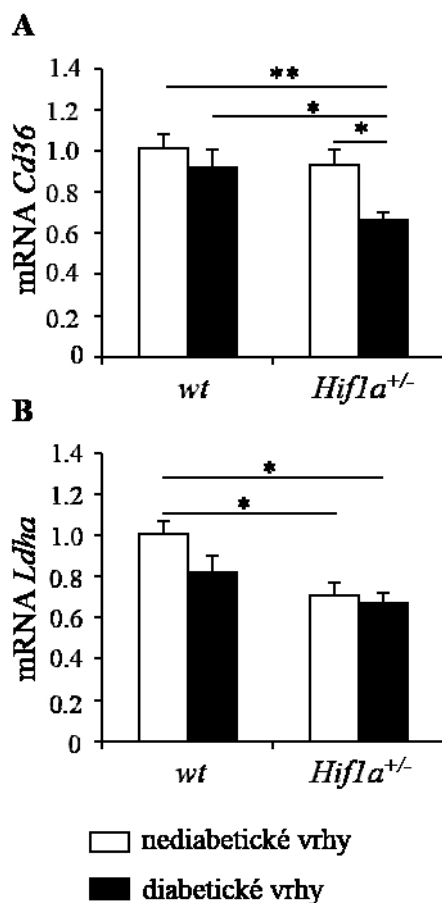


Ázeka č. 29: Množství AGE v myokardu a změny v expresi cx43

Reprezentativní mikrofotografie ukazující detekci křížových produktů glykace (E-H) pomocí barvení PAS, měřítko: 50 μ m. E-H Vyznačená červená oblast detekovaná pomocí programu Adobe Photoshop. I: Reprezentativní kvantifikace byla provedena jako procentuální podíl červeného barvení v zobrazené oblasti pomocí programu ImageJ. Hodnoty představují průměr \pm SEM, n = 4. J- Reprezentativní western blot a kvantifikace CX43 a jeho fosforylované izoformy pCX43 v myokardu LV. Hodnoty představují průměr \pm SEM, n = 3. Statistické vyhodnocení pomocí faktoriální ANOVA ukázalo vliv diabetu na CX43, $P = 0.0088$, a interakce mezi genotypem a diabetem na AGE, $P = 0.0013$, pCX43, $P = 0.0030$. * značí statistickou signifikanci potvrzenou pomocí post hoc Tukeyho testu, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. AU, arbritrární jednotky (Cerychova *et al.* 2018).

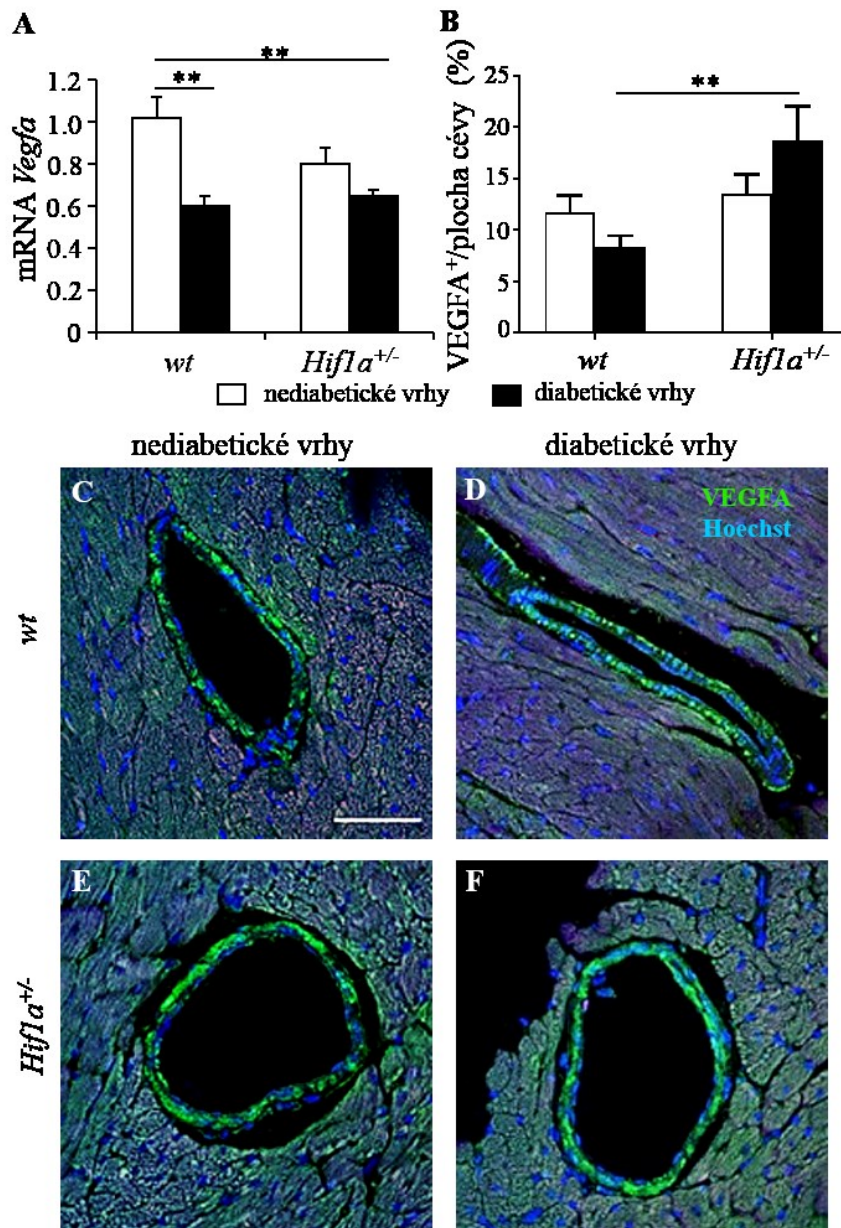
5.3.2. Změny v metabolismu

Se srdečními patologiemi jsou významně spojeny změny ve využití substrátů pro energetický metabolismus (Kolwicz *et al.*, 2013). Vzhledem k tomu, že analýza transkriptomu ukázala jako jednu z významně ovlivněných kategorií geny kódující proteiny účastníci se metabolismu, byly analyzovány dva cílové geny signalizace HIF-1: *Cd36* (Mwaikambo *et al.*, 2009) a *Ldha* (Semenza *et al.*, 1996). CD36 je receptor, který umožňuje lipoproteinům a mastným kyselinám z nich odvozených vstupovat do buněk (Yang *et al.*, 2007) a LDHA je enzym katalyzující poslední krok anaerobní glykolýzy, přeměnu pyruvátu na laktát. Expze *Cd36* byla změněna pouze u *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM, zatímco expze *Ldha* byla snižená v porovnání s *wt* potomky kontrolních matek ve všech skupinách (obrázek č.30).



Obrázek č. 30: Metabolické změny

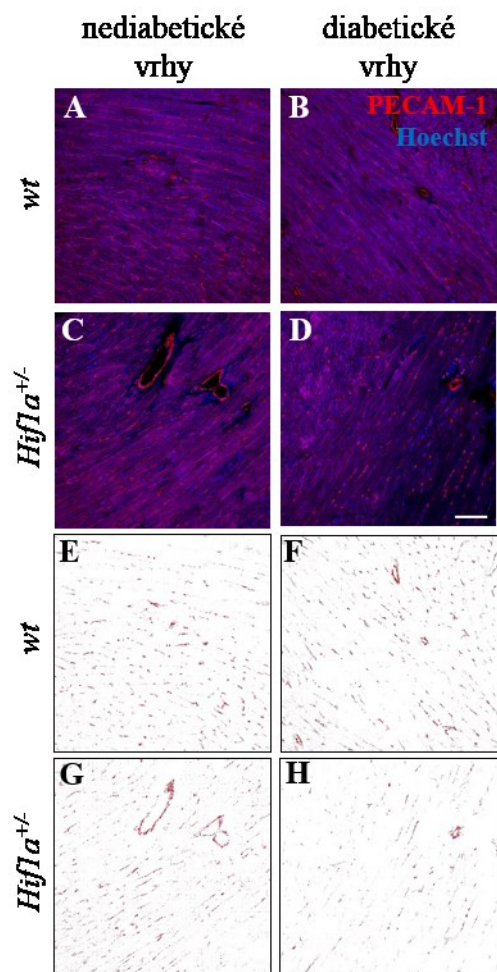
Relativní expze mRNA genu *Cd36* (A) a genu *Ldha* (B) v myokardu LV stanovená pomocí qPCR. Hodnoty představují průměr ± SEM, n = 8. Data jsou normalizována k expzi mRNA kontrolního genu *Hprt1*. Statistické vyhodocení pomocí dvoufaktorové ANOVA ukázalo vliv genotypu na mRNA *Cd36*, P = 0.0118, mRNA *Ldha*, P = 0.0034 a vliv diabetu na mRNA *Cd36*, P = 0.0061. * značí statistickou signifikanci detekovanou pomocí post hoc Tukeyho testu, *P < 0.05, **P < 0.01 (Cerychova *et al.*, 2018).



Obrázek č. 31: Změny v expresi *Vegfa* A: Relativní exprese mRNA genu *Vegfa* v myokardu LV, hodnoty představují průměr ± SEM, n = 8. Data jsou normalizována k expresi mRNA kontrolního genu *Hprt1*. B: Relativní kvantifikace VEGFA v cévách byla stanovena jako procentuální podíl VEGFA⁺ oblasti ve stěně cév. Hodnoty představují průměr ± SEM, n = 4. C-F: Reprezentativní mikrofotografie z konfokálního mikroskopu ukazují imunohistochemické barvení VEGFA (zelená) ve stěně velkých koronárních cév LV, jádra byla obarvena pomocí Hoechst (modrá), měřítko: 50 μm. Statistické vyhodnocení pomocí dvoufaktorové ANOVA ukázalo vliv diabetu na mRNA *Vegfa*, P = 0.0003, a vliv interakce diabetu a genotypu VEGFA v cévách, P = 0.0382. * značí statistickou signifikanci detekovanou pomocí post hoc Tukeyho testu, *P < 0.05, **P < 0.01 (Cerychova *et al.*, 2018).

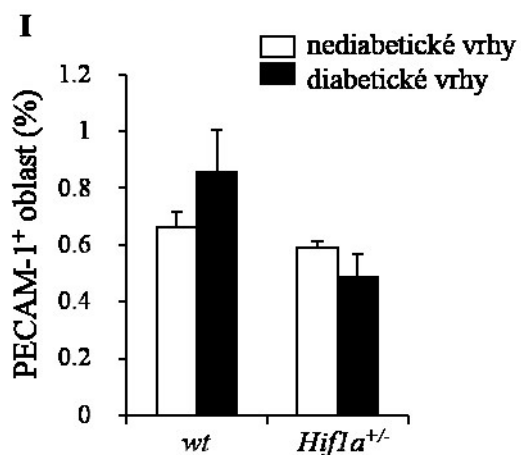
5.3.3. Změny v cévách

Maternální diabetes je spojen se zvýšeným rizikem rozvoje kardiovaskulárních chorob v dospělosti (Manderson *et al.*, 2002), proto byla analyzována exprese *Vegfa*, který je důležitý pro vaskularizaci a zároveň je cílem signalizace HIF-1. Na úrovni mRNA byla v LV exprese *Vegfa* snížena v obou skupinách potomků DiaM (obrázek č. 31A). Imunohistochemická detekce PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), který značí endotelové buňky, neodhalila žádné změny v kapilární síti (obrázek č. 32). Proto byl VEGFA imunohistochemicky analyzován specificky ve velkých koronárních cévách myokardu LV, kde byla jeho exprese naopak zvýšena u *Hif1a*^{+/-} potomků DiaM ve srovnání s *wt* potomky vystavenými maternálnímu diabetu (obrázek č. 31B-F). Rozdíl mezi výsledky kvantifikace VEGFA z celého myokardu a velkých cév naznačuje odlišnou regulaci *Vegfa* v různých strukturách. Podobně byla detekována odlišná exprese *Vegf* na úrovni mRNA v myokardu a velkých cévách diabetických pacientů (Semenza, 2011), což ukazuje, že rozdíl v expresi mezi jednotlivými tkáněmi není dán translací mRNA do proteinu.



Obrázek č. 32: Vaskularizace myokardu

A-D: Repräsentativní mikrofotografie endotelových buněk kapilár v myokardu LV, které byly imunohistochemicky detekovány pomocí PECAM-1 (červená), buněčná jádra byla obarvena pomocí Hoechst (modrá), měřítko: 50 μ m. E-H: Vyznačená PECAM-1⁺ oblast, pomocí programu Adobe Photoshop. I: Relativní kvantifikace byla stanovena jako procentuální podíl PECAM-1⁺ barvení v zobrazené oblasti pomocí programu ImageJ. Hodnoty představují průměr \pm SEM, n = 4. . Statistické vyhodocení pomocí dvoufaktorové ANOVA ukázalo vliv genotypu P = 0.0302, pomocí následného post hoc Tukeyho testu nebyl detekován signifikantní rozdíl (Cerychova *et al.*, 2018).



Tabulka č.9: Výsledky echokardiografického měření potomků samčího pohlaví z nediabetických a diabetických vrhů ve věku 1 týdne a 12 týdnů

1 týden staří samci

skupina/(n)	AWTd	LVDd	PWTd	AWTs	LVDs	PWTs	FS %	HR	BW
<i>wt</i> nediabetické vrhy/(n=20)	0.37	1.92	0.39	0.62	0.86	0.67	55.5	444	3.7
SEM	0.01	0.03	0.01	0.02	0.03	0.01	1.4	16	0.09
<i>wt</i> diabetické vrhy/(n=14)	0.4	1.69	0.4	0.56	0.74	0.65	56.3	431	2.8
SEM	0.01	0.06	0.01	0.02	0.04	0.03	1.24	16	0.19
<i>Hif1a</i> ^{+/-} nediabetické vrhy/(n=17)	0.4	1.99	0.41	0.62	0.93	0.68	53.5	421	3.7
SEM	0.01	0.03	0.01	0.02	0.04	0.02	1.68	14	0.1
<i>Hif1a</i> ^{+/-} diabetické vrhy/(n=9)	0.37	1.74	0.38	0.55	0.83	0.59	52.9	431	3.0
SEM	0.01	0.1	0.01	0.02	0.07	0.03	2.05	22	0.253

12 týdnů staří samci

skupina/(n)	AWTd	LVDd	PWTd	AWTs	LVDs	PWTs	FS %	HR	BW
<i>wt</i> nediabetické vrhy/(n=20)	0.76	3.92	0.7	1.17	2.31	1.22	41.2 ^{†‡§}	477 ^{†§}	25.9 ^{†§}
SEM	0.02	0.06	0.02	0.02	0.05	0.02	0.6	6	1.5
<i>wt</i> diabetické vrhy/(n=15)	0.69	3.73	0.66	1.02	2.35	1.06	37.0 ^{*§}	440 [*]	23.6 ^{*‡}
SEM	0.01	0.04	0.01	0.02	0.04	0.02	0.4	10	0.6
<i>Hif1a</i> ^{+/-} nediabetické vrhy/(n=15)	0.75	3.93	0.70	1.10	2.46	1.13	37.5 ^{*§}	469 [§]	27.6 ^{†§}
SEM	0.02	0.09	0.02	0.03	0.09	0.03	1.1	10	0.8
<i>Hif1a</i> ^{+/-} diabetické vrhy/(n=10)	0.62	3.85	0.61	0.91	2.64	0.93	31.4 ^{*†‡}	425 ^{*‡}	24.0 ^{*‡}
SEM	0.01	0.04	0.01	0.02	0.03	0.03	0.6	10	0.7

AWTd, diastolická tloušťka anteriorní stěny; LVDd, diastolický rozměr dutiny levé komory; PWTd, diastolická tloušťka posteriorní stěny; AWTs systolická tloušťka anteriorní stěny; LVDs, systolický rozměr dutiny levé komory; PWTs, systolická tloušťka posteriorní stěny; FS%, frakční zkrácení; HR, tepová frekvence; BW, tělesná hmotnost. Statisticky signifikantní rozdíly byly stanoveny pomocí post hoc Tukeyho testu; *, P < 0.05 v porovnání s *wt* z nediabetických vrhů; †, P < 0.05 v porovnání s *wt* z diabetických vrhů; ‡, P < 0.05 v porovnání s *Hif1a*^{+/-} z nediabetických vrhů; §, P < 0.05 v porovnání s *Hif1a*^{+/-} z diabetických vrhů.

