

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Eva Zábrowská**

**Vliv časného postnatálního období na rozvoj pro-arytmogenního substrátu  
po tlakovém přetížení srdce potkana**

**Impact of early postnatal period on pro-arrhythmogenic substrate development  
caused by pressure overload in rat heart**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:  
MVDr. Veronika Olejníčková, Ph.D.

Praha 2021

## Prohlášení

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

V Praze, 10. 8. 2021

Podpis

## Poděkování

V první řadě bych chtěla velice poděkovat mé školitelce MUDr. Veronice Olejníčkové, Ph.D. za vedení diplomové práce, trpělivost a především ochotu. Jsem velice vděčná za vstřícnost a spoustu cenných rad, bez kterých by diplomová práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěla poděkovat celému vědeckému týmu pana prof. MUDr. Davida Sedmery, Ph.D., DSc. Především Mgr. Aleně Kvasilové, která mi byla velikou oporou nejen při získávání experimentálních dat. Dále také Blance Topinkové a Bc. Patriku Štychovi za profesionální i osobní podporu. Také děkuji Anatomickému ústavu 1. lékařské fakulty a Fyziologickému ústavu AV ČR, díky nimž mi bylo umožněno tuto práci vytvořit. Z AV ČR bych chtěla poděkovat konkrétně paní Milaně Peškové za provedení operací a RNDr. Kristýně Holzerové, Ph.D. za pomoc s Western bloty. Na závěr bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě v průběhu studia podporovala a umožnila mi studium.

## Abstrakt

Tlakové přetížení v dospělém myokardu vede k rozvoji srdeční hypertrofie. Vyšší výskyt život ohrožujících arytmií u levostranné hypertrofie se pojí se strukturální, mechanickou a elektrickou remodelací myokardu. Vznik pro-arytmogenního fenotypu zahrnuje řadu faktorů, jejichž role jsou závislé na konkrétním experimentálním modelu a stádiu srdečního selhání. V této studii jsme se zaměřili na jednotlivé faktory remodelace u unikátního modelu tlakového přetížení srdce potkana indukovaného v neonatálním období.

Druhý postnatální den byla samcům potkana kmene Wistar provedena konstriktce abdominální aorty. Rozvoj kardiomegalie byl spojen se signifikantním poklesem váhových přírůstků patrných již od 6. týdne. Normalizovaná hmotnost srdce vzrostla ve věku 12 týdnů o 45 % u skupiny s kompenzovaným (AC I) a o 109 % u skupiny s dekompenzovaným (AC II) fenotypem. V tomto věku bylo provedeno EKG a pomocí histologických a imunohistochemických metod byla u AC II skupiny analyzována pro-arytmogenní remodelace pracovního i převodního myokardu. Signifikantní prodloužení QT a QTc intervalu na EKG svědčilo o pro-arytmogenní remodelaci, avšak komorové arytmie pozorovány nebyly. V pracovním myokardu došlo k poklesu exprese jak Cx43 o 15 %, tak jeho fosforylované formy (p-Cx43<sup>S368</sup>) o 23 %. Byla zjištěna významná negativní korelace mezi rozvojem fenotypu a množstvím exprese p-Cx43<sup>S368</sup>. Množství fibrózy bylo 2,5 x větší než u Sham operované skupiny. V myokardu převodního systému srdečního jsme pozorovali zvětšení průměru Purkyňových vláken o 75 %. Všechny zaznamenané změny vytvářejí pro-arytmogenní substrát známý z dospělého myokardu vystaveného nadměrné hemodynamické zátěži.

**Klíčová slova: komorové arytmie, neonatální myokard, levostranná hypertrofie, konexin 43, srdeční fibróza**

## Abstract

In adult heart, pressure overload leads to cardiac hypertrophy. Higher propensity of hypertrophied myocardium to life-threatening arrhythmia is attributed to structural, mechanical and electrical remodeling. Pro-arrhythmogenic remodeling comprise several factors depending on an experimental model and a stage of heart failure. This thesis aims to characterize the impact of these factors in our unique model of pressure overloaded neonatal rat heart.

The constriction of abdominal aorta was performed at postnatal day 2 in male Wistar rats. Decreased body weight, significant since week 6, was observed during development of cardiomegaly. At 12 weeks, the heart to body weight ratio was increased by 45% and by 109% in group with compensated (AC I) and decompensated (AC II) heart failure, respectively. At this age, the ECG was recorded and histological and immunohistochemical measurements were performed to analyze the pro-arrhythmogenic remodeling of working myocardium and cardiac conduction system.

The markers of pro-arrhythmogenic remodeling such as significant prolongation of QT and QTc intervals were observed in the ECG recordings of AC II animals. However, spontaneously occurring arrhythmias was not detected. Further analysis of working myocardium showed decrease in Cx43 expression and its phosphorylated form (p-Cx43<sup>S368</sup>) by 15% and by 23% respectively, compare with Sham animals. Moreover, a significant negative correlation between the p-Cx43<sup>S368</sup> expression and severity of heart failure (based on HW/BW) was observed. The fibrosis content increased 2.5 times compared to Sham operated rats. Analysis of the cardiac conduction system showed remodeling of Purkinje fibers and increase in their diameter by 75%. All these changes create a pro-arrhythmogenic substrate well known from adult models of pressure overloaded hearts.

**Key words: ventricular arrhythmias, neonatal heart, left ventricular hypertrophy, connexin 43, myocardial fibrosis**

## Seznam zkratek

AC	aortální konstriktce
AG2	angiotenzin II
AP	akční potenciál
AV	atrio-ventrikulární
BPM	počet srdečních úderů za minutu (z ang. <i>beats per minute</i> )
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CICR	vápníkem indukované uvolnění vápníku (z ang. <i>calcium induced calcium release</i> )
Cx	konexin
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAD	pozdní následná depolarizace (z ang. <i>delayed afterdepolarization</i> )
EAD	časná následná depolarizace (z ang. <i>early afterdepolarization</i> )
ECM	extracelulární matrix
EF	ejekční frakce
GJ	gap junctions
HW/BW	poměr hmotnosti srdce ku hmotnosti těla (z angl. <i>heart weight to body weight ratio</i> )
KM	kardiomyocyt
LK	levá komora
LVH	hypertrofie levé komory (z ang. <i>left ventricular hypertrophy</i> )
NGS	kozí sérum (z ang. <i>normal goat serum</i> )
PBS	fosfátový pufr
PBT	fosfátový pufr s Tween 20
PK	pravá komora
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PMJ	Purkinje myocyte junction
PSS	převodní systém srdeční
RAS	renin angiotensinový systém
RYR	ryanodinové receptory

SA	sinoatriální uzel
SERCA	sarkoplazmatická Ca <sup>2+</sup> - ATPáza
SF	srdeční frekvence
SR	sarkoplazmatické retikulum
TTBS	pufrovaný solný roztok s Tween 20
TGF-β	transformující růstový faktor β
VVV	vrozené vývojové vady
WGA	lektin Wheat Germ Agglutinin

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Literární přehled .....	11
2.1	Tlakové přetížení .....	11
2.1.1	Kompenzované stádium LVH.....	11
2.1.2	Dekompenzované stádium LVH.....	14
2.1.3	Tlakové přetížení v neonatálním období .....	15
2.2	Elektrická aktivita srdce .....	17
2.2.1	Srdeční automacie .....	17
2.2.2	Pacemakery a jejich hierarchie .....	18
2.2.3	Autonomní ovlivnění .....	19
2.2.4	Převodní systém srdeční.....	19
2.2.5	Aktivace pracovního myokardu .....	20
2.2.6	Gap junction .....	22
2.2.7	Refraktelita myokardu .....	25
2.3	Poruchy srdečního rytmu .....	26
2.3.1	Dělení arytmií .....	26
2.3.2	Arytmogenní substrát.....	27
2.3.2.1	Potencovaná a ektopická aktivita .....	27
2.3.2.2	Spouštěná aktivita .....	28
2.3.2.3	Narušení šíření vzruchu .....	30
2.4	Fetální a neonatální programování .....	32
3	Cíle práce .....	33
4	Experimentální část .....	34
4.1	Metodika .....	34
4.1.1	Experimentální model .....	34
4.1.2	Měření a analýza EKG .....	34
4.1.3	Odběr tkáně a fixace.....	35
4.1.4	Western blot.....	36
4.1.4.1	Homogenizace tkáně .....	36
4.1.4.2	Elektroforéza a vlastní Western blot .....	36
4.1.5	Histologické a imunochemické analýzy .....	37
4.1.5.1	Velikost kardiomyocytů .....	37
4.1.5.2	Relativní plocha fibrotické tkáně .....	37
4.1.5.3	Množství Cx43 a p-Cx43 <sup>S368</sup> ve tkáni.....	37



4.1.5.4	Kolokalizace Cx43 s N-cadherinem .....	38
4.1.6	Analýza obrazu.....	39
4.1.6.1	Velikost kardiomyocytů a Purkyňových vláken .....	39
4.1.6.2	Cx43, p-Cx43 <sup>S368</sup> a fibróza .....	40
4.1.6.3	Kolokalizace Cx43 a N-cadherinu.....	40
4.1.6.4	Western blot.....	40
4.2	Statistika .....	41
5	Výsledky.....	42
5.1	Základní charakteristika modelu neonatální konstriktce aorty .....	42
5.2	Základní charakteristika skupin na úrovni srdečního svalu .....	46
5.3	Výskyt spontánních arytmií .....	47
5.4	Analýza pro-arytmogenního substrátu.....	50
5.4.1	Expresce Cx43 a p-Cx43 <sup>S368</sup> .....	50
5.4.1.1	Western blot.....	50
5.4.1.2	Histologické analýzy .....	51
5.4.1.3	Korelační analýzy .....	54
5.4.2	Rozvoj fibrózy .....	55
5.5	Vliv tlakového přetížení na komorový převodní systém .....	55
6	Diskuze.....	57
6.1	Model aortální konstriktce v neonatálním období .....	57
6.2	Výskyt arytmií .....	59
6.3	Změny na úrovni elektrické remodelace a Cx43 .....	59
6.4	Rozvoj fibrózních změn v důsledku tlakového přetížení .....	60
6.5	Remodelace Purkyňových vláken .....	61
7	Závěr .....	63
8	Literatura .....	64

## 1 Úvod

Srdce je životně důležitý orgán, který zajišťuje krevní oběh a tím přísun kyslíku a živin pro ostatní tkáně. U lidí začíná bít již 22. den embryonálního vývoje a musí fungovat až do konce života. Správná srdeční funkce je závislá nejen na mechanických vlastnostech srdce, ale také na správné rytmicitě a propagaci elektrického signálu myokardem. Arytmie, tedy poruchy v propagaci vzruchu, představují závažný problém s vysokou klinickou i ekonomickou relevancí.

Rozvoj pro-arytmogenního substrátu se pojí s řadou srdečních patologií. Remodelace myokardu vedoucí k rozvoji tohoto substrátu, může vznikat v důsledku dlouhodobého působení tlakového přetížení. Změny ve struktuře srdeční stěny ovlivňují jak mechanické, tak elektrické vlastnosti srdce, které se stává náchylnější ke vzniku arytmií. Pro remodelaci srdce v důsledku hemodynamického přetížení je typické provázání jednotlivých faktorů a závislost na stádiu rozvoje patologie.

Na potkaním modelu zavedeném na Fyziologickém ústavu AV ČR byla již dříve popsána specifická reakce myokardu vznikající v důsledku indukce zvýšené hemodynamické zátěže v neonatálním období. V periodě hyperplastického růstu kardiomyocytů (KM) zvířata vykazovala lepší funkční odpověď na tlakovou zátěž. Je známo, že podmínky krátce po narození mohou ovlivnit odpověď myokardu v dospělosti. V této diplomové práci jsme proto analyzovali, zda v dospělosti bude mít vliv na rozvoj pro-arytmogenního fenotypu spojeného s hemodynamickým přetížením fakt, že indukce byla navozena v hyperplastické fázi srdečního růstu. Zaměřili jsme se na pro-arytmogenní faktory známé z humánní medicíny i zvířecích modelů levostranné hypertrofie (LVH) a srdečního selhání. Konkrétně jsme stanovovali změny v expresi, fosforylaci a buněčné lokalizaci konexinu 43 (Cx43), jakožto hlavního Cx exprimovaného v srdečních komorách, a rozvoj fibrózy v myokardu. Vzhledem ke vzrůstajícímu počtu studií potvrzujících roli terminální části převodního systému srdečního (PSS), konkrétně Purkyňových vláken, v patogenezi arytmií u patologicky remodelovaného myokardu, jsme se v analýze arytmogeneze na tomto specifickém modelu zaměřili i na ně.

Získaná data mohou přispět k lepšímu pochopení elektrofyziologických změn u dětí s vrozenou vývojovou vadou srdce spojenou s hemodynamickým přetížením levé komory (LK), jako je například aortální stenóza či koarktace aorty. U těchto vad také dochází k vlivu tlakového přetížení na myokard v časných fázích vývoje, které se následně může projevit i u dospělých jedinců a komplikovat jejich následnou léčbu.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Tlakové přetížení

Tlakové přetížení vzniká při mechanickém zatížení srdce, u kterého musí srdce překonávat zvýšený afterload. Afterload je tlak, proti kterému srdce při systole vypuzuje krev z komor. Aby došlo k dostatečnému vypuzení krve do aorty a plicnice, musí srdce vyvinout dostatečně silnou kontrakci, aby afterload překonalo (Tarazi and Levy, 1982). Velikost afterloadu se odvíjí od více faktorů. Je dána například tlakem v aortě, systémovým tlakem a systémovou vaskulární rezistencí. Pokud dojde ke zvýšení afterloadu, musí srdce vyvinout při systole větší sílu než za normálních podmínek. Ve stěnách komor vzniká nadměrné pnutí a může dojít k tlakovému přetížení (Sidebotham and Le Grice, 2007).

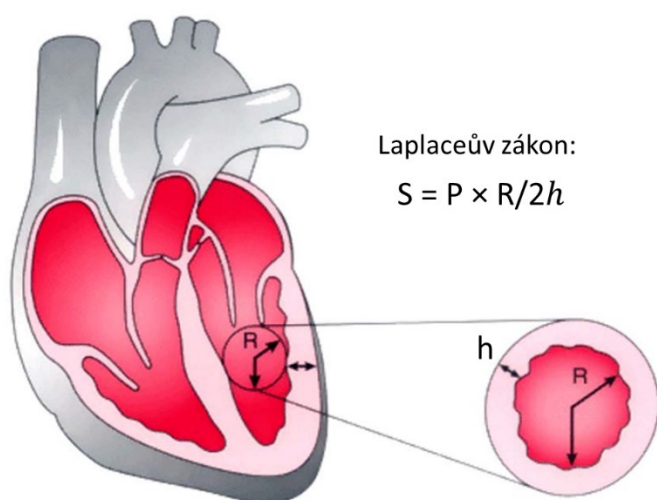
Mezi nejčastější příčiny vzniku tlakového přetížení LK patří hypertenze, látky zvyšující krevní tlak a některé vrozené vývojové vady (VVV) srdce (Frohlich and Susic, 2012). Nejčastějšími VVV srdce, pojícími se s tlakovým přetížením LK jsou aortální stenóza a koarktace aorty. Dohromady se s nimi v ČR narodí asi 43 dětí za rok a mohou se pojít se závažnými zdravotními komplikacemi (Šamánek and Voříšková, 1999).

Na tlakové přetížení reaguje srdce spuštěním adaptivních mechanismů, které mu pomáhají zvýšené nároky překonat. Krátkodobě to může být třeba zvýšení tepové frekvence nebo zvýšení preloadu, tedy objemu krve v komorách na konci diastoly. Při dlouhodobějším působení tlakového přetížení však tyto mechanismy nestačí (Ošťádal and Vízek, 2003). V srdci se tak spouští abnormální genová exprese, v jejímž důsledku dochází ke změnám na molekulární, buněčné i intersticiální úrovni. Aktivované procesy vedou k remodelaci myokardu. Její průběh určují hemodynamické změny a neurohumorální regulace (Cohn et al., 2000).

#### 2.1.1 Kompenzované stádium LVH

Kompenzační mechanismy aktivované při tlakovém přetížení slouží k zachování stálých hemodynamických podmínek organismu. Děje se tak především pomocí remodelace myokardu. Remodelace je soubor procesů, které vedou ke změně struktury srdeční stěny (Cohn et al., 2000). Zásadní změna, která ve stěně nastane, je nárůst v její šířce. Ztluštění stěny komory podle Laplaceova zákona vede ke zvýšení efektivity kontrakce při systole. Tento zákon je vyjádřen jako  $S = P \times r/2h$  a popisuje vztah mezi napětím stěny ( $S$ ), tlakem v komoře ( $P$ ), poloměrem komory ( $r$ ) a šíří myokardu ( $h$ ) (Obr. 1) (Ošťádal and Vízek, 2003).

U dospělého myokardu s terminálně diferencovanými KM dochází k růstu tkáně především hypertrofií. Tedy v nárůstu objemu jednotlivých buněk (Norton et al., 2002). V závislosti na původu a typu přetížení srdce, se mohou vyskytovat různé formy hypertrofie. Pro tlakové přetížení je typická hypertrofie koncentrická, u níž KM rostou především do šířky. Zvětšují tak šířku stěny myokardu bez ovlivnění jejího průměru. Nové sarkomery zde vznikají vzhledem ke stávajícím vláknům myokardu paralelně (Nadruz, 2015). V souladu s Laplaceovým zákonem dochází podle míry přetížení k proporcionálnímu ztluštění stěny komory tak, aby se v komoře vyrovnalo systolické napětí (Obr. 1) (Ošťádal and Vízek, 2003).



**Obrázek 1: Schéma reakce na zvýšený afterload dle Laplaceova zákona.**

Stres ve stěně myokardu ( $S$ ) o daném poloměru ( $R$ ), který vzniká zvýšením tlaku ( $P$ ) je vyrovnáván nárůstem v šířce myokardu ( $h$ ). Upraveno dle Affolter and Ghanayem (2014).

Dalším významným faktorem přispívajícím k vyrovnání tlakových poměrů je fibrotizace. Nárůst v počtu a objemu fibroblastů a kolagenních vláken ovlivňuje především extracelulární matrix (ECM) tkáně (Lajiness and Conway, 2012). Hlavní složkou srdeční ECM je kolagen produkovaný fibroblasty. Většina kolagenních vláken je tvořena kolagenem typu 1, tvořícím silná vlákna. Dále je v srdci zastoupen také kolagen typu 3, tvořící slabší elastičtější vlákna, která tvoří asi 10 % kolagenních vláken srdci. V ECM jsou zastoupeny také glykosaminoglykany, glykoproteiny a proteoglykany (Frangogiannis, 2019). ECM ve tkáni má značný význam pro srdeční činnost a změny ve struktuře ECM se mohou na srdeční funkci významně projevit (Gyöngyösi et al., 2017).

Spouštěč fibrotizaci mohou například makrofágy, vaskulární buňky nebo také myocyty, pomocí produkce různých signálních molekul (González et al., 2018). Pro iniciaci je klíčový nárůst

koncentrace pro-fibrotických růstových faktorů a cytokinů, které vedou k diferenciaci fibrocytů. Příkladem může být dráha aktivovaná transformujícím růstovým faktorem  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Tento růstový faktor indukuje fosforylaci dalšího transkripčního faktoru Smad, který se translokuje do jádra a spouští transkripci genů pro fibrotickou odpověď (Walton et al., 2017).

K diferenciaci fibroblastů může docházet z více buněčných typů. Jako zdroj pro jejich vznik mohou sloužit například hematopoetické progenitorové buňky (Frangogiannis, 2019). Při vývoji jsou také důležité transformace buněk. V prenatální fázi může docházet například k procesu epiteliální-mezenchymové transformace. Tedy přeměně epiteliálních buněk na fibroblasty (Wynn, 2008). Dále mohou růstové faktory, jako je například TGF- $\beta$  a kostní morfogenetický protein, iniciovat endotel-mezenchymální transformace, které se uplatňují při formaci srdečních chlopní (Ganong, 2005).

V kompenzované fázi tlakového přetížení byly popsány změny zrychlující vedení elektrického impulsu. K tomuto efektu přispívá změna poměru délky a šířky KM pomocí přidávání nových sarkomer (Toure and Cabo, 2010), i když tento efekt je pozorován převážně v případě hypertrofie spojené s prodloužením KM (Wiegerinck et al., 2006), řada dalších prací poukázala na zrychlení vedení vzruchu v důsledku změn na úrovni gap junction (GJ). Za povšimnutí stojí také fakt, že v reakci na tlakovou zátěž hypertrofují nejen pracovní komorové KM, ale i Purkyňova vlákna. Studie na dospělých potkanech ukázala kromě změn v geometrii Purkyňových vláken i zvýšení exprese Cx40, který je společně s Cx43 pro ně typický. Autoři tento nálezní připisovali zvýšení rychlosti vedení vzruchu, a tedy adaptaci Purkyňových vláken na hypertrofovanou masu LK (Harris et al., 2012).

S nárůstem objemu myokardiální tkáně je potřeba zajistit její dostatečné okysličení. To se v srdci děje převážně díky vazodilataci koronárního řečiště. Nároky na spotřebu kyslíku a živin jsou v srdci nejvyšší ze všech orgánů i za fyziologických podmínek (Verdejo et al., 2012). Zároveň má ale srdce pouze malou arteriovenózní diferencii (Ganong, 2005). Při hypertrofii se tak může stát, že nárůst v okysličení tkáně pomocí vazodilatace nestačí a ve stěně komory se může rozvíjet hypoxie spojená s aktivací signálních drah vedoucích k angiogenezi (Kayar and Weiss, 1992).

Všechny výše zmíněné parametry mají za úkol zajistit dostatečnou kontraktilní funkci srdce a udržení srdečního výdeje. Adaptivní mechanismy, které přechodně vedou ke zlepšení efektivity čerpací funkce srdce a pomáhají tak udržet LVH v kompenzovaném stádiu, však mají své limity. Při závažném a dlouhodobém tlakovém přetížení, mohou být tyto limity překročeny. Adaptivní procesy následně přechází v procesy maladaptivní a vedou k poklesu srdečního výdeje (Anversa et al., 1991).

### 2.1.2 Dekompenzované stádium LVH

Přetrvávající signalizace vedoucí k hypertrofii, fibrotizaci a apoptóze mohou vést k dilataci a k výraznému zhoršení srdeční funkce (Mann, 2003). Při nadměrném ztluštění stěny komory u koncentrické hypertrofie je ovlivněna její plasticita. Neúměrný rozvoj fibrózy v poměru ke kontraktální složce tkáně, vede ke zvýšení tuhosti komory. K nárůstu kolegenních vláken v ECM dochází především okolo cév, v oblastech perimysia a endomysia (González et al., 2018). Nedostatečná poddajnost ovlivňuje transport kyslíku a snižuje relaxaci myokardu při diastole. To má vliv především na narušeném plnění komory krví (Detterich, 2017).

Snížení end-diastolického objemu se následně projeví na ejekční frakci (EF), jakožto hlavního parametru popisující čerpací funkci srdce. Je to podíl krve, který je při jedné systole z komory vypuzen, vyjádřený v procentech. Pro výpočet platí vztah  $EF = V_s / VED$ , kde  $V_s$  je objem na konci systoly a VED end-diastolický objem. Za normálních podmínek se hodnota EF u LK pohybuje okolo 65 % (Ganong, 2005).

Dojde-li k poklesu EF, dojde také k poklesu krevního tlaku a následné aktivaci renin angiotensinového systému (RAS). Snížený krevní tlak v ledvinách pomocí baroreceptorů juxtaglomerulárních buněk indukuje sekreci reninu (Crowley and Coffman, 2012). Ten je sekretován do krevního oběhu, kde reaguje s angiotensinogenem, tím vzniká molekula angiotenzinu I. Z toho následně angiotenzin konvertujícím enzym odštěpí část aminokyselin a vzniká angiotenzin II (AG2) (Lorell, 1995). AG2 přítomný v oběhu poté může působit přímo v srdci nebo se dostane zpět do ledvin. V ledvinách spouští syntézu aldosteronu, který zvýší zpětnou resorpci  $Na^+$  a vody. Tím dojde ke zvětšení objemu extracelulární tekutiny a preloadu (Sayer and Bhat, 2014). V srdci se AG2 váže na specifické AT1 receptory, které mohou přispívat k fibrotizaci tkáně (Frangiannis, 2019).

Aktivovaný RAS také způsobuje vazokonstrikci a zvýšení krevního tlaku, čímž se zvýší i afterload. Dlouhodobě aktivovaný RAS tak může způsobovat jak objemové, tak tlakové srdeční přetížení (Sayer and Bhat, 2014). U hypertrofované i dilatované komory vzrůstají nároky na spotřebu kyslíku. Dochází tedy k dilataci koronárních cév. Trvale zvýšený tlak v koronárních cévách však může narušit vrstvu endotelu a jeho schopnost produkovat oxid dusnatý. Snížená syntéza této vazoaktivní látky následně může vést k nedostatečnému okysličení tkáně (Rajapakse et al., 2015). K maladaptaci přispívají i dlouhodobé dysbalance vegetativního systému. Například zvýšení tonu sympatiku, které vede ke zvýšení ionotropie, je spojováno s vyšším výskytem arytmií (Johnson and Antoons, 2018).

