

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Vývojová a buněčná biologie



Mgr. František Vostárek

Vliv teploty na vznik arytmii během vývoje srdce

**Effect of temperature on arrhythmogenesis during heart
development**

Disertační práce

Vedoucí práce: Prof. MUDr. David Sedmera, DSc.

Praha 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně citoval a uvedl všechny použité informační zdroje. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému projektu Theses.cz za účelem kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 10. 10. 2017

František Vostárek

Podpis

Poděkování

V první řadě chci hluboce poděkovat mému školiteli prof. Davidu Sedmerovi, protože lepšího školitele jsem si nemohl přát. Děkuji mu za skvělé vedení, vstřícnost, neuvěřitelnou trpělivost, neustálou ochotu pomoci, za mnoho cenných rad a připomínek a za velkou pomoc při tvorbě publikací i této disertační práce. Také mnohokrát děkuji Jarmile Svatůňkové za velkou technickou i osobní podporu a za analýzu dat. Za provedení části experimentů *in ovo* děkuji Zuzaně Halašové. Dále děkuji za velkou podporu a ochotnou pomoc Barboře Šaňkové, Aleně Kvasilové, Elišce Krejčí, Veronice Olejníčkové, Martině Gregorovičové, Janě Vašínové, Marii Jindrákové a Kláře Krausové. Děkuji také Radce Kočkové, prof. Ericu Raddatzovi a Barboře Šaňkové za spolupráci při tvorbě publikací. Děkuji také Janu Neckářovi za kritické připomínky. Mnohokrát děkuji Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy a Katedře buněčné biologie za záštitu mého doktorského studia, za podporu a za možnost realizovat tuto práci. Děkuji Fyziologickému ústavu AV ČR a Anatomickému ústavu 1. lékařské fakulty za nezbytné zázemí a podporu, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. V neposlední řadě také ze srdce děkuji mé rodině a to zejména svým skvělým rodičům, Kamile, Lubošovi, Zdeničce, Máše a Kataríně za nekonečnou a obrovskou podporu.

Grantová podpora

Práce shrnutá v této disertaci vznikla za podpory grantů GA ČR P302/11/1308, 16-02972S, 13-12412S a GA UK 716214.

Abstrakt:

Cíle: Hlavním cílem této práce bylo podrobně popsat změny ve funkci izolovaného embryonálního kuřecího srdce v reakci na akutní změny teploty a stresové podmínky v prostředí *in vitro* společně s porovnáním reakce embryonálního srdce *in ovo*.

Metody: Změny ve funkci čtyřdenního kuřecího srdce v prostředí *in vitro* jsme pozorovali pomocí vysokorychlostního optického mapování intracelulární dynamiky kalcia při třech různých teplotách. Kontrolní teplota (normotermie) byla 37 °C, 34 °C – hypotermie a 40 °C – hypertermie. Pro porovnání jsme při stejných teplotách sledovali změny ve funkci srdce pomocí videomikroskopie v prostředí *in ovo*. Pro zjištění frekvenčních limitů jednotlivých srdečních segmentů jsme provedli experimenty s elektrickou stimulací *in ovo* a *in vitro*.

Výsledky: V pozorovaném teplotním rozmezí jsme pozorovali téměř lineární závislost sinusové frekvence na teplotě. Proti normotermii činila změna sinusové frekvence *in vitro* a *in ovo* při hypotermii i hypertermii přibližně 20%. Pokles teploty ze 37 °C na 34 °C *in vitro* nezpůsobil významné změny v amplitudě kalciových transientů, zatímco nárůst teploty ze 37 °C na 40 °C snížil amplitudy v síních a komorách o 35%, respektive 38%. V prostředí *in vitro* jsme pozorovali řadu spontánních arytmií již při normotermii, proti prostředí *in ovo*, kde se při všech teplotách arytmie téměř nevyskytovaly. Hypotermie *in vitro* přinesla arytmií nejméně, zatímco hypertermie výrazně navýšila četnost vzniku arytmií. Nejčastější arytmií *in vitro* byl atrioventrikulární (AV) blok (II. a III. stupně), který tvořil 56% všech pozorovaných arytmií. Popsali jsme různé typy AV bloků podle lokalizace blokády vedení vzruchu. Experimenty s elektrickou stimulací naznačily, že AV bloky byly způsobeny pravděpodobněji tkáňovou hypoxií než limitem AV kanálu převádět vysoké sinusové frekvence při tachykardiích. Lokalizovali jsme místo ektopické aktivity na předělu komory a výtokové části srdce. Na základě epikardiálních aktivačních map jsme popsali AV reentry.