Tabulka č.10: Výsledky echokardiografického měření potomků samičího pohlaví z nediabetických a diabetických vrhů ve věku 1 týdne a 12 týdnů

1 týden staré samice

skupina/(n)	AWTd	LVDDd	PWTd	AWTs	LVDs	PWTs	FS %	HR	BW
<i>wt</i> nediabetické vrhy/(n=19)	0.36	1.87	0.38	0.60	0.83	0.64	55.6	439	3.6
SEM	0.01	0.03	0.01	0.02	0.04	0.02	1.47	14	0.10
<i>wt</i> diabetické vrhy/(n=18)	0.39	1.75	0.39	0.61	0.79	0.64	54.9	427	3.1
SEM	0.01	0.05	0.01	0.01	0.03	0.02	1.14	12	0.15
<i>Hif1a</i> ^{+/-} nediabetické vrhy/(n=22)	0.38	1.90	0.40	0.62	0.83	0.67	56.1	429	3.4
SEM	0.01	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02	1.07	13	0.11
<i>Hif1a</i> ^{+/-} diabetické vrhy/(n=7)	0.39	1.71	0.40	0.57	0.77	0.61	54.9	416	3.0
SEM	0.01	0.06	0.01	0.01	0.04	0.02	1.44	31	0.21

12 týdnů staré samice

skupina/(n)	AWTd	LVDDd	PWTd	AWTs	LVDs	PWTs	FS %	HR	BW
<i>wt</i> nediabetické vrhy/(n=22)	0.67	3.72	0.65	1.08	2.29	1.09	38.1 ^{†‡§}	419	22.8 ^{†§}
SEM	0.01	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02	0.4	11	0.4
<i>wt</i> diabetické vrhy/(n=19)	0.64	3.6	0.64	0.93	2.35	1.01	34.4 ^{*†§}	434	20.8 ^{*†}
SEM	0.01	0.05	0.01	0.02	0.04	0.02	0.4	10	0.5
<i>Hif1a</i> ^{+/-} nediabetické vrhy/(n=23)	0.71	3.68	0.7	1.02	2.35	1.07	36.1 ^{*†§}	406	22.5 [†]
SEM	0.01	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.5	9	0.3
<i>Hif1a</i> ^{+/-} diabetické vrhy/(n=7)	0.65	3.58	0.57	0.86	2.44	0.86	31.8 ^{*†‡}	449	19.7 ^{*†‡}
SEM	0.01	0.09	0.01	0.02	0.09	0.02	1.2	14	0.5

AWTd, diastolická tloušťka anteriorní stěny; LVDDd, diastolický rozměr dutiny levé komory; PWTd, diastolická tloušťka posteriorní stěny; AWTs systolická tloušťka anteriorní stěny; LVDs, systolický rozměr dutiny levé komory; PWTs, systolická tloušťka posteriorní stěny; FS%, frakční zkrácení; HR, tepová frekvence; BW, tělesná hmotnost. Statisticky signifikantní rozdíly byly stanoveny pomocí post hoc Tukeyho testu; *, P < 0.05 v porovnání s *wt* z nediabetických vrhů; †, P < 0.05 v porovnání s *wt* z diabetických vrhů; ‡, P < 0.05 v porovnání s *Hif1a*^{+/-} z nediabetických vrhů; §, P < 0.05 v porovnání s *Hif1a*^{+/-} z diabetických vrhů.

Tabulka č. 11: Seznam rozdílně exprimovaných genů ve skupině *Hif1a*^{+/-} potomků z diabetických vrhů v jednotlivých kategoriích biologických procesů.

Kategorie biologických procesů (N genů)	Seznam genů
Odpověď na stres/ (63 genů)	<i>Ackr2, Aldh1a1, Anxa1, Clqa, Clqb, Clqc, C3ar1, C5ar1, Casp4, Ccl2, Ccl6, Ccl7, Ccl9, Cd14, Cd55, Cd9, Claspl, Clec4n, Col3a1, Coro1a, Cotl1, Ctss, Cul4a, Cxcl1, Dab2, Dhx9, Duox1, Duoxa1, Ecm1, F13a1, Fcgr2b, Fcna, Fstl1, Icam1, Ifitm1, Il33, Impact, Itgam, Lmcd1, Loxl2, Lyz2, Malt1, Mrcl, Mylk3, Myocd, Nek1, Nlrp10, Pf4, Plek, Ptgs1, Ptprij, Rps6kb1, Serpinb6a, Setd2, Sfrp1, Srpj, Stab1, Tgfbr2, Tlr13, Txnip, Tyrobp, Vav1, Vldlr</i>
Vývojové procesy/ (79 genů)	<i>Adra1a, Aldh1a1, Amigo2, Anxa1, Clqb, Clqc, C3ar1, C5ar1, Casp4, Ccdc141, Ccdc80, Ccl2, Ccl7, Ccl9, Cd248, Cd53, Cd9, Cep126, Claspl, Clec3b, Col3a1, Coro1a, Ctsc, Cul4a, Cxcl1, Dab2, Dact2, Delk1, Duox1, Duoxa1, Ecm1, Fbn1, Gas7, Hcls1, Hexa, Icam1, Ifitm1, Il33, Ildr2, Impact, Itgam, Kcnab2, Kdm3a, Kdm5a, Loxl2, Lrp1, Malt1, Mfap5, Mknk2, Mmp19, Mylk3, Myocd, Nbl1, Nek1, Nrn1, Pf4, Pi16, Pirb, Pkp2, Plek, Ptgs1, Ptprij, Rpn2, Rps6kb1, Rpsa, S100a10, Serpinb6a, Setd2, Sfrp1, Stab1, Stmn4, Syne1, Tgfbr2, Txnip, Tyrobp, Usp9x, Vav1, Vldlr, Zbtb7b</i>
Metabolické procesy/ (73 genů)	<i>A4galt, Adgrd1, Adra1a, Anxa1, Arell1, Asb11, Asb15, B3gat3, Clqa, Clqb, Clqc, C5ar1, Casp4, Ccl2, Ccl6, Ccl7, Ccl9, Cd55, Clec3b, Clk1, Col3a1, Ctsc, Ctss, Cul4a, Dab2, Dcaf5, Delk1, Ddost, Dok2, Dusp27, Ecm1, Eef1g, F13a1, Fbn1, Fcna, Hcls1, Herc3, Icam1, Il33, Ildr2, Impact, Itgam, Kdm3a, Kdm5a, Loxl2, Malt1, March1, Mknk2, Mmp19, Mylk3, Myocd, Nek1, Pcolce, Pf4, Pfkfb2, Pi16, Plek, Pm20d2, Ppp1r37, Psm1, Ptprij, Rpn2, Rps6kb1, Rpsa, Serpinb6a, Setd2, Sfrp1, Tgfbr2, Tlr13, Trim33, Txnip, Usp9x, Vldlr</i>
Procesy imunitního systému/ (55 genů)	<i>Anxa1, Clqa, Clqb, Clqc, C3ar1, C5ar1, Casp4, Ccl2, Ccl6, Ccl7, Ccl9, Cd14, Cd248, Cd300ld, Cd55, Clec4n, Col3a1, Coro1a, Ctsc, Ctss, Cul4a, Cxcl1, Dab2, Dact2, Ddost, Ecm1, Fbn1, Fcgr2b, Fcna, Fyb, Hcls1, Icam1, Ifitm1, Il33, Itgam, Kenab2, Lmcd1, Malt1, March1, Mfap5, Mknk2, Mrcl, Myo1g, Nbl1, Nlrp10, Pf4, Pirb, Plek, Ptprij, Sfrp1, Tgfbr2, Tlr13, Tyrobp, Vav1, Zbtb7b</i>
Regulace buněčné proliferace/ (33 genů)	<i>Anxa1, C3ar1, C5ar1, Ccl2, Cd248, Cd9, Coro1a, Cul4a, Cxcl1, Dab2, Dpt, Ecm1, Fcgr2b, Fgf16, Folr2, Hcls1, Ifitm1, Il33, Itgam, Loxl2, Lrp1, Malt1, Myocd, Pf4, Pkp2, Ptgs1, Ptprij, Rps6kb1, Sfrp1, Srpj, Tgfbr2, Txnip, Wdr13</i>

Tabulka č. 11: pokračování

Angiogeneze/ (11 genů)	<i>C3ar1, C5ar1, Ccdc80, Ccl2, Ecm1, Loxl2, Mmp19, Pf4, Setd2, Stab1, Tgfbr2</i>
Organizace extracelulární matrix/ (10 genů)	<i>Ccdc80, Ccl2, Clasp1, Col3a1, Ctss, Dpt, Loxl2, Mfap5, Mmp19, Mrc2</i>
Buněčná smrt/ (28 genů)	<i>Aldh1a1, Amigo2, Anxa1, Arell, C5ar1, Casp4, Ccl2, Cd248, Corola, Ctsc, Dab2, Emp3, Fcgr2b, Hcls1, Icam1, Il33, Impact, Ivns1abp, Lrp1, Malt1, Mknk2, Myocd, Pf4, Rps6kb1, Sfrp1, SrpX, Tgfbr2, Txnip</i>
Buněčná komunikace/ (76 genů)	<i>Ackr2, Adgrd1, Adrala, Anxa1, Asb11, Asb15, C3ar1, C5ar1, Casp4, Ccl2, Ccl6, Ccl7, Ccl9, Cd14, Cd53, Cd9, Clec4n, Col3a1, Corola, Ctsc, Cxcl1, Dab2, Dact2, Delk1, Dok2, Duox1, Ecm1, Fbn1, Fcgr2b, Fcna, Fgf16, Frat2, Fyb, Gpr22, Hcls1, Hexa, Icam1, Il33, Ildr2, Impact, Iqgap2, Itgam, Ivns1abp, Kdm3a, Lmcd1, Lrp1, Malt1, Mknk2, Myo1g, Myocd, Nbl1, Ncln, Olfr78, P2ry6, Pf4, Pfkfb2, Pirb, Pkp2, Plek, Ptgs1, Ptprij, Rab15, Rps6kb1, Rrad, Sfrp1, Snx13, SrpX, Stab1, Tgfbr2, Tlr13, Trim33, Txnip, Tyrobp, Usp9x, Vav1, Vldlr</i>
Transport/ (24 genů)	<i>Anxa1, Atp8a1, Atp9a, Ccl2, Cd14, Cd9, Clasp1, Corola, Dab2, Fcgr2b, Lrp1, Mrc1, Mrc2, Msr1, Myo1g, Osbpl6, Plek, Rab15, S100a10, SrpX, Syne1, Tgfbr2, Vav1, Vldlr</i>
Ostatní/ (79 genů)	<i>Adamts13, Adamts14, Adssl1, Aldh1a2, Ankrd28, Arpc1b, Arpc3, Atf6b, Axl, Blk, Cadm3, Capg, Ccser2, Cd320, Cdk2ap2, Cfp, Chd4, Clpx, Cmah, Cpn2, Creld1, Ctsa, Ctsz, Dhdh, Efhd2, Emc10, Emilin2, Fbln1, Fbln2, Fgl2, Fmr1nb, Fxyd5, Fycol, G0s2, Gusb, Hck, Hn1, Igfbp4, Itgb2, Kap, Laptm5, Lbp, Luzp2, Lyve1, Mat2a, Mmp9, Mpeg1, Mpped2, Ms4a6d, Myh11, Ncf1, Ncf4, Nxpe5, Pacsin2, Pcf11, Pknnox2, Pla1a, Plekhh1, Plod3, Ptchd3, Ptgis, Rpl8, Sacs, Scin, Sla, Slc35e2, Slc7a7, Tcn2, Timp1, Tmem245, Ttc39b, Ubn2, Vwf, Wfdc17, Xpo4, Zbtb11, Zfp397, Zfp442, Zfp655</i>

Tabulka č. 12: Seznam genů v jednotlivých skupinách Vennova diagramu.

Skupina/ geny (N)	Seznam genů
<i>Hif1a</i>^{+/-} diabetické vrhy/ (135 genů)	<i>Itgb2, Cfp, Timp1, Vwf, Scin, Axl, Pla1a, Hck, Cadm3, Fbn1, G0s2, Fxyd5, Aldh1a2, Blk, Adamtsl4, Ncf1, Lbp, Cmah, Igfbp4, Mmp9, Ptgis, Myh11, Ccl6, Ccl9, Plek, Myo1g, Myocd, Rab15, Iqgap2, Xpo4, Stmn4, Dok2, Fyb, Dab2, Sla, Zbtb11, Ccdc80, Fstl1, Hcls1, Cpn2, Clec4n, Pi16, Emilin2, Zfp397, Ms4a6d, Il33, Msr1, Ptprij, Ifitm1, Clec3b, Gsta3, Col3a1, Cd55, Dpt, Fcgr2b, Mre1, Fcna, Fbn1, Tspan18, Duoxa1, Dclk1, Ecm1, Laptm5, Kenab2, Pf4, Cxcl1, Arpc1b, Mfap5, Ctsc, Tyrobp, Coro1a, Itgam, Lyve1, Cotl1, Rrad, Tgfbr2, Malt1, Folr2, Kap, Gas7, Duox1, Casp4, Tlr13, Vav1, Loxl2, Cd300ld, Ccl7, Ccl2, Pknnox2, March1, Cl1qa, Cl1qc, Cl1qb, Ctss, F13a1, Nrn1, Ptchd3, Fgl2, Emp3, Lrp1, C3ar1, Ildr2, Cd53, Nbl1, Pcf11, Slc35e2, Stab1, Olfr78, Adgrd1, Gpr22, Acker2, Adra1a, Mpeg1, Ptgs1, Nxpe5, Frat2, A4galt, Amigo2, P2ry6, Dact2, C5ar1, Cdh20, Cd14, Kdm3a, Pm20d2, Cd248, Capg, Pirb, Fmr1nb, Luzp2, Lyz2, Wfdc17, Adamts13, Ncf4, SrpX</i>
<i>wt</i> diabetické vrhy/ (39 genů)	<i>Scin, Axl, Fxyd5, Aldh1a2, Ncf1, Ptgis, Ccl6, Ccl9, Mknk2, Rab15, Stmn4, Fyb, Sla, Ms4a6d, Il33, Msr1, Gsta3, Fbn1, Tspan18, Cxcl1, Lyve1, Tsc22d3, Kap, Tlr13, Ccl2, March1, Txnip, Ctss, Fgl2, Cd53, Olfr78, Frat2, Amigo2, Cdh20, Aldh1a1, Fmr1nb, Cyt11, Luzp2, Trp53i11</i>
<i>Hif1a</i>^{+/-} nediabetické vrhy/ (17 genů)	<i>Mmp9, Rab15, Hif1a, Duoxa1, Itgam, Kap, Ccl7, Ccl2, Nrn1, Ptchd3, Olfr78, Acker2, Frat2, Cdh20, Plekhh1, Fmr1nb, Zfp442</i>
<i>Hif1a</i>^{+/-} diabetické vrhy + <i>Wt</i> diabetické vrhy/ (26 genů)	<i>Ctss, Lyve1, Il33, Ccl6, Stmn4, Tspan18, Gsta3, Fgl2, Scin, Ccl9, Aldh1a2, Axl, Ms4a6d, Amigo2, Sla, Ptgis, Msr1, Cd53, Tlr13, Fbn1, Fyb, Luzp2, Cxcl1, Ncf1, March1, Fxyd5</i>
<i>Hif1a</i>^{+/-} diabetické vrhy + <i>Hif1a</i>^{+/-} nediabetické vrhy/ (7 genů)	<i>Acker2, Duoxa1, Nrn1, Mmp9, Ccl7, Itgam, Ptchd3</i>
<i>Hif1a</i>^{+/-} diabetické vrhy + <i>wt</i> diabetické vrhy + <i>Hif1a</i>^{+/-} nediabetické vrhy/ (7 genů)	<i>Frat2, Cdh20, Olfr78, Ccl2, Kap, Fmr1nb, Rab15</i>

Tabulka č. 13: Seznam genů, jejichž exprese je změněna o $\geq 30\%$.