K rozvoji hypoxie může docházet také kvůli nárůstu objemu tkáně hypertrofované komory. Při hypertrofii sice dochází ke vzniku nových cév, neovaskularizace však neprobíhá v dostatečné míře. Nárůst krevního řečiště tak není proporcionální k nárůstu objemu tkáně. Snížená hustota kapilár ve tkáni vede ke zvýšení difuzní vzdálenosti pro kyslík a zpomalení dodávání kyslíku jednotlivým buňkám (Kayar and Weiss, 1992).

Nedostatek kyslíku v buňkách významně ovlivňuje energetický metabolismus a následně i metabolismus  $\text{Ca}^{2+}$ . Změny  $\text{Ca}^{2+}$  metabolismu v srdci mohou mít vážné následky při diastole. Pro relaxaci srdečního svalu je klíčové snížení cytoplazmatické koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . To je zajištěno vychytáváním  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplazmy do sarkoplazmatického retikula (SR) pomocí sarkoplazmatických  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz (Hendrych et al., 2016). Exprese těchto pump je však při tlakovém přetížení snížena (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). To přispívá k nahromadění  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazmě a narušení relaxační schopnosti komory. Navíc jsou ovlivněny ryanodinové receptory (RyR) na SR. Pokud je cytozolický  $\text{Ca}^{2+}$  příliš vysoký, mohou se RyR otevřít a spustit  $\text{Ca}^{2+}$  indukované uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  neboli „calcium induced calcium release“ (CICR) ze SR. Spontánní otevírání RyR může vyvolat kontrakci a vést k srdečním arytmiím mechanismem pozdní následné depolarizace (DAD) (Duan, 2010).

Společné působení maladaptivních procesů v dekompenzovaném stádiu LVH může vést k narušení srdeční funkce, arytmiím a srdečnímu selhání. Srdeční selhání je stav, při kterém srdce nedostatečně plní svoji funkci. Tkáně jsou tak nedostatečně zásobovány a vzniká hypoxie. Postižené tkáně spouští signalizace parakrinními, endokrinními i nervovými cestami (Salman, 2015). Srdeční selhání je tedy komplexní stav organismu, který se pojí s vysokou mortalitou. Úmrtí při této multiorgánové dysfunkci může být způsobeno více příčinami (Giordano, 2005).

### 2.1.3 Tlakové přetížení v neonatálním období

Stejně jako u dospělých srdcí dochází následkem tlakového přetížení u fetálních a neonatálních srdcí k ztluštění LK. V této fázi vývoje však ještě nedošlo ke specializaci KM a jejich vystoupení z buněčného cyklu. Srdce tak může reagovat na zvýšenou tlakovou zátěž specifickým způsobem. Mechanismus, který se zde při nárůstu v šířce stěny uplatňuje, je buněčná proliferace, a tedy hyperplastický růst tkáně (Sedmera et al., 2003b). Proto v tomto případě nelze proces ztluštění LK označovat jako hypertrofii. Tento termín popisuje zvětšení tkáně pouze nárůstem objemu buněk (Claycomb, 1977). V neonatálním období je však nárůst v objemu stěny komory způsoben především hyperplazií s jistou mírou hypertrofie (Sedmera et al., 2003b). Proto je pro

ztluštění stěny ve fetálním a neonatálním období vhodnější používat termín kardiomegalie (Ošťádal and Vízek, 2003).

Důležitou podmínkou limitující adaptaci na tlakové přetížení je adekvátní vývoj cév. Pokud tlakové přetížení spustí abnormální buněčnou proliferaci, musí dojít také k akceleraci vývoje koronárního řečiště (Gogiraju et al., 2019). Tento efekt byl popsán u neonatálních potkanů s navozeným tlakovým přetížením AC. U těchto zvířat byl pozorován nárůst ve stěně komory, který byl v dostatečné míře doprovázen nárůstem v koronárním řečišti. Hustota kapilár ve tkáni tak zůstala zachována (Kolář et al., 1998). Podobně tomu bylo u jehňat s provedenou AC, u kterých nebyl zaznamenán pokles ve vaskulární hustotě či koronární rezervě (Flanagan et al., 1991).

Podobně jako u hypertrofie, také u kardiomegalie dochází k nárůstu v počtu non-myocytálních buněk. Při navození tlakového přetížení byl zaznamenán signifikantní rozvoj fibrotické tkáně. Na rozdíl od hypertrofovaného myokardu tak rozvoj kolagenních vláken v ECM myokardu má menší dopad na negativní ovlivnění plasticity komory (Kolář et al., 1998). Tento efekt byl pozorován například ve studii Mohammadi et al. (2019), kde byl u myší s AC provedenou v neonatálním období pozorován menší dopad na čerpací funkci srdce.

Tlakové přetížení je v tomto období sice velice dobře kompenzováno, avšak po překročení limitů, může i zde docházet k maladaptacím (Novotny et al., 2003). Následná dekompenzace může vést například k dilatační kardiomyopatii. Tyto případy jsou v počátečních stádiích spíše výjimečné, ale po překročení kompenzačních limitů může tlakové přetížení navozené u neonatálních srdcí vést k dilataci, srdečnímu selhání a letalitě u starších zvířat (Sedmera et al., 2003b).

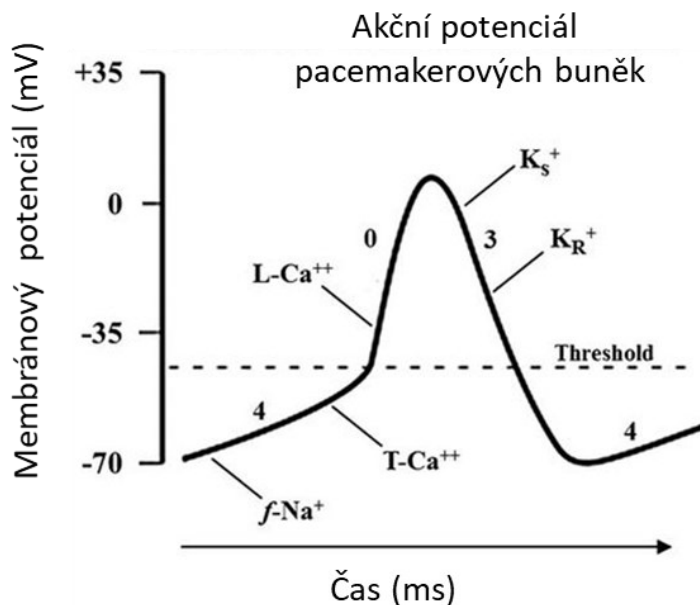


## 2.2 Elektrická aktivita srdce

Správné vedení elektrických vzruchů v srdci má zásadní vliv pro efektivní pumpování krve. K šíření impulzů slouží síť specializovaných KM. Ty tvoří PSS, který udává srdci rytmicitu (Štejfa, 2007). PSS je autonomní struktura, není tedy řízena centrální nervovou soustavou, ale může být vegetativním nervstvem ovlivněna (Čihák, 2016).

### 2.2.1 Srdeční automacie

Automacie srdce je jeho vlastnost samovolně vytvářet vzruchy k vlastní aktivaci. Děje se tak převážně v sinoatriálním uzlu (SA), který obsahuje nodální (nebo také pacemakerové) myocyty. Ty mají v membráně oproti ostatním buňkám výrazně méně  $K^+$  kanálů pro proud  $I_{K1}$  zodpovědný za membránový potenciál. Proto je jejich membránový potenciál nestabilní, pohybuje se okolo  $-65\text{mV}$  a přechází do spontánní depolarizace (Štejfa, 2007).



**Obrázek 2: Průběh AP u pacemakerových buněk.**

Upraveno dle Singh et al. (2016).

Spontánní depolarizace vzniká díky hyperpolarizací aktivovaným cyklickými nukleotidy řízeným kanálům HCN4, které zprostředkují „funny“  $I_f$  proud. Jsou propustné jak pro  $\text{Na}^+$  tak pro  $\text{K}^+$  ionty a aktivují se během repolarizace při hodnotách membránového potenciálu pod  $-40\text{mV}$ . Vtok  $\text{Na}^+$  převáží výtok  $\text{K}^+$  a pozitivní náboj začne pomalu depolarizovat membránu. Zvyšující se

membránový potenciál spustí aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů a naopak uzavření HCN4 kanálů (DiFrancesco, 2006). Pacemakerové buňky obsahují dva druhy  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů: kanály typu T (transient) a kanály typu L (long-lasting). T typ  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu se při počáteční depolarizaci otevírá jako první, proud  $\text{Ca}^{2+}$  pozvolna posouvá membránový potenciál ke kladnějším hodnotám, dokud nedojde k dosažení prahu pro otevření L typu kanálů. Po překročení tohoto prahu (neboli thresholdu) dojde v pacemakerové buňce, díky intenzivnímu proudění  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky, ke vzniku akčního potenciálu (AP). Na vrcholu AP se aktivují draselné kanály a výtok  $\text{K}^{+}$  spouští repolarizaci (Obr. 2) (Jakoi and Carbrey, 2015).

Popsaným mechanismem, s drobnými modifikacemi podle místa vzniku, dochází ke generování impulzu aktivující pracovní myokard (Štejf, 2007).

### 2.2.2 Pacemakery a jejich hierarchie

Za normálních okolností SF udává SA uzel a je tedy tzv. primárním pacemakerem (struktura udávající rytmus). Leží v pravé síni nad úponem trikuspidální chlopně (Obr. 3) a je tvořen třemi typy myocytů: nodálními myocyty, myocyty přechodného typu a myocyty typu Purkyňových vláken. Elektrický impulz vyvolávající systolu vzniká v nodálních myocytech, které mají schopnost se spontánně depolarizovat (Čihák, 2016).

Sekundárním pacemakerem je atrio-ventrikulární (AV) uzel ležící na rozhraní síní a komor pod endotelem síňového septa (Obr. 3). Stejně jako SA uzel obsahuje nodální myocyty, které jsou schopné spontánní depolarizace. Frekvence depolarizací je však nižší než v SA uzlu (Hall and Guyton, 2015). Proto díky tzv. overdrive efektu, který popisuje, že srdci udává rytmus centrum s nejrychlejší frekvencí, se spontánní aktivita AV uzlu za fyziologických podmínek neprojeví. Při patologiích může být funkce SA uzlu narušena. V těchto případech přebírá roli pacemakeru AV uzel, avšak s nižší frekvencí (Vassalle, 1977).

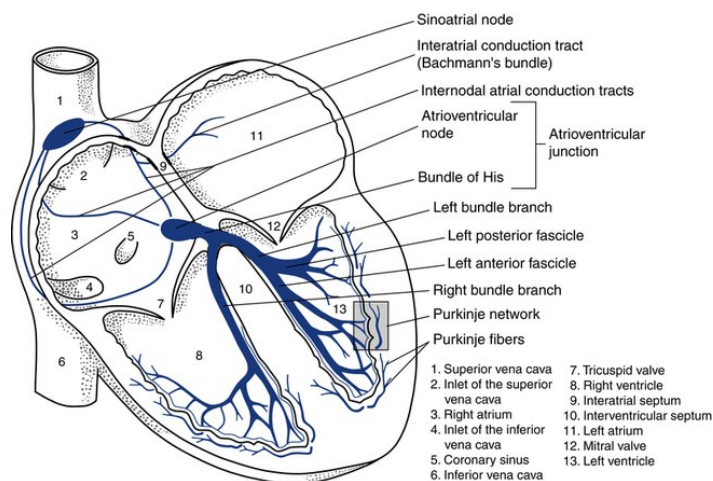
AV uzel není jediná struktura v srdci, která může roli pacemakeru převzít. Buňky v zakončení Purkyňových vláken také mohou depolarizaci spouštět a fungují tedy jako tzv. latentní pacemakery. Tyto pacemakery dle gradientu automacie mají nejnižší frekvenci spontánní depolarizace a projeví se tak pouze v případě, že dojde k narušení funkce u obou hierarchicky nadřazených struktur (Štejf, 2007).

### 2.2.3 Autonomní ovlivnění

Jak bylo zmíněno, srdce vykazuje vlastní automacii, avšak srdeční frekvence (SF) může být modulována vegetativní nervovou soustavou přes sympatická nervová vlákna *nervi cardiaci thoracici* a parasympatická vlákna *rami cardiaci nervi vagi* (Čihák, 2016). Parasympatická nervová zakončení uvolňující acetylcholin působící na buňky přes muskarinový receptor M2. Jeho působení je zprostředkováno spřažením s G-proteinem a uvolnění  $\beta$ - $\gamma$  podjednotky. Výsledný negativně chronotropní efekt (zpomalení SF) je dán otevřením muskarinových  $K^+$  (KAch) kanálů a v menší míře také přímým efektem na proud  $I_f$  (Yamada 2002). Naopak pozitivně chronotropní efekt, tedy zvyšující SF, mají sympatická vlákna uvolňující noradrenalin. Ten přes  $\beta_1$  adrenoreceptor zvyšuje intracelulární koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který otevírá  $Ca^{2+}$  kanály typu L a zvyšuje strmost spontánní depolarizace (Ganong, 2005).

### 2.2.4 Převodní systém srdeční

Elektrický potenciál vznikající v SA se šíří z pacemakerových myocytů na myocyty přechodného typu a následně na myocyty typu Purkyňových vláken. Dále se vlna depolarizace šíří síněmi a aktivuje jejich kontrakci. Skrz síně se impulz šíří patrně internodálními spoji. Avšak jejich existence u různých živočišných druhů je stále předmětem diskuze (Liebman, 1985). Jedná se o preferenční dráhy, kterými se impulz šíří rychlostí asi 1 m/s, tedy rychleji než pracovním myokardem síní. Tyto dráhy se sbíhají v AV uzlu (Obr. 3) (Kafer, 1991).



**Obrázek 3: Schéma PSS**

Upraveno dle Wesley (2016).

AV uzel má významnou úlohu při přechodu signálu ze síní na komory. Vedení vzruchu je v AV uzlu výrazně zpomaleno. Zpomalení je připisováno menšímu průměru KM a jejich uspořádání ve tkáni, jejíž ECM je bohatá na pojivovou tkáň. Dále snížením exprese  $\text{Na}^+$  kanálů a specifické exprese Cx (Temple et al., 2013). Výsledné nodální zdržení trvá asi 0,1 s a má významnou fyziologickou funkci pro srdeční revoluci. Bez zdržení v AV uzlu nedojde ke kompletnímu vypuzení krve ze síní. Sníží se tím end-diastolický objem, a tedy i objem vypuzený z komor neboli tepový objem (Štejfa, 2007).

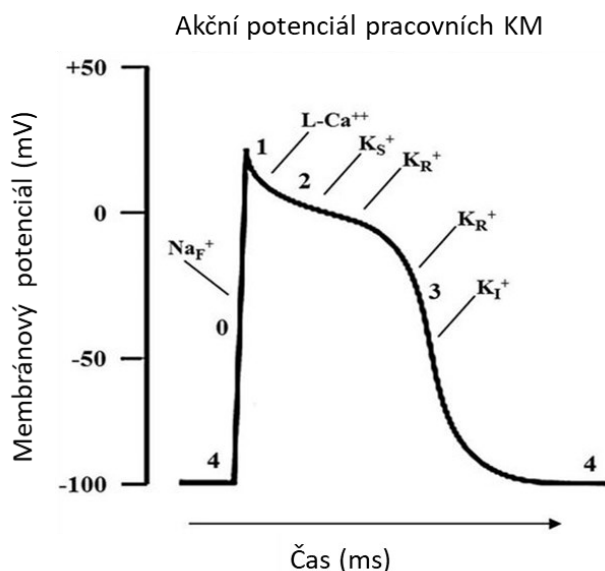
Z AV uzlu se vlna depolarizace šíří na komory přes Hisův svazek. Ten vystupuje z AV uzlu a jako jediná svalová spojka mezi myokardem síní a komor prochází *trigonum fibrosum dextrum*. To je část fibrózního srdečního skeletu, který jinak dokonale izoluje myokard síní od myokardu komor (Grim and Druga, 2016). V interventrikulárním septu se Hisův svazek dělí na pravé a levé Tawarovo raménko. Raménka jsou stejně jako Hisův svazek dobře izolované struktury, které rychle vedou elektrický impuls. Pravé raménko aktivuje pravou komoru (PK), levé raménko LK a interventrikulární septum. Raménka se od sebe morfologicky liší. Tato asymetrie pravděpodobně vznikla kvůli nepoměru komor, a tedy rozdílu v objemu pracovního myokardu, který jednotlivá raménka aktivují (Sedmera and Gourdie, 2014).

Na raménka navazují Purkyňova vlákna. Vytvářejí pod endokardem komor trojrozměrnou síť a napojují PSS na pracovní myokard. K napojení dochází v místě tzv. Purkinje-myocyte junkce (PMJ). Jedno Purkyňovo vlákno může aktivovat 5 000 – 10 000 KM. Spouštějí tak synchronní kontrakci komor (Grim and Druga, 2016). Na druhou stranu, jak Purkyňova vlákna, tak PMJ byla v nedávné době identifikována jako zdroj arytmií u řady patologických stavů a v tomto ohledu jsou předmětem intenzivního studia (Boyden et al., 2016; Haïssaguerre et al., 2002; Scheinman, 2009).

#### 2.2.5 Aktivace pracovního myokardu

Depolarizace se z Purkyňových vláken šíří na pracovního KM. Průběh AP u KM v pracovním myokardu je znázorněn na Obr. 4. Oproti AP PSS vykazuje pracovní myokard klidový membránový potenciál a nedochází u něj ke spontánní depolarizaci. Šíření vzruchu myokardem je založeno na pasivní depolarizaci cytoplazmatické membrány proudem příchozím GJ ze sousedních KM, které jsou již alespoň částečně depolarizovány. Stejně jako u nervů nebo kosterní svaloviny zde iniciují zahájení depolarizace napětově sensitivní  $\text{Na}^+$  kanály. Po otevření napětím ovládaných  $\text{Na}^+$  kanálu dojde k rychlé depolarizaci (označená na Obr. 4 jako fáze „0“) a „vystřelení“ hodnot membránového potenciálu (Ganong, 2005). Selektivní kanál pro  $\text{Na}^+$  má dvojí vrátkování. Uzavřený kanál připravený k aktivaci má uzavřená vnitřní vrátka, ty se při depolarizaci otevírají a propouští ionty přes

membránu. Kanál se inaktivuje při hodnotách membránového potenciálu, které se blíží rovnovážnému napětí pro  $\text{Na}^+$  (Goldin, 2003). Při vzrůstu membránového napětí na 40 mV proto dochází k uzavření vnějších vrátek a jeho inaktivaci. Společně s proudem  $\text{K}^+$  po elektrochemickém gradientu ven z buňky (proud „transient outward“  $I_{\text{to}}$ ) umožňuje dočasnou inaktivaci repolarizace a tím prodloužení trvání AP. Jedná se pravděpodobně o adaptaci na vyšší SF. Počáteční repolarizace je však u pracovních KM pouze částečná a snižuje membránový potenciál na hodnoty okolo 0 mV (označena na Obr. 4 jako fáze „1“). Při těchto hodnotách membránového potenciálu nastávají optimální podmínky pro proud  $\text{Ca}^{2+}$  (Štejf, 2007). Za povšimnutí stojí fakt, že u řady laboratorních zvířat, jako potkan či myš, chybějící  $I_{\text{to}}$  zkracuje délku AP (Varró et al., 1993).



**Obrázek 4: Průběh AP u pracovního KM.**

Upraveno dle Singh et al. (2016).

Vápníkové kanály se otevírají při hodnotách okolo -40 mV během depolarizace. Mají dvojitý vrátkování stejně jako  $\text{Na}^+$  kanály, ale výrazně pomalejší kinetiku. Jejich molekulární struktura je velice komplikovaná. Krom otevírání a zavírání kanálu dle změn v napětí jsou tyto kanály regulovány také autonomními nervy (Dolphin, 2018). Například adrenergní signalizace spouštěná přes cAMP, tím se aktivuje proteinkináza A (PKA). PKA pomocí naváděcího proteinu „A-kinase anchoring protein“ fosforyluje threonin a serin na C-terminální části proteinu. Tímto mechanismem se zvýší pravděpodobnost výskytu proteinu v otevřené konformaci (Kamp and Hell, 2000).

Pomalá kinetika  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů je základem pro tzv. plató fázi (vyznačena na Obr. 4 jako „2“). Při této fázi je zachováno poměrně konstantní membránové napětí mezi 0 až -20 mV. Vtok iontů nejen udržuje membránové napětí, ale také zvyšuje hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazmě (Feher, 2012). Zvýšením intracelulární koncentrace se spouští CICR. Díky následnému výraznému zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  dojde ke kontrakci svalové buňky. Dochází tedy k excitaci spřažené s kontrakcí, při níž je intenzita svalové kontrakce výrazně ovlivněna intracelulární koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  (Kho et al., 2012). Délka plato fáze tak přímo ovlivňuje velikost kontrakce. Za patologické situace, kdy je třeba energii ke kontrakci šetřit, např. v ischemii, dochází k aktivaci speciálního typu  $\text{K}^+$  kanálu, tzv.  $\text{K}_{\text{ATP}}$  kanálu, který zkrátí délku repolarizace (Noma, 1983).

Vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů přes  $\text{Ca}^{2+}$  kanály L typu do buňky vyrovnává pomalý výtok  $\text{K}^+$  iontů do extracelulárního prostoru. Po přibližně 200-400 ms se začnou  $\text{Ca}^{2+}$  kanály inaktivovat. Proud  $\text{K}^+$  z buňky začne převažovat a výrazně se zrychlí díky otevření dalších repolarizačních kanálů. Díky úbytku kladných  $\text{K}^+$  iontů dojde k repolarizaci buňky (viz. Obr. 4, fáze „2,3“) (Feher, 2012).

#### 2.2.6 Gap junction

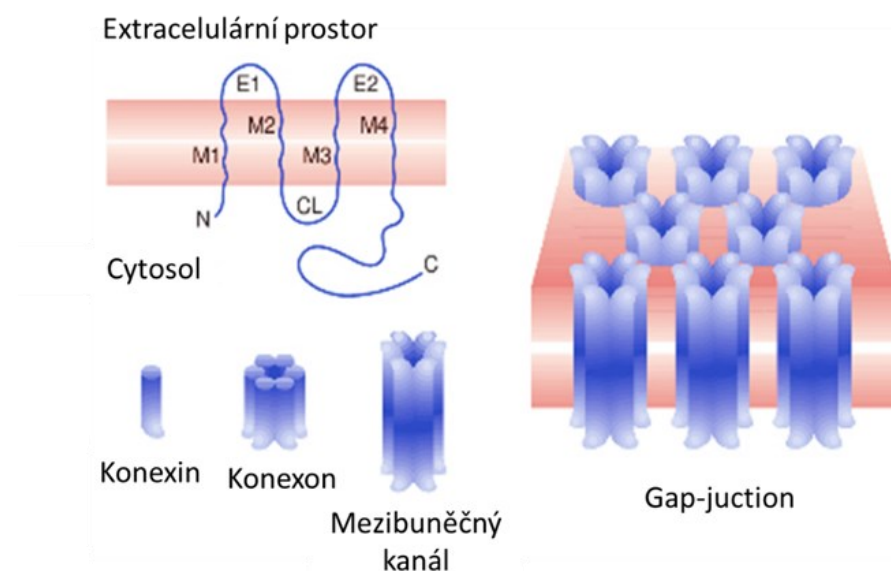
Jak bylo uvedeno výše, pro vzniku depolarizace v pracovním KM je klíčový přenos iontů ze sousední buňky depolarizující membránový potenciál do hodnot, kdy dojde k aktivaci  $\text{Na}^+$ . K tomu v srdeční svalovině slouží elektrické propojení sousedních buněk v oblasti interkalárních disků. Toto eklektické spojení umožňuje plynulé šíření vzruchu pracovním myokardem a srdeční sval je také proto označován jako funkční syncytium. Pro přenos depolarizace jsou významné především spoje typu GJ tvořené konexony (Kwak and Jongsma, 1996). Konexony jsou kanály vznikající oligomerací šesti podjednotek.

Tyto podjednotky se nazývají Cx. Každý Cx má čtyři transmembránové podjednotky, dvě extracelulární smyčky a jednu smyčku intracelulární. Směrem do cytosolu jsou také orientovány oba proteinové konce (Delmar et al., 2018). Konexony na plazmatických membránách sousedních buněk se propojují a tvoří tak kanál, který umožňuje průchod malým molekulám (Obr. 5). Volně tak mohou procházet například ionty, metabolity, cAMP a další signální molekuly (Ganong, 2005). Buněčná komunikace přes GJ je tedy krom šíření depolarizační vlny také důležitá pro mezibuněčnou signalizaci.

U lidí je známo 21 různých Cx. Jsou přítomny skoro ve všech buňkách a mají různé role. Jsou důležité pro udržení funkce tkání nebo vývoj orgánu. Jejich dysfunkce tak může způsobovat závažné patologie (Oyamada et al., 2005). Jednotlivé Cx se označují čísly dle své molekulové hmotnosti,

například Cx43 má hmotnost 43 kD. Další možností jejich dělení je dle sekvence proteinu a délky celulórní smyčky. Cx se podle těchto parametrů dělí do pěti skupin označených písmeny řecké abecedy. Toto dělení zamezuje nepřesnostem v označování, kdy homologní Cx mají u různých druhů různá jména (Nielsen et al., 2012).