Závěr: Změny teploty měly nejvýznamnější dopad na funkci pacemakeru a společně se stresem prostředí *in vitro* také na šíření vzruchu skrze AV kanál. Nejkritičtější oblastí pro šíření vzruchu byl předěl mezi AV kanálem a komorou, kde dochází k napojení pomalu vedoucí tkáň AV kanálu na rychle vedoucí síť trabekul komorového myokardu.

Klíčová slova: arytmie, AV kanál, blokáda vedení vzruchu, kuřecí embryo, optické mapování, teplota, vývoj srdce.

Abstract:

Aims: The main objective of this work was to analyze in detail the effects of acute temperature changes on the function of isolated chick embryonic heart *in vitro* in comparison with natural conditions *in ovo*.

Methods: The effects of temperature change (34 °C, 37 °C and 40 °C – hypo-, normo- and hyperthermia, respectively) on calcium dynamics in four days old isolated chick hearts *in vitro* were investigated by high-speed calcium optical imaging. For comparison and validation of *in vitro* measurements, experiments were also performed *in ovo* using videomicroscopy. Artificial electrical stimulation experiments were performed *in vitro* and *in ovo* to uncover conduction limits of different heart segments.

Results: We observed almost linear dependence of sinus frequency on temperature in our temperature range. Sinus frequency during hypothermia and hyperthermia *in vitro* and *in ovo* changed about 20% in comparison with normothermia. We observed no significant changes in amplitude of calcium transients during temperature change to hypothermia but hyperthermia caused a significant decrease in amplitude of calcium transients (atria 35%, ventricles 38%). We observed a wide spectrum of arrhythmias, which occurred spontaneously even during normothermia *in vitro*. Occurrence of arrhythmias *in vitro* significantly increased during hyperthermia and was reduced during hypothermia, while almost no arrhythmias occurred *in ovo* under all temperature conditions. The most common arrhythmia *in vitro* was atrioventricular (AV) block (2nd and 3rd degree together comprised 56% of all observed arrhythmias). Electrical pacing experiments *in vitro* and *in ovo* suggested that the AV blocks were likely caused by relative tissue hypoxia and not by the tachycardia itself. We described variability of AV block locations. We localized ectopic pacemaker in the transition of AV canal and the ventricle. We described atrioventricular re-entry using epicardial activation maps.

Conclusion: The pacemaker and AV canal were the most temperature-sensitive segments of the embryonic heart. AV canal was particularly sensitive to stress of *in vitro* conditions. We suggest that the critical point for conduction is the connection of the fast conducting ventricular trabecular network to the slow conducting tissue of AV canal.

Key words: arrhythmias, AV canal, chick embryo, conduction block, heart development, optical mapping, temperature.

Seznam použitých zkratk:

APD	action potential duration, doba trvání akčního potenciálu
ATP	adenosintrifosfát
AV	atrioventrikulární
Cav	napětově řízený kalciový kanál
CMOS	complementary metal oxide semiconductor, komplementární polovodič z oxidu kovu
Cx	connexin, konexin
di-4-ANEPPS	4- $\{\beta$ -[2(di- <i>n</i> -butylamino)-6-naphthyl]vinyl}pyridinium, barvivo citlivé na změny membránového napětí
ED	embryonální den
EKG	elektrokardiogram
EM-CCD	electron multiplier-charge coupled device, zařízení spojené s nábojem a zesilovačem elektronů
HCN	hyperpolarizací a cyklickými nukleotidy aktivovaný iontový kanál
hERG	human ether-a-go-go-related gene, draslíkový kanál
HH	stádium vývoje kuřecího embrya dle Hamburgera a Hamiltona
Nkx	NK transcription factor-related protein, homeobox transkripční faktor
Rhod-2	Rhodamin 2, barvivo citlivé na změny koncentrace kalcia
ROS	reactive oxygen species, reaktivní kyslíkové radikály
SA	sinoatriální
Shox	Short stature homeobox, homeobox transkripční faktor
Tbx	T-box transkripční faktor

OBSAH:

Prohlášení	2
Identifikační záznam	2
Poděkování	3
Grantová podpora	3
Abstrakt (česky)	4
Abstrakt (anglicky)	5
Seznam použitých zkratk	6
OBSAH	7
1. ÚVOD	11
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY DISERTAČNÍ PRÁCE	12
2.1 Stavba a funkce srdce	12
2.11 Vývoj srdce	14
2.111 Časný vývoj kuřecího embryonálního srdce	14
2.2 Převodní systém srdeční a elektrofyziologie srdce	18
2.21 Struktura a funkce převodního systému	18
2.22 Sinoatriální uzel	19
2.23 Atrioventrikulární uzel a komorový převodní systém	19
2.24 Role konexinů	20
2.25 Elektrofyziologie dospělého srdce	21
2.251 Akční potenciály srdečních segmentů	22
2.252 Spřažení excitace a kontrakce	23
2.253 Záznam elektrické aktivity srdce pomocí EKG	23

2.26 Vývoj převodního systému	24
2.261 Mechanismy vývoje převodního systému	24
2.262 Epigenetická determinace převodního systému	26
2.263 Elektrofyziologie během vývoje srdce	27
2.3 Klinický význam poruch srdečního rytmu během vývoje srdce	28
2.31 Základní rozdělení srdečních arytmií	28
2.311 Poruchy tvorby vzruchu	28
2.312 Poruchy šíření vzruchu	29
2.32 Arytmie během vývoje lidského plodu	29
2.321 Klinické metody pro diagnostiku fetálních arytmií	29
2.322 Klasifikace a léčba fetálních arytmií	30
2.3221 Extrasystoly	30
2.3222 Tachyarytmie	31
2.3223 Bradyarytmie	32
2.3224 Atrioventrikulární blok během fetálního vývoje	33
2.323 Spojitost strukturálních poruch srdce se vznikem fetálních arytmií	34
2.324 Převodní systém jako původce arytmií během fetálního vývoje	35
2.325 Spontánní arytmie během embryonálního vývoje	36
2.4 Experimentální modely pro výzkum arytmií během vývoje srdce	37
2.41 Savčí modely pro studium arytmií	38
2.411 Myš jako model pro genetické studie arytmií	38
2.412 Savčí modely pro výzkum arytmií indukovaných farmakologicky	39
2.42 Kuřecí embryo jako model pro studium arytmií	41

2.421 Arytmie indukované farmakologicky	42
2.422 Arytmie vznikající během anoxie a reoxygenace	42
2.423 Teplotní model	44
2.5 Metody pro studium arytmií během vývoje srdce	46
2.51 Historie elektrofyziologických technik záznamu šíření el. vzruchu	46
2.52 Optické metody pro vizualizaci šíření elektrického vzruchu	46
2.53 Vysokorychlostní kamery pro optické mapování	48
2.54 Pokroky ve vysokorychlostním zobrazování	49
2.55 Optické mapování intracelulární dynamiky kalcia	50
3. HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE	52
4. METODIKA	53
4.1 Experimentální model	53
4.2 Optické mapování	53
4.21 Vysokorychlostní zobrazování změn intracelulární koncentrace kalcia	54
4.22 Vysokorychlostní zobrazování změn membránového napětí	55
4.3 Analýza dat	55
4.4 Videomikroskopie	56
4.5 Elektrická stimulace <i>in ovo</i>	56
4.6 Elektrická stimulace <i>in vitro</i> – mapování změn membránového napětí	57
4.7 Statistická analýza	58
5. VÝSLEDKY	59
5.1 Samovolně vznikající arytmie v prostředí <i>in vitro</i>	59
5.11 Samovolně vznikající poruchy tvorby vzruchu v prostředí <i>in vitro</i>	61

5.12 Samovolně vznikající poruchy šíření elektrického impulsu v prostředí <i>in vitro</i>	61
5.2 Změny ve funkci embryonálního srdce indukované změnami teploty	63
5.21 Vliv teploty na sinusovou frekvenci a intracelulární dynamiku kalcia	63
5.22 Poruchy srdečního rytmu pozorované <i>in vitro</i>	64
5.221 Poruchy tvorby vzruchu – přímý vliv teploty na funkci SA uzlu	64
5.222 Poruchy šíření elektrického impulsu <i>in vitro</i>	65
5.2221 Lokalizace AV bloku třetího stupně – optické aktivační mapy	67
5.23 Vliv teploty na srdeční funkci <i>in ovo</i>	69
5.3 Elektrická stimulace embryonálních srdcí	70
6. DISKUZE	73
6.1 Studium arytmií embryonálního srdce	73
6.2 Akutní vliv teploty na srdeční frekvenci a dynamiku kalciových transientů	76
6.3 Teplota a srdeční výdej	77
6.4 Mechanismy poruch šíření vzruchu indukované změnami teploty	77
6.5 Role hypoxie během vývoje embryonálního srdce	79
7. ZÁVĚR	80
8. LITERATURA	81
9. Seznam publikací autora a jeho podíl na práci	97
10. Publikace autora	98