Skupina/ (N genů)	Seznam genů
<p>Geny se zvýšenou expresí/ (111 genů)</p>	<p><i>Itgb2, Cfp, Timp1, Vwf, Axl, Pla1a, Hck, Cadm3, Fbln1, Fxyd5, Aldh1a2, Adamtsl4, Ncf1, Lbp, Cmah, Igfbp4, Ptgis, Ccl6, Ccl9, Plek, Myo1g, Rab15, Stmn4, Dok2, Fyb, Dab2, Sla, Ccdc80, Fstl1, Hcls1, Clec4n, Pi16, Emilin2, Ms4a6d, Il33, Msr1, Ptpnj, Ifitm1, Clec3b, Gsta3, Col3a1, Cd55, Dpt, Fcgr2b, Mrcl, Fcna, Duoxa1, Dclk1, Ecm1, Laptm5, Kcnab2, Pf4, Cxcl1, Arpc1b, Mfap5, Ctsc, Tyrobp, Coro1a, Lyve1, Cotl1, Rrad, Tgfbr2, Folr2, Gas7, Duox1, Casp4, Tlr13, Vav1, Loxl2, Cd300ld, Pknx2, March1, C1qa, C1qc, C1qb, Ctss, F13a1, Fgl2, Emp3, Lrp1, C3ar1, Ildr2, Cd53, Nbl1, Stab1, Adgrd1, Mpeg1, Ptgs1, Nxp5, Frat2, A4galt, Amigo2, P2ry6, Dact2, C5ar1, Cd14, Cd248, Capg, Pirb, Lyz2, Wfdc17, Adamtsl3, Ncf4, Srpj, Mknk2, Tsc22d3, Aldh1a1, Cyt11, Hif1a, Plekhh1, Zfp442</i></p>
<p>Geny se sníženou expresí/ (25 genů)</p>	<p><i>Scin, G0s2, Blk, Myh11, Myocd, Iqgap2, Xpo4, Zbtb11, Cpn2, Zfp397, Tspan18, Malt1, Nrn1, Ptchd3, Pcf11, Slc35e2, Olfr78, Gpr22, Adrala, Cdh20, Kdm3a, Pm20d2, Luzp2, Txnip, Trp53i11</i></p>
<p>Geny se změněnou expresí/ (8 genů)</p>	<p><i>Mmp9, Itgam, Kap, Ccl7, Ccl2, Ackr2, Fmr1nb, Fbn1</i></p>

Tabulka č. 14: Seznam cílů signalizace HIF-1

Kategorie	Geny N/ % ze 135 genů	Seznam genů
Přímé cíle HIF-1	9 genů/6.7%	<i>Adgrd1, Axl, Cd55, Cfp, Kdm3a, Loxl2, Lrp1, Pcf11, Sla</i>
Expresce genu spojená s <i>Hif1a</i>	18 genů/13.3%	<i>Aldh1a2, Capg, Cd248, Col3a1, Coro1a, Cxcl1, Dclk1, Ifitm1, Il33, Lyve1, Msr1, Myh11, Ptgis, Ptgs1, Ptpnj, Srpj, Tgfbr2, Timp1</i>
Expresce genu spojená s hypoxií	42 genů/31.1%	<i>Adra1a, Amigo2, Clqa, Clqb, Ccl2, Ccl7, Ccl9, Cd53, Cpn2, Ctsc, Ctss, Dpt, Ecm1, Emp3, F13a1, Fbln1, Fbn1, Fcgr2b, Fgl2, Folr2, Frat2, Fstl1, Fxyd5, Fyb, G0s2, Gas7, Gsta3, Igfbp4, Itgb2, Kap, Lbp, Mmp9, Mpeg1, Myocd, Ncf1, Nrn1, Pirb, Rab15, Rrad, Stab1, Vav1, Vwf</i>
Předpokládané cíle HIF-1	12 genů/8.9%	<i>C5ar1, Capg, Ccdc80, Ctss, Fmr1nb, Fyb, Itgb2, Mmp9, Myocd, Ptgis, Rab15, Vwf</i>
Geny patřící do rodiny s předpokládaným cílem HIF-1	62 genů/45.9%	<i>Ackr2, Adamts13, Adamts14, Adgrd1, Aldh1a2, Amigo2, Arpc1b, Clqa, Clqb, Clqc, Casp4, Ccl2, Ccl6, Ccl7, Ccl9, Cd14, Cd248, Cd300ld, Cd53, Cd55, Cdh20, Clec3b, Clec4n, Col3a1, Coro1a, Ctsc, Cxcl1, Ecm1, Emilin2, Emp3, Fbln1, Fcna, Frat2, Fxyd5, Gas7, Gpr22, Gsta3, Ifitm1, Il33, Itgam, Kcnab2, Kdm3a, Lbp, Mfap5, Mrc1, Ms4a6d, Myh11, Myo1g, Nxp5, Olfr78, P2ry6, Plek, Ptchd3, Ptgs1, Ptpnj, Slc35e2, Tgfbr2, Tlr13, Vav1, Wfdc17, Zbtb11, Zfp397</i>

Seznam genů se změnou exprese $\geq 30\%$ ve skupině *Hif1a*^{+/-} potomků z diabetických vrhů (N = 135) byl použit pro ruční vyhledání přímých cílů signalizace HIF-1 a genů, jejich exprese je ovlivněna změnami v expresi *Hif1a* nebo hypoxií. Pro vyhledání předpokládaných cílů a genů patřících do rodin s předpokládaným cílem signalizace HIF-1 určených na základě přítomnosti motivu odpovídajícího vazebnému místu (HRE) byla použita databáze Harmonizome (Rouillard *et al.*, 2016).

Tabulka č. 15: Seznam genů v obohacených kategoriích biologických procesů.

	Biologické procesy/ geny (N)	Seznam genů
wt diabetické vrhy	Zánětlivá odpověď/ (10 genů) P=0.000151	<i>Axl, Ncf1, Ptgis, Ccl6, Ccl9, Il33, Cxcl1, Tlr13, Ccl2, Ctss</i>
	Procesy imunitního systému/ (16 genů) P=0.00173	<i>Scin, Axl, Ncf1, Ccl6, Ccl9, Mknk2, Fyb, Sla, Il33, Fbn1, Cxcl1, Tsc22d3, Tlr13, Ccl2, March1, Ctss</i>
Hif1a^{+/-} diabetické vrhy	Procesy imunitního systému/ (54 genů) P=2.72E-16	<i>Itgb2, Cfp, Scin, Axl, Hck, Blk, Ncf1, Lbp, Mmp9, Ccl6, Ccl9, Plek, Myo1g, Fyb, Sla, Hcls1, Clec4n, Il33, Ptpnj, Ifitm1, Col3a1, Cd55, Mrc1, Fcna, Fbn1, Ecm1, Kcnab2, Pf4, Cxcl1, Mfap5, Ctsc, Tyrobp, Coro1a, Tgfbr2, Malt1, Casp4, Tlr13, Vav1, Cd300ld, Ccl7, Ccl2, March1, Clqa, Clqc, Clqb, Ctss, Lrp1, C3ar1, Nbl1, Dact2, C5ar1, Cd14, Cd248, Pirb</i>
	Vývojové procesy/ (61 genů) P=0.00226	<i>Itgb2, Timp1, Scin, Axl, Hck, Fbn1, Aldh1a2, Blk, Adamts14, Mmp9, Ptgis, Myh11, Ccl9, Plek, Myocd, Stmn4, Dab2, Sla, Hcls1, Il33, Msr1, Ifitm1, Clec3b, Gsta3, Col3a1, Fbn1, Duoxa1, Dclkl, Ecm1, Kcnab2, Pf4, Cxcl1, Mfap5, Ctsc, Tyrobp, Coro1a, Tgfbr2, Malt1, Duox1, Casp4, Vav1, Loxl2, Ccl7, Ccl2, Clqc, Clqb, Nrn1, Lrp1, C3ar1, Ildr2, Cd53, Nbl1, Stab1, Adra1a, Ptgs1, Amigo2, Dact2, C5ar1, Kdm3a, Cd248, Pirb</i>
	Odpovědi na podnět/ (90 genů) P=3.38E-6	<i>Itgb2, Cfp, Timp1, Vwf, Axl, Hck, Fbn1, G0s2, Aldh1a2, Blk, Ncf1, Lbp, Igfbp4, Mmp9, Ptgis, Ccl6, Ccl9, Plek, Myo1g, Myocd, Iqgap2, Dok2, Fyb, Dab2, Sla, Fstl1, Hcls1, Clec4n, Il33, Msr1, Ptpnj, Ifitm1, Clec3b, Gsta3, Col3a1, Cd55, Mrc1, Fcna, Fbn1, Tspan18, Duoxa1, Dclkl, Ecm1, Laptm5, Pf4, Cxcl1, Arpc1b, Ctsc, Tyrobp, Coro1a, Itgam, Lyve1, Cotl1, Rrad, Tgfbr2, Malt1, Duox1, Casp4, Tlr13, Vav1, Loxl2, Ccl7, Ccl2, March1, Clqa, Clqc, Clqb, Ctss, F13a1, Lrp1, C3ar1, Ildr2, Cd53, Nbl1, Stab1, Olfr78, Adgrd1, Gpr22, Acker2, Adra1a, Ptgs1, Frat2, P2ry6, Dact2, C5ar1, Cd14, Kdm3a, Pirb, Lyz2, SrpX</i>

Pokračování tabulky č. 15

	Biologické procesy/ geny (N)	Seznam genů
Hif1a^{+/-} diabetické vrhy	Buněčná komunikace/ (69 genů) P=0.00108	<i>Itgb2, Timp1, Axl, Hck, Fbln1, G0s2, Aldh1a2, Blk, Ncf1, Lbp, Igfbp4, Mmp9, Ptgis, Ccl6, Ccl9, Plek, Myo1g, Myocd, Iqgap2, Dok2, Fyb, Dab2, Sla, Hcls1, Clec4n, Il33, Ptprj, Col3a1, Mrc1, Fcna, Fbn1, Tspan18, Dclk1, Ecm1, Pf4, Cxcl1, Ctsc, Tyrobp, Coro1a, Itgam, Lyve1, Rrad, Tgfbr2, Malt1, Duox1, Casp4, Tlr13, Vav1, Ccl7, Ccl2, Lrp1, C3ar1, Ildr2, Cd53, Nbl1, Stab1, Olfr78, Adgrd1, Gpr22, Acker2, Adra1a, Frat2, P2ry6, Dact2, C5ar1, Cd14, Kdm3a, Pirb, SrpX</i>
	Apoptotické procesy/ (26 genů) P=0.0455	<i>Timp1, Scin, Axl, Hck, G0s2, Aldh1a2, Adamtsl4, Ncf1, Mmp9, Ptgis, Myocd, Dab2, Hcls1, Il33, Pf4, Ctsc, Coro1a, Tgfbr2, Malt1, Casp4, Ccl2, Lrp1, Amigo2, C5ar1, Cd248, SrpX</i>
	Regulace angiogeneze/ (9 genů) P=0.0244	<i>Itgb2, Ptgis, Ecm1, Pf4, Tgfbr2, Ccl2, C3ar1, Stab1, C5ar1</i>
	Buněčná proliferace/ (30 genů) P=0.00159	<i>Timp1, Scin, Hck, Fbln1, Aldh1a2, Blk, Ncf1, Igfbp4, Mmp9, Myocd, Sla, Hcls1, Il33, Ptprj, Ifitm1, Dpt, Ecm1, Pf4, Cxcl1, Coro1a, Tgfbr2, Malt1, Folr2, Loxl2, Ccl2, Lrp1, Ptgs1, C5ar1, Cd248, SrpX</i>
	Endocytosa/ (18 genů) P=0.00025	<i>Axl, Hck, Lbp, Myo1g, Dab2, Msr1, Mrc1, Coro1a, Tgfbr2, Vav1, Loxl2, Ccl2, Lrp1, Stab1, Acker2, Cd14, Ncf4, SrpX</i>
	Odpověď na stres/ (55 genů) P=1.84E-09	<i>Itgb2, Cfp, Timp1, Vwf, Axl, Hck, Fbln1, Blk, Ncf1, Lbp, Igfbp4, Mmp9, Ptgis, Ccl6, Ccl9, Plek, Myocd, Sla, Fstl1, Clec4n, Il33, Ifitm1, Col3a1, Cd55, Mrc1, Fcna, Duoxa1, Ecm1, Pf4, Cxcl1, Tyrobp, Coro1a, Cotl1, Tgfbr2, Malt1, Duox1, Casp4, Tlr13, Vav1, Loxl2, Ccl7, Ccl2, Clqa, Clqc, Clqb, Ctss, F13a1, C3ar1, Stab1, Acker2, Ptgs1, C5ar1, Cd14, Lyz2, SrpX</i>
	Migrace leukocytů/ (17 genů) P=9.51E-09	<i>Itgb2, Lbp, Mmp9, Ccl6, Ccl9, Myo1g, Il33, Ecm1, Pf4, Cxcl1, Coro1a, Vav1, Ccl7, Ccl2, C3ar1, Nbl1, C5ar1</i>
	Organizace ECM/ (9 genů) P=0.0121	<i>Fbln1, Adamtsl4, Mmp9, Myh11, Ccdc80, Col3a1, Dpt, Loxl2, Ctss</i>

Tabulka č. 16: Obohacené kategorie savčích fenotypových ontologií

Obohacené kategorie savčích fenotypových ontologií	Holm-Bonferroni	Počet genů
Abnormalní vrozená imunita [MP:0002419]	3.93E-10	25
Abnormalní fyziologie krevních cév [MP:0000249]	5.85E-06	17
Abnormalní fyziologie cévní hladké svaloviny [MP:0005595]	0.002573	9
Abnormalní fyziologie imunitního systému [MP:0001790]	2.10E-08	51
Fenotyp imunitního systému [MP:0005387]	2.74E-07	60
Fenotyp homeostasy/metabolismu [MP:0005376]	0.000693	63

6. Diskuse

Předkládaná práce hodnotí vliv maternálního diabetu na vývoj srdce v prenatálním a postnatálním období. První část práce je zaměřena na embryonální vývoj v prostředí maternálního diabetu. Mezi počty embryí z nediabetických a diabetických vrhů nebyl zjištěn rozdíl, stejně tak množství absorbovaných embryí nebylo statisticky signifikantně změněno. Nicméně, u diabetických embryí byl detekován opožděný růst (Tabulka č. 8), což koresponduje se studii, které spojují intrauterinní růstovou retardaci s pre-gestačním maternálním diabetem (Mitanchez *et al.*, 2015, Fetita *et al.*, 2006). Porovnání relativních velikostí orgánů ve vztahu k tělu ukázalo zvětšení srdce (Obrázek č. 12), to odpovídá závěrům studie provedené na potkaním modelu maternálního diabetu (Lehtoranta *et al.*, 2013). Hypertrofie srdce byla pozorována také u dětí narozených diabetickým matkám (Lin *et al.*, 2017). Hypertrofie myokardu je sama o sobě patologickým znakem (Shimizu a Minamino, 2016).

Analýza vnější morfologie embryí ukázala v diabetických vrzích významně navýšené množství defektů nervové trubice a kardiovaskulárních defektů, jako jsou otoky a krvácení (Obrázek č. 12), což jsou výsledky konzistentní s již publikovanou literaturou, podle které jsou tyto soustavy k defektům způsobených maternálním diabetem nejnáchylnější (Bohuslavova *et al.*, 2013, Gabbay-Benziv *et al.*, 2015, Farrell *et al.*, 2002). Histologická analýza srdcí v E14,5, kdy je dokončen vývoj všech struktur (Savolainen *et al.*, 2009), ukázala, že nejčastější vývojový defekt způsobený vlivem maternálního diabetu je nekompletní uzavření mezikomorového septa (Obrázek č. 12). Kromě toho měla všechna srdce diabetických embryí ztenčený myokard, který je pravděpodobně způsoben sníženou proliferací detekovanou v srdcích diabetických embryí (Bohuslavova *et al.*, 2013).

Časový profil změn v expresi mRNA izolované z embryonálního srdce od E10,5 do E18,5 byl získán analýzou změn v expresi genů vybraných na základě výsledků předchozí studie změn v mRNA izolované z celých embryí, která ukázala změny v expresi zejména u genů kódujících transkripční faktory (Pavlinkova *et al.*, 2009). Bylo vybráno 11 genů, jejichž deregulace v embryonálním srdci by na základě literatury mohla přispívat k rozvoji kardiovaskulárních defektů. Porovnání změn v průběhu embryonálního vývoje od E10,5

po E18,5 ukázalo deregulaci vybraných genů v srdci vlivem diabetu (Obrázek č. 15). Grafické znázornění intenzity expresních změn (Obrázek č. 14) ukazuje, že největší změny v expresi byly detekovány v E13,5, E14,5 a E18,5. Embryonální dny 13,5 a 14,5 jsou spojeny s růstem kompaktní vrstvy myokardu komor, kompaktace tkáně, expanze srdečních komor a dokončení septace (Risebro a Riley, 2006, Sedmera *et al.*, 2000). Mimo jiné dochází v tomto období k sekundární tranzici během vývoje pankreatu a k diferenciaci B-buněk, což vede ke stonásobnému zvýšení produkce inzulínu (Green *et al.*, 2010). Embryonální nadprodukce inzulínu v diabetickém prostředí představuje jeden z možných faktorů ovlivňujících genovou expresi. Vliv inzulínu na embryonální vývoj je podporován také studiemi ukazujícími, že zatímco nedostatek inzulínu vede k opožděnému růstu plodu (Travers *et al.*, 1989, Vambergue a Fajardy, 2011), hyperinzulinemie je spojována s makrosomií, tedy abnormálně velkými novorozenci (Schwartz *et al.*, 1994, Hoegsberg *et al.*, 1993).

S diabetickou embryopatií jsou nejčastěji spojovány defekty septace, transpozice velkých cév, perzistentní *truncus arteriosus*, dvojodtoková pravá komora a syndrom hypoplasie levé komory (Kumar *et al.*, 2007, Wren *et al.*, 2003). U myších embryí vystavených maternálnímu diabetu bylo také pozorováno ztenčení myokardu (Bohuslavova *et al.*, 2013). Široké spektrum defektů naznačuje, že maternálním diabetem není ovlivněn pouze jeden proces, mnoho z výše zmíněných defektů však lze spojit s poruchou EMT a vývoje, či migrace buněk ze srdeční neurální lišty. Během vývoje srdce se EMT uplatňuje při tvorbě endokardových polštářů, a při vycestování buněk z epikardu. Buňky neurální lišty migrují do odtokové části komor a tím se podílejí na správném vytvoření velkých cév (Miyagawa-Tomita *et al.*, 1991). Mimo to byl ztenčený myokard asociován s narušeným procesem epikardiální EMT (Kreidberg *et al.*, 1993, Wagner *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2008). EMT je proces, který je spojen také s defekty atrioventrikulárního septa, protože se podílí na tvorbě endokardových polštářů, které tvoří jeho část (Sedmera *et al.*, 2000, Wessels a Sedmera, 2003). V době, kdy dochází k závěrečným procesům v tvorbě septa a remodelaci velkých cév, tedy v E13,5, bylo detekováno snížení exprese genů *Itgav*, *Tgfb1*, *Pdgfra*, *Il6st*, *Efnb2* a *Baz1b*.