V srdci je exprimováno více izoform Cx, u lidí jsou to převážně Cx40, Cx43 a Cx45. Jejich exprese závisí na typu srdečních buněk a liší se u různých živočišných druhů (Verheule and Kaese, 2013). Například u myši se v srdci exprimuje navíc pomalu vedoucí myši Cx30,2 přítomný v PSS, kde podporuje zdržení v AV uzlu (Kreuzberg et al., 2006). U ptáků byla prokázána přítomnost Cx42 v komorových strukturách PSS, která má funkci savčího analogu Cx40 (Gourdie et al., 1993).



**Obrázek 5: Znáznění struktury Cx, jejich skládání do konexonů, vznik mezibuněčných kanálů a GJ**

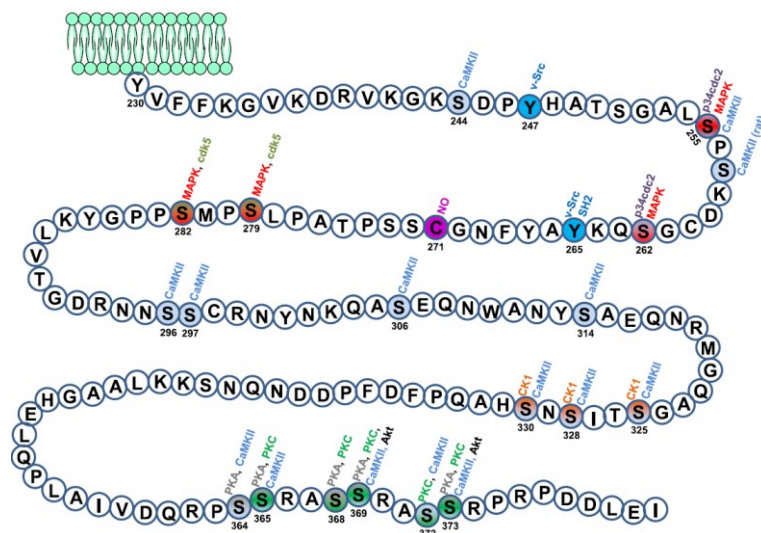
Ve struktuře proteinu E1-E2 značí extracelulární smyčky. M1-M4 transmembránové domény. CL intercelulární smyčku. N a C intracelulárně orientované konce proteinu. Převzato z Kidder and Mhawi, (2002).

Exprese je různá také v ontogenezi, například pomalu vedoucí Cx45 se vyskytuje v srdci velmi hojně při vývoji. S postupujícím vývojem je však jeho exprese snižována a v pracovním myokardu komor se následně vykytuje poměrně zřídka. V dospělosti je typický hlavně pro GJ buněk SA a AV uzlu (Yamada et al., 2003). Podobně je ve vývoji potlačena exprese Cx40 v komorách. U dospělců je tak jeho výskyt omezen na myokard síní, AV uzlu a převodní systém komor (Miquerol et al., 2003). Naopak je to mu Cx43, který je u vyzrálého savčího a ptačího myokardu typický především pro



pracovní KM komor (Jansen et al., 2010). Deregulace exprese jednotlivých forem Cx je spojována jak se změnami ve vývoji srdce, kdy např. studie s Cx40 haploinsuficientními myši ukázaly vliv na vývoj jak PSS, konkrétně pravého Tawarova raménka, tak vedení v oblasti síní (Benes et al., 2014; Sankova et al., 2012). Je zřejmé, že správná časoprostorová exprese Cx je důležitá pro normální vývoj srdce a její narušení je spojováno s rozvojem řady pro-arytmogenních stavů (Delmar and Makita, 2012).

Cx mohou být regulovány na mnoha úrovních. Krom přímého ovlivnění exprese pomocí transkripčních faktorů, hraje významnou roli také epigenetická regulace. Regulace tak probíhá od transkripce, přes kotranslační vložení proteinu do endoplazmatického retikula a transfer k plazmatické membráně, až po jejich degradaci. Značný vliv na funkci má také ovlivnění tzv. gatingu, tedy otevřeného či zavřeného stavu kanálu (Lampe and Lau, 2000).





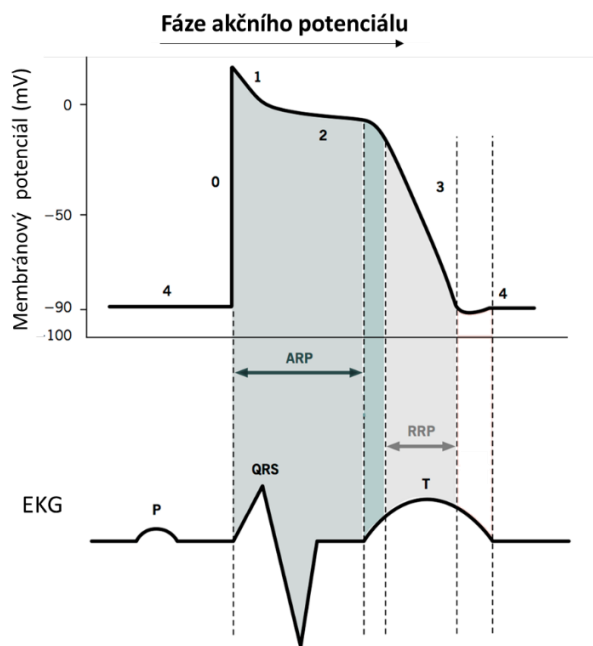
Fosforylované formy Cx mohou přispívat ke snížení mezibuněčného odporu, a tedy k rychlejší propagaci signálu funkčním syncitiem myokardu. Nebo mohou naopak propagaci signálu srdcem zpomalovat. Zda bude fosforylace přispívat ke zpomalení či zrychlení závisí na mnoha faktorech (Jabr et al., 2016). Jedním z těchto faktorů je například typ proteinkinázy, který se fosforylace účastní (Kwak and Jongsma, 1996). Dále výsledek fosforylace určuje specifické místo fosforylace u konkrétního Cx. Například u Cx43 je na C-terminální části přítomných 21 míst, které mohou být fosforylovány (Obr. 6) (Pogoda et al., 2016).

Tyto rozdílné výsledky naznačují ještě vyšší komplexitu působení fosforylace, kdy se na výsledku může navíc projevit buněčný typ a prostředí ve kterém se buňky nachází nebo například změny v metabolismu a mnoho dalších faktorů (Pogoda et al., 2016). Fosforylační post-translační změny se mohou také ovlivňovat navzájem. Příkladem takového ovlivnění je nutnost defosforylase S365, aby mohlo při ischemii myokardu dojít k fosforylaci S368 PKC-  $\epsilon$  (Jabr et al., 2016).

#### 2.2.7 Refrakternita myokardu

Aby byl zajištěn jednosměrný, a plynulý průchod aktivace myokardem, nachází se v průběhu AP doba, kdy není možné tuto část srdce depolarizovat vůbec či jen za speciálních podmínek. Tzv. refrakterní perioda se dělí na dvě části: absolutní a relativní refrakterní periodu (viz. obr 7) (Carlson, 1907). Při absolutní refrakterní periodě (ARP) nelze vyvolat novou depolarizaci membrány žádným vzruchem. Oproti tomu při relativní refrakterní periodě je možné depolarizaci vyvolat. Pro spuštění depolarizace je však potřeba velmi silný (nadprahový) stimul (Štejf, 2007).

Refrakterita membrány chrání srdce před předčasnou aktivací. Ta by mohla vést k arytmickým nebo tetanickým stahům, který je neslučitelný s čerpací funkcí srdce. Podklad pro refrakteritu vychází z faktu, že při repolarizaci zároveň dochází k přechodu  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu ze zavřeného inaktivovaného stavu do stavu zavřených kanálů připravených k aktivaci. Inaktivní stav kanálů, které mají zavřená vnější vrátka a nemohou tak být aktivovány, je zodpovědný za dočasnou refrakteritu buňky (Feher, 2012). Proto jsou kanály spojeny s touto periodou klinicky významné (Štejf, 2007). Změny v kanálech řídících ARP se pojí například s atriálními fibrilacemi. Zkrácení ARP je při nich hlavní změna v elektrofyziologické remodelaci. Je proto cílem farmakologických přístupů, které na ně cílí antiarytmické léky (Yu et al., 1998).



**Obrázek 7: Schéma AP s vyznačenou ARP a relativní refrakterní periodou označenou jako RRP společně s EKG křivkou.**

Upraveno dle "Refractory periods in cardiac cycle | McMaster Pathophysiology Review, 2021"

## 2.3 Poruchy srdečního rytmu

Arytmie jsou definovány jako poruchy tvorby nebo přenosu vzruchu v srdci (Štefja, 2007). Ve většině případů vznikají kvůli abnormální pacemakerové aktivitě, poruše ve vedení elektrického vzruchu nebo kombinací obou (Shu et al., 2009). Arytmie mohou být různě závažné. Od zcela fyziologické respirační sinusové arytmie, při které SF kolísá v závislosti na dýchání, přes závažnější poruchy srdečního rytmu bez klinických příznaků (ojedinělé komorové extrasystoly), až po arytmie s klinickými projevy, které mohou představovat závažný problém s významnými zdravotními a ekonomickými důsledky (Badrawi et al., 2009).

### 2.3.1 Dělení arytmíí

Arytmie je možné dělit podle různých faktorů. Jedním ze základních dělení je dle toho, zda se srdeční rytmus zpomaluje či zrychluje. Pokud dojde ke zpomalení SF pod 60 úderů za minutu (BPM), je tento jev označován jako bradykardie. Naopak při zrychlení nad 100 BPM, nastává tachykardie (Hall and Guyton, 2015).

Mezi tachykardie se řadí také flutter a fibrilace. Flutter síní se vyznačuje pravidelnými velmi rychlými stahy síní dosahujícími hodnot 300-500 kontrakcí za minutu. Díky refraktilitě v AV uzlu se

na komory nepřenáší všechny kontrakce, ale pouze část. To představuje ochranu adekvátní čerpací funkce komor (Srinivasan and Strasburger, 2008). Fibrilace jsou nepravidelné stahy jednotlivých svalových vláken, či jejich skupin. Při fibrilaci nedochází ke koordinované kontrakci. Pokud nastane fibrilace síní, může krev pasivně procházet skrz síně do komor. Dojde ke snížení efektivity srdeční funkce až o 30 %, přesto je tento stav slučitelný se životem. Fibrilace komor je mnohem závažnější stav, při kterém srdce přestane úplně plnit svou čerpací funkci (Hall and Guyton, 2015).

Dále je možné arytmie dělit dle místa vzniku. Rozlišují se tak arytmie sinusové (vznikající v SA) supraventrikulární a komorové. Supraventrikulární arytmie vznikají v oblastech nad komorami, konkrétněji nad bifurkací Hisova svazku. Vznikají tedy například v myokardu síní, AV junkci, v oblastech dutých žil či plicních vén. Patří sem také aktivace pomocí abnormálních AV spojek, které vedou mimo AV junkci. Komorové arytmie představují závažný problém u patologicky změněného myokardu (Srinivasan and Balaji, 2019).

Obě zmíněná dělení jsou spíše klinická. Pro vědecké účely je vhodnější rozčlenit arytmie podle mechanismů jejich vzniku. Tímto dělením se budu podrobněji zabývat v následujících kapitolách.

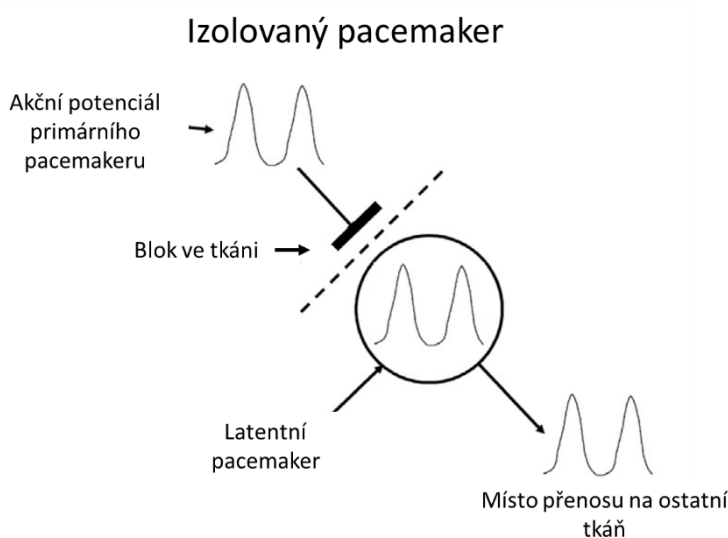
### 2.3.2 Arytmogenní substrát

#### 2.3.2.1 *Potencovaná a ektopická aktivita*

Zvýšená aktivita SA může být dána fyziologickými podněty, jako je zvýšení  $\beta$ -adrenergní stimulace nebo snížením vagového ovlivnění SA. Ten má u lidí svou vnitřní aktivitu nastavenou na hodnoty okolo 100 depolarizací za minutu, je však parasymptikem trvale tlumen. Snížení vagového tonu má za následek vyšší SF (Štejf, 2007). Za patologických podmínek mohou sinusové tachykardie vznikat kvůli hypovolemii, ischemii či změnám v koncentracích elektrolytů. Ke zvýšené aktivitě mohou vést tři hlavní mechanismy. Jedná se o negativní posun hodnoty prahového potenciálu, pozitivní posun maximálního diastolického potenciálu či zvýšená frekvence fáze 4 depolarizace (Tse, 2016).

Spontánní depolarizace mohou také pocházet z AV uzlu, pokud jejich frekvence převyší frekvenci pocházející z SA. Při stavech jako je infarkt myokardu nebo pooperační stavy může docházet k zvýšení frekvence depolarizací v AV uzlu (de Azevedo et al., 1973). Může tedy dojít i k situaci, kdy se impuls šíří na síně z AV uzlu. Jako například při sinusové zástavě, kdy následně dochází k retrográdnímu šíření impulzů (Barold et al., 2012)

Při fyziologických podmínkách dochází při šíření depolarizace k potlačení aktivity latentních pacemakerů a projeví se pouze ten nejrychlejší. Pokud ve tkáni vznikne blok, který chrání latentní pacemaker, může se i on uplatnit jako zdroje ektopické aktivace (Obr. 8) (Tse, 2016). V případě, že blok vzniká neúplný, nedochází ke kompletní blokádě latentního pacemakeru a je ovlivněn frekvencí primárního pacemakeru. Jestliže elektrické ovlivnění přichází v časných fázích, je vybití ektopického pacemakeru zpožděno. Pokud je tomu naopak, dojde ke zrychlení jeho vybití (Antzelevitch and Burashnikov, 2011).



**Obrázek 8: Schéma ektopické aktivace.**

Upraveno z Tse (2016).

Zdrojem arytmií mohou být také Purkyňova vlákna. Vzhledem k jejich nízké hodnotě spontánní frekvence (Tse, 2016), se jako zdroj arytmií v neremodelované tkáni uplatňují jen zřídka (Haissaguerre et al., 2016). Naproti tomu, u patologicky změněného myokardu jsou arytmie častěji asociovány s Purkyňovými vlákny (Boyden et al., 2016; Logantha et al., 2021) Přestože mechanismus vzniku není zcela objasněn, předpokládá se podíl  $I_f$  a specifického buněčného cyklu  $Ca^{2+}$  na potencované aktivitě Purkyňových vláken (Boyden et al., 2010; Haissaguerre et al., 2016).

#### 2.3.2.2 Spouštěná aktivita

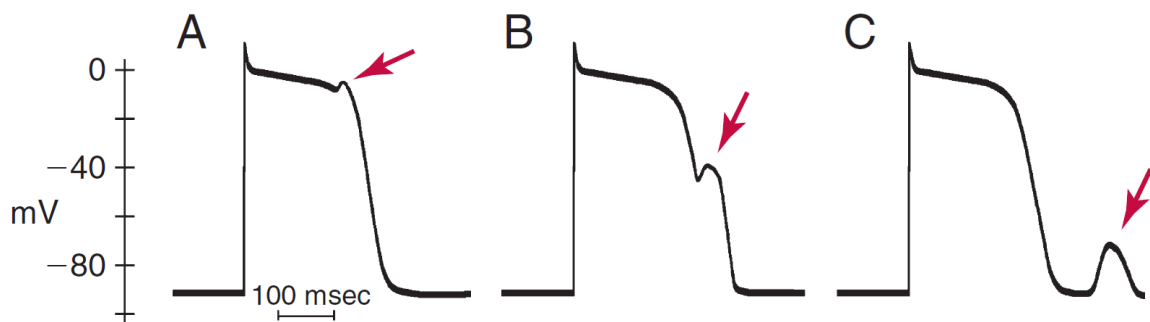
Dalším mechanismem arytmií je spouštěná aktivita. Tyto arytmie se vyznačují předčasnou depolarizací vznikající mimo pacemaker. Od abnormální tvorby srdečního potenciálu se liší v tom, že jsou závislé na předešlém AP a nikdy nevznikají *de novo* (Issa, 2018). Všeobecně jsou rozeznávány dvě formy spouštěné aktivity, které se dělí podle toho, v jaké fázi AP vznikají. Jednou z těchto forem

je časná následná depolarizace (EAD), druhou formou je DAD. Pokud dojde k výskytu těchto depolarizací a jsou dostatečně silné pro překonání prahové hodnoty, vznikají extrasystoly. Ty mohou být ojedinělé nebo součástí tachyarytmií (Antzelevitch and Burashnikov, 2011).

#### 2.3.2.2.1 Časná následná depolarizace

Při EAD vzniká předčasná depolarizace ve fázi 2 nebo 3 AP (Obr. 9). Většinou vznikají při prodloužení délky trvání AP, které se klinicky manifestuje jako prodloužení QT či QTc (tedy korigovaného intervalu na SF) na EKG záznamu (Issa, 2018). Vznikají při narušení intenzity iontových proudů zodpovědných za zmíněné fáze AP. Jedná se zejména o zvýšenou intenzitu proud  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  proudu či  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníku nebo snížení intenzity repolarizujících proudů (Tse, 2016).

Vznik EAD je často spojen s poškozenou srdeční tkání, ve které dochází k narušení rovnováhy elektrolytů, katecholaminů nebo acidóze. Dalšími faktory zvyšujícími náchylnost tkáně ke vzniku EAD jsou hypoxie či komorová hypertrofie (Antzelevitch and Burashnikov, 2011). Podobně byly EAD popsány při srdečním selhání. Např. Nuss et al., 1999 pozoroval prodloužené trvání AP a zvýšený výskyt EAD oproti kontrolní skupině u izolovaných KM psů s navozeným srdečním selháním.



**Obrázek 9: Schéma vzniku spouštěné aktivity během různých fází AP.**

Vznik EAD je zobrazen na obrázcích vlevo a uprostřed (A, B). DAD po vznikající po repolarizaci je zobrazeno vpravo (C). Upraveno z Issa (2018).

#### 2.3.2.2.2 Pozdní následná depolarizace

DAD jsou oscilace v membránovém potenciálu, které se projeví až po dokončení repolarizace předešlého AP (ve fázi 4 AP; Obr. 9). Ve většině případů jsou spouštěny zvýšenou koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě. Přesto, že navýšení  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrace nemusí být samo o sobě dostatečné pro spuštění depolarizace, může vést k otevření RYR2 kanálů na SR. To následně může spustit CICR a zahájení kontrakce (Issa, 2018). DAD mohou vznikat po působení srdečních glykosidů, jako je například digitoxin, či po vystavení tkáně nadměrným koncentracím katecholaminů (Antzelevitch and

Burashnikov, 2011). Mechanismem DAD mohou vznikat arytmie i v Purkyňových vláknech. Oscilace  $Ca^{2+}$  spojené se vznikem arytmií byly popsány u psiho srdce po okluzi koronární artérie (Boyden, 2003; Lazzara et al., 1973).

### 2.3.2.3 *Narušení šíření vzruchu*

Pro správnou srdeční funkci je klíčové rychlé a koordinované šíření AP. Za fyziologických podmínek dochází pouze anterográdního vedení signálu (Hall and Guyton, 2015). Pokud dojde k narušení tohoto mechanismu a v myokardu jsou přítomny oblasti nacházející se v různých fázích AP, může dojít situaci, kdy vlna depolarizace re-excituje oblast již dříve aktivovanou. Následně vzniká spontánně se udržující smyčka (Obr. 10) (Antzelevitch and Burashnikov, 2011).

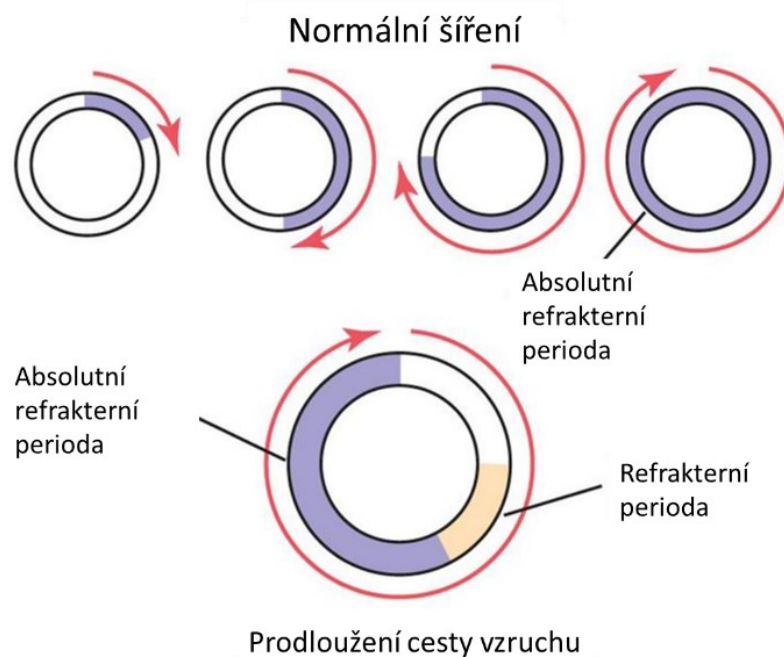
Prvními pokusy vedoucí k popisu mechanismu re-entry provedl již Mayer (1906) na začátku minulého století. Při nich použil pro výzkum muskulární disk medúzy, u něhož sledoval změny v kontrakcích. Avšak první, kdo spojil koncept cirkulujícího signálu se vznikem srdečních arytmií, byl Mines (1913). Ten také definoval tři pravidla pro identifikaci cirkulujících re-entry arytmií, které jsou používány dodnes.

Tyto pravidla jsou:

- 1 – přítomnost jednosměrné blokády šíření vzruchu ve tkáni
- 2 – vlna excitace musí postupovat určitou oblastí myokardu, vrátit se na začátek svého původu a následně znovu pokračovat stejnou cestou jako původní vlna
- 3 – Pokud je signál v jakékoliv části cesty přerušen, mělo by toto přerušování ukončit krouživý vzruch

Blokáda, okolo které dochází ke kroužení depolarizační vlny, může pocházet buď z anatomických či funkčních změn ve tkáni. Funkčních re-entry vzniká nejčastěji na základě rozdílu refrakterních period v myokardu (Tse, 2016). Anatomickou příčinu většinou představuje nevodivá část myokardu, např. jizva po infarktu myokardu či fibrotizovaná tkáň (de Bakker et al., 1988).

Zda po vzniku blokády dojde k cirkulující re-entry závisí na délce cesty, rychlosti šíření AP a době trvání ARP. Případný okruh musí být dostatečně dlouhý, aby v jeho průběhu došlo k dostatečnému zdržení vlny depolarizace a u KM na jeho počátku došlo k překlenutí ARP. Následně může dojít k re-excitaci KM (Shu et al., 2009). Při celkovém či ložiskovém zpomalení rychlosti šíření vzruchu (např. u změn v expresi a funkci Cx43) či zvětšení velikosti srdce (u hypertrofovaného či dilatovaného myokardu) se pravděpodobnost vzniku re-entry zvyšuje (Hall and Guyton, 2015). Klinicky významný je i fakt, že součástí re-entry okruhu mohou být také Purkyňova vlákna (Boyden et al., 2010; Haissaguerre et al., 2016).



**Obrázek 10: Schéma vzniku cirkulující re-entry arytmie při prodloužení cesty okruhu.**  
Upraveno z Hall a Guyton (2015).

## 2.4 Fetální a neonatální programování

Krom „okamžitých“ efektů, které mohou být po indukci tlakového přetížení znatelné na fenotypu, může tlakové přetížení indukovat změny v epigenetické informaci, které přetrvávají do dospělosti a projeví se až po delším časovém úseku. Tento jev popisuje Barkerův koncept fetálního a neonatálního programování (Netuka et al., 2006). Barker (2000) ve své práci popisuje rozvoj patologií, které mají původ v perinatálním období, ale projeví se až u dospělých. Na několika případech vysvětluje fetální programování jako proces, při kterém má stimul nebo poškození orgánu v kritické periodě vývoje orgánu významný doživotní efekt. Kritická perioda se může shodovat s fázemi intenzivní proliferace a u jednotlivých orgánů se liší.