1. ÚVOD

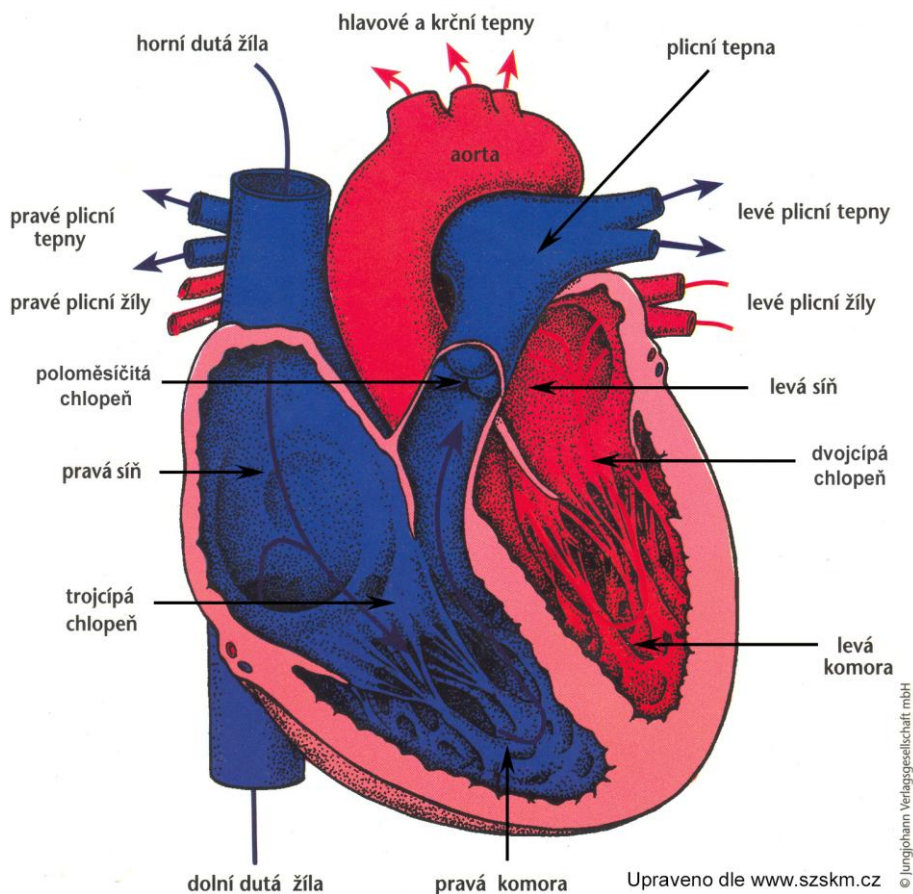
V současné době jsou v civilizovaném světě kardiovaskulární onemocnění nejčastější příčinou úmrtí. Se stárnutím populace přibývá srdečních arytmií a jejich výskyt bude v blízké budoucnosti s největší pravděpodobností stále častější. Arytmie významně snižují kvalitu života a jejich léčba je značně nákladná. Poruchy v srdečním výdeji během fetálního vývoje mohou mít až fatální vliv na vývoj celého jedince. Proto pokud je možné předejít následkům maligních arytmií prevencí, pečlivou diagnostikou a odpovídající léčbou již během fetálního vývoje, může být výrazně ovlivněna kvalita života dospívajícího a dospělého jedince. Studium vzniku arytmií během vývoje srdce tedy zastává důležitou úlohu a jakékoliv nové poznatky mohou vést k lepší prevenci, přesnější diagnostice a také ke zvýšení efektivity léčby arytmií. Pro podrobné studium arytmií během embryonálního vývoje jsou úspěšně používány zvířecí experimentální modely.