Delece *Itgav* je letální, většinou v prenatalním stádiu (Bader *et al.*, 1998). Projevuje se defekty vaskularizace, otokem perikardu a ztenčením myokardu. *Tgfb1* je obecně důležitý

pro EMT, jeho delece v epikardu vede k narušení růstu myokardu a abnormalitám koronárních cév (Sridurongrit *et al.*, 2008). Delece *Tgfbr1* v endokardu vede k hypoplasii endokardových polštářů (Sorensen *et al.*, 2003). Celková delece *Tgfbr1* je embryonálně letální v důsledku defektů cév placenty a žloutkového váčku (Larsson *et al.*, 2001). Podobně i delece *Il6st* je embryonálně letální, má za následek vývoj srdce se ztenčeným myokardem avšak beze změny ve vrstvě trabekul a defektů septa (Yoshida *et al.*, 1996). Defekty mezisíňového a mezikomorového septa, ale také dvojodtokovou pravou komoru způsobuje delece *Pdgfra* (Bax *et al.*, 2010). Defektní vývoj cév žloutkového váčku byl pozorován u embryí s delecí *Efnb2* a *Vegfa* (Adams *et al.*, 1999, Carmeliet *et al.*, 1996, Ferrara *et al.*, 1996). Delece *Efnb2* a *Pdgfra* jsou dávány do souvislosti také se změnami ve vývoji buněk z neurální lišty (Bax *et al.*, 2010, Davy a Soriano, 2007). Kromě toho narušuje inaktivace *Pdgfra* proces EMT z epikardu a má za následek změny v proliferaci a diferenciaci buněk odvozených z epikardu (Mellgren *et al.*, 2008). Geny, jejichž snížená exprese byla detekována v E13,5, tedy mohou být ve světle těchto poznatků dány do souvislosti s pozorovaným ztenčením myokardu. Zvýšení exprese mRNA genů *Il6st*, *Baz1b* a *Itgav* pozorované v E14,5 by mohlo být projevem kompenzačních mechanismů, nicméně je možné, že nebylo dosaženo optimální úrovně, která se v čase může rychle měnit, jak ukazují grafy časových profilů změn v expresi na obrázku č. 15.

Navíc byly zmíněné geny spolu s *Cxadr*, *Adam10*, *Ctss* a *Vegfa* v E14,5 změněny také u embryí s kardiovaskulárními defekty (obrázek č.17). V E14,5 byla však u embryí s defekty exprese *Il6st*, *Baz1b* a *Itgav* snížena, na rozdíl od embryí bez defektů, což dále podporuje hypotézu, že se deregulace těchto genů může podílet na ztenčení myokardu pozorovaném u embryí vystavených maternálnímu diabetu (Bohuslavova *et al.*, 2013). U diabetických embryí s defekty byla nejvýrazněji změněna exprese genu *Vegfa*, která nebyla v E13,5 a E14,5 signifikantně změněna u diabetických embryí bez defektů (obrázek č.16). Nicméně změny v expresi *Efnb2* a *Flt1*, které se podílí na modulaci přenosu signálu VEGFA (Kappas *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2010), naznačují deregulaci této signální dráhy.

Expresí VEGFA je během embryonálního vývoje přísně regulována. Jeho deregulace vede k embryonální letalitě v důsledku kardiovaskulárních defektů (Miquerol *et al.*, 2000, Carmeliet *et al.*, 1996, Ferrara *et al.*, 1996). Delece *Vegfa* v heterozygotním stavu je

embryonálně letální v E9,5 a podobně i dvoj- až trojnásobné zvýšení exprese vede k vážným defektům ve vývoji srdce a je letální mezi E12,5 a E14,5. Jak snížená, tak zvýšená exprese *Vegfa* má za následek ztenčení myokardu, v případě zvýšení exprese je to navíc doprovázeno navýšením množství trabekul (Miquerol *et al.*, 2000). Podobný efekt má také vystavení embryí maternálnímu diabetu (Bohuslavova *et al.*, 2013). Výsledky ukazující snížení exprese *Vegfa* v celých embryích v E8,5 (obrázek č. 18) vlivem maternálního diabetu jsou s těmito poznatky v souladu, podobně jako studie ukazující sníženou expresi *Vegfa* ve žlutkových váčcích embryí kultivovaných v hyperglykemických podmínkách (Pinter *et al.*, 2001). V srdcích embryí starých E9,5 vystavených diabetu byla exprese *Vegfa* variabilní (obrázek č. 18), některá embrya měla hladinu mRNA *Vegfa* sníženou, a některá měla expresi zvýšenou. V srdcích embryí starých E10,5 vystavených diabetu byla exprese *Vegfa* naopak signifikantně zvýšena oproti embryím z nediabetických vrhů (obrázek č. 16). Vysokou variabilitu v expresi *Vegfa* způsobenou vlivem maternálního diabetu ukázaly i další studie, které se věnovaly studiu mRNA i proteinu VEGFA v srdcích v pozdějších vývojových stádiích (Kumar *et al.*, 2008, Roest *et al.*, 2009). V předkládané práci bylo na úrovni proteinu zjištěno zvýšení exprese VEGFA v srdci ve věku E10,5 (obrázek č. 20), které koresponduje se zvýšenou expresí na úrovni mRNA. *Vegfa* je cílem signalizace HIF-1 (Shweiki *et al.*, 1992, Ryan *et al.*, 1998), hlavního regulátoru odpovědi na hypoxii. Detekce hypoxie v tkáni potvrdila zvýšení hypoxie v srdcích diabetických embryí starých E10,5 a s tím související navýšení stabilizace proteinu HIF-1 α ve srovnání s nediabetickými embryi (obrázek č. 21). Hypoxií indukované navýšení VEGFA vede k inhibici EMT, která je nutná pro vytvoření endokardových polštářů v atrioventrikulárním kanálu, a vývoji ztenčeného myokardu (Dor *et al.*, 2001). Možnou souvislost změny v expresi *Vegfa* vlivem maternálního diabetu a rozvoj defektů podporuje analýza změn mRNA v srdcích embryí starých E14,5, u kterých byly zjištěny kardiovaskulární defekty, která ukazuje, že tato embrya měla změněnou expresi mRNA *Vegfa* (obrázek č. 16). Většina kardiovaskulárních defektů, včetně defektů AVS, vzniká v důsledku narušení tvorby endokardových polštářů (Srivastava a Olson, 2000). Defekty septace jsou nejčastějšími kardiovaskulárními defekty vznikajícími vlivem maternálního diabetu a to i v použitém experimentálním modelu (Bohuslavova *et al.*, 2013).

Kromě toho, že má maternální diabetes teratogenní efekt během embryonálního vývoje, představuje i pro potomky, kteří se narodí bez vrozených vývojových vad, zvýšené

riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (Oyen *et al.*, 2016, Manderson *et al.*, 2002, West *et al.*, 2011, Holemans *et al.*, 1999). V druhé části předkládané práce byly analyzovány změny v srdci potomků diabetických matek. Vzhledem k tomu, že je diabetes spojován s hypoxií v tkáních (Williamson *et al.*, 1993), a předchozí výsledky ukázaly změny v signalizaci HIF-1, byly zařazeny také myši heterozygotní pro globální delecí genu kódujícího HIF-1 α , tedy podjednotku hlavního regulátoru odpovědi na hypoxii, která je v přítomnosti kyslíku degradována (Kaluz *et al.*, 2008). Homozygotní delece *Hif1a* je embryonálně letální (Compernelle *et al.*, 2003, Kotch *et al.*, 1999, Iyer *et al.*, 1998), heterozygotní delece *Hif1a* nemá na embryonální vývoj vliv. Pokud jsou embrya s genotypem *Hif1a*^{+/-} vystavena maternálnímu diabetu, jsou náchylnější k vrozeným vývojovým vadám, včetně zvýšené letality v porovnání s *wt* embryi (Bohuslavova *et al.*, 2013). Tomu odpovídá snížené množství narozených *Hif1a*^{+/-} mláďat diabetickým matkám (obrázek č. 22). Sníženou hmotnost těla měli potomci diabetiček obou genotypů (obrázek č. 22), avšak *Hif1a*^{+/-} potomci diabetiček měli v porovnání s potomky nediabetických matek větší poměr hmotnosti srdce k hmotnosti těla (obrázek č. 22), což ukazuje na hypertrofii srdce. *Hif1a*^{+/-} potomci diabetiček také měli kulatější srdce (obrázek č. 22), tento jev byl pozorován také u dětí vystavených chronické intrauterinní hypoxii, která měla za následek opožděný růst (Crispi *et al.*, 2010). U těchto dětí byla detekována, podobně jako ve zde zkoumaném myším modelu, systolická dysfunkce srdce.

U potomků diabetických myší nebyly detekovány změny v srdeční funkci ve věku 1 týdne (obrázek č. 23), avšak ve věku 12 týdnů měli ve srovnání s *wt* potomky nediabetických matek zhoršenou funkci jak *Hif1a*^{+/-} potomci, kteří nebyli vystaveni diabetu, tak obě skupiny potomků diabetiček, přičemž u *Hif1a*^{+/-} potomků došlo k největšímu zhoršení funkce (obrázek č. 23), což ukazuje, že genotyp *Hif1a*^{+/-} je sám o sobě zátěží do budoucího života, stejně jako maternální diabetes, ale jejich kombinace urychluje zhoršování srdeční funkce. Jak *wt*, tak *Hif1a*^{+/-} potomci diabetiček měli ve věku 12 týdnů sníženou frekvenci srdečního tepu (obrázek č. 23), což naznačuje vliv expozice maternálnímu diabetu na autonomní inervaci srdce.

Analýza transkriptomu ukázala největší změny v expresi genů v LV 12 týdnů starých *Hif1a*^{+/-} potomků diabetiček (obrázek č. 24), což indikuje změnu transkripčního programu

vlivem expozice maternálnímu diabetu. Z této skupiny genů bylo 53 % spojeno se signální dráhou transkripčního faktoru HIF-1, ať už jako potvrzené nebo predikované cílové geny regulace HIF-1. Kombinace maternálního diabetu a genotypu *Hif1a*^{+/-} tedy vede k významným změnám v transkripčním programu v myokardu LV dospělých potomků. Vzhledem k tomu, že se jedná o globální delecii ovlivňující všechny tkáně, nelze vyloučit vliv placentální dysfunkce, protože její správný růst a vývoj je ovlivněn maternálním diabetem a také transkripční regulací HIF-1 (Oyen *et al.*, 2016, Ornoy *et al.*, 2015, Salbaum *et al.*, 2011, Kenchegowda *et al.*, 2017, Burton *et al.*, 2016, Patterson *et al.*, 2012, Dong *et al.*, 2016). Hypoxií indukovaná placentální dysfunkce byla také dána do souvislosti s fetálním programováním.

Mezi procesy změněné v LV *Hif1a*^{+/-} potomků diabetiček patřily podle analýzy transkriptomu zejména metabolické procesy, změny ve vrozených i adaptivních imunitních odpovědích, apoptóze a změny v transkripci genů spojených s vývojovými procesy (obrázek č. 24). Naproti tomu ve skupině *wt* potomků diabetiček byly identifikovány jako změněné pouze procesy spojené s imunitními a zánětlivými reakcemi. Z klinických studií vyplývá, že ženy trpící gestačním diabetem mají zvýšené riziko kardiovaskulárních chorob, které souvisí se změnami v zánětlivých procesech (Goueslard *et al.*, 2016, Vilmi-Kerala *et al.*, 2017, Lekva *et al.*, 2016, Lekva *et al.*, 2017). V souladu s těmito výsledky bylo v našem modelu u LV *wt* potomků diabetiček zjištěno zvýšené množství infiltrovaných makrofágů exprimujících F4/80, které však nebylo pozorováno ve skupině *Hif1a*^{+/-} potomků diabetiček (obrázek č. 27). Narušená schopnost makrofágů migrovat do myokardu *Hif1a*^{+/-} potomků je v souladu s nedávným zjištěním, že HIF-1 α je nezbytný pro makrofágovou zánětlivou odpověď (Cramer *et al.*, 2003). Pozorované navýšení apoptózy v tkáni LV potomků diabetiček obou genotypů detekované metodou TUNEL (obrázek č. 28) naznačuje, že zhoršená migrace makrofágů u *Hif1a*^{+/-} potomků by mohla vést ke snížení fagocytózy apoptotických buněk a tím dále negativně ovlivňovat integritu tkáně, což vede k dalšímu zhoršení srdeční funkce (Cramer *et al.*, 2003).

Kromě apoptózy, která negativně ovlivňuje funkci srdce (Wencker *et al.*, 2003), je významným procesem v remodelaci myokardu také fibróza, která mění vlastnosti tkáně a přispívá k srdeční dysfunkci (Fan *et al.*, 2012). Hlavním proteinem stimulujícím sekreci

kolagenu v srdci je TGF- β 1 (Petrov *et al.*, 2002). Ačkoli je pro remodelaci tkáně vlivem diabetického prostředí charakteristická zvýšená fibróza (van Heerebeek *et al.*, 2008), u potomků diabetiček obou genotypů bylo paradoxně detekováno snížení množství kolagenu v tkáni LV, stejně jako snížená exprese *Tgfb1* (obrázek č. 28). Snížení množství kolagenu bylo detekováno také u *Hif1a*^{+/-} potomků nediabetických matek. HIF-1 reguluje mnoho kroků v biogenezi kolagenu, inhibice podjednotky HIF-1 α vede k jeho snížení (Gilkes *et al.*, 2013). To je v souladu s prezentovaným zjištěním, že *Hif1a*^{+/-} genotyp ovlivňuje množství kolagenu i bez expozice diabetu. Podobně, diabetické prostředí destabilizuje HIF-1 α a ovlivňuje signalizaci HIF-1 (Catrina *et al.*, 2004, Bosch-Marce *et al.*, 2007), která může ovlivnit metabolismus kolagenu v srdci tak, že dojde ke snížení jeho množství. Při výzkumu procesu fetálního programování je však třeba brát v úvahu, že intrauterinní vývoj v diabetickém prostředí a zhoršení srdeční funkce v dospělosti je ovlivněno mnoha faktory, které mohou být přítomny v různých fázích vývoje. Kromě toho je samotná akumulace kolagenu závislá na věku a délce trvání choroby. Snížené množství kolagenních vláken v tkáni může znamenat mezistupeň, kdy dochází k degradaci původních vláken před tím, než se vytvoří nová kolagenní struktura (King *et al.*, 2003). Ztráta kolagenních vláken je spojována s remodelací LV během objemového přetížení a s degradací ECM u dilatované kardiomyopatie (Spinale, 2007), také byla zjištěna u dětí s vrozeným selháváním jedné komory (Nakano *et al.*, 2017). Ačkoli není možné určit, je-li uváděné snížení množství kolagenu v tkáni způsobeno remodelací ECM, které představuje predispozici pro srdeční dysfunkci, je zřejmé, že kombinace vystavení maternálnímu diabetu a haploinsuficience *Hif1a* má vliv na strukturu ECM v myokardu.

Dalším mechanismem spojovaným s patofyziologií diabetického prostředí je zvýšená produkce AGE. Glykační reakce mění fyziologické vlastnosti proteinů ECM a způsobují vnitrobuněčné změny v tkáni myokardu a cév (Vlassara a Striker, 2011), což vede ke zvýšenému riziku mikro- a makrovaskulárních komplikací u diabetických pacientů (Nin *et al.*, 2011). Zvýšené množství těchto pro-oxidativních diabetogenních produktů koreluje se zvýšeným oxidativním stresem, zánětem a apoptózou v tkáních diabetických zvířat a jejich potomků (Peppia *et al.*, 2003). V předkládané práci bylo u *Hif1a*^{+/-} potomků diabetických matek detekováno zvýšené množství AGE (obrázek č. 29), což představuje nový pohled na roli haploinsuficience *Hif1a* a náchylnost ke zvýšené akumulaci AGE v tkáních vystavených

maternálnímu diabetu. Vzhledem k tomu, že HIF-1 reguluje metabolismus glukózy a glykolýzu za účelem minimalizace oxidativního stresu (Semenza, 2011) a že diabetické *Hif1a*^{+/-} myši mají ve srovnání s diabetickými *wt* zvýšenou hladinu glukózy a AGE v séru (Bohuslavova *et al.*, 2017) a narušenou glukózovou homeostázu (Cheng *et al.*, 2010), je možné spekulovat o tom, že nedostatečná regulace HIF-1 během embryonálního vývoje může vyústit v navýšení AGE v srdeční tkáni *Hif1a*^{+/-} potomků diabetiček jako důsledek systémových změn v metabolismu glukózy a oxidativního stresu.