Proces perinatálního programování byl již několikrát popsán také u kardiovaskulárního systému. Například Li et al. (2003) ve své práci popsal efekt prenatální hypoxie na náchylnost tkáně k ischemicko-reperfuznímu poškození. Šestiměsíční samci, kteří byli v intrauterinním stádiu vývoje vystaveni chronické hypoxii, vykazovali po indukované ischemii větší plochu postižené tkáně a sníženou schopnost obnovy funkce LK než kontroly. Naopak Netuka et al. (2006) popsal vystavení potkaních samic perinatální hypoxii jako kardioprotektivní. Protichůdné výsledky těchto studií jsou připisovány pohlavním rozdíly.



### 3 Cíle práce

Jak již bylo zmíněno, neonatální srdce vykazují výhodnější odpověď na hemodynamické přetížení, než je tomu v případě dospělých jedinců. Cílem této práce bylo zjistit, zda u dospělých potkanů bude rozvoj pro-arytmogenního substrátu vznikajícího v důsledku hemodynamického přetížení modulován proliferativní fází růstu KM. Za tímto účelem jsme stanovili dílčí cíle práce:

- Zjistit, zda se budou v dospělém srdci vystavenému hemodynamickému přetížení od neonatálního období vyskytovat spontánní arytmie
- Posoudit, nakolik přispívá remodelace Cx43 a fibrózy k rozvoji pro-arytmogenního fenotypu na tomto modelu tlakového přetížení
- Analyzovat, zda zvýšená hemodynamická zátěž v neonatálním období bude mít vliv na velikost Purkyňových vláken u dospělých srdcí

## 4 Experimentální část

### 4.1 Metodika

#### 4.1.1 Experimentální model

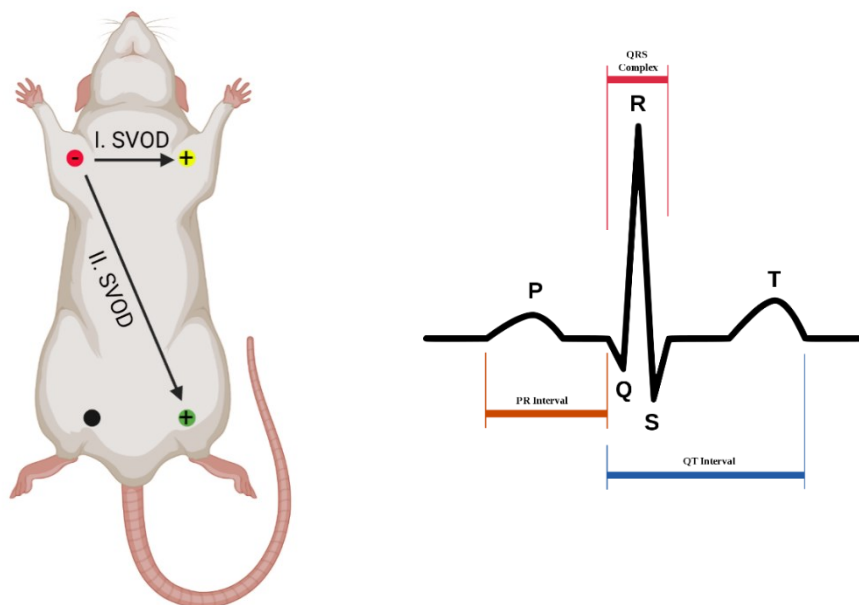
Pro studii byli použiti potkaní samci kmene Wistar. Za provedení všech operací děkují pracovníci Fyziologického ústavu AVČR paní Milaně Peškové. Tlakové přetížení bylo u zvířat navozeno transversální konstrikcí aorty (AC) 2. postnatální den. Zvíře bylo uvedeno do celkové anestézie pomocí inhalace etherových par. Tento typ anestézie byl použit vzhledem k tomu, že u jiných typů inhalačních anestetik byl prokázán možný negativní vliv na nezralý mozek (Olney et al., 2002). Po ztrátě reakce na bolestivý podnět bylo zvíře umístěno do pronační polohy a připraveno operačního pole v levé lumbální oblasti. Následně byl proveden malý řez, kterým se z levé dorzolaterální strany odkryl abdominální úsek aorty. V subdiafragmatické suprarenální části aorty se provedla konstrikce nevstřebatelným šicím materiálem (Ethilon 6/0) na průměr 0,25 mm. Požadovaného průměru konstrikce bylo dosaženo pomocí dočasného přiložení jehly o daném průměru k aortě. Takto je možné zajistit reprodukovatelnost metody. Operační rána byla zavřena ve dvou vrstvách vstřebatelným šicím materiálem (Chirlac 6/0) a ošetřena standartním způsobem. Postupným růstem aorty došlo k dalšímu navýšení tlakového přetížení. U kontrolních zvířat byla provedena operace se stejným postupem, až na konečné utažení konstrikce. Finální analýzy proběhly ve věku 12 týdnů od operace. První série zvířat byla alokována pro EKG měření a analýzu proteinů metodou Western blot, druhá pro histologické a imunochemické analýzy.

#### 4.1.2 Měření a analýza EKG

Zvířata byla uvedena do hluboké anestézie (pentobarbital i.p., 60 mg/kg; Sigma-Aldrich). Následně byla po ztrátě reakce na bolestivý podnět umístěna na vyhřívanou podložku a polohována do supinační polohy. Průchodnost dýchacích cest byla zajištěna povytažením jazyka. Vnitřní teplota zvířat byla po celou dobu monitorována a udržována v rozmezí 37,5 - 38°C. Po celou dobu měření byla sledována hloubka anestézie a saturace kyslíkem (posouzením barvy sliznic).

Pomocí 23-G jehel upevněných do pozic odpovídajíc I. a II. svodu v humánní medicíně (pravá přední končetina negativní pro I. i II. svod, pozitivní elektroda pro I. svod umístěna na levé přední končetině a pro II. svod na levé zadní končetině; uzemnění na pravé zadní končetině; barevné kódování označeno na Obr. 11 vlevo. EKG bylo zaznamenáno po dobu 5 minut. Záznam byl digitalizován pomocí systému PowerLab (ADInstruments) a vyhodnocen v programu LabChart. V EKG záznamu byly analyzovány následující parametry: délka trvání vlny P; PR interval; délka trvání

QRS komplexu; QT interval a korigovaný QT interval na SF - QTc (korigováno dle Bazzeta). Měřené parametry jsou vyznačeny na Obr. 11 (vpravo). Arytmie byly vyhodnoceny podle Lambetha (Curtis et al., 2013).



**Obrázek 11: Schéma snímání EKG (vlevo) se znázorněnou pozicí elektrod spolu s barevným kódováním a EKG křivka (vpravo) se zakreslenými časy a intervaly, které byly měřeny.**

Vytvořeno pomocí programu BioRender, resp. upraveno dle "Elektrokardiogram,2021"

Po ukončení měření byli potkani usmrceni (detailněji popsáno níže), srdce odebráno a využito pro analýzu proteinů metodou Western blot.

#### 4.1.3 Odběr tkáně a fixace

Zvířata byla uvedena do celkové anestézie (pentobarbital i.p., 60 mg/kg; Sigma-Aldrich) a po ztrátě reakce na bolestivý podnět usmrcena cervikální dislokací. Následně bylo srdce vystřiženo z hrudníku a propláchnuto chladným fyziologickým roztokem. U vzorků určených pro detekci proteinů bylo srdce rozděleno na PK, LK a septum. Jednotlivé srdeční oddíly byly zváženy a zmraženy v kapalném dusíku, kde byly uchovány do dalšího zpracování. U srdcí pro histologické analýzy byla dutina LK otevřena a vyfocena pro analýzu zvětšení Purkyňových vláken (Obr. 26). Následně byla odebraná srdce rozdělena na tři části v horizontální rovině. Na bazální část, střední část a apex. Po odebrání a rozdělení proběhlo fixování tkáně 24 h ve 4% roztoku paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (PBS). Poté byly vzorky přendány do čistého PBS. V tomto médiu byly uchovány při 4 °C do dalšího zpracování.

#### 4.1.4 Western blot

##### 4.1.4.1 Homogenizace tkáně

Myokard LK byl homogenizován v třecí misce s tloučkem pod kapalným dusíkem. K rozdrčené tkáni byl přidán homogenizační pufr v poměru 8 ml pufru na 1 g srdeční tkáně. Složení homogenizačního pufru bylo: 12,5 mM Tris-HCl (pH 7,4), 250 mM sacharóza, 2,5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 0,3 mM fenylmethylsulfonylfluorid, 6 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 10 mM glycerol-2-fosfát, 0,2 mM leupeptin, 0,02 mM aprotinin a 0,1 mM ortovanadát sodný. Následně byla tkáň homogenizována pomocí Potter-Elvehjemova homogenizátoru za současného chlazení v ledové tříšti 15 tahy nahoru a dolů během 1 min. Koncentrace proteinů v homogenátech byly analyzovány metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976).

##### 4.1.4.2 Elektroforéza a vlastní Western blot

Elektroforéza probíhala v prostředí dodecylsulfátu sodného na 10% bisakrylamidových gelech v elektroforetické soustavě Mini-Protean III apparatus (Bio-Rad, Hercules) při 25 mA/gel po dobu 120 min. Nanášky proteinů se pro Cx43 a p-Cx43<sup>S368</sup> lišily. Pro analýzu Cx43 byly 20  $\mu$ g, kdežto u p-Cx43<sup>S368</sup> byly nanášky 40  $\mu$ g. Jako standard molekulových hmotností byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Biorad, 1610374). Po skončení elektroforézy byl proveden elektropřenos proteinů na membránu. Byly použity membrány PVDF, které byly předem 5 minut aktivovány v methanolu. Vlastní blotování probíhalo 1 h při napětí 350 mA. Pro kontrolu správného přenosu proteinů byly membrány na 10 s ponořeny do roztoku Ponceau S. Po obarvení byla membrána promyta v pufrovaném roztoku: NaCl: 0,1 M Tris, 2,5 M NaCl, 0,5 % (v/v) Tween 20; pH 7,5 (TTBS).

Pro imunodetekci byly nejprve membrány blokovány v roztoku 5% nízkotučného mléka v TTBS po dobu 60 min. Následovala inkubace s primární králičí polyklonální protilátkou anti-Cx43 (Sigma-Aldrich, C6219) ředěnou 1:8000 v TTBS, respektive králičí polyklonální protilátkou anti-Phospho-Connexin43 Ser368 (Cell Signaling, #3511S) ředěnou 1:1000 v TTBS. Inkubace s primární protilátkou anti-Cx43 probíhala 1,5 h při pokojové teplotě. S protilátkou anti-Phospho-Connexin43 byla membrána inkubována přes noc při 4 °C na rotátoru. Jako sekundární protilátka byla v obou případech použita protilátka Goat-anti-Rabbit (Bio-Rad, 170-6515). Tato protilátka byla ředěna 1:10000 v TTBS a inkubace probíhala 1 h při pokojové teplotě. Následně byly membrány důkladně propláchnuty v TTBS a vizualizovány.

#### 4.1.5 Histologické a imunochemické analýzy

Odebrané a nafixované vzorky byly odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou, projasněny benzenem a prosyceny rozehrátým paraplastem. Poté byly pomocí parafínové zalévací linky (Medite, TES 99) zality do bločku a takto zpevněné nakrájeny na rotačním mikrotomu (Leica, RM 2135) na 8 µm řezy. Od každého vzorku bylo vytvořeno 5 sérií obsahujících 5 skel po dvou řezech. Po důkladném zaschnutí byly řezy odparafinovány pomocí roztoku Bioclear (Bio-Optica, 06-1782Q) a opět rehydratovány sestupnou alkoholovou řadou. Následně byla tkáň na vybraných sklech obarvena dle individuálních protokolů.

##### 4.1.5.1 Velikost kardiomyocytů

Pro stanovení relativní plochy KM bylo použito trojitě histologické barvení alciánovou modří, hematoxylinem a eosinem. Alciánová modř barví modrozeleně kyselé mukopolysacharidy (pojiva), hematoxylin je modrofialové bazofilní barvivo, které se váže na jádra a eosin je růžové acidofilní barvivo barvící cytoplazmu, kolagen a KM. Nejprve bylo provedeno barvení 1% roztokem alciánové modři (pH 2,5) v teplé vodní lázni při 50 °C, po dobu 10 minut. Následně byla obarvena jádra Mayerovým hematoxylinem aplikací roztoku na 8-10 s při pokojové teplotě. Nakonec byla tkáň barvena přibližně 1 min při pokojové teplotě eosinem.

Po obarvení byla tkáň na sklech odvodněna vzestupnou alkoholovou řadou, převedena do roztoku karbol-xylenu a následně do čistého xylenu. Pro trvalé zachování tkáně byla skla zamontována pomocí permanentního média Histokit (ROTH, T160.2).

##### 4.1.5.2 Relativní plocha fibrotické tkáně

Množství fibrózy ve tkáni bylo stanoveno pomocí barvení Picro-Sirius red. Touto metodou se obarví kolagenní vlákna typu 1 a 3 na červeno. Okolní KM jsou obarveny žlutě. V 0,1% roztoku Picro-Sirius red byla skla s tkání ponechána 15 min při pokojové teplotě. Následně byla obarvená tkáň důkladně propláchnuta destilovanou vodou. Pro zvýraznění žluté barvy značící KM byla tkáň na 5 min při pokojové teplotě ponořena do nasyceného roztoku kyseliny pikrové. Poté byla obarvená tkáň na sklech propláchnuta, dehydratována a zamontována stejným postupem jako při přehledovém barvení alciánovou modří, hematoxylinem a eosinem.

##### 4.1.5.3 Množství Cx43 a p-Cx43<sup>S368</sup> ve tkáni

Pro značení Cx43 i p-Cx43<sup>S368</sup> byla tkáň nejprve vyprána v PBS a 0,5% Tweenu 20 v PBS (PBT). Pro restauraci antigenu byl použit 10mM citrátový pufr (pH 6), ve kterém byla skla s tkání povařena

2x5 minut v mikrovlnné troubě (ETA, 7197) nastavené na 750 W. Následně byla blokována aktivita endogenní peroxidázy aplikací 1,5% roztoku peroxidu vodíku v PBS na 20 minut. Pro předinkubaci bylo použito *normal goat serum* (NGS) ředěné 1:10 s 0,1 % PBT. Předinkubace byla na sklech ponechána hodinu při pokojové teplotě.

Následně proběhla inkubace s primární protilátkou přes noc při 4°C. Pro značení Cx43 byla použita králičí polyklonální protilátka anti-Cx43 (Sigma-Aldrich, C6219) ředěná 1:200 v NGS 1:10/0,1 % PBT. Pro značení p-Cx43<sup>S368</sup> byla použita králičí polyklonální protilátka anti-Phospho-Connexin43 Ser368 (Cell Signaling, #3511S) ředěná 1:100 v NGS 1:10/0,1 % PBT. U obou forem proteinu byla použita Goat-anti-Rabbit (Jackson ImmunoResearch, 111-035-144) sekundární protilátka s peroxidázovou koncovkou.

Inkubace se sekundární protilátkou probíhala 90 min při pokojové teplotě. Pro dokončení barvení byla tkáň inkubována s roztokem substrátu a chromogenu obsahujícím 0,05M Tris-HCl (pH 7,6), imidazol, 3,3'-diaminobenzidin (DAB) a peroxid vodíku. Po přidání tohoto roztoku následovala rychlá reakce DAB s peroxidem vodíku katalyzovaná peroxidázou. DAB se oxiduje a polymerizuje, tím vzniká stabilní hnědý precipitát detekovatelný ve viditelném spektru. Reakce probíhala v zatemněném prostoru 10 min pod pečlivou mikroskopickou kontrolou. Na závěr byla dobarvena jádra vložení skel na 8 s do roztoku hematoxylinu. Poté byla skla s tkání vzestupnou alkoholovou řadou dehydratována a převedena do xylenu. Následně byla skla zamontována pomocí permanentního média Histokit (ROTH, T160.2).

#### 4.1.5.4 Kolokalizace Cx43 s N-cadherinem

Detekce umístění Cx43 na end-to-end, případně side-to-side byla provedena pomocí kolokalizace Cx43 s N-cadherinem, jakožto markerem podélně orientovaných GJ. Vzhledem k nutnosti použít dvojité značení ve stejné oblasti GJ, byla reakce provedena ve fluorescenčním spektru. Pro toto barvení byla použita amplifikace signálu anti-Cx43 protilátky pomocí biotinu. Na začátku barvení byla tkáň nejprve vyprána v PBS a 0,5% PBT. Následovala restaurace antigenu v 10mM citrátovém pufru (pH 6) po dobu 2x5 min v mikrovlnné troubě (750 W). Poté 15 min při pokojové teplotě probíhala blokáce streptavidinem a následně za stejných podmínek blokáce biotinem. Pro blokáci byl použit Streptavidin/Biotin blocking kit (Vector Laboratories, SP-2002), obě látky byly ředěny v NGS 1:50 s 0,1 % PBT. Poté byla aplikována předinkubace (NGS 1:10/0,1 % PBT) na 30 min při pokojové teplotě.

S primárními protilátkami probíhala inkubace přes noc při 4°C. Cx43 byl značen králičí polyklonální protilátkou anti-Cx43 (Sigma-Aldrich, C6219), pro N-cadherin byla použita myší monoklonální protilátka anti-N-cadherin (Thermo Fisher Scientific, #33-3900). U obou bylo použito ředění 1:200 v NGS 1:10/0,1 % PBT. Následně byly aplikovány sekundární protilátky na 90 min při pokojové teplotě. Pro vazbu na primární protilátku anti-Cx43 byla použita Goat-anti-Rabbit sekundární protilátka (Jackson ImmunoResearch, 111-065-144) konjugovaná s biotinem a ředěná 1:500 v NGS 1:10/0,1 % PBT. K označení primární protilátky anti-N-cadherin byla použita Goat-anti-Mouse sekundární protilátka (Jackson ImmunoResearch, 115-175-146) s navázaným fluoroforem Cy5. U této protilátky bylo ředění 1:400 v NGS 1:10/0,1 % PBT. Následovala aplikace streptavidinu (Jackson ImmunoResearch, 016-020-084) s navázaným fluoroforem TRITC (pro značení Cx43) a ředěným 1:150 s 0,1% PBT. Aplikace probíhala 20 min při pokojové teplotě.

Na závěr byla provedena vizualizace buněčných membrán aplikací lektinu Wheat Germ Agglutinin (WGA) s navázaným fluoroforem Alexa Fluor 488, která značí glykokonjugáty. Váže se tedy převážně na vláknitou složku mimobuněčné hmoty, čímž barví mimo jiné bazální membránu. WGA (Invitrogen, W11261) byl na skla aplikován na 60 min při pokojové teplotě. Ředění bylo 1:50 v roztoku 1% hovězího sérového albuminu (bovine serum albumin, BSA) a 0,1 % PBT. Následně byly vzorky propláchnuty, dehydratovány a zamontovány permanentním médiem Histokit (ROTH, T160.2).

#### 4.1.6 Analýza obrazu

##### 4.1.6.1 *Velikost kardiomyocytů a Purkyňových vláken*

Pro analýzu velikosti KM a Purkyňových vláken byla použita skla s přehledovým histologickým barvením alcianovou modří, hematoxylinem a eosinem. Snímky byly pořízeny pomocí programu OlyVIA na mikroskopu BX51 (Olympus). Od každého vzorku byla hodnocena 4 snímaná pole při zvětšení 20x. Snímána byla především v oblasti papilárních svalů, kde je viditelný příčný řez KM. U snímků byla v programu ImageJ pomocí prahování vybrána plocha KM. Následně byla pomocí funkce Analyze particles určena plocha průřezu jednotlivými KM. Hodnoty nižší než 100  $\mu\text{m}^2$  a vyšší než 600  $\mu\text{m}^2$  nebyly do analýzy zahrnuty.

Zvětšení Purkyňových vláken bylo analyzováno obdobným způsobem. Pro tyto analýzy se však fotila tkáň v oblasti apexu LK, kde je síť Purkyňových vláken nejrozsáhlejší. Po cirkulárním odvodu byla ručně označena plocha všech volně běžících Purkyňových vláken (dobře rozeznatelných

podle povrchové izolace, Obr. 27(A)). Aby nedošlo ke zkreslení výsledků, byla k analýze vybrána pouze vlákna s podélným průřezem.

#### 4.1.6.2 Cx43, p-Cx43<sup>S368</sup> a fibróza

Pro histologické barvení detekovatelné ve viditelném spektru byl použit mikroskop BX51 (Olympus). Od každého srdce byla pro barvení použita dvě skla s histologickými řezy. V programu OlyVIA (Olympus) bylo z obou skel nasnímáno 5 zorných polí z oblasti střední části LK. Z jednoho vzorku bylo tedy vždy nasnímáno 10 zorných polí při zvětšení 20x. Pole byla vybrána v oblastech, kde byly KM rozkrojeny v podélné ose. V těchto oblastech jsou nejlépe viditelné interkalární disky a jsou to tedy ideální oblasti pro snímání plochy Cx43 a p-Cx43<sup>S368</sup>. Snímaná pole pro vyhodnocování fibrózy byla vybírána tak, aby do nich nezasahovaly cévy, které by interferovali s celkovým množstvím fibrotické tkáně. Snímky byly zpracovány v FIJI open source programu ImageJ. U snímků byla hodnocena pozitivní plocha (Cx43, p-Cx43<sup>S368</sup>, fibróza) normalizovaná na plochu KM.

#### 4.1.6.3 Kolokalizace Cx43 a N-cadherinu

Pro analýzu imunohistochemického značení byl použit konfokální fluorescenční mikroskop Olympus BX61 (konfokální modul FluoView1000). Snímky pro vyhodnocení kolokalizace byly snímány ze střední části LK. Oblasti byly vybírány tak, aby byly zaznamenány KM s podélným průřezem a byl tak dobře vidět jejich obvod a interkalární disky. Od každého vzorku bylo pořízeno 5 snímků. Oblasti byly snímány na zvětšení 60x za použití imerzního oleje. Pro jednotlivé fluorofory byl nastaven laser na odpovídající vlnovou délku pro jejich excitaci. Pro všechny vzorky byla u jednotlivých signálů nastavena konstantní intenzita laseru. Signál byl snímán sekvenčně ze dvou optických řezů s z-krokem 2  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.6.4 Western blot

Obarvené membrány byly vizualizovány pomocí metody zesílené chemiluminiscence ECL (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate) pomocí přístroje ChemiDoc (ChemiDoc™system, Bio-Rad). Relativní zastoupení jednotlivých proteinů bylo analyzováno pomocí programu ImageQuant (Molecular Dynamics). Každý vzorek byl analyzován minimálně ve 4 nezávislých stanoveních. Výsledky byly normalizovány na Ponceau.



## 4.2 Statistika

Pro základní charakteristiku modelu byla operovaná zvířata rozdělena do dvou skupin podle rozvoje fenotypu: AC I s poměrem hmotnosti srdce k hmotnosti těla (HW/BW) do hodnoty 5 a skupina AC II s HW/BW nad 5. Pro posouzení rozdílu mezi jednotlivými skupinami byla použita analýza rozptylu (ANOVA) s Bonferroniho korekcí. Pro důkladnější analýzy rozvoje pro-arytmogenního substrátu byla zařazena pouze AC II skupina a kontrolní skupina. Pro testování statistické hladiny významnosti mezi těmito skupinami byl použit Studentův t-test. Pro posouzení korelace mezi spojitými proměnnými byl použit Pearsonův korelační koeficient.

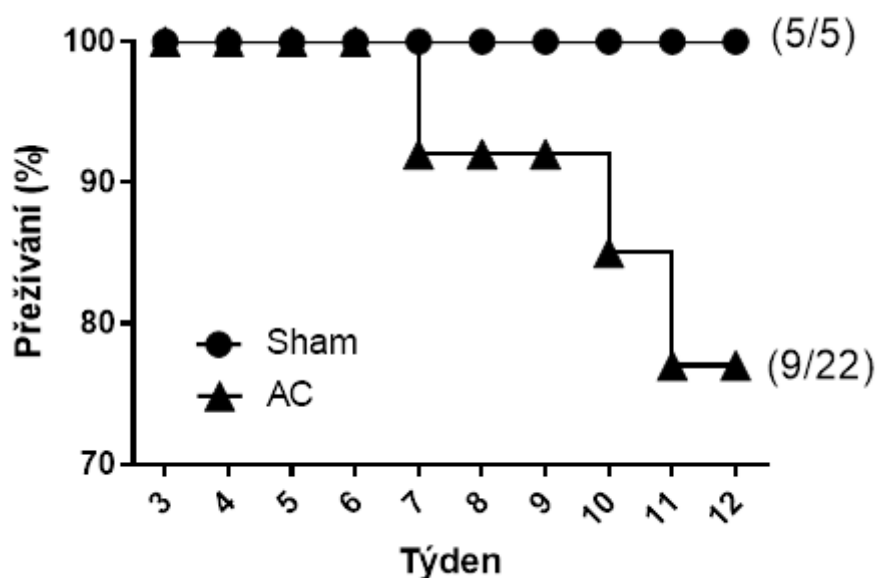
Statistické analýzy byly prováděny pomocí programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Rozdíly byly analyzovány na hladině významnosti \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

## 5 Výsledky

### 5.1 Základní charakteristika modelu neonatální konstriktce aorty

Před vlastními analýzami rozvoje pro-arytmogenních substrátů byla provedena měření, pomocí kterých byl model neonatální AC charakterizován. Do těchto měření byly zahrnuty křivky přežívání, informace o váze těla a hmotnostních přírůstků, hmotnosti srdce a plic.