Tato práce je zaměřena na mapování potenciálních příčin arytmií z pohledu vývojové kardiologie v souvislosti s akutními změnami teploty prostředí, což může odpovídat náhlému nástupu horečky anebo podchlazení u těhotné. Jako zvířecí model bylo využito stresované (izolace, prostředí *in vitro*) kuřecí embryonální srdce. Tento model v sobě snoubí několik výhod a pro studium vyvíjejícího se srdce je využíván již značnou řadu let. Embryonální vývoj na kuřecím modelu studoval již Aristoteles a první popisy vyvíjejícího se kardiovaskulárního systému sahají do 17. století (Malpighi, 1672). Vývoj srdce u kuřete velmi blízké odpovídá vývoji srdce u člověka a díky snadné inkubaci a snadnému přístupu k srdci a embryu proti savčím srdcím představuje zejména během časného embryonálního vývoje jeden z ideálních modelů pro studium vývoje srdce a jeho funkce. Pro podrobné studium změn ve funkci embryonálního srdce z pohledu intracelulární dynamiky kalcia bylo použito vysokorychlostní optické mapování, které umožňuje sledovat šíření vzruchu s vysokým časoprostorovým rozlišením a tím precizně lokalizovat blokády vedení vzruchu nebo místa ektopické aktivity.

2. PŘEHLED PROBLEMATIKY DISERTAČNÍ PRÁCE

2.1 Stavba a funkce srdce

Srdce je jedním z nejdůležitějších orgánů. Během vývoje plodu je prvním orgánem, který začíná fungovat a jeho správný vývoj a funkce jsou pro zdravý vývoj jedince naprosto zásadní. Domnívám se, že si srdce zaslouží v každém případě velkou pozornost a úctu za jeho neutuchající, neúnavnou a hlavně klíčovou činnost.



Obrázek 1

Stavba lidského srdce.

Dospělé lidské srdce je čtyřdutinový svalový orgán, jehož hlavním úkolem je efektivně pumpovat krev a zajišťovat tak v organismu dostatečnou distribuci kyslíku, živin a metabolitů. Velikost srdce dospělého člověka odpovídá přibližně velikosti jeho pěsti. Dospělé srdce má dvě síně (levou a pravou) a dvě komory (levou a pravou), jejichž kontrahováním a ochabováním zabezpečuje pumpování krve (Obr. 1). Kontrahování srdeční svaloviny síní a komor neprobíhá nahodile, ale probíhá rytmicky a koordinovaně.

Rytmus kontrahování je řízen specializovanou tkání – převodním systémem srdečním. Převodní systém srdeční a sledování jeho funkce během časných embryonálních stádií je jedním z hlavních předmětů této práce.

Srdce zajišťuje cirkulaci krve ve dvou oběhových systémech. Prvním z nich je tělní oběh, který svým pumpováním zajišťuje levá síň a levá komora. Druhým z nich je plicní oběh, jehož cirkulaci zajišťuje pravá síň s pravou komorou. Stavba srdeční tkáně se skládá z vnitřní vrstvy srdce – endokardu, střední vrstvy pracovního myokardu a vnější povrchové vrstvy epikardu. Srdce je chráněno obalem, který se nazývá osrdečník neboli perikard.

Kromě základní funkce biomechanické pumpy pro krevní oběh má srdce ještě další důležitou, méně známou funkci. Srdce totiž v druhé řadě vystupuje také jako orgán endokrinní, protože jeho myokard produkuje několik druhů hormonů. Byly popsány hormony, které jsou produkovány v myokardu síní a ovlivňují metabolismus sodných kationtů a tím i krevní tlak a funkci ledvin a nadledvin. Nejznámější z nich je atriální natriuretický peptid a natriuretický peptid typu B (de Bold et al., 1981, Maekawa et al., 1988).