Kromě strukturních změn v myokardu ovlivňují srdeční funkci také změny v energetickém metabolismu. Ačkoli je srdce schopno metabolizovat jakýkoli energetický substrát, pro jeho funkci je nejvýhodnější oxidativní metabolismus FA doplněný z přibližně 5 % glykolýzou (Ashrafian *et al.*, 2007). Změny v poměru využití FA a glukózy jsou nejčastějšími změnami spojovanými s patologií myokardu (Kolwicz *et al.*, 2013). Během perinatálního remodelování srdce dochází k přechodu z glykolytického metabolismu na oxidativní metabolismus FA. V diabetickém prostředí je fetální srdce vystaveno abnormálnímu množství energetického substrátu, které může vést k trvalým změnám v energetickém metabolismu. U *Hif1a*^{+/-} potomků diabetiček byla ve srovnání s ostatními skupinami zjištěna snížená exprese mRNA translokázy FA, *Cd36* (obrázek č. 30). Snížené množství CD36 v myokardu bylo ukázáno jako škodlivé, neboť i v nepřítomnosti zvýšeného množství cirkulujících FA přispívá k srdeční dysfunkci (Sung *et al.*, 2017). Kromě toho je *Cd36* regulován signalizací HIF-1 (Mwaikambo *et al.*, 2009). Cílovým genem signalizace HIF-1 je také *Ldha* účastníci se glykolýzy (Hu *et al.*, 2003). Exprese mRNA *Ldha* byla signifikantně snížena u obou skupin *Hif1a*^{+/-} potomků (obrázek č. 30). Oba tyto výsledky spolu s analýzou transkriptomu, která ukázala významné změny v expresi genů účastnících se energetického metabolismu (obrázek č. 24), naznačují porušení rovnováhy energetického metabolismu, které může přispívat ke zhoršené srdeční funkci.

Analýza transkriptomu ukázala také změny v expresi genů kódujících proteiny související s angiogenezí, proto byla analyzována exprese VEGFA. V LV potomků diabetiček bez ohledu na genotyp byla detekována snížená exprese mRNA *Vegfa* (obrázek č. 31), což je v souladu s několika studii ukazujícími snížení *Vegfa* na úrovni mRNA i proteinu v myokardu zvířat trpících diabetem a inzulinovou rezistencí a u diabetických pacientů (Yoon

et al., 2005, Chou *et al.*, 2002). VEGFA byl navíc asociován s cévními abnormalitami v diabetickém srdci a diabetickou kardiomyopatií (Yoon *et al.*, 2005). Delece *Vegfa* v kardiomyocytech ukazuje, že kardiomyocyty jsou hlavním zdrojem VEGFA v srdci a že vývoj a správná funkce koronárních cév je kompenzován expresí *Vegfa* v jiných buňkách (Giordano *et al.*, 2001). Z těchto analýz vyplývá různý mechanismus regulace VEGFA signalizace v angiogenezi a vaskulogenezi myokardu a v koronárních cévách. Tomu odpovídá detekovaný rozdíl v expresi mRNA *Vegfa* v myokardu LV a proteinu VEGFA ve stěnách velkých cév, kdy byla exprese VEGFA ve stěnách cév *Hif1a*^{+/-} potomků diabetiček zvýšená (obrázek č. 31). Podobný výsledek se sníženou expresí *Vegfa* v srdeční tkáni a navýšenou expresí *Vegfa* ve velkých cévách byl pozorován také u diabetických pacientů (Zygalaki *et al.*, 2008). Tyto výsledky naznačují existenci lokálních regulačních faktorů, které se liší v myokardu a cévách, a je možné, že diabetes mění expresi *Vegfa* jak v cévách, tak v myokardu.

7. Závěr

Této práci je zaměřena na objasnění některých molekulárních mechanismů embryonálních a fetálních odpovědí na diabetické intrauterinní prostředí. Ke studiu změn ve vyvíjejícím se srdci a také v srdci dospělých jedinců byl použit myší model STZ indukovaného maternálního diabetu.

Dříve publikované výsledky naší laboratoře ukázaly, že model STZ indukovaného maternálního diabetu vede ke stejným vývojovým defektům, jaké se vyskytují u člověka, a mezi nejčastější patří defekty septace (Bohuslavova *et al.*, 2013). Studium exprese genů na úrovni mRNA byla identifikována tři vývojová stádia s největšími změnami: E13,5, E14,5 a E18,5, přičemž období mezi E13,5 a E14,5 souvisí s dokončováním septace, s expanzí kompaktního myokardu a zvyšující se produkcí inzulínu v embryonálním pankreatu (Green *et al.*, 2010). Geny *Tgfb1*, *Pdgfra* *Efnb2* a *Vegfa* souvisí s procesem EMT, který je nezbytný pro tvorbu endokardových polštářů, detekované změny v expresi těchto genů tedy mohou vést k defektům septa. Analýzou změn v expresi genů v srdcích embryí s kardiovaskulárními defekty byl jako klíčový gen identifikován *Vegfa*, jehož přísná regulace je zásadní pro normální kardiovaskulární vývoj embrya (Carmeliet *et al.*, 1996, Miquerol *et al.*, 2000). Exprese *Vegfa* je regulována signalizací HIF-1, která řídí odpovědi na hypoxii (Shweiki *et al.*, 1992, Ryan *et al.*, 1998, Semenza, 2011). Analýza embryonálních srdcí v E10,5, klíčovém vývojovém stádiu, kdy byla u diabetických embryí navýšena exprese *Vegfa* na úrovni mRNA i na úrovni proteinu, prokázala zvýšenou hypoxii v srdeční tkáni a zvýšenou expresi kyslíkem regulované podjednotky HIF-1 α . Vzhledem k tomu, že *Vegfa* je cílovým genem signální dráhy HIF-1 a jeho deregulace vede k embryonální letalitě, naznačují uvedené výsledky, že VEGFA je klíčovým proteinem v rozvoji kardiovaskulárních defektů působením maternálního diabetu.

Populační studie ukazují, že potomci diabetických matek mají zvýšené riziko diabetu, obezity, metabolického syndromu a kardiovaskulárních chorob (Fetita *et al.*, 2006, Plagemann, 2004). Na základě předchozích výsledků ukazujících změny v expresi HIF-1 α a zapojení signální dráhy HIF-1 do rozvoje diabetické embryopatie (Bohuslavova *et al.*, 2013), byl pro studium vlivu maternálního diabetu na funkci srdce dospělých potomků zvolen model STZ indukovaného maternálního diabetu v kombinaci s heterozygotní globální delecí genu

Hif1a. Výsledky ukázaly, že *Hif1a*^{+/-} potomci diabetiček mají na rozdíl od ostatních skupin hypertrofované srdce a jejich srdce je kulatější, také měli nejvíce zhoršenou srdeční funkci měřenou frakčním zkrácením. Analýza transkriptomu LV ukázala, že jsou ve skupině *Hif1a*^{+/-} potomků nejvýraznější změny v expresi genů, které kódují proteiny účastníci se metabolických, imunitních a vývojových procesů, odpovědí na stres, angiogeneze a apoptózy. Další analýzy prokázaly zvýšenou apoptózu v myokardu LV, avšak infiltrace makrofágů byla zvýšená pouze u *wt* potomků diabetických matek, což naznačuje narušený proces odstraňování odumřelých buněk u *Hif1a*^{+/-} potomků diabetiček, který může negativně ovlivňovat funkci srdce. Dále byly zjištěny změny v množství kolagenu a AGE, které ovlivňují mechanické vlastnosti tkáně a mohou tak mít vliv na kontraktilitu. Pomocí western blotu bylo zjištěno snížené množství CX43 i jeho funkční fosforylované formy pCX43, což ovlivňuje schopnost přenosu signálu myokardem, která je nutná pro správný průběh kontrakce. Na úrovni mRNA bylo potvrzeno snížení exprese genů *Cd36* a *Ldha*, regulovaných transkripčním faktorem HIF-1, které kódují proteiny účastníci se energetického metabolismu. Tyto výsledky představují první molekulární analýzy srdcí dospělých potomků diabetických matek, které ukazují konkrétní procesy ovlivněné vývojem v diabetickém prostředí. Zároveň je poprvé ukázán negativní vliv kombinace vývoje v diabetickém prostředí a mutace genu *Hif1a* na rozvoj kardiovaskulárních chorob v dospělosti.

8. Seznam použité literatury

- Abokaf, H., Shoham-Vardi, I., Sergienko, R., Landau, D. a Sheiner, E.** 2018. In utero exposure to gestational diabetes mellitus and long term endocrine morbidity of the offspring. *Diabetes Res Clin Pract*, 144, 231-235.
- Adams, R. H., Wilkinson, G. A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N. W., Deutsch, U., Risau, W. a Klein, R.** 1999. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*, 13, 295-306.
- Akhurst, R. J., Lehnert, S. A., Faissner, A. a Duffie, E.** 1990. TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development*, 108, 645-56.
- Al-Qattan, M. M. a Abou Al-Shaar, H.** 2015. Molecular basis of the clinical features of Holt-Oram syndrome resulting from missense and extended protein mutations of the TBX5 gene as well as TBX5 intragenic duplications. *Gene*, 560, 129-36.
- Alabi, R. O., Glomski, K., Haxaire, C., Weskamp, G., Monette, S. a Blobel, C. P.** 2016. ADAM10-Dependent Signaling Through Notch1 and Notch4 Controls Development of Organ-Specific Vascular Beds. *Circ Res*, 119, 519-31.
- American Diabetes, A.** 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37 Suppl 1, S81-90.
- Anders, S., Pyl, P. T. a Huber, W.** 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 166-9.
- Andrae, J., Gallini, R. a Betsholtz, C.** 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 22, 1276-312.
- Ascuitto, R. J. a Ross-Ascuitto, N. T.** 1996. Substrate metabolism in the developing heart. *Semin Perinatol*, 20, 542-63.
- Ashrafian, H., Frenneaux, M. P. a Opie, L. H.** 2007. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation*, 116, 434-48.
- Atherton, B. T. a Behnke, M. M.** 1988. Structure of myofibrils at extra-junctional membrane attachment sites in cultured cardiac muscle cells. *J Cell Sci*, 89 (Pt 1), 97-106.
- Baack, M. L., Wang, C., Hu, S., Segar, J. L. a Norris, A. W.** 2014. Hyperglycemia induces embryopathy, even in the absence of systemic maternal diabetes: an in vivo test of the fuel mediated teratogenesis hypothesis. *Reprod Toxicol*, 46, 129-36.
- Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D. a Hynes, R. O.** 1998. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*, 95, 507-19.
- Barczyk, M., Carracedo, S. a Gullberg, D.** 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*, 339, 269-80.
- Barnett, C. a Krebs, J. E.** 2011. WSTF does it all: a multifunctional protein in transcription, repair, and replication. *Biochem Cell Biol*, 89, 12-23.
- Bartoš, V.** 2000. *Praktická diabetologie*.
- Bartrons, R. a Caro, J.** 2007. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr*, 39, 223-9.
- Bashey, R. I., Martinez-Hernandez, A. a Jimenez, S. A.** 1992. Isolation, characterization, and localization of cardiac collagen type VI. Associations with other extracellular matrix components. *Circ Res*, 70, 1006-17.
- Bax, N. A., Bleyl, S. B., Gallini, R., Wisse, L. J., Hunter, J., Van Oorschot, A. A., Mahtab, E. A., Lie-Venema, H., Goumans, M. J., Betsholtz, C. a Gittenberger-de Groot, A. C.** 2010. Cardiac malformations in Pdgfralpha mutant embryos are associated with increased expression of WT1 and Nkx2.5 in the second heart field. *Dev Dyn*, 239, 2307-17.
- Bax, N. A., Lie-Venema, H., Vicente-Steijn, R., Bleyl, S. B., Van Den Akker, N. M., Maas, S., Poelmann, R. E. a Gittenberger-de Groot, A. C.** 2009. Platelet-derived growth factor is

- involved in the differentiation of second heart field-derived cardiac structures in chicken embryos. *Dev Dyn*, 238, 2658-69.
- Bekeredjian, R., Walton, C. B., MacCannell, K. A., Ecker, J., Kruse, F., Outten, J. T., Sutcliffe, D., Gerard, R. D., Bruick, R. K. a Shohet, R. V.** 2010. Conditional HIF-1alpha expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS One*, 5, e11693.
- Benes, J., Jr., Melenovsky, V., Skaroupkova, P., Pospisilova, J., Petrak, J., Cervenka, L. a Sedmera, D.** 2011. Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload. *Anat Rec (Hoboken)*, 294, 102-11.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. a Finberg, R. W.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275, 1320-3.
- Bino, L., Prochazkova, J., Radaszkiewicz, K. A., Kucera, J., Kudova, J., Pachernik, J. a Kubala, L.** 2017. Hypoxia favors myosin heavy chain beta gene expression in an Hif-1alpha-dependent manner. *Oncotarget*, 8, 83684-83697.
- Blobel, C. P.** 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 32-43.
- Bloomekatz, J., Singh, R., Prall, O. W., Dunn, A. C., Vaughan, M., Loo, C. S., Harvey, R. P. a Yelon, D.** 2017. Platelet-derived growth factor (PDGF) signaling directs cardiomyocyte movement toward the midline during heart tube assembly. *Elife*, 6.
- Bohuslavova, R., Cerychova, R., Nepomucka, K. a Pavlinkova, G.** 2017. Renal injury is accelerated by global hypoxia-inducible factor 1 alpha deficiency in a mouse model of STZ-induced diabetes. *BMC Endocr Disord*, 17, 48.
- Bohuslavova, R., Skvorova, L., Cerychova, R. a Pavlinkova, G.** 2015. Gene expression profiling of changes induced by maternal diabetes in the embryonic heart. *Reprod Toxicol*, 57, 147-56.
- Bohuslavova, R., Skvorova, L., Sedmera, D., Semenza, G. L. a Pavlinkova, G.** 2013. Increased susceptibility of HIF-1alpha heterozygous-null mice to cardiovascular malformations associated with maternal diabetes. *J Mol Cell Cardiol*, 60, 129-41.
- Bolger, A. M., Lohse, M. a Usadel, B.** 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-20.
- Bosch-Marce, M., Okuyama, H., Wesley, J. B., Sarkar, K., Kimura, H., Liu, Y. V., Zhang, H., Strazza, M., Rey, S., Savino, L., Zhou, Y. F., McDonald, K. R., Na, Y., Vandiver, S., Rabi, A., Shaked, Y., Kerbel, R., Lavalley, T. a Semenza, G. L.** 2007. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ Res*, 101, 1310-8.
- Boudina, S. a Abel, E. D.** 2010. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord*, 11, 31-9.
- Bozkurt, B., Kribbs, S. B., Clubb, F. J., Jr., Michael, L. H., Didenko, V. V., Hornsby, P. J., Seta, Y., Oral, H., Spinale, F. G. a Mann, D. L.** 1998. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*, 97, 1382-91.
- Bruneau, B. G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C. J., Seidman, J. G. a Seidman, C. E.** 1999. Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol*, 211, 100-8.
- Bruneau, B. G., Nemer, G., Schmitt, J. P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., Conner, D. A., Gessler, M., Nemer, M., Seidman, C. E. a Seidman, J. G.** 2001. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell*, 106, 709-21.
- Bugger, H. a Abel, E. D.** 2009. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech*, 2, 454-66.

- Burton, G. J., Fowden, A. L. a Thornburg, K. L.** 2016. Placental Origins of Chronic Disease. *Physiol Rev*, 96, 1509-65.
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J. a Evans, S.** 2003. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*, 5, 877-89.
- Camprubi Robles, M., Campoy, C., Garcia Fernandez, L., Lopez-Pedrosa, J. M., Rueda, R. a Martin, M. J.** 2015. Maternal Diabetes and Cognitive Performance in the Offspring: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 10, e0142583.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. a Nagy, A.** 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435-9.
- Casson, I. F., Clarke, C. A., Howard, C. V., McKendrick, O., Pennycook, S., Pharoah, P. O., Platt, M. J., Stanistreet, M., van Velszen, D. a Walkinshaw, S.** 1997. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ*, 315, 275-8.
- Catrina, S. B., Okamoto, K., Pereira, T., Brismar, K. a Poellinger, L.** 2004. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability and function. *Diabetes*, 53, 3226-32.
- Cerychova, R., Bohuslavova, R., Papousek, F., Sedmera, D., Abaffy, P., Benes, V., Kolar, F. a Pavlinkova, G.** 2018. Adverse effects of Hif1a mutation and maternal diabetes on the offspring heart. *Cardiovasc Diabetol*, 17, 68.
- Chang, K. K., Yoon, C., Yi, B. C., Tap, W. D., Simon, M. C. a Yoon, S. S.** 2018. Platelet-derived growth factor receptor-alpha and -beta promote cancer stem cell phenotypes in sarcomas. *Oncogenesis*, 7, 47.
- Chen, T., Chang, T. C., Kang, J. O., Choudhary, B., Makita, T., Tran, C. M., Burch, J. B., Eid, H. a Sucov, H. M.** 2002. Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. *Dev Biol*, 250, 198-207.
- Cheng, K., Ho, K., Stokes, R., Scott, C., Lau, S. M., Hawthorne, W. J., O'Connell, P. J., Loudovaris, T., Kay, T. W., Kulkarni, R. N., Okada, T., Wang, X. L., Yim, S. H., Shah, Y., Grey, S. T., Biankin, A. V., Kench, J. G., Laybutt, D. R., Gonzalez, F. J., Kahn, C. R. a Gunton, J. E.** 2010. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates beta cell function in mouse and human islets. *J Clin Invest*, 120, 2171-83.
- Chou, E., Suzuma, I., Way, K. J., Opland, D., Clermont, A. C., Naruse, K., Suzuma, K., Bowling, N. L., Vlahos, C. J., Aiello, L. P. a King, G. L.** 2002. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation*, 105, 373-9.
- Čihák, R.** 2004. *Anatomie 3*, Grada.
- Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. a Bergelson, J. M.** 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 15191-6.
- Collins, R. T., 2nd** 2013. Cardiovascular disease in Williams syndrome. *Circulation*, 127, 2125-34.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Franco, D., Moorman, A., Dewerchin, M., Collen, D. a Carmeliet, P.** 2003. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cardiovasc Res*, 60, 569-79.
- Coort, S. L., Hasselbaink, D. M., Koonen, D. P., Willems, J., Coumans, W. A., Chabowski, A., van der Vusse, G. J., Bonen, A., Glatz, J. F. a Luiken, J. J.** 2004. Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese zucker rats. *Diabetes*, 53, 1655-63.

- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V. H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G. S., Gerber, H. P., Ferrara, N. a Johnson, R. S.** 2003. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, 112, 645-57.
- Crispi, F., Bijmens, B., Figueras, F., Bartrons, J., Eixarch, E., Le Noble, F., Ahmed, A. a Gratacos, E.** 2010. Fetal growth restriction results in remodeled and less efficient hearts in children. *Circulation*, 121, 2427-36.
- Dabelea, D., Hanson, R. L., Lindsay, R. S., Pettitt, D. J., Imperatore, G., Gabir, M. M., Roumain, J., Bennett, P. H. a Knowler, W. C.** 2000. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes*, 49, 2208-11.
- Dalgaard, K., Landgraf, K., Heyne, S., Lempradl, A., Longinotto, J., Gossens, K., Ruf, M., Orthofer, M., Strogantsev, R., Selvaraj, M., Lu, T. T., Casas, E., Teperino, R., Surani, M. A., Zvetkova, I., Rimmington, D., Tung, Y. C., Lam, B., Larder, R., Yeo, G. S., O'Rahilly, S., Vavouri, T., Whitelaw, E., Penninger, J. M., Jenuwein, T., Cheung, C. L., Ferguson-Smith, A. C., Coll, A. P., Korner, A. a Pospisilik, J. A.** 2016. Trim28 Haploinsufficiency Triggers Bi-stable Epigenetic Obesity. *Cell*, 164, 353-64.
- Davy, A. a Soriano, P.** 2007. Ephrin-B2 forward signaling regulates somite patterning and neural crest cell development. *Dev Biol*, 304, 182-93.
- Defer, N., Azroyan, A., Pecker, F. a Pavoine, C.** 2007. TNFR1 and TNFR2 signaling interplay in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 282, 35564-73.
- Delorme, C., Gras, D., Fabre-Teste, J. a Roze, E.** 2016. Forceful Backbending Stereotypies Revealing MEF2C Haploinsufficiency. *Pediatr Neurol*, 60, 90-1.
- Devine, W. P., Wythe, J. D., George, M., Koshiba-Takeuchi, K. a Bruneau, B. G.** 2014. Early patterning and specification of cardiac progenitors in gastrulating mesoderm. *Elife*, 3.
- Dickson, M. C., Slager, H. G., Duffie, E., Mummery, C. L. a Akhurst, R. J.** 1993. RNA and protein localisations of TGF beta 2 in the early mouse embryo suggest an involvement in cardiac development. *Development*, 117, 625-39.
- Dobaczewski, M., Chen, W. a Frangogiannis, N. G.** 2011. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 600-6.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. a Gingeras, T. R.** 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15-21.
- Dodou, E., Verzi, M. P., Anderson, J. P., Xu, S. M. a Black, B. L.** 2004. Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*, 131, 3931-42.
- Doenst, T., Nguyen, T. D. a Abel, E. D.** 2013. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res*, 113, 709-24.
- Doenst, T., Pytel, G., Schrepper, A., Amorim, P., Farber, G., Shingu, Y., Mohr, F. W. a Schwarzer, M.** 2010. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res*, 86, 461-70.
- Dong, D., Reece, E. A., Lin, X., Wu, Y., AriasVilella, N. a Yang, P.** 2016. New development of the yolk sac theory in diabetic embryopathy: molecular mechanism and link to structural birth defects. *Am J Obstet Gynecol*, 214, 192-202.
- Dor, Y., Camenisch, T. D., Itin, A., Fishman, G. I., McDonald, J. A., Carmeliet, P. a Keshet, E.** 2001. A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects. *Development*, 128, 1531-8.
- Dorner, A. A., Wegmann, F., Butz, S., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Mack, A., Nasdala, I., August, B., Westermann, J., Rathjen, F. G. a Vestweber, D.** 2005. Coxsackievirus-

- adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci*, 118, 3509-21.
- Dunwoodie, S. L.** 2009. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell*, 17, 755-73.
- Eichenholz, P. W., Eichacker, P. Q., Hoffman, W. D., Banks, S. M., Parrillo, J. E., Danner, R. L. a Natanson, C.** 1992. Tumor necrosis factor challenges in canines: patterns of cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol*, 263, H668-75.
- Engleka, K. A., Manderfield, L. J., Brust, R. D., Li, L., Cohen, A., Dymecki, S. M. a Epstein, J. A.** 2012. Islet1 derivatives in the heart are of both neural crest and second heart field origin. *Circ Res*, 110, 922-6.
- Ertl, G. a Frantz, S.** 2005. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 66, 22-32.
- Fan, D., Takawale, A., Lee, J. a Kassiri, Z.** 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5, 15.
- Farrell, T., Neale, L. a Cundy, T.** 2002. Congenital anomalies in the offspring of women with type 1, type 2 and gestational diabetes. *Diabet Med*, 19, 322-6.
- Feldman, A. M., Combes, A., Wagner, D., Kadakomi, T., Kubota, T., Li, Y. Y. a McTiernan, C.** 2000. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 35, 537-44.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J. a Moore, M. W.** 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380, 439-42.
- Fetita, L. S., Sobngwi, E., Serradas, P., Calvo, F. a Gautier, J. F.** 2006. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 3718-24.
- Flanagan-Steet, H., Christian, C., Lu, P. N., Aarnio-Peterson, M., Sanman, L., Archer-Hartmann, S., Azadi, P., Bogyo, M. a Steet, R. A.** 2018. TGF-ss Regulates Cathepsin Activation during Normal and Pathogenic Development. *Cell Rep*, 22, 2964-2977.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. a Breitman, M. L.** 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376, 66-70.
- Frangogiannis, N. G.** 2014. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*, 11, 255-65.
- Gabbay-Benziv, R., Reece, E. A., Wang, F. a Yang, P.** 2015. Birth defects in pregestational diabetes: Defect range, glycemic threshold and pathogenesis. *World J Diabetes*, 6, 481-8.
- Galler, S., Puchert, E., Gohlsch, B., Schmid, D. a Pette, D.** 2002. Kinetic properties of cardiac myosin heavy chain isoforms in rat. *Pflugers Arch*, 445, 218-23.
- Gallini, R., Lindblom, P., Bondjers, C., Betsholtz, C. a Andrae, J.** 2016. PDGF-A and PDGF-B induces cardiac fibrosis in transgenic mice. *Exp Cell Res*, 349, 282-290.
- Gardiner, H. M., Pasquini, L., Wolfenden, J., Kulinskaya, E., Li, W. a Henein, M.** 2006. Increased periconceptual maternal glycated haemoglobin in diabetic mothers reduces fetal long axis cardiac function. *Heart*, 92, 1125-30.
- Gerety, S. S. a Anderson, D. J.** 2002. Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development*, 129, 1397-410.
- Gilkes, D. M., Bajpai, S., Chaturvedi, P., Wirtz, D. a Semenza, G. L.** 2013. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem*, 288, 10819-29.
- Giordano, F. J., Gerber, H. P., Williams, S. P., VanBruggen, N., Bunting, S., Ruiz-Lozano, P., Gu, Y., Nath, A. K., Huang, Y., Hickey, R., Dalton, N., Peterson, K. L., Ross, J., Jr., Chien, K. R. a Ferrara, N.** 2001. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 5780-5.

- Gleissner, C. A., Galkina, E., Nadler, J. L. a Ley, K.** 2007. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech*, 4, 131-140.
- Gnarra, J. R., Ward, J. M., Porter, F. D., Wagner, J. R., Devor, D. E., Grinberg, A., Emmert-Buck, M. R., Westphal, H., Klausner, R. D. a Linehan, W. M.** 1997. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9102-7.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M. a Creager, M. A.** 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, 114, 597-605.
- Goueslard, K., Cottenet, J., Mariet, A. S., Giroud, M., Cottin, Y., Petit, J. M. a Quantin, C.** 2016. Early cardiovascular events in women with a history of gestational diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 15, 15.
- Green, A. S., Rozance, P. J. a Limesand, S. W.** 2010. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *J Endocrinol*, 205, 211-24.
- Greene, M. F.** 2001. Diabetic embryopathy 2001: moving beyond the "diabetic milieu". *Teratology*, 63, 116-8.
- Gros, D., Dupays, L., Alcolea, S., Meysen, S., Miquerol, L. a Theveniau-Ruissy, M.** 2004. Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart-new models for cardiovascular research. *Cardiovasc Res*, 62, 299-308.
- Guimaraes-Camboa, N., Stowe, J., Aneas, I., Sakabe, N., Cattaneo, P., Henderson, L., Kilberg, M. S., Johnson, R. S., Chen, J., McCulloch, A. D., Nobrega, M. A., Evans, S. M. a Zambon, A. C.** 2015. HIF1alpha Represses Cell Stress Pathways to Allow Proliferation of Hypoxic Fetal Cardiomyocytes. *Dev Cell*, 33, 507-21.
- Gutstein, D. E., Morley, G. E., Tamaddon, H., Vaidya, D., Schneider, M. D., Chen, J., Chien, K. R., Stuhlmann, H. a Fishman, G. I.** 2001. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res*, 88, 333-9.
- Han, W. Q., Zhu, Q., Hu, J., Li, P. L., Zhang, F. a Li, N.** 2013. Hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase-2 mediates transforming growth factor beta 1-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 1454-62.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. a Saftig, P.** 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*, 11, 2615-24.
- Heikinheimo, M., Scandrett, J. M. a Wilson, D. B.** 1994. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol*, 164, 361-73.
- Heldin, C. H. a Moustakas, A.** 2016. Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- Herrera, E. a Amusquivar, E.** 2000. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev*, 16, 202-10.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. a Shibuya, M.** 1998. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9349-54.
- Hirschy, A., Schatzmann, F., Ehler, E. a Perriard, J. C.** 2006. Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev Biol*, 289, 430-41.
- Hoch, R. V. a Soriano, P.** 2003. Roles of PDGF in animal development. *Development*, 130, 4769-84.
- Hod, M., Jovanovic, L. G., Di Renzo, G. C., De Leiva, A. a Langer, O.** 2008. *Textbook of Diabetes and Pregnancy, Second Edition*, Taylor & Francis.
- Hoegsberg, B., Gruppuso, P. A. a Coustan, D. R.** 1993. Hyperinsulinemia in macrosomic infants of nondiabetic mothers. *Diabetes Care*, 16, 32-6.

- Holemans, K., Gerber, R. T., Meurrens, K., De Clerck, F., Poston, L. a Van Assche, F. A.** 1999. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia*, 42, 81-9.
- Holler, C. J., Taylor, G., McEachin, Z. T., Deng, Q., Watkins, W. J., Hudson, K., Easley, C. A., Hu, W. T., Hales, C. M., Rossoll, W., Bassell, G. J. a Kukar, T.** 2016. Trehalose upregulates progranulin expression in human and mouse models of GRN haploinsufficiency: a novel therapeutic lead to treat frontotemporal dementia. *Mol Neurodegener*, 11, 46.
- Holmes, D. I. a Zachary, I.** 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*, 6, 209.
- Holscher, M., Schafer, K., Krull, S., Farhat, K., Hesse, A., Silter, M., Lin, Y., Pichler, B. J., Thistlethwaite, P., El-Armouche, A., Maier, L. S., Katschinski, D. M. a Zieseniss, A.** 2012. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1alpha stabilization. *Cardiovasc Res*, 94, 77-86.
- Hong, S. B., Furihata, M., Baba, M., Zbar, B. a Schmidt, L. S.** 2006. Vascular defects and liver damage by the acute inactivation of the VHL gene during mouse embryogenesis. *Lab Invest*, 86, 664-75.
- Hotamisligil, G. S.** 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-7.
- Houghton, F. D., Thompson, J. G., Kennedy, C. J. a Leese, H. J.** 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev*, 44, 476-85.
- Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A., Keith, B. a Simon, M. C.** 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*, 23, 9361-74.
- Huang, Y., Hickey, R. P., Yeh, J. L., Liu, D., Dadak, A., Young, L. H., Johnson, R. S. a Giordano, F. J.** 2004. Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *Faseb J*, 18, 1138-40.
- Hulsmans, M., Sam, F. a Nahrendorf, M.** 2016. Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 93, 149-55.
- Iruretagoyena, J. I., Davis, W., Bird, C., Olsen, J., Radue, R., Teo Broman, A., Kendzioriski, C., Splinter BonDurant, S., Golos, T., Bird, I. a Shah, D.** 2014. Metabolic gene profile in early human fetal heart development. *Mol Hum Reprod*, 20, 690-700.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y. a Semenza, G. L.** 1998. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, 12, 149-62.
- Jauniaux, E., Watson, A. a Burton, G.** 2001. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 184, 998-1003.
- Jiang, X., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. a Sucov, H. M.** 2000. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development*, 127, 1607-16.
- Jordan, J. a Tank, J.** 2014. Complexity of impaired parasympathetic heart rate regulation in diabetes. *Diabetes*, 63, 1847-9.
- Junqueira, L. C., Carneiro, C. a Kelley, R. O.** 1997. *Základy histologie*, H&H.
- Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N. a Groffen, J.** 1995. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet*, 11, 415-21.
- Kaluz, S., Kaluzova, M. a Stanbridge, E. J.** 2008. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin Chim Acta*, 395, 6-13.

- Kappas, N. C., Zeng, G., Chappell, J. C., Kearney, J. B., Hazarika, S., Kallianos, K. G., Patterson, C., Annex, B. H. a Bautch, V. L.** 2008. The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching. *J Cell Biol*, 181, 847-58.
- Karaca, E., Atik, T., Alpman Durmaz, A., Ozkinay, F. a Cogulu, O.** 2016. Transmembrane Activator and Caml Interactor (Taci) Haploinsufficiency in B-Cell Dysfunction in a Patient with Smith-Magenis Syndrome. *Genet Couns*, 27, 251-4.
- Karamitsos, D. T.** 2011. The story of insulin discovery. *Diabetes Res Clin Pract*, 93 Suppl 1, S2-8.
- Kashimura, T., Kodama, M., Hotta, Y., Hosoya, J., Yoshida, K., Ozawa, T., Watanabe, R., Okura, Y., Kato, K., Hanawa, H., Kuwano, R. a Aizawa, Y.** 2004. Spatiotemporal changes of coxsackievirus and adenovirus receptor in rat hearts during postnatal development and in cultured cardiomyocytes of neonatal rat. *Virchows Arch*, 444, 283-92.
- Kattman, S. J., Huber, T. L. a Keller, G. M.** 2006. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell*, 11, 723-32.
- Kenchegowda, D., Liu, H., Thompson, K., Luo, L., Martin, S. S. a Fisher, S. A.** 2014. Vulnerability of the developing heart to oxygen deprivation as a cause of congenital heart defects. *J Am Heart Assoc*, 3, e000841.
- Kenchegowda, D., Natale, B., Lemus, M. A., Natale, D. R. a Fisher, S. A.** 2017. Inactivation of maternal Hif-1alpha at mid-pregnancy causes placental defects and deficits in oxygen delivery to the fetal organs under hypoxic stress. *Dev Biol*, 422, 171-185.
- King, M. K., Coker, M. L., Goldberg, A., McElmurray, J. H., 3rd, Gunasinghe, H. R., Mukherjee, R., Zile, M. R., O'Neill, T. P. a Spinale, F. G.** 2003. Selective matrix metalloproteinase inhibition with developing heart failure: effects on left ventricular function and structure. *Circ Res*, 92, 177-85.
- Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T. a Saga, Y.** 2000. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development*, 127, 3215-26.
- Koch, S. a Claesson-Welsh, L.** 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a006502.
- Kodde, I. F., van der Stok, J., Smolenski, R. T. a de Jong, J. W.** 2007. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146, 26-39.
- Kolwicz, S. C., Jr., Purohit, S. a Tian, R.** 2013. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*, 113, 603-16.
- Koonen, D. P., Glatz, J. F., Bonen, A. a Luiken, J. J.** 2005. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1736, 163-80.
- Kopylova, E., Noe, L. a Touzet, H.** 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28, 3211-7.
- Kotch, L. E., Iyer, N. V., Laughner, E. a Semenza, G. L.** 1999. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*, 209, 254-67.
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. a Jaenisch, R.** 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74, 679-91.
- Krishnan, J., Ahuja, P., Bodenmann, S., Knapik, D., Perriard, E., Krek, W. a Perriard, J. C.** 2008. Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function. *Circ Res*, 103, 1139-46.
- Kubota, T., McTiernan, C. F., Frye, C. S., Demetris, A. J. a Feldman, A. M.** 1997a. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J Card Fail*, 3, 117-24.
- Kubota, T., McTiernan, C. F., Frye, C. S., Slawson, S. E., Lemster, B. H., Koretsky, A. P., Demetris, A. J. a Feldman, A. M.** 1997b. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*, 81, 627-35.