Na základě úmrtnosti zvířat byly sestaveny křivky přežívání. Akutní úmrtnost po provedené operaci byla zhruba 28 %. Do grafu přežívání pak byla zahrnuta pouze úmrtnost zvířat související s rozvojem tlakového přetížení a srdečního selhání. Ze Sham operovaných zvířat v průběhu experimentu z těchto důvodů nezemřelo ani jedno. U skupiny zvířat s provedenou AC byla úmrtnost na konci experimentu 41 % (Obr. 12).



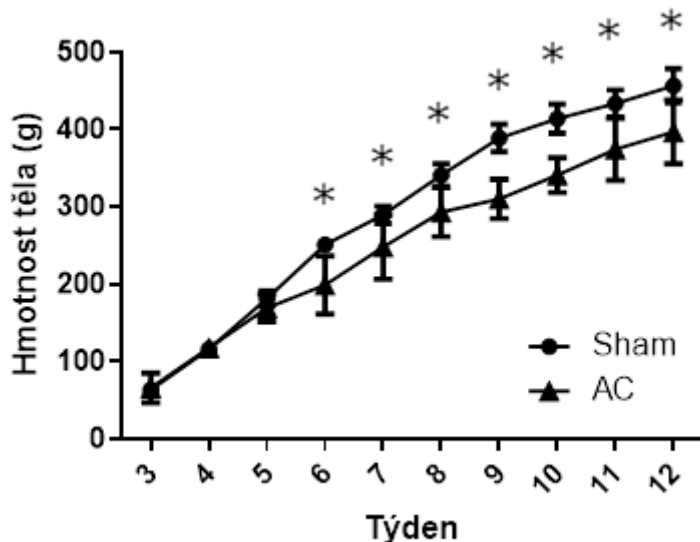
**Obrázek 12: Graf přežívání zvířat v průběhu sledovaného období.**

Na rozdíl od Sham operovaných zvířat, u AC skupiny byla během sledovaného období zaznamenána úmrtnost v důsledku rozvoje srdečního selhání.

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  S.E.M.

Zvířata byla v průběhu experimentu pravidelně vážena. Na základě získaných dat byl sestaven graf přírůstků hmotností Sham operované skupiny a skupiny s provedenou AC. Z výsledků je patrné, že u operovaných zvířat došlo k rozvoji patologie, která se negativně projevila na jejich váze. Rozdíl mezi operovanými a kontrolními zvířaty je signifikantní od 6 do 12 týdne, kdy byl

experiment ukončen (Obr. 13). Je tedy zřejmé, že model vykazuje dostatečný rozvoj kardiomegalie spojené se srdečním selháním, avšak ne takový, který by se neslučoval s přežíváním do 12 týdnů.



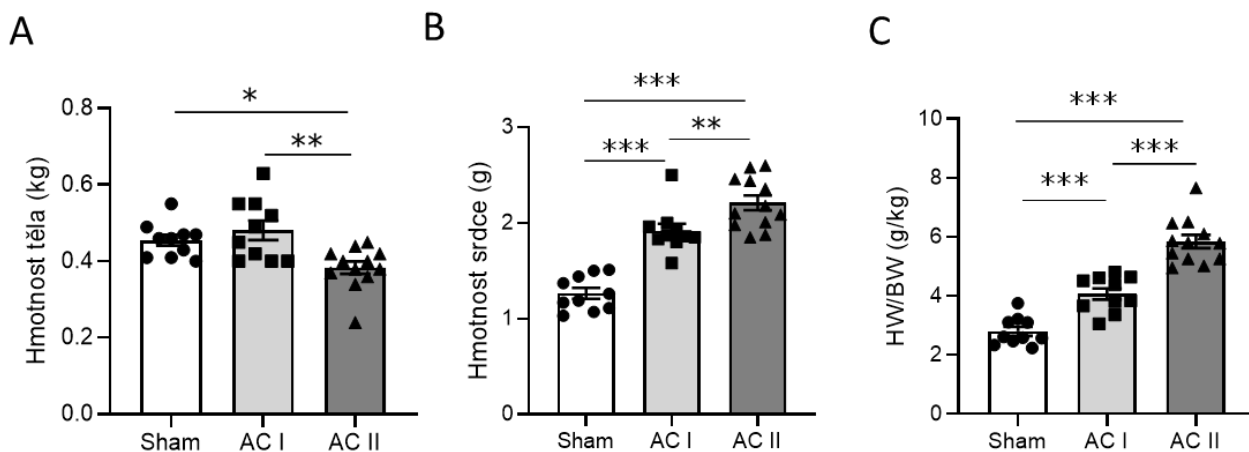
**Obrázek 13: Růstové křivky u operovaných a Sham zvířat.**

S rozvojem fenotypu u AC skupiny došlo k poklesu přírůstků, který byl oproti Sham skupině signifikantní od 6. týdne.

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  S.E.M.; \*  $P < 0,05$ ; ANOVA s Bonferroniho korekcí.

Na konci experimentu byla zvířata usmrcena a srdce zvážena. V důsledku variability fenotypu byla operovaná zvířata rozdělena do 2 skupin dle závažnosti kardiomegalie: skupina AC I, která zahrnuje zvířata se středně rozvinutým fenotypem ( $HW/BW \leq 5$ ) a skupina AC II zahrnující jedince se závažnou kardiomegalií ( $HW/BW > 5$ ).

Mezi skupinami byl zaznamenán rozdíl jak ve váze těla, tak v hmotnosti srdcí. Tyto rozdíly měly opačný trend. Zatímco u váhy těla docházelo s rozvojem kardiomegalie ke snižování, u hmotnosti srdce docházelo k výraznému nárůstu. Váhy potkanů jsou zobrazeny na Obr. 14(A). Hmotnost AC I skupiny se na konci experimentu od kontrolní skupiny signifikantně nelišila ( $0,455 \pm 0,014$  g u Sham a  $0,481 \pm 0,025$  g u AC I).



**Obrázek 14: Porovnání hmotnostních parametrů u sledovaných skupin.**

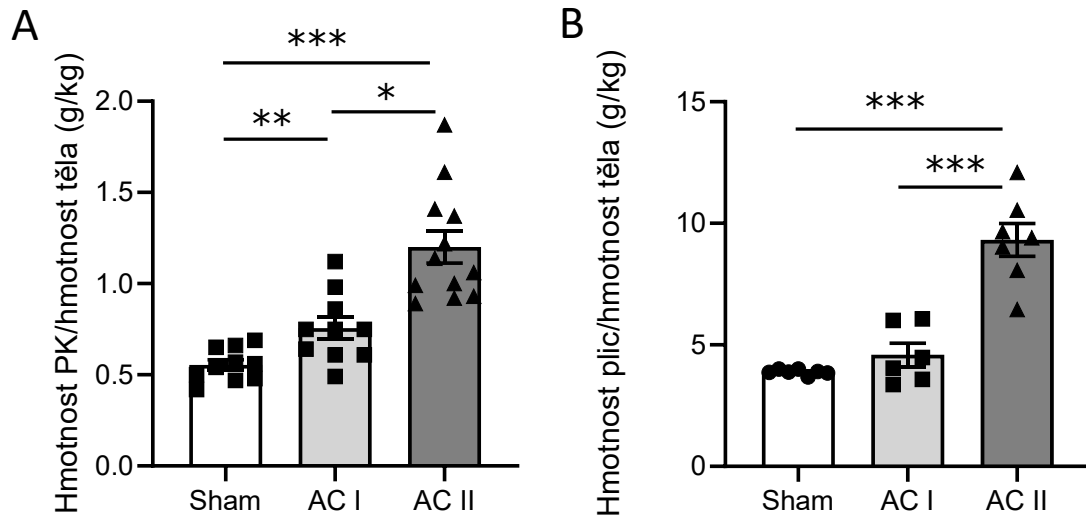
Hmotnost těla byla nižší oproti Sham operovaným zvířatům pouze u skupiny AC II (A), hmotnost srdce se signifikantně lišila mezi všemi skupinami (B) vzájemný poměr byl signifikantně rozdílný v porovnání všech skupin oproti sobě (C).

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  S.E.M.; \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ; ANOVA s Bonferroniho korekcí.

Signifikantní pokles hmotnosti u skupiny AC II ( $0,383 \pm 0,016$  g) naznačuje progresi fenotypu u této skupiny a odůvodňuje její vyčlenění ze skupiny AC operovaných potkanů. U hmotnosti srdce, zobrazené na Obr. 14(B), byly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi všemi skupinami. U HW/BW, jakožto u indexu hodnocení patologického zvětšení srdce (Sedmera et al., 2003b), byl mezi všemi skupinami zaznamenány signifikantní změny ( $2,800 \pm 0,150$  g/kg u Sham;  $4,067 \pm 0,191$  g/kg u AC I a  $5,846 \pm 0,222$  g/kg u AC II; Obr. 14(C)).

Při vážném tlakovém přetížení dochází k přenosu patologie na PK a plíce, což se projeví na jejich váze (Chen et al., 2012). Po vystřížení srdcí byla proto vážena samostatně i PK. Váha PK signifikantně rostla s nárůstem normalizované hmotnosti srdce (viz Obr. 15(A)) a je tedy zřejmé, že váha srdce do jisté míry odráží i nárůst hmotnosti PK. Z výsledků normalizované hmotnosti plic vyplývá, že u AC I nedochází k dekompenzaci stavu projevujícího se edémem plic ( $3,884 \pm 0,042$ g/kg

u Sham a  $4,592 \pm 0,483$  g/kg u AC I; Obr. 15(C)). Naproti tomu signifikantní nárůst normalizované hmotnosti plic jak oproti Sham, tak AC I skupině naznačuje dekompenzaci srdečního selhání u AC II skupiny (Obr. 15(B)).



**Obrázek 15: Rozvoj fenotypu u sledovaných skupin.**

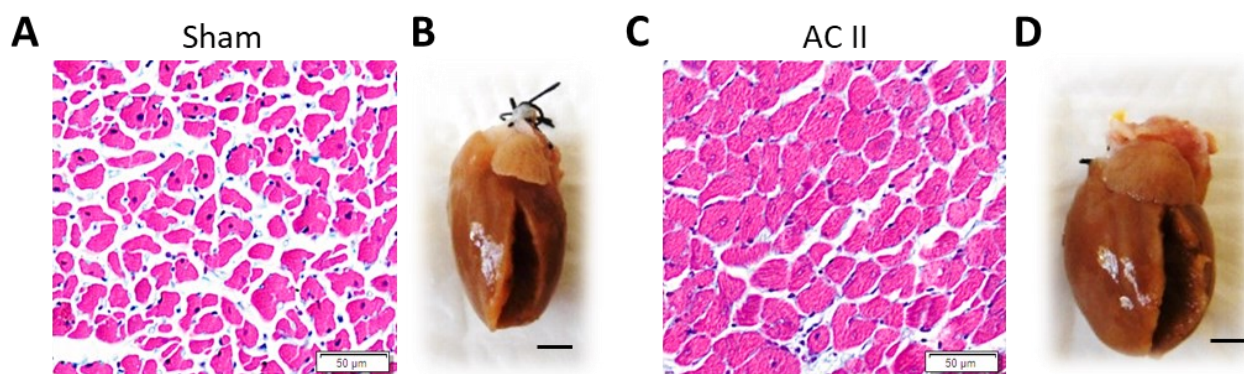
Hmotnosti PK normalizovaná na hmotnosti těla se lišila mezi všemi skupinami (A). Rozvoj dekompenzace u AC II byl patrný z nárůstu hmotnosti plic normalizované na hmotnost těla oproti Sham i AC I skupině (B).

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  S.E.M.; \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ; ANOVA s Bonferroniho korekcí.

## 5.2 Základní charakteristika skupin na úrovni srdečního svalu

Vzhledem k povaze sledovaných parametrů a rozsahu diplomové práce jsme se pro další analýzy rozhodli zařadit pouze data ze Sham a AC II skupiny.

Konstrikce abdominální aorty vedla k výrazné změně velikosti a geometrii srdce (Obr. 16(B, D)). Krom výrazného zvětšení AC II srdcí je u nich v porovnání se Sham skupinou znatelná také změna tvaru. Ta může souviset s rozvojem patologie, při které dochází ke koncentrické změně tvaru či dilataci LK a srdce se stávají více sférická (Ošťádal and Vízek, 2003).

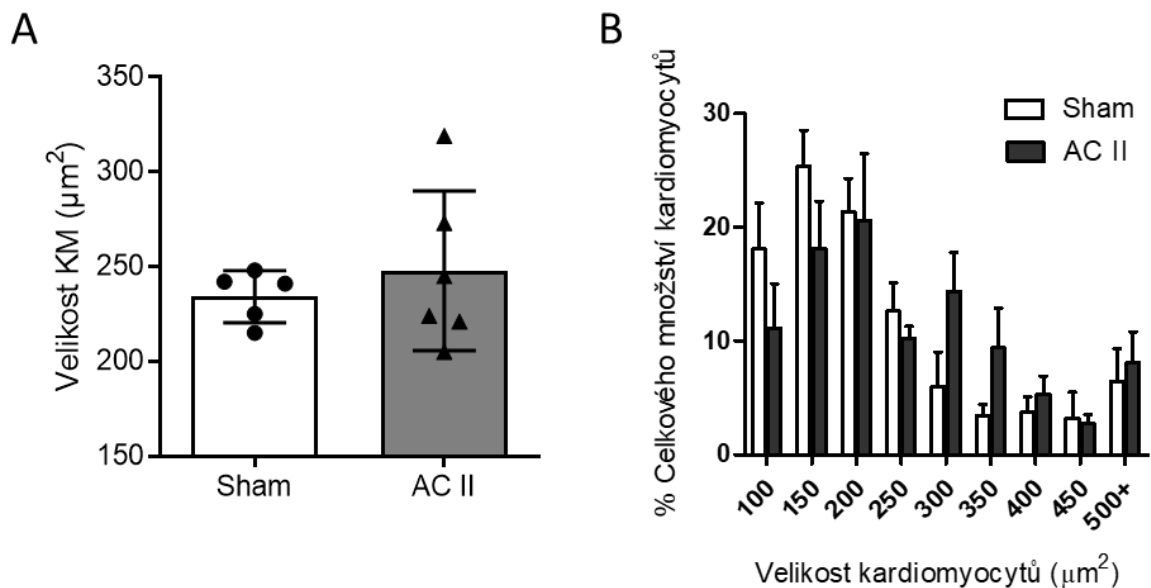


**Obrázek 16: Porovnání morfologických změn u Sham a AC II skupiny.**

Snímky histologických řezů (barvení hematoxylinem/eosinem a alciánovou modří) ukazují zvětšení KM u AC II (C) v porovnání se Sham skupinou (A). Na makrosnímčích (B, D) je patrná změna tvaru po AC. Měřítka u A, C je 50 µm, u B, D je 2 mm.

Podobně jako u embryonálního období (Clark and Hu, 1982), tak i růst myokardu se v časném neonatálním období realizuje ne jen výlučně hyperplazií, ale do jisté míry se uplatňuje i zvětšení KM pomocí hypertrofického růstu (Sedmera et al., 2003b). Pro odlišení jednotlivých mechanismů růstu jsme provedli měření velikosti KM. Při měření plochy KM na transverzálním řezu papilárním svalem byl Sham a AC II skupinou (Obr. 16(A, C)), zaznamenám mírný rozdíl, který však těsně nepřekročil hladinu statistické významnosti ( $p=0,508$ ; Obr. 17(A)). Avšak, při detailnější analýze, kdy byly KM rozděleny dle velikosti po 50 µm<sup>2</sup>, byl rozdíl mezi skupinami znatelný. Velikost KM ze Sham skupiny se pohyboval především mezi 100–200 µm<sup>2</sup> a od 250 µm<sup>2</sup> procentuální zastoupení KM ze Sham skupiny prudce klesá. U KM z AC II byl patrný posun v procentuálním zastoupení k větším KM (Obr. 17(B)). Tento fakt značí kombinaci hyperplastického i hypertrofického růstu KM. Relativně nižší

zastoupením hypertrofie, v porovnání se situací u modelu transverzální AC v dospělosti, je méně zřetelné v souhrnném pohledu.



**Obrázek 17: Porovnání velikosti KM u Sham a AC II skupiny.**

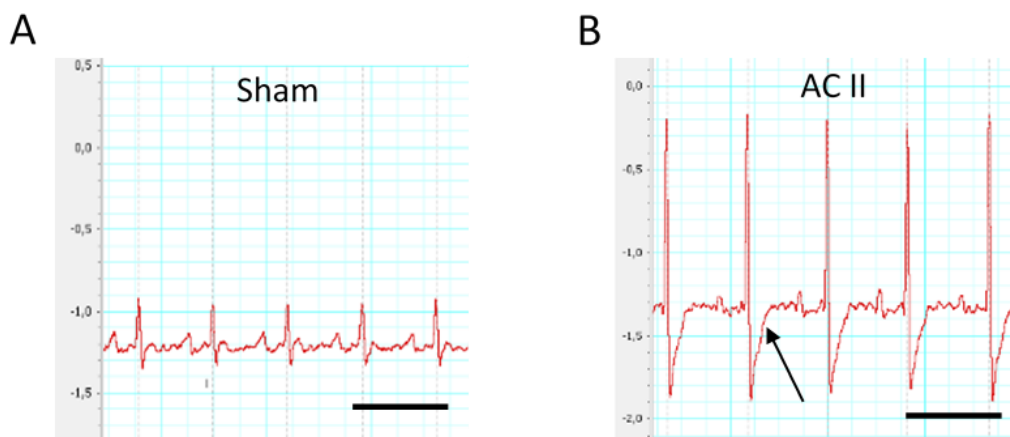
Mírné zvětšení velikosti AC II (A), projevující se jako větší zastoupení větším KM u této skupiny (B) reflektuje kombinaci hyperplastického a hypertrofického růstu. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± S.D.; Studentův t-test.

### 5.3 Výskyt spontánních arytmií

Před ukončením pokusu bylo provedeno EKG měření za účelem zaznamenat výskyt spontánních arytmií a posoudit EKG parametry asociované s vyšším rizikem jejich vzniku. Typický záznam EKG křivky je vidět na Obr. 18. Na záznamu jsou patrné známky zvětšení srdce u AC II skupiny. Jedná se o větší amplitudu QRS komplexu odpovídající větší mase LK. Absolutní hodnota QRS amplitudy nebyla hodnocena vzhledem k faktu, že se jedná o parametr závislý na přesné poloze elektrod k pozici srdce u jednotlivých zvířat (Bacharova and Estes, 2017).

Taktéž bylo zaznamenáno signifikantní prodloužení doby trvání QRS komplexu u AC II ( $21,67 \pm 1,4$  ms u Sham a  $29,33 \pm 0,6$  ms u AC II), což svědčí o zvětšení LK (Bacharova and Estes, 2017). Přítomnost deprese úseku ST (na Obr. 18 označeno šipkou) ukazuje na pravděpodobnou ischemii myokardu. Přestože tento parametr není zcela specifický, jeho sensitivita je vysoká a jedná se o obecně uznávaný marker nedostatku kyslíku v hypertrofovaném myokardu LK (Ronzhina et al., 2017).

Všechny měřené EKG parametry jsou sumarizované v Tab. 1. Znaky zvětšení srdce (prodloužení QRS) byly uvedeny výše. Hlavní pro-arytmogenní marker z hlediska vzniku arytmií je prodloužení QT intervalu, potažmo QTc (Aschermann et al., 2004). Oba parametry byly signifikantně proslouženy u AC II skupiny.



**Obrázek 18: Porovnání EKG záznamu u zvířat ze Sham a AC II skupiny.**

Při stejné rozmezí zobrazení je patrná větší amplituda QRS komplexu odpovídající větší mase LK u AC II skupiny (B) oproti Sham zvířatům (A). Rovněž je u AC II skupiny zřejmá deprese ST úseku (označeno šipkou). Měřítka je 200 ms.

Analýza SF ukázala statisticky významné snížení. U Sham zvířat se hodnoty pohybovaly v rozmezí  $398 \pm 8$  BPM a oproti tomu u AC II skupiny dosahovala hodnot  $345 \pm 11$  BPM,  $P < 0,05$ . SF byla stabilní po celou dobu měření. Tento fakt není možné přičítat snížení teploty, která byla monitorovaná po celou dobu záznamu a odpovídá datům získaných z echokardiografického měření (není součástí této diplomové práce).

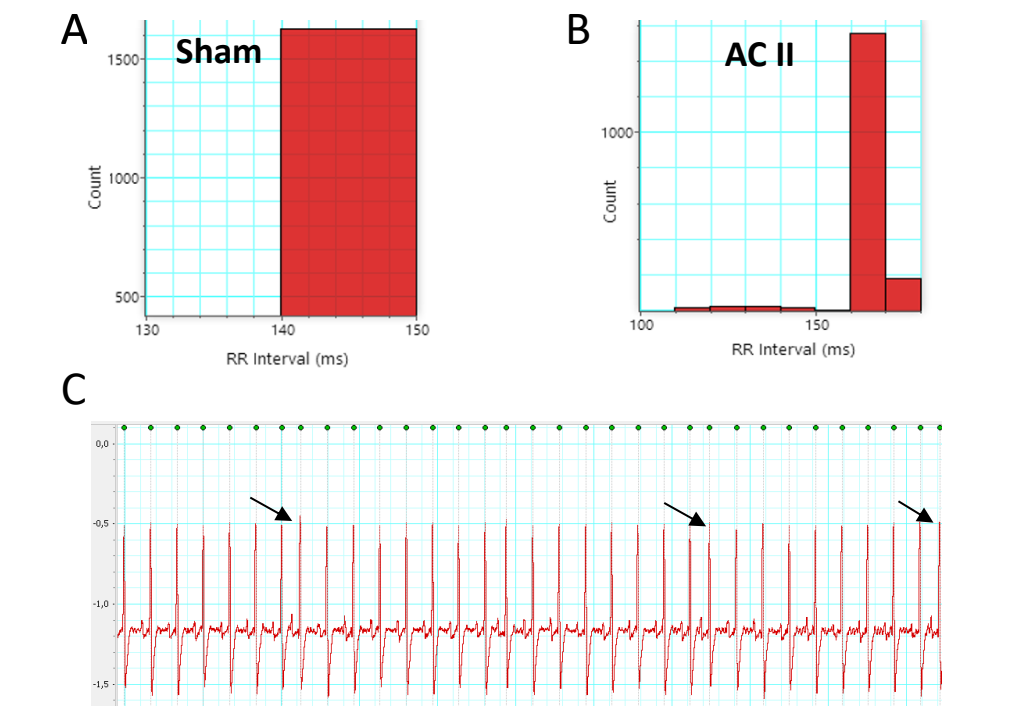
Parametr	Sham	n	AC II	n	Hodnota p
P vlna (ms)	$15,78 \pm 0,6$	6	$17,43 \pm 1,7$	3	$P=0,29$
PR interval (ms)	$48,95 \pm 1,0$	6	$55,73 \pm 0,4$	3	$P < 0,05$
QRS komplex (ms)	$21,67 \pm 1,4$	6	$29,33 \pm 0,6$	3	$P < 0,05$
QT interval (ms)	$50,72 \pm 1,5$	6	$66,3 \pm 2,2$	3	$P < 0,001$
QTc (Bazzet)	$129,8 \pm 3,0$	6	$159,0 \pm 6,6$	3	$P < 0,05$
SF (BPM)	$398 \pm 8$	6	$345 \pm 11$	3	$P < 0,05$

**Tabulka 1. Parametry EKG měření u Sham operovaných a AC II zvířat.**

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  S.D.; Studentův t-test.



Dle skórovacího systému podle Lambetha (Curtis et al., 2013) byly zaznamenány arytmie pouze jako ojedinělé supraventrikulární aktivace (příklad uveden na Obr. 19), a to jen u jednoho AC II zvířete. Komorové arytmie, které byly primárním cílem analýzy vzhledem k jejich klinické relevanci pro dopad na hemodynamiku organismu, zaznamenány nebyly. Nicméně je třeba vzít v úvahu, že vzhledem k rozdělení zvířat do skupin až podle HW/BW, byla měřena pouze 3 AC II zvířata a vypovídající hodnota měření je z tohoto důvodu nižší. Vzhledem k signifikantnímu prodloužení QT a QTc intervalu, jakožto pro-arytmogenního markeru EKG lze předpokládat větší výskyt komorových arytmii v početnější skupině zvířat či jejich přímou indukci.



### Obrázek 19: Výskyt spontánních arytmii.

Analýza RR intervalu na EKG ukázala stabilní hodnoty u Sham operovaných zvířat (A). Naproti tomu vlevo uvedena ukázka variabilního RR intervalu u AC II zvířete značící výskyt supraventrikulárních arytmii (B). V dolním panelu (C) je zobrazena část EKG záznamu se supraventrikulárními aktivacemi označenými šipkami.