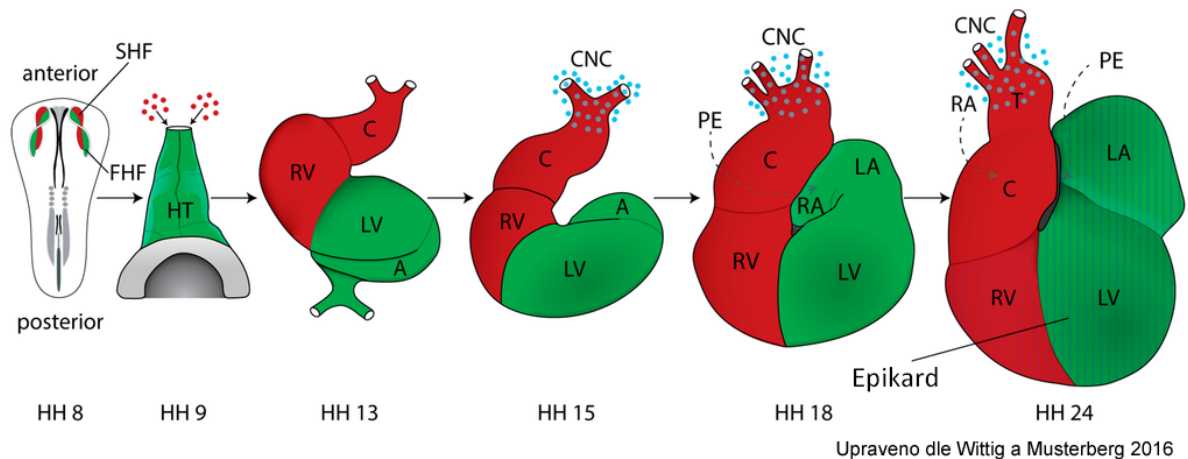
2.11 Vývoj srdce

Srdce je u obratlovců prvním orgánem, který začne plně vykonávat svou funkci. Pro rychlý a správný embryonální vývoj je totiž nutná velmi efektivní distribuce kyslíku, živin a metabolitů. U člověka začíná srdce bít mezi 21. a 22. dnem vývoje, u kuřecího embrya začíná fungovat již okolo 36 h od oplození (Clark, 1984, Kirby, 2007).

Prvním krokem vývoje srdce je gastrulace, po které dochází ke zformování jednoduché srdeční trubice fúzí bilaterálních plotének prekardiálního mesodermu. Buňky podílející se na stavbě srdce pocházejí ze dvou hlavních skupin progenitorů, prvního a druhého kardiogenního pole. Srdeční trubice má původ v prvním kardiogenním poli a je v této fázi složena ze dvou vrstev – vnitřní vrstvu tvoří endokard, vnější je tvořena myokardem a prostor mezi nimi vyplňuje tzv. srdeční rosol. Po zformování primitivní trubice buňky z prvního kardiogenního pole zpomalí proliferaci a růst srdce pokračuje hlavně v oblasti vtokové a výtokové části začleňováním mezenchymálních buněk z okolního druhého kardiogenního pole. Z rovné trubice se jejím zakřivením následovně stává srdeční klička, což je první znak asymetrie ve vývoji srdce. V pozdějším vývoji je savčí a ptačí srdce procesem septace rozděleno na 4 oddíly – 2 síně a 2 komory. Síně a levá komora mají svůj původ hlavně v prvním kardiogenním poli a pravá komora s výtokovou částí ve druhém kardiogenním poli (Buckingham et al., 2005, Christoffels et al., 2006, Snarr et al., 2007). Méně známé, ovšem ne méně důležité, je třetí kardiogenní pole, které hraje zásadní roli při formování sinoatriálního uzlu (Bressan et al., 2013). Při tvorbě aortopulmonárního septa se svou imigrací zapojují buňky, které mají svůj původ v srdeční neurální liště (Kirby et al., 1983) a během tvorby epikardu se svou imigrací zapojují buňky z proepikardiálního orgánu, viz Obr. 2 (Wittig a Munsterberg, 2016).

2.111 Časný vývoj kuřecího embryonálního srdce

Na začátku vývoje kuřecího embryonálního srdce dochází ke zformování primitivní srdeční trubice mezi 26 – 29 h vývoje, což odpovídá dle Hamburgera a Hamiltona stádiu 8 (stádium HH 8, Hamburger a Hamilton, 1951). Svou venózní částí je trubice orientována kaudálně a arteriální část je orientována kranálně (Obr. 2). Oblast budoucích komor je již patrná (de la Cruz et al., 1991, Manner, 2000). První slabé kontrakce se objevují již okolo 29 h vývoje. Do 36 h vývoje (HH 10) srdce začíná pravidelně bít a pumpovat krev. Kontrakce probíhají pomalu izotropicky od venózní k arteriální části, což odpovídá pomalé uniformní rychlosti vedení vzruchu v primitivní srdeční trubici (Kamino et al., 1981, Clark, 1984).