- Kumar, S. D., Dheen, S. T. a Tay, S. S.** 2007. Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development. *Cardiovasc Diabetol*, 6, 34.
- Kumar, S. D., Yong, S. K., Dheen, S. T., Bay, B. H. a Tay, S. S.** 2008. Cardiac malformations are associated with altered expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase genes in embryos of diabetic mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233, 1421-32.
- Kuo, C. T., Morrisey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., Soudais, C. a Leiden, J. M.** 1997. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*, 11, 1048-60.
- Lager, S. a Powell, T. L.** 2012. Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy*, 2012, 179827.
- Lalli, M. A., Jang, J., Park, J. H., Wang, Y., Guzman, E., Zhou, H., Audouard, M., Bridges, D., Tovar, K. R., Papuc, S. M., Tutulan-Cunita, A. C., Huang, Y., Budisteanu, M., Arghir, A. a Kosik, K. S.** 2016. Haploinsufficiency of BAZ1B contributes to Williams syndrome through transcriptional dysregulation of neurodevelopmental pathways. *Hum Mol Genet*, 25, 1294-306.
- Larsson, J., Goumans, M. J., Sjostrand, L. J., van Rooijen, M. A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C. L. a Karlsson, S.** 2001. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *Embo J*, 20, 1663-73.
- Lee, H. J., Kang, J. O., Kim, S. M., Ji, S. M., Park, S. Y., Kim, M. E., Jigden, B., Lim, J. E., Hwang, S. Y., Lee, Y. H. a Oh, B.** 2016. Gene Silencing and Haploinsufficiency of Csk Increase Blood Pressure. *PLoS One*, 11, e0146841.
- Lee, Y. M., Jeong, C. H., Koo, S. Y., Son, M. J., Song, H. S., Bae, S. K., Raleigh, J. A., Chung, H. Y., Yoo, M. A. a Kim, K. W.** 2001. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn*, 220, 175-86.
- Lehtoranta, L., Vuolteenaho, O., Laine, V. J., Koskinen, A., Soukka, H., Kyto, V., Maatta, J., Haapsamo, M., Ekholm, E. a Rasanen, J.** 2013. Maternal hyperglycemia leads to fetal cardiac hyperplasia and dysfunction in a rat model. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305, E611-9.
- Lei, L., Mason, S., Liu, D., Huang, Y., Marks, C., Hickey, R., Jovin, I. S., Pypaert, M., Johnson, R. S. a Giordano, F. J.** 2008. Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol*, 28, 3790-803.
- Lekva, T., Michelsen, A. E., Aukrust, P., Henriksen, T., Bollerslev, J. a Ueland, T.** 2017. Leptin and adiponectin as predictors of cardiovascular risk after gestational diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 16, 5.
- Lekva, T., Michelsen, A. E., Bollerslev, J., Norwitz, E. R., Aukrust, P., Henriksen, T. a Ueland, T.** 2016. Low circulating pentraxin 3 levels in pregnancy is associated with gestational diabetes and increased apoB/apoA ratio: a 5-year follow-up study. *Cardiovasc Diabetol*, 15, 23.
- Li, R., Chase, M., Jung, S. K., Smith, P. J. a Loeken, M. R.** 2005. Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E591-9.
- Li, Y. Y., McTiernan, C. F. a Feldman, A. M.** 1999. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res*, 42, 162-72.
- Licht, A. H., Muller-Holtkamp, F., Flamme, I. a Breier, G.** 2006. Inhibition of hypoxia-inducible factor activity in endothelial cells disrupts embryonic cardiovascular development. *Blood*, 107, 584-90.

- Lin, Q., Lu, J., Yanagisawa, H., Webb, R., Lyons, G. E., Richardson, J. A. a Olson, E. N.** 1998. Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development*, 125, 4565-74.
- Lin, X., Yang, P., Reece, E. A. a Yang, P.** 2017. Pregestational type 2 diabetes mellitus induces cardiac hypertrophy in the murine embryo through cardiac remodeling and fibrosis. *Am J Obstet Gynecol*, 217, 216 e1-216 e13.
- Lints, T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I. a Harvey, R. P.** 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*, 119, 969.
- Liu, S., Liu, F., Schneider, A. E., St Amand, T., Epstein, J. A. a Gutstein, D. E.** 2006. Distinct cardiac malformations caused by absence of connexin 43 in the neural crest and in the non-crest neural tube. *Development*, 133, 2063-73.
- Lo, C. W., Cohen, M. F., Huang, G. Y., Lazatin, B. O., Patel, N., Sullivan, R., Pauken, C. a Park, S. M.** 1997. Cx43 gap junction gene expression and gap junctional communication in mouse neural crest cells. *Dev Genet*, 20, 119-32.
- Lorenzo, O., Ramirez, E., Picatoste, B., Egido, J. a Tunon, J.** 2013. Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy. *Mediators Inflamm*, 2013, 461967.
- Love, M. I., Huber, W. a Anders, S.** 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15, 550.
- Lu, H., Forbes, R. A. a Verma, A.** 2002. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem*, 277, 23111-5.
- Lu, X., Meng, X., Morris, C. A. a Keating, M. T.** 1998. A novel human gene, WSTF, is deleted in Williams syndrome. *Genomics*, 54, 241-9.
- Luo, D., Luo, Y., He, Y., Zhang, H., Zhang, R., Li, X., Dobrucki, W. L., Sinusas, A. J., Sessa, W. C. a Min, W.** 2006. Differential functions of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 signaling in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*, 169, 1886-98.
- Lyons, I., Parsons, L. M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J. E., Robb, L. a Harvey, R. P.** 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*, 9, 1654-66.
- Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B. D., Ye, S. Q., Garcia, J. G. a Semenza, G. L.** 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, 105, 659-69.
- Manderson, J. G., Mullan, B., Patterson, C. C., Hadden, D. R., Traub, A. I. a McCance, D. R.** 2002. Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. *Diabetologia*, 45, 991-6.
- Mann, D. L.** 2015. Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res*, 116, 1254-68.
- Marfella, R., D'Amico, M., Di Filippo, C., Piegari, E., Nappo, F., Esposito, K., Berrino, L., Rossi, F. a Giugliano, D.** 2002. Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycaemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1. *Diabetologia*, 45, 1172-81.
- Martinez-Estrada, O. M., Lettice, L. A., Essafi, A., Guadix, J. A., Slight, J., Velecela, V., Hall, E., Reichmann, J., Devenney, P. S., Hohenstein, P., Hosen, N., Hill, R. E., Munoz-Chapuli, R. a Hastie, N. D.** 2010. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nature Genetics*, 42, 89-93.
- Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M. a Lassar, A. B.** 2001. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev*, 15, 316-27.
- Massague, J.** 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 169-78.

- McCarty, J. H., Monahan-Earley, R. A., Brown, L. F., Keller, M., Gerhardt, H., Rubin, K., Shani, M., Dvorak, H. F., Wolburg, H., Bader, B. L., Dvorak, A. M. a Hynes, R. O.** 2002. Defective associations between blood vessels and brain parenchyma lead to cerebral hemorrhage in mice lacking alphav integrins. *Mol Cell Biol*, 22, 7667-77.
- Mellgren, A. M., Smith, C. L., Olsen, G. S., Eskiocak, B., Zhou, B., Kazi, M. N., Ruiz, F. R., Pu, W. T. a Tallquist, M. D.** 2008. Platelet-derived growth factor receptor beta signaling is required for efficient epicardial cell migration and development of two distinct coronary vascular smooth muscle cell populations. *Circ Res*, 103, 1393-401.
- Menendez-Montes, I., Escobar, B., Palacios, B., Gomez, M. J., Izquierdo-Garcia, J. L., Flores, L., Jimenez-Borreguero, L. J., Aragonés, J., Ruiz-Cabello, J., Torres, M. a Martin-Puig, S.** 2016. Myocardial VHL-HIF Signaling Controls an Embryonic Metabolic Switch Essential for Cardiac Maturation. *Dev Cell*, 39, 724-739.
- Miquerol, L., Gertsenstein, M., Harpal, K., Rossant, J. a Nagy, A.** 1999. Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev Biol*, 212, 307-22.
- Miquerol, L., Langille, B. L. a Nagy, A.** 2000. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*, 127, 3941-6.
- Mitanchez, D., Zydorczyk, C., Siddeek, B., Boubred, F., Benahmed, M. a Simeoni, U.** 2015. The offspring of the diabetic mother--short- and long-term implications. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 29, 256-69.
- Miyagawa-Tomita, S., Waldo, K., Tomita, H. a Kirby, M. L.** 1991. Temporospatial study of the migration and distribution of cardiac neural crest in quail-chick chimeras. *Am J Anat*, 192, 79-88.
- Miyazawa, H., Yamaguchi, Y., Sugiura, Y., Honda, K., Kondo, K., Matsuda, F., Yamamoto, T., Suematsu, M. a Miura, M.** 2017. Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching. *Development*, 144, 63-73.
- Mjaatvedt, C. H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R. A., Kern, M. J., Eisenberg, C. A., Turner, D. a Markwald, R. R.** 2001. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol*, 238, 97-109.
- Molin, D. G., Bartram, U., Van der Heiden, K., Van Iperen, L., Speer, C. P., Hierck, B. P., Poelmann, R. E. a Gittenberger-de-Groot, A. C.** 2003. Expression patterns of Tgfbeta1-3 associate with myocardialisation of the outflow tract and the development of the epicardium and the fibrous heart skeleton. *Dev Dyn*, 227, 431-44.
- Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N. D. a Schedl, A.** 1999. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development*, 126, 1845-57.
- Moses, K. A., DeMayo, F., Braun, R. M., Reecy, J. L. a Schwartz, R. J.** 2001. Embryonic expression of an Nkx2-5/Cre gene using ROSA26 reporter mice. *Genesis*, 31, 176-80.
- Moslehi, J., Minamishima, Y. A., Shi, J., Neubergh, D., Charytan, D. M., Padera, R. F., Signoretti, S., Liao, R. a Kaelin, W. G., Jr.** 2010. Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 122, 1004-16.
- Musikant, D., Sato, H., Capobianco, E., White, V., Jawerbaum, A. a Higa, R.** 2018. Altered FOXO1 activation in the programming of cardiovascular alterations by maternal diabetes. *Mol Cell Endocrinol*.
- Mwaikambo, B. R., Yang, C., Chemtob, S. a Hardy, P.** 2009. Hypoxia up-regulates CD36 expression and function via hypoxia-inducible factor-1- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms. *J Biol Chem*, 284, 26695-707.
- Nagao, K., Taniyama, Y., Kietzmann, T., Doi, T., Komuro, I. a Morishita, R.** 2008. HIF-1alpha signaling upstream of NKX2.5 is required for cardiac development in Xenopus. *J Biol Chem*, 283, 11841-9.

- Nakano, S. J., Siomos, A. K., Garcia, A. M., Nguyen, H., SooHoo, M., Galambos, C., Nunley, K., Stauffer, B. L., Sucharov, C. C. a Miyamoto, S. D.** 2017. Fibrosis-Related Gene Expression in Single Ventricle Heart Disease. *J Pediatr*, 191, 82-90 e2.
- Nearby, M. T., Ng, K. E., Ludtmann, M. H., Hall, A. R., Piotrowska, I., Ong, S. B., Hausenloy, D. J., Mohun, T. J., Abramov, A. Y. a Breckenridge, R. A.** 2014. Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function. *J Mol Cell Cardiol*, 74, 340-52.
- Nickel, J., Ten Dijke, P. a Mueller, T. D.** 2018. TGF-beta family co-receptor function and signaling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 50, 12-36.
- Niessen, K. a Karsan, A.** 2008. Notch signaling in cardiac development. *Circ Res*, 102, 1169-81.
- Nin, J. W., Jorsal, A., Ferreira, I., Schalkwijk, C. G., Prins, M. H., Parving, H. H., Tarnow, L., Rossing, P. a Stehouwer, C. D.** 2011. Higher plasma levels of advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Diabetes Care*, 34, 442-7.
- O'Donnell, C. J. a Elosua, R.** 2008. [Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study]. *Rev Esp Cardiol*, 61, 299-310.
- O'Neill, K., Alexander, J., Azuma, R., Xiao, R., Snyder, N. W., Mesaros, C. A., Blair, I. A. a Pinney, S. E.** 2018. Gestational Diabetes Alters the Metabolomic Profile in 2nd Trimester Amniotic Fluid in a Sex-Specific Manner. *Int J Mol Sci*, 19.
- Olivey, H. E., Mundell, N. A., Austin, A. F. a Barnett, J. V.** 2006. Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn*, 235, 50-9.
- Ornoy, A., Rand, S. B. a Bischitz, N.** 2010. Hyperglycemia and hypoxia are interrelated in their teratogenic mechanism: studies on cultured rat embryos. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 89, 106-15.
- Ornoy, A., Reece, E. A., Pavlinkova, G., Kappen, C. a Miller, R. K.** 2015. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 105, 53-72.
- Oyen, N., Diaz, L. J., Leirgul, E., Boyd, H. A., Priest, J., Mathiesen, E. R., Quertermous, T., Wohlfahrt, J. a Melbye, M.** 2016. Prepregnancy Diabetes and Offspring Risk of Congenital Heart Disease: A Nationwide Cohort Study. *Circulation*, 133, 2243-53.
- Pan, L., Li, Y., Jia, L., Qin, Y., Qi, G., Cheng, J., Qi, Y., Li, H. a Du, J.** 2012. Cathepsin S deficiency results in abnormal accumulation of autophagosomes in macrophages and enhances Ang II-induced cardiac inflammation. *PLoS One*, 7, e35315.
- Pasquale, E. B.** 2008. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, 133, 38-52.
- Patterson, A. J., Xiao, D., Xiong, F., Dixon, B. a Zhang, L.** 2012. Hypoxia-derived oxidative stress mediates epigenetic repression of PKCepsilon gene in foetal rat hearts. *Cardiovasc Res*, 93, 302-10.
- Pavlinkova, G., Salbaum, J. M. a Kappen, C.** 2009. Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC Genomics*, 10, 274.
- Peppas, M., He, C., Hattori, M., McEvoy, R., Zheng, F. a Vlassara, H.** 2003. Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 52, 1441-8.
- Persson, M., Norman, M. a Hanson, U.** 2009. Obstetric and perinatal outcomes in type 1 diabetic pregnancies: A large, population-based study. *Diabetes Care*, 32, 2005-9.
- Peters, K. G., De Vries, C. a Williams, L. T.** 1993. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8915-9.