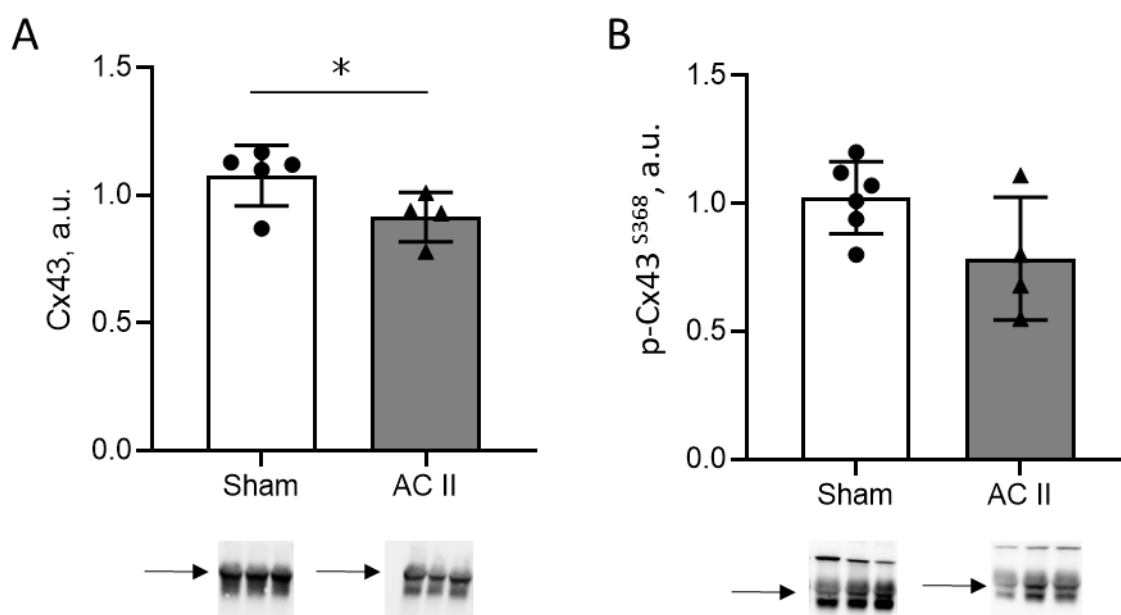
## 5.4 Analýza pro-arytmogenního substrátu

Následně byla posouzena elektrická remodelace myokardu vedoucí k vyššímu výskytu arytmií u tlakově přetížených srdcí v dospělosti. Byly analyzovány parametry exprese a lokalizace Cx43, přítomnost fibrózy a změny na úrovni Purkyňových vláken.

### 5.4.1 Exprese Cx43 a p-Cx43<sup>S368</sup>

#### 5.4.1.1 Western blot

Pro propagaci elektrického impulzu srdcem je klíčová nenarušená komunikace přes mezibuněčné spoje (Kostin et al., 2004). Proto byly provedeny analýzy exprese Cx43 metodou Western blot. Hodnota exprese Cx43 byla u ACII skupiny signifikantně nižší než u Sham skupiny, pokles v expresi činil 15 % (Obr. 20(A)).



**Obrázek 20: Porovnání exprese Cx43 a p-Cx43<sup>S368</sup> AC II a Sham skupiny**

U ACII skupiny byl patrný pokles exprese jak Cx43 (A), tak a p-Cx43<sup>S368</sup> (B).

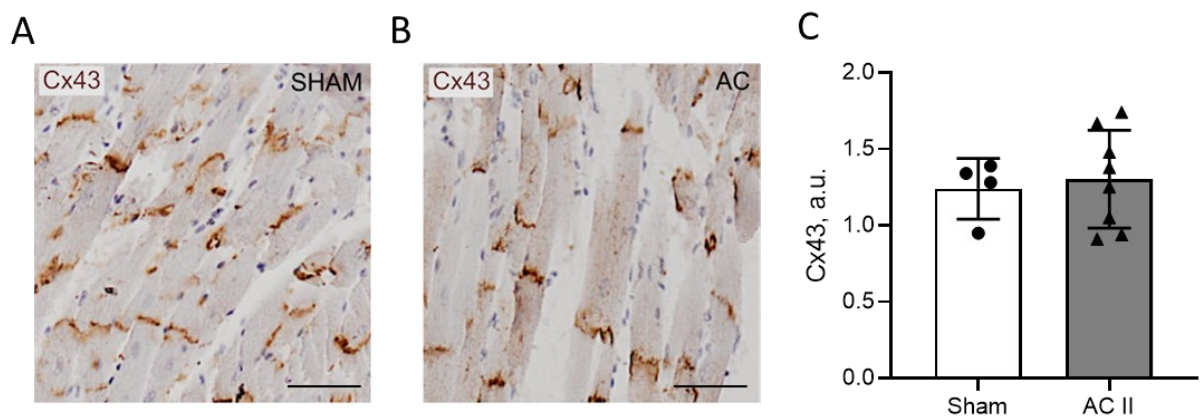
Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± S.D.; \* P < 0,05; Studentův t-test.

Krom samotné exprese Cx43 je pro elektrickou aktivitu srdce také významná jeho fosforylace, která moduluje funkci Cx43 (Lampe and Lau, 2000). V expresi fosforylované formy p-Cx43<sup>S368</sup> ovlivňující „end-to-end“ propojení (Kohutova et al., 2019) byl rovněž zaznamenán pokles u AC II v porovnání se Sham, v tomto případě o 23 %. Přesto tento rozdíl nedosahoval statistické významnosti (Obr. 20(B))

#### 5.4.1.2 Histologické analýzy

Pomocí histologické detekce byla následně analyzována exprese a lokalizace Cx43 a p-Cx43<sup>S368</sup> v souvislosti s orientací KM. Lokalizace Cx43 ve smyslu „end-to-end“ a „side-to-side“ je důležitá pro adekvátní přenos elektrického signálu. Lateralizace Cx43, tedy přesun distribuce na „side-to-side“ lokalizaci je spojován s vyšším výskytem arytmií (Boulaksil et al., 2016).

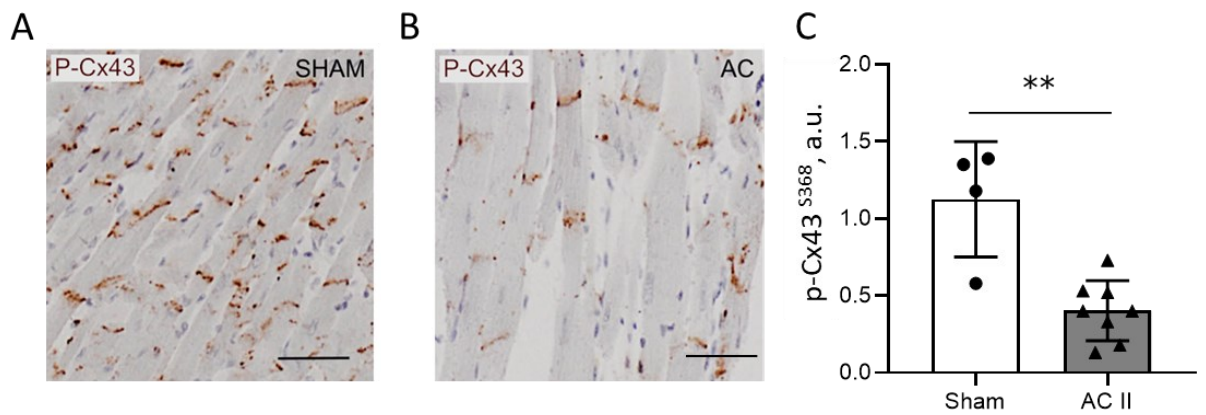
Snímky histologických řezů s jádry obarvenými modře a Cx43 barvenými hnědou barvou (označené šipkou) jsou zobrazeny a kvantifikovány na Obr. 21. Měření neukázala rozdíl v expresi Cx43 u ACII oproti Sham skupině ( $1,240 \pm 0,199$  u Sham a  $1,303 \pm 0,32$  u AC II).



#### Obrázek 21: Histologické značení Cx43.

Příklad Cx43 detekce u Sham (A) a ACII skupiny (B). Cx43 je zobrazen hnědě a jádra modře. Kvantifikace exprese neukázala statisticky významný rozdíl (C). Měřítka je 50  $\mu$ m. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  S.D.; Studentův t-test.

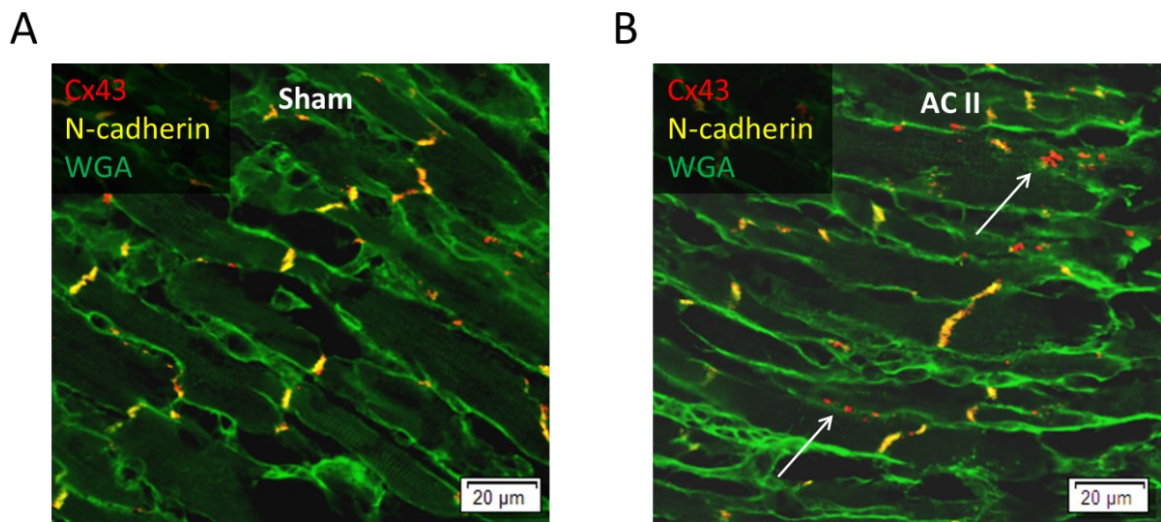
Podobně byla provedena analýza p-Cx43<sup>S368</sup>. Data sumarizována na Obr. 22 ukázala signifikantní pokles exprese u ACII (Obr. 22(C)). Průměrná hodnota exprese p-Cx43<sup>S368</sup> u Sham skupiny byla  $1,125 \pm 0,265$  a u AC II byla  $0,403 \pm 0,195$  ).



**Obrázek 22: Histologické značení p-Cx43<sup>S368</sup>.**

Příklad p-Cx43<sup>S368</sup> detekce u Sham (A) a ACII skupiny (B). p-Cx43<sup>S368</sup> je zobrazen hnědě a jádra modře. Kvantifikace exprese ukázala statisticky významný pokles u skupiny AC II (C). Měřítka je 50  $\mu$ m. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  S.D.; Studentův t-test.

Pro detailní analýzu lateralizace byla Cx43 exprese kolokalizována s markerem adhesních spojů interkalárních disků KM, N-cadherinem. Pro detekci cytoplazmatické membrány KM byl použito WGA. Na některých snímcích byl u ACII skupiny zaznamenán mírný pokles v kolokalizaci, který představuje přerozdělení Cx43 z „end-to-end“ lokalizace na „side-to-side“ umístění (Obr. 23(B)). Tyto oblasti však nebyly typické pro celou skupinu a v celém souboru se tedy lateralizace neprokázala.

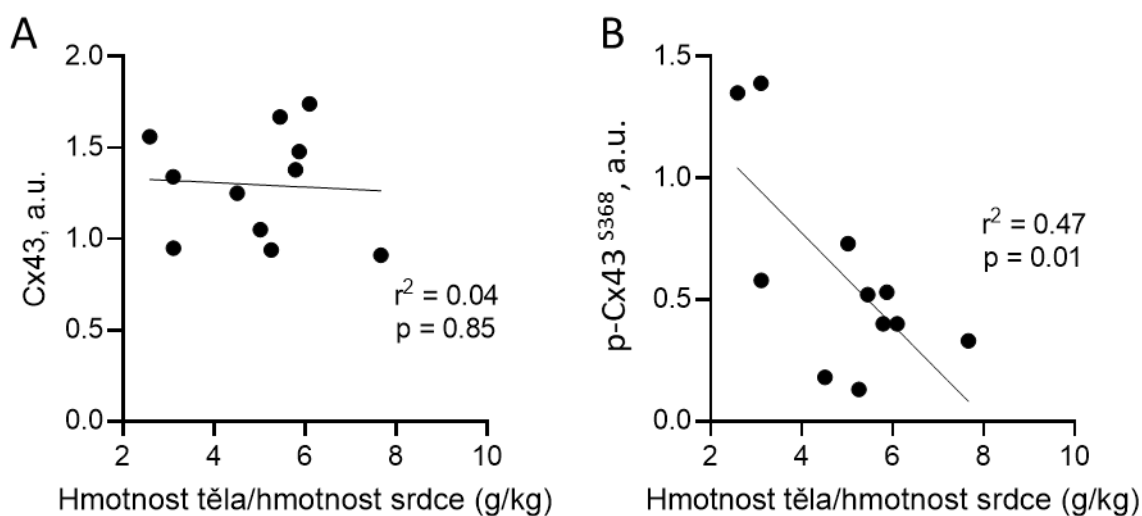


**Obrázek 23: Snímky z konfokálního fluorescenčního mikroskopu analyzující lateralizaci Cx43.**

Cx43 exprese v GJ patrná z kolokalizace Cx43 (červeně) a s N-cadherinem (žluté). Cytoplazma označena pomocí WGA zeleně. Na snímcích ze Sham skupiny (A) se oblasti bez kolokalizace téměř nevyskytovaly, naproti tomu u skupiny AC II byla ojediněle zřetelná lateralizace Cx43 (označeno šipkou na B). Měřítka je 20 µm.

### 5.4.1.3 Korelační analýzy

Vzhledem k variabilitě AC fenotypu jsme následně analyzovali závislost mezi mírou fenotypu (HW/BW) a expresí Cx43, potažmo jeho fosforylované formy p-Cx43<sup>S368</sup>. Pro analýzu jsme použili lineární regresi a závislost jsme otestovali testem dobré shody  $r^2$  tohoto modelu a analyzovali pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. V případě Cx43 závislost poklesu jeho exprese na rozvoji fenotypu prokázána nebyla ( $p=0,85$ ; Obr. 24(A)). Naopak u p-Cx43<sup>S368</sup> byla pozorována signifikantní závislost exprese na závažnosti kardiomegalického fenotypu (Obr. 24(B)).



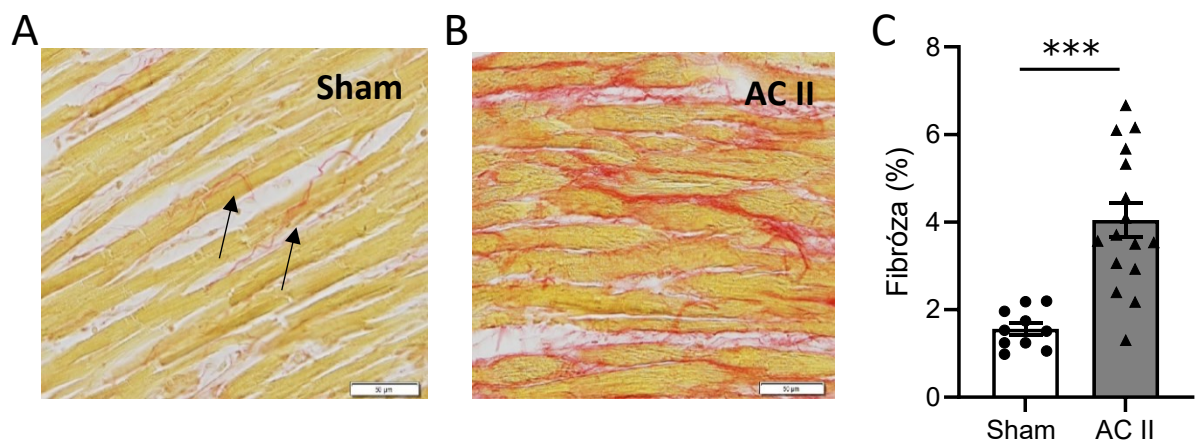
**Obrázek 24: Graf závislosti exprese Cx43 a p-Cx43<sup>S368</sup> na rozvoji fenotypu.**

Nebyla prokázána závislosti na míře rozvoje fenotypu v případě Cx43 (A). Naopak v případě p-Cx43<sup>S368</sup> tato závislost dosahovala statistické signifikance (B).

Pearsonův korelační koeficient.

#### 5.4.2 Rozvoj fibrózy

Výrazným pro-arytmogenním substrátem je rozvoj fibrózy ve tkáni (Durdil, 2010). Pro kvantifikaci fibrózy, bylo použito barvení pomocí Picrosirius Red. Na histologických řezech na Obr. 25 (A, B) jsou červeně obarvená kolagenní vlákna a žlutě cytoplazma KM. Na snímcích je viditelný rozdíl mezi plochou fibrotické tkáně u Sham skupiny a AC II. Kvantifikace ukázala signifikantní nárůst relativní fibrotické plochy u AC II skupiny ( $1,564 \pm 0,141$  %) oproti Sham operovaným zvířatům ( $5,011 \pm 0,740$  %).



#### Obrázek 25: Analýza fibrózních změn.

Příklady Picrosirius Red barvení u Sham (A) a AC II skupiny (B). Kvantifikace pozitivní plochy ukázala signifikantní nárůst u AC II skupiny (C). Měřítka je 50  $\mu\text{m}$ .

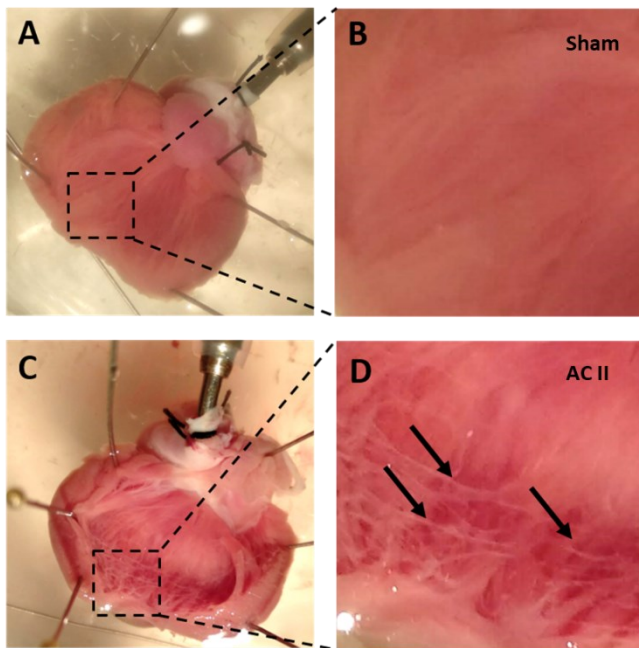
Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  S.D.; \*\*\*  $P < 0,001$ ; Studentův t-test.

#### 5.5 Vliv tlakového přetížení na komorový převodní systém

V remodelovaném myokardu je zdroj arytmií spojován také s terminální částí převodního systému komor, tedy Purkyňovými vlákny (Surget et al., 2021). Změny Purkyňových vláken byly v dutině LK viditelné již při odběrech srdcí (Obr. 26).

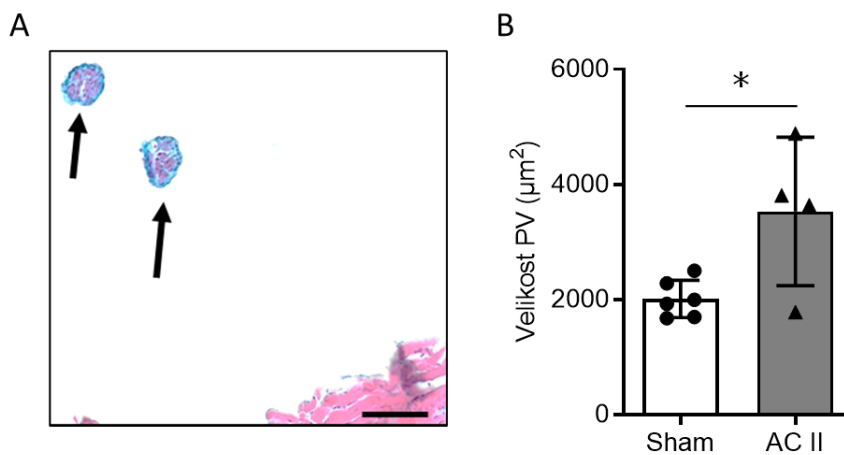
Protože tlakové přetížení vede k hypertrofii Purkyňových vláken (Logantha et al., 2021), analyzovali jsme změny jejich velikosti. Měření bylo zaměřena na volně běžící Purkyňova vlákna, protože je možné je velmi dobře odlišit od myokardu komory (viz Obr. 27(A), Purkyňova vlákna vyznačena šipkami). Plocha těchto vláken byla u AC II skupiny statisticky významně zvětšena ( $502,2 \pm 74 \mu\text{m}^2$  u sham zvířat oproti  $880,9 \pm 278 \mu\text{m}^2$ ; Obr. 27(B)).





**Obrázek 26: Vliv tlakového přetížení v neonatálním období na PSS.**

Makrosnímky odebraných srdcí kontrolních zvířat (A, B) a tlakově přetížených zvířat (C, D). Na levé straně (A, C) je pohled do dutiny LK. Vlevo jsou endokardy nasnímány v detailu (B, D) s viditelně ztluštěním Purkyňových vláken u AC II zvířat (D, označeno šipkami).



**Obrázek 27: Porovnání velikosti Purkyňových vláken.**

Snímek histologického řezu nabarveného hematoxylinem, eosinem a alciánovou modří (A) s vyznačenými volně běžící Purkyňova vlákna (šipky). Volně běžící Purkyňova vlákna u AC II skupiny byla signifikantně v porovnání se Sham skupinou (B). Měřítka je 100 µm. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± S.D.; \* P < 0,05; Studentův t-test.



## 6 Diskuze

### 6.1 Model aortální konstriktce v neonatálním období

Tlakové přetížení v důsledku konstriktce abdominální aorty v neonatálním období vedlo k rozvoji srdečního selhání. HW/BW statisticky významně vzrostla o 45 % u AC I a 109 % u AC II skupiny. Zvětšení masy LK odpovídalo i signifikantní prodloužení QRS komplexu. Výrazný zásah AC do organismu potvrzují rozdíly v hmotnostech mezi kontrolní a operovanou skupinou. Signifikantně nižší váhové přírůstky operovaných zvířat s provedenou AC potvrzují rozvoj patologie spojené se srdeční nedostatečností. Podobně byly zaznamenány nižší přírůstky či ztráta hmotnosti u zvířat se srdečním selháním po infarktu myokardu (Hrdlička et al., 2019), doxorubicinem navozeném srdečním selháním (Timm et al., 2020) či tlakového přetížení srdce indukovaném v dospělosti (Guo et al., 2018). Oproti předchozím publikacím na modelu neonatálního tlakového přetížení (Hamplová et al., 2010; Novotny et al., 2003; Sedmera et al., 2003b) bylo cílem studie posouzení neonatálního programování na fenotyp v dospělosti, a proto bylo nutné, aby zásah vedl k rozvoji takového srdečního selhání, které umožní v dostatečné míře přežití do dospělého věku. Je známo, že velikost konstriktce je přímo úměrná stupni vývoje tlakového gradientu a následného selhávání. Na myším AC modelu bylo ukázáno, že použití konstriktce na průměr 0,375 mm vede po 4 týdnech k rozvoji závažného dekompenzovaného srdečního selhání s 59% úmrtností. Naproti tomu konstriktce na velikost 0,4 mm vedla k rozvoji mírné hypertrofie bez progresu do srdečního selhání (Furihata et al., 2016). V našem případě byla úmrtnost na konci experimentu, tedy v 12 týdnech, 44 %. Je tedy zřejmé, že námi zvolený model je vhodný pro navození tlakového přetížení v míře, která vede k rozvoji fenotypu výrazné kardiomegalie, a zároveň umožňuje přežití dostatečného množství zvířat do konce experimentu.

Tlakové přetížení srdce navozené v neonatálním období má na srdce specifický vliv. Sedmera et al. (2003b) ve své práci ukázal, že tento zásah sice vede v určité míře k hypertrofii KM, ale především k jejich buněčné proliferaci. Přestože jsme v této studii míru proliferace nestanovovali, tak naše výsledky odpovídají zmíněným zjištěním. Ze skutečnosti, že mezi AC II a kontrolní skupinou nebyl nezaznamenán rozdíl v průměrné velikosti KM, který byl patrný až při rozdělení KM dle jejich velikosti vyplývá, že hypertrofický růst byl u těchto srdcí jen minimální. Podobné výsledky ve své studii zaznamenal i Novotný et al. (2003), který pozoroval u stejného modelu až trojnásobný nárůst v hmotnosti LK s minimálními rozdíly v šířce jednotlivých KM.