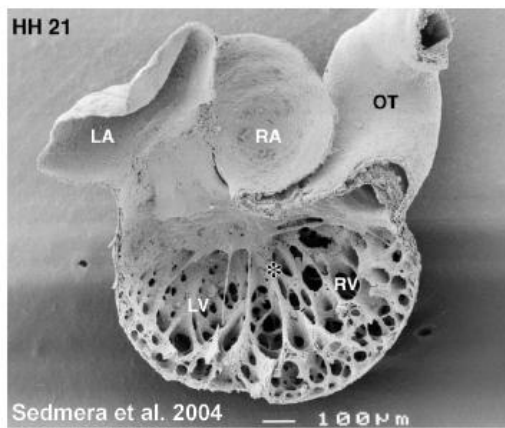
Obrázek 2

Proces formování srdeční kličky u kuřecího embryonálního srdce u stádií HH 8 – 24.

Proces formování srdeční trubice začíná splynutím plotének prekardiálního mesodermu. Zpočátku je primitivní trubice tvořena hlavně buňkami z prvního kardiogenního pole (HH 8 – 9). Srdeční klička se formuje hlavně začleňováním buněk druhého kardiogenního pole (červené tečky, HH 9 – 24). Při formování výtokové části přispívají svou imigrací také buňky srdeční neurální lišty (modré tečky, HH 15 – 24). K formování epikardu (označen pruhy) dochází díky imigraci buněk z proepikardiálního orgánu (HH 18 – 24). FHF – první kardiogenní pole (označeno zeleně), SHF – druhé kardiogenní pole (označeno červeně), HT – srdeční trubice, A – síň, RA – pravá síň, LA – levá síň, RV – pravá komora, LV – levá komora, C – výtoková část, CNC – srdeční neurální lišta, PE – proepikardiální orgán, T – trunкус.

U stádia HH 11 (40 – 45 h) začíná proces formování srdeční kličky a srdeční trubice se začíná ohýbat doprava. Z funkčního hlediska již lze zaznamenat rozdíl v rychlosti vedení vzruchu a tedy v rychlosti kontrakce v oblasti budoucího atrioventrikulárního (AV) kanálu (Arguello et al., 1986). Tento rozdíl v rychlosti vedení vzruchu postupně narůstá a je již zřetelný u stádia HH 15 (50 – 55 h) (Arguello et al., 1986, de Jong et al., 1992, Sedmera et al., 2004). Oblast budoucích síní a komor se v průběhu dalšího vývoje zvětšuje a u stádia HH 16 (51 – 56 h) se okolo 53 h vývoje začíná mezi síněmi a komorami zužovat segment, který je posléze odděluje. Dochází k morfoloicky patrnému formování AV kanálu (Patten, 1964), který v rámci embryonálního srdce i v této disertační práci zastává klíčovou úlohu. Z hlediska pumpování krve počíná plnit funkci primitivní chlopně a z pohledu elektrofyziologického začíná zastávat funkci důležitého propojení budoucích síní a komor. U stádií HH 16 až 17 (51 – 64 h) také začíná proces formování trabekul, které hrají velmi důležitou roli při kontrakci srdce. U srdeční kličky zajišťuje síť trabekul svým velkým

povrchem efektivní transport živin do srdeční tkáně i při pomalém lokálním proudění krve (Moorman a Lamers, 1992, Sedmera et al., 1997). U stádií HH 17 – 18 (52 h – embryonální den 3, ED3) začíná být již patrný předěl mezi budoucí levou a pravou komorou, který tvoří vznikající mezikomorové septum (de la Cruz et al., 1997, Sedmera et al., 2004). U stádia HH 18 (ED3) má srdce tvar písmene C a je u něj možné rozeznat jednotlivé segmenty a přechodové zóny mezi nimi (Gittenberger-de Groot et al., 1995, Manner, 2000). U tohoto stádia se začínají v oblasti AV kanálu a výtokové části formovat endokardiální polštářky vyplněné srdečním rosolem, které poté v primitivním srdci plní úlohu jednoduchých chlopní a zabraňují tak zpětnému proudění krve. Během pozdějšího vývoje se endokardiální polštářky částečně podílejí na vývoji finálních chlopní (Patten et al., 1948, De la Cruz et al., 1983, Oosthoek et al., 1998). Vývoj srdce dále pokračuje přes stádium HH 21 (ED3,5 – viz Obr. 3) zejména expandováním vnějšího zakřivení komory.