- Petrov, V. V., Fagard, R. H. a Lijnen, P. J.** 2002. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*, 39, 258-63.
- Pinter, E., Haigh, J., Nagy, A. a Madri, J. A.** 2001. Hyperglycemia-induced vasculopathy in the murine conceptus is mediated via reductions of VEGF-A expression and VEGF receptor activation. *Am J Pathol*, 158, 1199-206.
- Pinto, A. R., Godwin, J. W. a Rosenthal, N. A.** 2014. Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. *Stem Cell Res*, 13, 705-14.
- Plagemann, A.** 2004. 'Fetal programming' and 'functional teratogenesis': on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *J Perinat Med*, 32, 297-305.
- Rahelic, D.** 2016. [7th Edition of Idf Diabetes Atlas--Call for Immediate Action]. *Lijec Vjesn*, 138, 57-8.
- Ramalho, A. R., Toscano, A., Pereira, P., Girao, H., Goncalves, L. a Marques, C.** 2017. Hyperglycemia-induced degradation of HIF-1alpha contributes to impaired response of cardiomyocytes to hypoxia. *Rev Port Cardiol*, 36, 367-373.
- Ream, M., Ray, A. M., Chandra, R. a Chikaraishi, D. M.** 2008. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295, R583-95.
- Reaume, A. G., de Sousa, P. A., Kulkarni, S., Langille, B. L., Zhu, D., Davies, T. C., Juneja, S. C., Kidder, G. M. a Rossant, J.** 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*, 267, 1831-4.
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H. a Vilo, J.** 2016. g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res*, 44, W83-9.
- Risebro, C. A. a Riley, P. R.** 2006. Formation of the ventricles. *ScientificWorldJournal*, 6, 1862-80.
- Rittie, L.** 2017. Method for Picosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods Mol Biol*, 1627, 395-407.
- Rodesch, F., Simon, P., Donner, C. a Jauniaux, E.** 1992. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol*, 80, 283-5.
- Roest, P. A., Molin, D. G., Schalkwijk, C. G., van Iperen, L., Wentzel, P., Eriksson, U. J. a Gittenberger-de Groot, A. C.** 2009. Specific local cardiovascular changes of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, vascular endothelial growth factor, and Smad2 in the developing embryos coincide with maternal diabetes-induced congenital heart defects. *Diabetes*, 58, 1222-8.
- Rosenblatt-Velin, N., Montessuit, C., Papageorgiou, I., Terrand, J. a Lerch, R.** 2001. Postinfarction heart failure in rats is associated with upregulation of GLUT-1 and downregulation of genes of fatty acid metabolism. *Cardiovasc Res*, 52, 407-16.
- Rouillard, A. D., Gunderson, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G. a Ma'ayan, A.** 2016. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)*, 2016.
- Rudat, C. a Kispert, A.** 2012. Wt1 and epicardial fate mapping. *Circ Res*, 111, 165-9.
- Ruthenborg, R. J., Ban, J. J., Wazir, A., Takeda, N. a Kim, J. W.** 2014. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells*, 37, 637-43.
- Ryan, H. E., Lo, J. a Johnson, R. S.** 1998. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*, 17, 3005-15.
- Rybka, J.** 2007. *Diabetes mellitus - komplikace a pridruzená onemocnění*, Grada.
- Sada, K., Nishikawa, T., Kukidome, D., Yoshinaga, T., Kajihara, N., Sonoda, K., Senokuchi, T., Motoshima, H., Matsumura, T. a Araki, E.** 2016. Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1. *PLoS One*, 11, e0158619.

- Saga, Y., Hata, N., Koseki, H. a Taketo, M. M.** 1997. Mesp2: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes Dev*, 11, 1827-39.
- Saga, Y., Kitajima, S. a Miyagawa-Tomita, S.** 2000. Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*, 10, 345-52.
- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J. a Inoue, T.** 1999. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*, 126, 3437-47.
- Salbaum, J. M., Kruger, C., Zhang, X., Delahaye, N. A., Pavlinkova, G., Burk, D. H. a Kappen, C.** 2011. Altered gene expression and spongiotrophoblast differentiation in placenta from a mouse model of diabetes in pregnancy. *Diabetologia*, 54, 1909-20.
- Samovski, D., Su, X., Xu, Y., Abumrad, N. A. a Stahl, P. D.** 2012. Insulin and AMPK regulate FA translocase/CD36 plasma membrane recruitment in cardiomyocytes via Rab GAP AS160 and Rab8a Rab GTPase. *J Lipid Res*, 53, 709-17.
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L. a Doetschman, T.** 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, 124, 2659-70.
- Santini, M. P., Forte, E., Harvey, R. P. a Kovacic, J. C.** 2016. Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells. *Development*, 143, 1242-58.
- Sato, T., Haimovici, R., Kao, R., Li, A. F. a Roy, S.** 2002. Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes*, 51, 1565-71.
- Savolainen, S. M., Foley, J. F. a Elmore, S. A.** 2009. Histology Atlas of the Developing Mouse Heart with Emphasis on E11.5 to E18.5. *Toxicologic Pathology*, 37, 395-414.
- Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C. L., Wilkinson, G. A., Pitulescu, M. E., Acker, T. a Acker-Palmer, A.** 2010. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature*, 465, 487-91.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. a Eliceiri, K. W.** 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, 671-5.
- Schwartz, R., Gruppuso, P. A., Petzold, K., Brambilla, D., Hiilesmaa, V. a Teramo, K. A.** 1994. Hyperinsulinemia and macrosomia in the fetus of the diabetic mother. *Diabetes Care*, 17, 640-8.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R. P. a Anderson, R. H.** 2000. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec*, 258, 319-37.
- Semenza, G. L.** 2011. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med*, 365, 537-47.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. a Giallongo, A.** 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271, 32529-37.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. a Schuh, A. C.** 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376, 62-6.
- Shi, G. P., Sukhova, G. K., Kuzuya, M., Ye, Q., Du, J., Zhang, Y., Pan, J. H., Lu, M. L., Cheng, X. W., Iguchi, A., Perrey, S., Lee, A. M., Chapman, H. A. a Libby, P.** 2003. Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res*, 92, 493-500.
- Shibuya, M.** 2006. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*, 9, 225-30; discussion 231.
- Shimizu, I. a Minamino, T.** 2016. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 97, 245-62.

- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D. a et al.** 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359, 693-9.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. a Keshet, E.** 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359, 843-5.
- Siedner, S., Kruger, M., Schroeter, M., Metzler, D., Roell, W., Fleischmann, B. K., Hescheler, J., Pfitzer, G. a Stehle, R.** 2003. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol*, 548, 493-505.
- Škrha, J.** 2009. *Diabetologie*, Galén.
- Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Li, D. Y. a Urness, L. D.** 2003. Loss of distinct arterial and venous boundaries in mice lacking endoglin, a vascular-specific TGFbeta coreceptor. *Dev Biol*, 261, 235-50.
- Spinale, F. G.** 2007. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*, 87, 1285-342.
- Sridurongrit, S., Larsson, J., Schwartz, R., Ruiz-Lozano, P. a Kaartinen, V.** 2008. Signaling via the Tgf-beta type I receptor Alk5 in heart development. *Dev Biol*, 322, 208-18.
- Srivastava, D. a Olson, E. N.** 2000. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature*, 407, 221-6.
- Sun, X., Hota, S. K., Zhou, Y. Q., Novak, S., Miguel-Perez, D., Christodoulou, D., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Gregorio, C. C., Henkelman, R. M., Rossant, J. a Bruneau, B. G.** 2018. Cardiac-enriched BAF chromatin-remodeling complex subunit Baf60c regulates gene expression programs essential for heart development and function. *Biol Open*, 7.
- Sung, M. M., Byrne, N. J., Kim, T. T., Levasseur, J., Masson, G., Boisvenue, J. J., Febbraio, M. a Dyck, J. R.** 2017. Cardiomyocyte-specific ablation of CD36 accelerates the progression from compensated cardiac hypertrophy to heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312, H552-H560.
- Tallquist, M. D. a Soriano, P.** 2000. Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genesis*, 26, 113-5.
- Tallquist, M. D. a Soriano, P.** 2003. Cell autonomous requirement for PDGFRalpha in populations of cranial and cardiac neural crest cells. *Development*, 130, 507-18.
- Tam, W. H., Ma, R. C., Yang, X., Ko, G. T., Tong, P. C., Cockram, C. S., Sahota, D. S., Rogers, M. S. a Chan, J. C.** 2008. Glucose intolerance and cardiometabolic risk in children exposed to maternal gestational diabetes mellitus in utero. *Pediatrics*, 122, 1229-34.
- Thangarajah, H., Vial, I. N., Grogan, R. H., Yao, D., Shi, Y., Januszyk, M., Galiano, R. D., Chang, E. I., Galvez, M. G., Glotzbach, J. P., Wong, V. W., Brownlee, M. a Gurtner, G. C.** 2010. HIF-1alpha dysfunction in diabetes. *Cell Cycle*, 9, 75-9.
- Thangarajah, H., Yao, D., Chang, E. I., Shi, Y., Jazayeri, L., Vial, I. N., Galiano, R. D., Du, X. L., Grogan, R., Galvez, M. G., Januszyk, M., Brownlee, M. a Gurtner, G. C.** 2009. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13505-10.
- Tittarelli, A., Janji, B., Van Moer, K., Noman, M. Z. a Chouaib, S.** 2015. The Selective Degradation of Synaptic Connexin 43 Protein by Hypoxia-induced Autophagy Impairs Natural Killer Cell-mediated Tumor Cell Killing. *J Biol Chem*, 290, 23670-9.
- Tomko, R. P., Johansson, C. B., Totrov, M., Abagyan, R., Frisen, J. a Philipson, L.** 2000. Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res*, 255, 47-55.
- Tomko, R. P., Xu, R. a Philipson, L.** 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3352-6.

- Torre-Amione, G., Kapadia, S., Lee, J., Durand, J. B., Bies, R. D., Young, J. B. a Mann, D. L.** 1996. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation*, 93, 704-11.
- Touger, L., Looker, H. C., Krakoff, J., Lindsay, R. S., Cook, V. a Knowler, W. C.** 2005. Early growth in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care*, 28, 585-9.
- Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E. a Blaxall, B. C.** 2016. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res*, 118, 1021-40.
- Travers, J. P., Pratten, M. K. a Beck, F.** 1989. Effects of low insulin levels on rat embryonic growth and development. *Diabetes*, 38, 773-8.
- Trojan, S., Langmeier, M., Hrachovina, V., Kittnar, O., Koudelová, J., Kuthan, V., Mareš, J., Marešová, D., Mourek, J., Pokorný, J., Sedláček, J., Schreiber, M., Trávníčková, E. a Wünsch, Z.** 2003. *Lékařská fyziologie*, Grada.
- Tsai, C. T., Wu, C. K., Lee, J. K., Chang, S. N., Kuo, Y. M., Wang, Y. C., Lai, L. P., Chiang, F. T., Hwang, J. J. a Lin, J. L.** 2015. TNF-alpha down-regulates sarcoplasmic reticulum Ca(2)(+) ATPase expression and leads to left ventricular diastolic dysfunction through binding of NF-kappaB to promoter response element. *Cardiovasc Res*, 105, 318-29.
- Vaidya, D., Tamaddon, H. S., Lo, C. W., Taffet, S. M., Delmar, M., Morley, G. E. a Jalife, J.** 2001. Null mutation of connexin43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development. *Circ Res*, 88, 1196-202.
- Vambergue, A. a Fajardy, I.** 2011. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World J Diabetes*, 2, 196-203.
- van der Vusse, G. J., van Bilsen, M. a Glatz, J. F.** 2000. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res*, 45, 279-93.
- van Dijk, S. J., Bezold Kooiker, K., Mazzalupo, S., Yang, Y., Kostyukova, A. S., Mustacich, D. J., Hoye, E. R., Stern, J. A., Kittleson, M. D. a Harris, S. P.** 2016. The A31P missense mutation in cardiac myosin binding protein C alters protein structure but does not cause haploinsufficiency. *Arch Biochem Biophys*, 601, 133-40.
- van Heerebeek, L., Hamdani, N., Handoko, M. L., Falcao-Pires, I., Musters, R. J., Kupreishvili, K., Ijsselmuiden, A. J., Schalkwijk, C. G., Bronzwaer, J. G., Diamant, M., Borbely, A., van der Velden, J., Stienen, G. J., Laarman, G. J., Niessen, H. W. a Paulus, W. J.** 2008. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*, 117, 43-51.
- Van Linthout, S. a Tschope, C.** 2017. Inflammation - Cause or Consequence of Heart Failure or Both? *Curr Heart Fail Rep*, 14, 251-265.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. a Thompson, C. B.** 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-33.
- Vilmi-Kerala, T., Lauhio, A., Tervahartiala, T., Palomaki, O., Uotila, J., Sorsa, T. a Palomaki, A.** 2017. Subclinical inflammation associated with prolonged TIMP-1 upregulation and arterial stiffness after gestational diabetes mellitus: a hospital-based cohort study. *Cardiovasc Diabetol*, 16, 49.
- Vlassara, H. a Striker, G. E.** 2011. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol*, 7, 526-39.
- Wagner, K. D., Wagner, N., Wellmann, S., Schley, G., Bondke, A., Theres, H. a Scholz, H.** 2003. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J*, 17, 1364-6.
- Wagner, N., Wagner, K. D., Theres, H., Englert, C., Schedl, A. a Scholz, H.** 2005. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*, 19, 2631-42.
- Walker, C. A. a Spinale, F. G.** 1999. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 118, 375-82.

- Wang, H. U., Chen, Z. F. a Anderson, D. J.** 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 93, 741-53.
- Wang, J., Nagy, A., Larsson, J., Dudas, M., Sucov, H. M. a Kaartinen, V.** 2006. Defective ALK5 signaling in the neural crest leads to increased postmigratory neural crest cell apoptosis and severe outflow tract defects. *BMC Dev Biol*, 6, 51.
- Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M. E., Schmidt, T. S., Bochenek, M. L., Sakakibara, A., Adams, S., Davy, A., Deutsch, U., Luthi, U., Barberis, A., Benjamin, L. E., Mäkinen, T., Nobes, C. D. a Adams, R. H.** 2010. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*, 465, 483-6.
- Wang, Y., Tanner, B. C., Lombardo, A. T., Tremble, S. M., Maughan, D. W., Vanburen, P., Lewinter, M. M., Robbins, J. a Palmer, B. M.** 2013. Cardiac myosin isoforms exhibit differential rates of MgADP release and MgATP binding detected by myocardial viscoelasticity. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 1-8.
- Waza, A. A., Andrabi, K. a Hussain, M. U.** 2014. Protein kinase C (PKC) mediated interaction between connexin43 (Cx43) and K(+)(ATP) channel subunit (Kir6.1) in cardiomyocyte mitochondria: Implications in cytoprotection against hypoxia induced cell apoptosis. *Cell Signal*, 26, 1909-17.
- Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S. M., Shirani, J., Armstrong, R. C. a Kitsis, R. N.** 2003. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest*, 111, 1497-504.
- Wessels, A. a Sedmera, D.** 2003. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics*, 15, 165-76.
- West, N. A., Crume, T. L., Maligie, M. A. a Dabelea, D.** 2011. Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero. *Diabetologia*, 54, 504-7.
- Westgate, J. A., Lindsay, R. S., Beattie, J., Pattison, N. S., Gamble, G., Mildenhall, L. F., Breier, B. H. a Johnstone, F. D.** 2006. Hyperinsulinemia in cord blood in mothers with type 2 diabetes and gestational diabetes mellitus in New Zealand. *Diabetes Care*, 29, 1345-50.
- Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K. S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J. R., van den Enden, M., Kilo, C. a Tilton, R. G.** 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42, 801-13.
- World Health, O.** 2016. *Global report on diabetes*.
- Wren, C., Birrell, G. a Hawthorne, G.** 2003. Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers. *Heart*, 89, 1217-20.
- Ya, J., Erdtsieck-Ernste, E. B., de Boer, P. A., van Kempen, M. J., Jongsma, H., Gros, D., Moorman, A. F. a Lamers, W. H.** 1998. Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ Res*, 82, 360-6.
- Yang, J., Sambandam, N., Han, X., Gross, R. W., Courtois, M., Kovacs, A., Febbraio, M., Finck, B. N. a Kelly, D. P.** 2007. CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res*, 100, 1208-17.
- Yokoyama, T., Vaca, L., Rossen, R. D., Durante, W., Hazarika, P. a Mann, D. L.** 1993. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*, 92, 2303-12.
- Yoon, Y. S., Uchida, S., Masuo, O., Cejna, M., Park, J. S., Gwon, H. C., Kirchmair, R., Bahlman, F., Walter, D., Curry, C., Hanley, A., Isner, J. M. a Losordo, D. W.** 2005. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation*, 111, 2073-85.

- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N. a Kishimoto, T.** 1996. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 407-11.
- Yuan, X., Qi, H., Li, X., Wu, F., Fang, J., Bober, E., Dobрева, G., Zhou, Y. a Braun, T.** 2017. Disruption of spatiotemporal hypoxic signaling causes congenital heart disease in mice. *J Clin Invest*, 127, 2235-2248.
- Zhang, L., Huang, T. a Bordey, A.** 2016. Tsc1 haploinsufficiency is sufficient to increase dendritic patterning and Filamin A levels. *Neurosci Lett*, 629, 15-18.
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S. M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K. R. a Pu, W. T.** 2008. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*, 454, 109-13.
- Zhou, Q., Wang, H., Schwartz, D. M., Stoffels, M., Park, Y. H., Zhang, Y., Yang, D., Demirkaya, E., Takeuchi, M., Tsai, W. L., Lyons, J. J., Yu, X., Ouyang, C., Chen, C., Chin, D. T., Zaal, K., Chandrasekharappa, S. C., E, P. H., Yu, Z., Mullikin, J. C., Hasni, S. A., Wertz, I. E., Ombrello, A. K., Stone, D. L., Hoffmann, P., Jones, A., Barham, B. K., Leavis, H. L., van Royen-Kerkof, A., Sibley, C., Batu, E. D., Gul, A., Siegel, R. M., Boehm, M., Milner, J. D., Ozen, S., Gadina, M., Chae, J., Laxer, R. M., Kastner, D. L. a Aksentijevich, I.** 2016. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. *Nat Genet*, 48, 67-73.
- Zygalaki, E., Kaklamanis, L., Nikolaou, N. I., Kyrzopoulos, S., Hourri, M., Kyriakides, Z., Lianidou, E. S. a Kremastinos, D. T.** 2008. Expression profile of total VEGF, VEGF splice variants and VEGF receptors in the myocardium and arterial vasculature of diabetic and non-diabetic patients with coronary artery disease. *Clin Biochem*, 41, 82-7.