Postupný rozvoj kompenzovaného fenotypu kardiomegalie s přechodem do dekompenzace je znám z humánních dat (Kostin et al., 2004) a studií na dospělých zvířatech (Jin et al., 2010), byl popsán také na modelu neonatální AC u potkana (Sedmera et al., 2003b). V této práci byla zvířata dle rozvoje fenotypu dělena do tří skupiny, tedy mírný, střední a těžký. I v našich datech jsme zaznamenali fenotypovou heterogenitu. Zvířata jsme rozdělili na skupinu se středně rozvinutým fenotypem ( $HW/BW < 5$ ) a skupinu se závažnou kardiomegalií ( $HW/BW \geq 5$ ). Skupinu zvířat s mírným fenotypem jsme nepozorovali. Tento rozdíl by mohl být dán rozdílnou délkou experimentu. Oproti 12 týdnům, ve kterých jsme experiment ukončili my, Sedmera et al. (2003b) srdce odebíral 21. postnatální den. Lze tedy předpokládat, že v našich datech došlo u všech zvířat s provedenou AC k rozvinutí závažnější formy patologie.

Z naměřených dat usuzujeme, že u skupiny se středně rozvinutým fenotypem (AC I) bylo srdeční selhání v kompenzovaném stádiu, a naopak u AC II, s  $HW/BW \geq 5$ , byl zaznamenán přechod do dekompenzovaného stavu. O kompenzovaném stádiu AC I svědčí fakt, že i přes statisticky významně zvýšenou hmotnost srdce nedošlo v průběhu experimentálního období ke snížení přírůstků zvířat. Oproti tomu u AC II zvířat o dekompenzaci stavu u skupiny svědčil krom výrazného zvýšení hmotnosti srdce rovněž pokles váhových přírůstků, snížení SF a hmotnost plic.

Z humánní medicíny je známo, že jednu z adaptivních změn představuje u srdečního selhání zvýšení SF (mechanismem vyšší aktivity RAS systému a sympatiku) za účelem udržení srdečního výdeje (Borovac et al., 2020). Avšak během progresu dochází k maladaptaci a postupnému snížením sensitivity  $\beta$ -adrenergických receptorů k cirkulujícím katecholaminům i downregulaci a snížení denzity  $\beta$ -adrenergických receptorů (Bristow et al., 1982). To je provázeno zhoršením čerpací funkce srdce a poklesem původně zvýšené SF do či pod fyziologické rozmezí (Borovac et al., 2020). Pozorovaná nižší hodnota SF u AC II o 13 % oproti Sham zvířatům svědčí o dekompenzaci stavu.

Rovněž signifikantně vyšší normalizovaná váha plic oproti Sham skupině i AC I zvířatům vypovídá o dekompenzaci srdečního selhání u AC II skupiny. Vzhledem k tomu, že srdeční komory fungují jako sériově zapojená pumpa, vede nedostatečnost LK ke stagnaci krve v plicích. Zvýšený tlak se projeví v kapilárním systému plic a vede k uvolňování kapaliny z kapilár (Tanai and Frantz, 2015). Rozvíjející se plicní edém zvýší vlhkou hmotnost plic. Dlouhodobé změny na plicích v důsledku takového přetížení však vedou i k jejich remodelaci, což v publikaci popsal Chen et al. (2012), kde na myším modelu tlakového přetížení srdce popsal změny ve hmotnosti plic společně s výrazným rozvojem fibrózy ve tkáni. Remodelace plic vedla až k třikrát větší hmotnosti plic, která byla na obsahu vody nezávislá.

## 6.2 Výskyt arytmií

Tlakové přetížení v dospělosti se silně pojí s arytmiemi. Tento fakt byl prokázán jak v klinických studiích (Boulaksil et al., 2010), tak v experimentálních modelech (Boulaksil et al., 2016). Pro-arytmogenní fenotyp se rozvíjí v důsledku zpomalení rychlosti šíření vzruchu a zvýšení elektrické heterogenity ve tkáni. Zodpovědnými mechanismy těchto změn jsou narušení membránové excitability, buněčného spojení v důsledku změn na úrovni Cx43 a rozvoj fibrózy ve tkáni (Lilly and Braunwald, 2012). Další zdroj ektopických vzruchů v remodelovaném srdci jsou Purkyňova vlákna (Haissaguerre et al., 2016). V naší práci jsme na EKG záznamu nezaznamenali výskyt komorových arytmií. Tento fakt přikládáme nízkému počtu měřených zvířat. Byl však zaznamenán rozvoj pro-arytmogenního fenotypu. Z EKG parametrů vyplývá, že došlo k prodloužení QT i QTc intervalu o 29 %, respektive 22 %. Změny v jednotlivých pro-arytmogenních faktorech jsou rozebrány níže.

## 6.3 Změny na úrovni elektrické remodelace a Cx43

Elektrická remodelace a s ní spojené změny mohou v počátečních stádiích tlakového přetížení vést ke zrychlení elektrického vedení. S postupem patologie se elektrická remodelace stává spíše negativní a vede ke vzniku arytmií (Winckels and Vos, 2008). Tento jev sledoval Formigli et al. (2003) u prasat po navození objemového přetížení. Do 4 dní od operace pozoroval nárůst exprese Cx43 a následně s rozvojem hypertrofie sledoval pokles v jeho expresi. Podobný jev popsal i Jin et al. (2010) u potkanů s tlakovým přetížením navozeným transverzální AC. Po počátečním nárůstu exprese Cx43 do 4 týdnů od AC autoři pozorovali výrazný pokles Cx43 i p-Cx43<sup>S368</sup> spojený s postupným zpomalováním rychlosti vedení vzruchu. Ke zpomalení propagace vzruchu v pozdějších fázích dále napomáhá rozvoj fibrózy (Kessler et al., 2014). Změny Cx43 jsou spojovány s pro-arytmogenní remodelací i u dospělých tlakově přetížených lidských srdcí (Kostin et al., 2004). Změny v míře exprese a lokalizace Cx43 byly popsány i u experimentálních modelů, u kterých vedly k disperzi a snížení rychlosti vedení. To se projevilo na zvýšené náchylnosti ke komorovým arytmiím (Akar et al., 2004; Boulaksil et al., 2010; Kitamura et al., 2002; Kostin et al., 2004)). Přestože počáteční nárůst exprese Cx43 není pozorován vždy, zejména v případech objemové přetížení srdce jej některé práce nepopisovali (Benes et al., 2011), snížení exprese Cx43 je s rozvojem dekompenzace stavu spojováno vždy (Fontes et al., 2012; Formigli et al., 2003). A to i v případě objemového přetížení srdce (Benes et al., 2011; Sedmera et al., 2016). V této práci jsme zaznamenali u AC II, která dekompenzovanému stavu odpovídá, signifikantně sníženou hladinu Cx43. Výsledná exprese Cx43 byla u AC II oproti kontrolám snížena o 15 %.

Podobný trend počátečního nárůstu a následného poklesu exprese v důsledku tlakového přetížení srdce byl pozorován i u fosforylované formy Cx43 v pozici Ser368 (Jin et al., 2010). Fosforylace na této pozici pomocí PKC-ε byla asociována se stabilizací GJ udržující end-to-end propojení buněk (Johansen et al., 2011; Kohutova et al., 2019). Výrazné snížení v pokročilém rozvoji LVH bylo popisováno také u potkaního modelu objemového přetížení srdce (Benes et al., 2011). Podobně jsme v naší práci pozorovali signifikantní korelaci mezi expresí p-Cx43<sup>S368</sup> a závažnosti fenotypu (na základě HW/BW). Podobnou závislost poklesu exprese p-Cx43<sup>S368</sup> s progresí fenotypu popsal i Sedmera et al. (2016) na modelu objemově přetíženého srdce. V této práci byl popsán podobný trend závislosti i u celkového Cx43. Ten v našich výsledcích pozorován nebyl. Možné vysvětlení vychází ze zvoleného modelu, tedy hypertrofie v důsledku objemového přetížení srdce oproti tlakovému přetížení v našem případě a také z faktu, že indukce byla v naší studii provedena v neonatálním období.

Snížení exprese Cx43 je často doprovázeno i změnou jeho lokalizace (Kessler et al., 2014). Redistribuce Cx43 z interkalárních disků na obvod buněk narušuje end-to-end propojení buněk a vede ke snížení rychlosti vedení, disperzi signálu ve tkáni a vzniku funkčního bloku u re-entry arytmií (Boulaksil et al., 2010; Kitamura et al., 2002; Kostin et al., 2004). Například Akar et al. (2004) u psů se srdečním selháním zaznamenal až dvakrát vyšší výskyt lateralizovaného Cx43 oproti kontrolní skupině. Lateralizace a heterogenita exprese Cx43 jsou asociovány s arytmiemi jak u humánních studií, tak u zvířecích modelů, a to dokonce i v případě nenarušené exprese Cx43 (Boulaksil et al., 2016, 2010). My jsme na základě kolokalizace Cx43 a N-cadherinu (Kostin et al., 2004; Matsuda et al., 2006; Sykora et al., 2019) změny v lateralizaci Cx43 pozorovali jen v některých oblastech myokardu. Ložiskové změny v souvislosti s Cx43 nejsou u srdečního selhání výjimečné. Podobně jako v našich datech, byly u lidských vzorků oblasti s výrazně nižší expresí Cx43 pozorovány jen u srdcí s nezávažnějším fenotypem (Kostin et al., 2004), a je tedy obtížné je kvantifikovat.

#### 6.4 Rozvoj fibrózních změn v důsledku tlakového přetížení

Fibrózní remodelace je adaptivní mechanismus vyrovnávající systolické napětí ve stěně komory. Je popisována u přetížení srdce v dospělosti (Swynghedauw, 1999). Zajímavostí je, že u většiny modelů není součástí fenotypu objemového přetížení (Ryan et al., 2007). I tak je objemové zatížení spojované s rozvojem arytmií (Sedmera et al., 2016). Zpomalení rychlosti vedení v důsledku downregulace a defosforylace Cx43 (Benes et al., 2011) spolu prostorovými změnami činí myokard komory náchylnější k re-entry aktivaci.

Naopak u srdečního selhání z tlakových příčin je fibrózní remodelace přítomna (Boulaksil et al., 2010; Xia et al., 2009). Na myším modelu bylo ukázáno, že iniciálně se jedná o reaktivní fibrózu (Isoyama and Nitta-Komatsubara, 2002). Tento typ vzniká v důsledku vyšší produkce kolagenu než jeho spotřeby a zahrnuje intersticiální a difuzní fibrózní změny (Kessler et al., 2014). Větší množství kolagenu lokalizované v mezibuněčném prostoru pak vede k narušení elektrického přenosu a je tedy pro-arytmogenní (Rohr, 2009). S progresem patologie se může stávat výskyt kolagenu ve tkáni heterogenní (Isoyama and Nitta-Komatsubara, 2002). V naší práci jsme krom perivaskulárního prostoru pozorovali víceméně homogenní distribuci kolagenu ve tkáni. To může souviset s méně závažným rozvojem fibrózy pozorované dříve jak na potkaním modelu (Kolář et al., 1998), tak na myším modelu (Mohammadi et al., 2019). V naší práci byla zaznamenána větší míra fibrózy než ve zmiňovaných studiích, tento rozdíl mohl vzniknout v důsledku různé délky experimentů. U publikace Kolář et al. (1998) byl experiment ukončen po 8 týdnech, tedy o 4 týdny dříve než v naší studii. Ve studii Mohammadi et al. (2019) byl experiment ukončen 2. týden po indukci. Při delším působení tlakových změn v naší studii lze předpokládat, že rozvoj fibrózní remodelace bude větší.

## 6.5 Remodelace Purkyňových vláken

Při tlakovém přetížení srdce v dospělosti nedochází pouze k hypertrofii pracovního myokardu, ale také k hypertrofii Purkyňových vláken. Ty byly popsány jak na modelu tlakově-objemového zatížení u králíka (Logantha et al., 2021), tak i u transverzální AC s fluorescenčně označenými Purkyňovými vlákny pomocí transgenního myšího modelu Cx40<sup>EGFP/+</sup> (Harris et al., 2012). Zajímavé je, že hypertrofie Purkyňových vláken v důsledku tlakových změn byla spojena s remodelací vedoucí ke změnám ve vedení vzruchu (Harris et al., 2012). Vzhledem k faktu, že Purkyňova vlákna byla označena jako zdroj vzniku arytmí u jiných srdečních patologií, jako je remodelace po infarktu myokardu (Bogun et al., 2006; Boyden, 2003), lze předpokládat, že Purkyňova vlákna hrají určitou roli v arytmogenezi také po tlakovém přetížení (Logantha et al., 2021). Na myším modelu byl sledován nárůst Cx40, který byl asociován s pozorovanou změnou aktivace komory. Autoři rovněž spekulovali o zrychlení vedení vzruchu v systému Purkyňových vláken vzhledem k zvýšené expresi Cx40 (Harris et al., 2012). Naopak u králíka s kombinovaným tlakově-objemovým přetížením vedoucím k srdečnímu selhání, nebyly změny v expresi Cx40 zaznamenány. Autoři v této publikaci připisovali pozorované prodloužení doby vedení vzruchu komorou, detekované jako prodloužení QRS komplexu na EKG, komplexním změnám exprese v Purkyňových vláknech. Konkrétně došlo ke změně v mRNA 40 iontových pumpu, transportérů, Cx

a systému regulujících pohyb vápníku v buňce (Logantha et al., 2021). Ty následně vedly k prodloužení AP a mohly by být podkladem pro EAD, podobně jak bylo pozorováno u remodelovaných Purkyňových vláken po infarktu myokardu (Boyden, 2003).

V naší práci jsme na mikroskopických řezech rovněž zaznamenali zvětšení plochy volně běžících Purkyňových vláken v důsledku tlakové zátěže. U AC II skupiny jsme pozorovali signifikantní nárůst ve velikosti Purkyňových vláken oproti kontrolní skupině o 75 %. Podobně byla zvětšená Purkyňova vlákna detekována u kardiomegalie způsobené zvětšením tepového objemu u kuřecího hypotermického modelu (Skuhrová, 2018). Přestože jsme v naší práci neměřili velikost jednotlivých buněk, tak vzhledem k faktu, že Purkyňova vlákna již v průběhu vývoje vykazují výrazně nižší proliferační aktivitu než buňky pracovního myokardu (Sedmera et al., 2003a), připisujeme naměřené rozdíly ve velikosti hypotrofii jednotlivých buněk. Otázka změn v expresi Cx40 a rychlosti šíření vzruchu podílející se poruchách rytmu bude předmětem dalšího studia.

## 7 Závěr

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že indukce tlakového přetížení v časném neonatálním období má vliv na výsledný kardiomegalický fenotyp a elektrickou remodelaci dospělých zvířat.

I přes signifikantní prodloužení QT a QTc intervalu na EKG, záznamy neodhalily žádné spontánně se vyskytující komorové arytmie. Nicméně je třeba vzít v úvahu, že počet zvířat, u kterých byl výskyt arytmií analyzován, nemusel být pro jejich zaznamenání dostačující. Vzhledem ke změnám ve zkoumaných pro-arytmogenních faktorech lze předpokládat projevení fenotypu v početnější skupině měřených zvířat, popř. při jejich přímé indukci.

Ze sledovaných faktorů nežádoucí elektrické remodelace myokardu jsme zaznamenali pokles exprese jak Cx43, tak i p-Cx43<sup>S368</sup>. Podobně jako na modelu objemového přetížení v dospělosti, byla v případě p-Cx43<sup>S368</sup> pozorována signifikantní závislost exprese na závažnosti kardiomegalie. Naopak, a na rozdíl od objemového přetížení srdce v dospělosti, v případě Cx43 se závislost na rozvoji fenotypu neprojevila. Pokles exprese Cx43 byl mírnější než u zmiňovaného modelu. Součástí pozorované remodelace myokardu byl i nárůst fibrózy. Společně tyto změny vytváří v myokardu pro-arytmogenní substrát, v důsledku dispenze a zpomalení rychlosti šíření vzruchu vedoucí k funkčnímu bloku a re-entry.

V souladu s několika pracemi, které se věnují remodelaci Purkyňových vláken v tlakově přetíženém myokardu, jsme zjistili zvětšení Purkyňových vláken. Zda pozorovaná změna byla větší než v případě indukce tlakové zátěže v dospělosti, nebylo možné určit pro omezený počet studií. Tato otázka bude spolu s funkčním dopadem pozorovaných změn předmětem následných studií.

Dle našich výsledků lze na závěr říct, že indukce tlakového přetížení srdce v neonatálním období se v dospělosti projevila pro-arytmogenní remodelací myokardu, ale spontánně se vyskytující arytmie pozorovány nebyly.

## 8 Literatura

- Affolter, J.T., Ghanayem, N.S., 2014. Preoperative management of the neonate with critical aortic valvar stenosis\*. *Cardiology in the Young* 24, 1111–1116. <https://doi.org/10.1017/S1047951114002029>
- Akar, F.G., Spragg, D.D., Tunin, R.S., Kass, D.A., Tomaselli, G.F., 2004. Mechanisms Underlying Conduction Slowing and Arrhythmogenesis in Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation Research* 95, 717–725. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000144125.61927.1c>
- Antzelevitch, C., Burashnikov, A., 2011. Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Card Electrophysiol Clin* 3, 23–45. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2010.10.012>
- Anversa, P., Olivetti, G., Capasso, J.M., 1991. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 68, 7D-16D.
- Aschermann, M., Widimský, P., Veselka, J., Linhart, A., Krupička, J., Petrášek, J., 2004. *Kardiologie*. Galén, Praha.
- Bacharova, L., Estes, E.H., 2017. Left Ventricular Hypertrophy by the Surface ECG. *Journal of Electrocardiology* 50, 906–908. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2017.06.006>
- Badrawi, N., Hegazy, R.A., Tokovic, E., Lotfy, W., Mahmoud, F., Aly, H., 2009. Arrhythmia in the Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatr Cardiol* 30, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00246-008-9355-4>
- Barker, D.J., 2000. In utero programming of cardiovascular disease. *Theriogenology* 53, 555–574. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00258-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00258-7)
- Barold, S.S., Stroobandt, R., Herweg, B., 2012. Escape-echo bigeminy. *J Electrocardiol* 45, 167–169. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2011.11.008>
- Benes, J., Ammirabile, G., Sankova, B., Campione, M., Krejci, E., Kvasilova, A., Sedmera, D., 2014. The role of connexin40 in developing atrial conduction. *FEBS Letters* 588, 1465–1469. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.032>
- Benes, J., Melenovsky, V., Skaroupkova, P., Pospisilova, J., Petrak, J., Cervenka, L., 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, 102–111. <https://doi.org/10.1002/ar.21280>
- Bogun, F., Good, E., Reich, S., Elmouchi, D., Igic, P., Tschopp, D., Dey, S., Wimmer, A., Jongnarangsin, K., Oral, H., Chugh, A., Pelosi, F., Morady, F., 2006. Role of Purkinje fibers in post-infarction ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 48, 2500–2507. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.062>
- Borovac, J.A., D'Amario, D., Bozic, J., Glavas, D., 2020. Sympathetic nervous system activation and heart failure: Current state of evidence and the pathophysiology in the light of novel biomarkers. *World J Cardiol* 12, 373–408. <https://doi.org/10.4330/wjc.v12.i8.373>
- Boulaksil, M., Bierhuizen, M.F.A., Engelen, M.A., Stein, M., Kok, B.J.M., van Amersfoort, S.C.M., Vos, M.A., van Rijen, H.V.M., de Bakker, J.M.T., van Veen, T.A.B., 2016. Spatial Heterogeneity of Cx43 is an Arrhythmogenic Substrate of Polymorphic Ventricular Tachycardias during Compensated Cardiac Hypertrophy in Rats. *Front Cardiovasc Med* 3, 5. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2016.00005>
- Boulaksil, M., Winckels, S., Engelen, M., Stein, M., van Veen, T., Jansen, J., Linnenbank, A., Bierhuizen, M., Groenewegen, W., Oosterhout, M.F.M., Kirkels, J., Jonge, N., Varro, A., Vos, M., Bakker, J.M.T., van Rijen, H., 2010. Heterogeneous Connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. *European journal of heart failure* 12, 913–21. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfq092>
- Boyden, P., 2003. Nonuniform Ca<sup>2+</sup> transients in arrhythmogenic Purkinje cells that survive in the infarcted canine heart. *Cardiovascular Research* 57, 681–693. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00725-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00725-3)
- Boyden, P.A., Dun, W., Robinson, R.B., 2016. Cardiac Purkinje fibers and Arrhythmias; The GK Moe award Lecture 2015. *Heart Rhythm* 13, 1172–1181. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2016.01.011>
- Boyden, P.A., Hirose, M., Dun, W., 2010. Cardiac Purkinje cells. *Heart Rhythm* 7, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.09.017>



- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bristow, M.R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R.S., Sageman, W.S., Lurie, K., Billingham, M.E., Harrison, D.C., Stinson, E.B., 1982. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307, 205–211.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM198207223070401>
- Carlson, A.J., 1907. On the mechanism of the refractory period in the heart. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 18, 71–88. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1907.18.1.71>
- Chen, Y., Guo, H., Xu, D., Xu, X., Wang, H., Hu, X., Lu, Z., Kwak, D., Xu, Y., Gunther, R., Huo, Y., Weir, E.K., 2012. Left Ventricular Failure Produces Profound Lung Remodeling and Pulmonary Hypertension in Mice. *Hypertension* 59, 1170–1178. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186072>
- Čihák, R., 2016. *Anatomie 3: Třetí, upravené a doplněné vydání*. Grada Publishing, a.s.
- Clark, E.B., Hu, N., 1982. Developmental hemodynamic changes in the chick embryo from stage 18 to 27. *Circulation Research* 51, 810–815. <https://doi.org/10.1161/01.RES.51.6.810>
- Claycomb, W.C., 1977. Cardiac-muscle hypertrophy. Differentiation and growth of the heart cell during development. *Biochem J* 168, 599–601.
- Cohn, J.N., Ferrari, R., Sharpe, N., 2000. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 569–582.
- Crowley, S.D., Coffman, T.M., 2012. Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* 318, 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.023>
- Curtis, M.J., Hancox, J.C., Farkas, A., Wainwright, C.L., Stables, C.L., Saint, D.A., Clements-Jewery, H., Lambiase, P.D., Billman, G.E., Janse, M.J., Pugsley, M.K., Ng, G.A., Roden, D.M., Camm, A.J., Walker, M.J.A., 2013. The Lambeth Conventions (II): guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther* 139, 213–248.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.008>
- de Azevedo, I.M., Watanabe, Y., Dreifus, L.S., 1973. Atrioventricular Junctional Rhythm: Classification and Clinical Significance. *Chest* 64, 732–740. <https://doi.org/10.1378/chest.64.6.732>
- de Bakker, J.M., van Capelle, F.J., Janse, M.J., Wilde, A.A., Coronel, R., Becker, A.E., Dingemans, K.P., van Hemel, N.M., Hauer, R.N., 1988. Reentry as a cause of ventricular tachycardia in patients with chronic ischemic heart disease: electrophysiologic and anatomic correlation. *Circulation* 77, 589–606. <https://doi.org/10.1161/01.cir.77.3.589>
- Delmar, M., Laird, D.W., Naus, C.C., Nielsen, M.S., Verselis, V.K., White, T.W., 2018. Connexins and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029348>
- Delmar, M., Makita, N., 2012. Cardiac connexins, mutations and arrhythmias. *Current Opinion in Cardiology* 27, 236–241. <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e328352220e>
- Detterich, J.A., 2017. Myocardial fibrosis: the heart of diastole? *Blood* 130, 104–105.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786335>
- DiFrancesco, D., 2006. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacological Research, The role of the pacemaker current If in cardiovascular pharmacology* 53, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.03.006>
- Dolphin, A.C., 2018. Voltage-gated calcium channels: Their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci Adv* 2. <https://doi.org/10.1177/2398212818794805>
- Duan, D.D., 2010. A Leakage Leads to Failure: Roles of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Leak via RyR2 in Heart Failure Progression. *Hypertension* 55, 849–851.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147991>
- Durdil, V., 2010. Komorové arytmie a náhlá srdeční smrt u hypertrofické kardiomyopatie. *Cor et Vasa* 52, 441–446.
- Elektrokardiogram, 2021. . Wikipedie.
- Feher, J.J., 2012. *Quantitative Human Physiology: An Introduction*. Academic Press.

- Flanagan, M.F., Fujii, A.M., Colan, S.D., Flanagan, R.G., Lock, J.E., 1991. Myocardial angiogenesis and coronary perfusion in left ventricular pressure-overload hypertrophy in the young lamb. Evidence for inhibition with chronic protamine administration. *Circ. Res.* 68, 1458–1470.
- Fontes, M.S.C., van Veen, T.A.B., de Bakker, J.M.T., van Rijen, H.V.M., 2012. Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, The Communicating junctions, composition, structure and characteristics Part 1* 1818, 2020–2029. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.039>
- Formigli, L., Ibba-Manneschi, L., Perna, A.M., Pacini, A., Polidori, L., Nediani, C., Modesti, P.A., Nosi, D., Tani, A., Celli, A., Neri-Serneri, G.G., Quercioli, F., Zecchi-Orlandini, S., 2003. Altered Cx43 expression during myocardial adaptation to acute and chronic volume overloading. *Histol Histopathol* 18, 359–369. <https://doi.org/10.14670/HH-18.359>
- Frangogiannis, N.G., 2019. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Molecular Aspects of Medicine, Pathophysiology of Organ and Tissue Fibrosis* 65, 70–99. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.07.001>
- Frohlich, E.D., Susic, D., 2012. Pressure overload. *Heart Fail Clin* 8, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2011.08.005>
- Furihata, T., Kinugawa, S., Takada, S., Fukushima, A., Takahashi, M., Homma, T., Masaki, Y., Tsuda, M., Matsumoto, J., Mizushima, W., Matsushima, S., Yokota, T., Tsutsui, H., 2016. The experimental model of transition from compensated cardiac hypertrophy to failure created by transverse aortic constriction in mice. *Int J Cardiol Heart Vasc* 11, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2016.03.007>
- Ganong, W.F., 2005. *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Galén, Praha.
- Giordano, F.J., 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115, 500–508. <https://doi.org/10.1172/JCI200524408>
- Gogiraju, R., Bochenek, M.L., Schäfer, K., 2019. Angiogenic Endothelial Cell Signaling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Front Cardiovasc Med* 6. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00020>
- Goldin, A.L., 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current Opinion in Neurobiology* 13, 284–290. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00065-5](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00065-5)
- González, A., Schelbert, E.B., Díez, J., Butler, J., 2018. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71, 1696–1706. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.021>
- Gourdie, R.G., Green, C.R., Severs, N.J., Anderson, R.H., Thompson, R.P., 1993. Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart. *Circulation Research* 72, 278–289. <https://doi.org/10.1161/01.RES.72.2.278>
- Grim, M., Druga, R., 2016. *Základy anatomie. 2., 2.,.*
- Guo, Y., Wang, Z., Qin, X., Xu, J., Hou, Z., Yang, H., Mao, X., Xing, W., Li, X., Zhang, X., Gao, F., 2018. Enhancing fatty acid utilization ameliorates mitochondrial fragmentation and cardiac dysfunction via rebalancing optic atrophy 1 processing in the failing heart. *Cardiovasc Res* 114, 979–991. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy052>
- Gyöngyösi, M., Winkler, J., Ramos, I., Do, Q.-T., Firat, H., McDonald, K., González, A., Thum, T., Díez, J., Jaisser, F., Pizard, A., Zannad, F., 2017. Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *Eur. J. Heart Fail.* 19, 177–191. <https://doi.org/10.1002/ejhf.696>
- Haïssaguerre, M., Shoda, M., Jaïs, P., Nogami, A., Shah, D.C., Kautzner, J., Arentz, T., Kalushe, D., Lamaison, D., Griffith, M., Cruz, F., de Paola, A., Gaïta, F., Hocini, M., Garrigue, S., Macle, L., Weerasooriya, R., Clémenty, J., 2002. Mapping and Ablation of Idiopathic Ventricular Fibrillation. *Circulation* 106, 962–967. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000027564.55739.B1>
- Haïssaguerre, M., Vigmond, E., Stuyvers, B., Hocini, M., Bernus, O., 2016. Ventricular arrhythmias and the His–Purkinje system. *Nat Rev Cardiol* 13, 155–166. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.193>
- Hall, Guyton, 2015. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Health Sciences.
- Hamplová, B., Novák, F., Kolář, F., Nováková, O., 2010. Transient upregulation of protein kinase C in pressure-overloaded neonatal rat myocardium. *Physiol Res* 59, 25–33. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931638>

- Harris, B.S., Baicu, C.F., Haghshenas, N., Kasiganesan, H., Scholz, D., Rackley, M.S., Miquerol, L., Gros, D., Mukherjee, R., O'Brien, T.X., 2012. Remodeling of the peripheral cardiac conduction system in response to pressure overload. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H1712-1725. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00621.2011>
- Hendrych, M., Olejníčková, V., Nováková, M., 2016. Calcium versus strontium handling by the heart muscle. *Gen. Physiol. Biophys.* 35, 13–23. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2015026](https://doi.org/10.4149/gpb_2015026)
- Hrdlička, J., Neckář, J., Papoušek, F., Husková, Z., Kikerlová, S., Vaňourková, Z., Vernerová, Z., Akat, F., Vašínová, J., Hammock, B.D., Hwang, S.H., Imig, J.D., Falck, J.R., Červenka, L., Kolář, F., 2019. Epoxyeicosatrienoic Acid-Based Therapy Attenuates the Progression of Postischemic Heart Failure in Normotensive Sprague-Dawley but Not in Hypertensive Ren-2 Transgenic Rats. *Front. Pharmacol.* 10, 159. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00159>
- Isoyama, S., Nitta-Komatsubara, Y., 2002. Acute and chronic adaptation to hemodynamic overload and ischemia in the aged heart. *Heart Fail Rev* 7, 63–69. <https://doi.org/10.1023/a:1013701923065>
- Issa, Z.F., 2018. *Clinical arrhythmology and electrophysiology: a companion to Baunwald's heart disease*, 3rd edition. ed. Elsevier, Philadelphia, MO.
- Jabr, R.I., Hatch, F.S., Salvage, S.C., Orłowski, A., Lampe, P.D., Fry, C.H., 2016. Regulation of gap junction conductance by calcineurin through Cx43 phosphorylation: implications for action potential conduction. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 468, 1945–1955. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1885-7>
- Jakoi, E., Carbrey, J., 2015. *Introductory Human Physiology*. Lulu.com.
- Jansen, J.A., van Veen, T.A.B., de Bakker, J.M.T., van Rijen, H.V.M., 2010. Cardiac connexins and impulse propagation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.018>
- Jin, H., Chemaly, E.R., Lee, A., Kho, C., Hadri, L., Hajjar, R.J., Akar, F.G., 2010. Mechanoelectrical remodeling and arrhythmias during progression of hypertrophy. *FASEB j.* 24, 451–463. <https://doi.org/10.1096/fj.09-136622>
- Johansen, D., Cruciani, V., Sundset, R., Ytrehus, K., Mikalsen, S.-O., 2011. Ischemia induces closure of gap junctional channels and opening of hemichannels in heart-derived cells and tissue. *Cell Physiol Biochem* 28, 103–114. <https://doi.org/10.1159/000331719>
- Johnson, D.M., Antoons, G., 2018. Arrhythmogenic Mechanisms in Heart Failure: Linking  $\beta$ -Adrenergic Stimulation, Stretch, and Calcium. *Front. Physiol.* 9, 1453. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01453>
- Kafer, C.J., 1991. Internodal pathways in the human atria: a model study. *Comput Biomed Res* 24, 549–563. [https://doi.org/10.1016/0010-4809\(91\)90039-y](https://doi.org/10.1016/0010-4809(91)90039-y)
- Kamp, T.J., Hell, J.W., 2000. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 87, 1095–1102. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.12.1095>
- Kayar, S.R., Weiss, H.R., 1992. Diffusion distances, total capillary length and mitochondrial volume in pressure-overload myocardial hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24, 1155–1166.
- Kessler, E.L., Boulaksil, M., van Rijen, H.V.M., Vos, M.A., van Veen, T.A.B., 2014. Passive ventricular remodeling in cardiac disease: focus on heterogeneity. *Front Physiol* 5, 482. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00482>
- Kho, C., Lee, A., Hajjar, R.J., 2012. Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling—targets for heart failure therapy. *Nat Rev Cardiol* 9, 717–733. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.145>
- Kidder, G.M., Mhawi, A.A., 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123, 613–620. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230613>
- Kitamura, H., Ohnishi, Y., Yoshida, A., Okajima, K., Azumi, H., Ishida, A., Galeano, E.J., Kubo, S., Hayashi, Y., Itoh, H., Yokoyama, M., 2002. Heterogeneous Loss of Connexin43 Protein in Nonischemic Dilated Cardiomyopathy with Ventricular Tachycardia. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 13, 865–870. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2002.00865.x>
- Kohutova, J., Elsnicova, B., Holzerova, K., Neckar, J., Sebesta, O., Jezkova, J., Vecka, M., Vebr, P., Hornikova, D., Szeiffova Bacova, B., Egan Benova, T., Hlavackova, M., Tribulova, N., Kolar, F., Novakova, O., Zurmanova, J.M., 2019. Anti-arrhythmic Cardiac Phenotype Elicited by Chronic Intermittent Hypoxia

- Is Associated With Alterations in Connexin-43 Expression, Phosphorylation, and Distribution. *Front. Endocrinol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00789>
- Kolář, F., Papoušek, F., Pelouch, V., Ošťádal, B., Rakusan, K., 1998. Pressure Overload Induced in Newborn Rats: Effects on Left Ventricular Growth, Morphology, and Function. *Pediatric Research* 43, 521–526. <https://doi.org/10.1203/00006450-199804000-00014>
- Kostin, S., Dammer, S., Hein, S., Klovekorn, W.P., Bauer, E.P., Schaper, J., 2004. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res* 62, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.010>
- Kreuzberg, M.M., Schrickel, J.W., Ghanem, A., Kim, J.-S., Degen, J., Janssen-Bienhold, U., Lewalter, T., Tiemann, K., Willecke, K., 2006. Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5959–5964. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508512103>
- Kwak, B.R., Jongsma, H.J., 1996. Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol Cell Biochem* 157, 93–99. <https://doi.org/10.1007/BF00227885>
- Lajiness, J.D., Conway, S.J., 2012. The Dynamic Role of Cardiac Fibroblasts in Development and Disease. *J Cardiovasc Transl Res* 5, 739–748. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9394-3>
- Lampe, P.D., Lau, A.F., 2000. Regulation of Gap Junctions by Phosphorylation of Connexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384, 205–215. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2131>
- Lazzara, R., el-Sherif, N., Scherlag, B.J., 1973. Electrophysiological properties of canine Purkinje cells in one-day-old myocardial infarction. *Circ Res* 33, 722–734. <https://doi.org/10.1161/01.res.33.6.722>
- Li, G., Xiao, Y., Estrella, J.L., Ducsay, C.A., Gilbert, R.D., Zhang, L., 2003. Effect of Fetal Hypoxia on Heart Susceptibility to Ischemia and Reperfusion Injury in the Adult Rat. *Reprod. Sci.* 10, 265–274. [https://doi.org/10.1016/S1071-5576\(03\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S1071-5576(03)00074-1)
- Liebman, J., 1985. Are there internodal tracts? Yes. *International Journal of Cardiology* 7, 174–185. [https://doi.org/10.1016/0167-5273\(85\)90362-6](https://doi.org/10.1016/0167-5273(85)90362-6)
- Lilly, L.S., Braunwald, E., 2012. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Elsevier Health Sciences.
- Logantha, S.J.R.J., Cai, X.J., Yanni, J., Jones, C.B., Stephenson, R.S., Stuart, L., Quigley, G., Monfredi, O., Nakao, S., Oh, I.-Y., Starborg, T., Kitmitto, A., Vohra, A., Hutcheon, R.C., Corno, A.F., Jarvis, J.C., Dobrzynski, H., Boyett, M.R., Hart, G., 2021. Remodeling of the Purkinje Network in Congestive Heart Failure in the Rabbit. *Circulation: Heart Failure* 14, e007505. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007505>
- Lorell, B.H., 1995. Cardiac renin-angiotensin system: role in development of pressure-overload hypertrophy. *Can J Cardiol* 11 Suppl F, 7F-12F.
- Mann, D.L., 2003. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 81–101. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142249>
- Matsuda, T., Fujio, Y., Nariai, T., Ito, T., Yamane, M., Takatani, T., Takahashi, K., Azuma, J., 2006. N-cadherin signals through Rac1 determine the localization of connexin 43 in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 40, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.12.010>
- Mayer, A.G., 1906. *Rhythmical pulsation in Scyphomedusae*. University of Michigan Library.
- Mines, G.R., 1913. On dynamic equilibrium in the heart. *J Physiol* 46, 349–383. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1913.sp001596>
- Miquerol, L., Dupays, L., Théveniau-Ruissy, M., Alcoléa, S., Jarry-Guichard, T., Abran, P., Gros, D., 2003. Gap junctional connexins in the developing mouse cardiac conduction system. *Novartis Found Symp* 250, 80–98; discussion 98-109, 276–279. <https://doi.org/10.1002/0470868066.ch6>
- Mohammadi, M., Abouissa, A., Azizah, I., Xie, Y., Cordero, J., Shirvani, A., Gigina, A., Engelhardt, M., Trogisch, F.A., Geffers, R., Dobрева, G., Bauersachs, J., Heineke, J., 2019. Induction of cardiomyocyte proliferation and angiogenesis protects neonatal mice from pressure overload-associated maladaptation. *JCI Insight* 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128336>
- Nadruz, W., 2015. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens* 29, 1–6. <https://doi.org/10.1038/jhh.2014.36>

- Netuka, I., Szarszoi, O., Maly, J., Besik, J., Neckar, J., Kolar, F., Ostadalova, I., Pirk, J., Ostadal, B., 2006. Effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to acute ischaemia in adult male and female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 714–719. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04423.x>
- Nielsen, M.S., Axelsen, L.N., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., Holstein-Rathlou, N.-H., 2012. Gap Junctions. *Compr Physiol* 2. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110051>
- Noma, A., 1983. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147–148. <https://doi.org/10.1038/305147a0>
- Norton, G.R., Woodiwiss, A.J., Gaasch, W.H., Mela, T., Chung, E.S., Aurigemma, G.P., Meyer, T.E., 2002. Heart failure in pressure overload hypertrophy: The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 664–671. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01792-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01792-2)
- Novotny, J., Hrbasová, M., Kolář, F., Svoboda, P., 2003. Cardiomegaly induced by pressure overload in newborn rats is accompanied by altered expression of the long isoform of G $\alpha$  protein and deranged signaling of adenylyl cyclase. *Mol Cell Biochem* 245, 157–166. <https://doi.org/10.1023/A:1022828430565>
- Nuss, H.B., Käbb, S., Kass, D.A., Tomaselli, G.F., Marbán, E., 1999. Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. *Am J Physiol* 277, H80-91. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.1.H80>
- Olney, J.W., Tenkova, T., Dikranian, K., Qin, Y.-Q., Labruyere, J., Ikonomidou, C., 2002. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Developmental Brain Research* 133, 115–126. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(02\)00279-1](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(02)00279-1)
- Ošťádal, B., Vízek, M., 2003. *Patologická fyziologie srdce a cév*. Karolinum, Praha.
- Oyamada, M., Oyamada, Y., Takamatsu, T., 2005. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta* 1719, 6–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.002>
- Periasamy, M., Kalyanasundaram, A., 2007. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430–442. <https://doi.org/10.1002/mus.20745>
- Pogoda, K., Kameritsch, P., Retamal, M.A., Vega, J.L., 2016. Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision. *BMC Cell Biol* 17 Suppl 1, 11. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0099-3>
- Rajapakse, N.W., Johnston, T., Kiriazis, H., Chin-Dusting, J.P., Du, X.-J., Kaye, D.M., 2015. Augmented endothelial l-arginine transport ameliorates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy. *Exp. Physiol.* 100, 796–804. <https://doi.org/10.1113/EP085250>
- Refractory periods in cardiac cycle | McMaster Pathophysiology Review [WWW Document], n.d. URL <http://www.pathophys.org/physiology-of-cardiac-conduction-and-contractility/refractoryperiod/> (accessed 8.10.21).
- Rohr, S., 2009. Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias? *Heart Rhythm* 6, 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.02.038>
- Ronzhina, M., Olejnickova, V., Stracina, T., Novakova, M., Janousek, O., Hejc, J., Kolarova, J., Hlavacova, M., Paulova, H., 2017. Effect of increased left ventricle mass on ischemia assessment in electrocardiographic signals: rabbit isolated heart study. *BMC Cardiovasc Disord* 17, 216. <https://doi.org/10.1186/s12872-017-0652-9>
- Ryan, T.D., Rothstein, E.C., Aban, I., Tallaj, J.A., Husain, A., Lucchesi, P.A., Dell'Italia, L.J., 2007. Left ventricular eccentric remodeling and matrix loss are mediated by bradykinin and precede cardiomyocyte elongation in rats with volume overload. *J Am Coll Cardiol* 49, 811–821. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.06.083>
- Salman, I.M., 2015. Cardiovascular Autonomic Dysfunction in Chronic Kidney Disease: a Comprehensive Review. *Curr. Hypertens. Rep.* 17, 59. <https://doi.org/10.1007/s11906-015-0571-z>
- Šamánek, M., Voříšková, M., 1999. Congenital heart disease among 815,569 children born between 1980 and 1990 and their 15-year survival: a prospective Bohemia survival study. *Pediatr Cardiol* 20, 411–417. <https://doi.org/10.1007/s002469900502>

- Sankova, B., Benes, J., Krejci, E., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Miquerol, L., Sedmera, D., 2012. The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. *Cardiovascular Research* 95, 469–479. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs210>
- Sayer, G., Bhat, G., 2014. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiol Clin* 32, 21–32, vii. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2013.09.002>
- Scheinman, M.M., 2009. Role of the His-Purkinje system in the genesis of cardiac arrhythmia. *Heart Rhythm* 6, 1050–1058. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.03.011>
- Sedmera, D., Gourdie, R.G., 2014. Why do we have Purkinje fibers deep in our heart? *Physiol Res* 63, S9-18. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932686>
- Sedmera, D., Neckar, J., Benes, J., Pospisilova, J., Petrak, J., Sedlacek, K., Melenovsky, V., 2016. Changes in Myocardial Composition and Conduction Properties in Rat Heart Failure Model Induced by Chronic Volume Overload. *Front Physiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00367>
- Sedmera, D., Reckova, M., DeAlmeida, A., Coppen, S.R., Kubalak, S.W., Gourdie, R.G., Thompson, R.P., 2003a. Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 274A, 773–777. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10085>
- Sedmera, D., Thompson, R.P., Kolar, F., 2003b. Effect of increased pressure loading on heart growth in neonatal rats. *J Mol Cell Cardiol* 35, 301–309. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(03\)00011-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(03)00011-7)
- Shu, J., Zhou, J., Patel, C., Yan, G.-X., 2009. Pharmacotherapy of cardiac arrhythmias--basic science for clinicians. *Pacing Clin Electrophysiol* 32, 1454–1465. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2009.02526.x>
- Sidebotham, D., Le Grice, I.J., 2007. Chapter 1 - Physiology and Pathophysiology, in: Sidebotham, D., Mckee, A., Gillham, M., Levy, J.H. (Eds.), *Cardiothoracic Critical Care*. Butterworth-Heinemann, Philadelphia, pp. 3–27. <https://doi.org/10.1016/B978-075067572-7.50004-7>
- Singh, D., Akingbola, A., Ross-Ascuitto, N., Ascuitto, R., 2016. Electrocardiac effects associated with lithium toxicity in children: an illustrative case and review of the pathophysiology. *Cardiol Young* 26, 221–229. <https://doi.org/10.1017/S104795111500147X>
- Skuhrová, K., 2018. Vliv inkubační teploty na růst pracovního a převodního myokardu u kuřecího embrya (Diplomová práce). Univerzita Karlova, Praha. Prof. MUDr. David Sedmera, DSc.
- Srinivasan, C., Balaji, S., 2019. Neonatal supraventricular tachycardia. *Indian Pacing Electrophysiol J* 19, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.ipej.2019.09.004>
- Srinivasan, S., Strasburger, J., 2008. Overview of fetal arrhythmias. *Curr Opin Pediatr* 20, 522–531. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32830f93ec>
- Štejfá, M., 2007. *Kardiologie - 3., přepracované a doplněné vydání*. Grada Publishing a.s.
- Surget, E., Cheniti, G., Ramirez, F.D., Leenhardt, A., Nogami, A., Gandjbakhch, E., Extramiana, F., Hidden-Lucet, F., Pillois, X., Benoist, D., Krisai, P., Nakatani, Y., Nakashima, T., Takagi, T., Kamakura, T., André, C., Welte, N., Chauvel, R., Tixier, R., Duchateau, J., Pambrun, T., Derval, N., Jaïs, P., Sacher, F., Bernus, O., Hocini, M., Haïssaguerre, M., 2021. Sex differences in the origin of Purkinje ectopy initiating idiopathic ventricular fibrillation. *Heart Rhythm* S1547527121018658. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2021.07.007>
- Swynghedauw, B., 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 79, 215–262. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.215>
- Sykora, M., Szeiffova Bacova, B., Egan Benova, T., Barancik, M., Zurmanova, J., Rauchova, H., Weismann, P., Pavelka, S., Kurahara, L.H., Slezak, J., Soukup, T., Tribulova, N., 2019. Cardiac Cx43 and ECM Responses to Altered Thyroid Status Are Blunted in Spontaneously Hypertensive versus Normotensive Rats. *Int J Mol Sci* 20, E3758. <https://doi.org/10.3390/ijms20153758>
- Tanai, E., Frantz, S., 2015. Pathophysiology of Heart Failure, in: *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society, pp. 187–214. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140055>
- Tarazi, R.C., Levy, M.N., 1982. Cardiac responses to increased afterload. State-of-the-art review. *Hypertension* 4, 8–18.

- Temple, I.P., Inada, S., Dobrzynski, H., Boyett, M.R., 2013. Connexins and the atrioventricular node. *Heart Rhythm* 10, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2012.10.020>
- Timm, K.N., Perera, C., Ball, V., Henry, J.A., Miller, J.J., Kerr, M., West, J.A., Sharma, E., Broxholme, J., Logan, A., Savic, D., Dodd, M.S., Griffin, J.L., Murphy, M.P., Heather, L.C., Tyler, D.J., 2020. Early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by its cardiac metabolic signature assessed with hyperpolarized MRI. *Commun Biol* 3, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01440-z>
- Toure, A., Cabo, C., 2010. Effect of cell geometry on conduction velocity in a subcellular model of myocardium. *IEEE Trans Biomed Eng* 57, 2107–2114. <https://doi.org/10.1109/TBME.2010.2050064>
- Tse, G., 2016. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Arrhythm* 32, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2015.11.003>
- Varró, A., Lathrop, D.A., Hester, S.B., Nánási, P.P., Papp, J.G.Y., 1993. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* 88, 93–102. <https://doi.org/10.1007/BF00798257>
- Vassalle, M., 1977. The relationship among cardiac pacemakers. Overdrive suppression. *Circ Res* 41, 269–277. <https://doi.org/10.1161/01.RES.41.3.269>
- Verdejo, H.E., del Campo, A., Troncoso, R., Gutierrez, T., Toro, B., Quiroga, C., Pedrozo, Z., Munoz, J.P., Garcia, L., Castro, P.F., Lavandero, S., 2012. Mitochondria, myocardial remodeling, and cardiovascular disease. *Curr. Hypertens. Rep.* 14, 532–539. <https://doi.org/10.1007/s11906-012-0305-4>
- Verheule, S., Kaese, S., 2013. Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse models. *Front Pharmacol* 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00081>
- Walton, K.L., Johnson, K.E., Harrison, C.A., 2017. Targeting TGF- $\beta$  Mediated SMAD Signaling for the Prevention of Fibrosis. *Front Pharmacol* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00461>
- Wesley, K., 2016. *Huszar's Basic Dysrhythmias and Acute Coronary Syndromes: Interpretation and Management Text & Pocket Guide Package - E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Wiegerinck, R.F., Verkerk, A.O., Belterman, C.N., van Veen, T.A.B., Baartscheer, A., Ophhof, T., Wilders, R., de Bakker, J.M.T., Coronel, R., 2006. Larger Cell Size in Rabbits With Heart Failure Increases Myocardial Conduction Velocity and QRS Duration. *Circulation* 113, 806–813. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.565804>
- Winckels, S.K.G., Vos, M.A., 2008. Ventricular Electrical Remodeling in Compensated Cardiac Hypertrophy, in: Gussak, I., Antzelevitch, C., Wilde, A.A.M., Friedman, P.A., Ackerman, M.J., Shen, W.-K. (Eds.), *Electrical Diseases of the Heart: Genetics, Mechanisms, Treatment, Prevention*. Springer, London, pp. 305–315. [https://doi.org/10.1007/978-1-84628-854-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-84628-854-8_20)
- Wynn, T.A., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology* 214, 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Xia, Y., Lee, K., Li, N., Corbett, D., Mendoza, L., Frangogiannis, N.G., 2009. Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem Cell Biol* 131, 471–481. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0541-5>
- Yamada, K.A., Rogers, J.G., Sundset, R., Steinberg, T.H., Saffitz, J.E., 2003. Up-Regulation of Connexin45 in Heart Failure. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 14, 1205–1212. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2003.03276.x>
- Yamada, M., 2002. The Role of Muscarinic K<sup>+</sup> Channels in the Negative Chronotropic Effect of a Muscarinic Agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 681–687. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.2.681>
- Yu, W.C., Chen, S.A., Lee, S.H., Tai, C.T., Feng, A.N., Kuo, B.I., Ding, Y.A., Chang, M.S., 1998. Tachycardia-induced change of atrial refractory period in humans: rate dependency and effects of antiarrhythmic drugs. *Circulation* 97, 2331–2337. <https://doi.org/10.1161/01.cir.97.23.2331>