Obrázek 3

Embryonální kuřecí srdce – stádium HH 21.

V oblasti komor lze vidět houbovitou síť vyvíjejících se trabekul. RA – pravá síň, LA – levá síň, RV – pravá komora, LV – levá komora, OT – výtoková část.

Během čtvrtého embryonálního dne (ED4, stádium HH 23) intenzivně laterálně expanduje oblast budoucích síní a začíná být poprvé patrný počátek rozdělávání síní na pravou a levou. V této fázi začíná být také patrný tzv. interventrikulární žlábek, jehož přítomnost naznačuje pokrok v separaci komor na pravou a levou (Patten, 1964, Sedmera et al., 2004). Srdce se nachází ve fázi, kdy jsou zřetelně patrné jednotlivé srdeční segmenty, což se projevuje i z funkčního hlediska. Rychlost vedení vzruchu a tudíž i rychlost kontrakce se nyní u jednotlivých segmentů značně liší. Oblast síní a komor se v tuto chvíli vyznačuje proti AV kanálu a výtokové části výrazně vyšší rychlostí vedení vzruchu a tudíž i rychlejšími kontrakcemi (Arguello et al., 1986). Tento rozdíl v rychlosti vedení u jednotlivých srdečních segmentů zajišťuje zvýšení efektivity pumpování krve a je analogický se zpomalením vedení vzruchu v AV uzlu u dospělého srdce. Srdeční stěna se skládá již ze tří vrstev. Vnitřní vrstvu tvoří endokard, střední vrstva je tvořena myokardem a vnější vrstvu tvoří

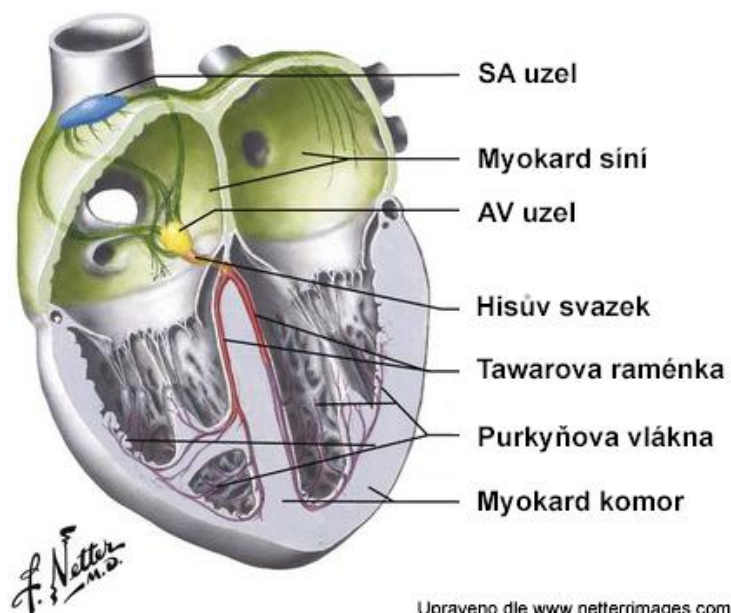
epikard (Hara et al., 2016). U stádia HH 24 (ED4,5) dochází ke zformování srdeční kličky ve tvaru písmene S (Manner et al., 1993, Manner, 2000, de la Cruz a Markwald, 1998). V této fázi jsou venózní a arteriální pól již umístěny vedle sebe na bázi srdce (Steding a Seidl, 1980). Myokard vnitřního zakřivení komory je pokryt endokardiálními polštářky, které plynule přecházejí z oblasti AV kanálu až do distální oblasti výtokové části srdce (Gittenberger-de Groot et al., 1995). Od stádia HH 24, kdy není ještě srdce plně septováno a funguje v rámci jednoho oběhového systému, vývoj dále pokračuje čím dál komplexněji až do fáze plně septovaného čtyřdutinového srdce, které zajišťuje dva krevními oběhy.

2.2 Převodní systém srdeční a elektrofyziologie srdce

Převodní systém srdeční je specializovaná část srdeční svalové tkáně, která má schopnost generovat elektrické impulsy a díky své vysoké elektrické vodivosti umožňuje koordinovaně a efektivně rozvádět elektrické vzruchy nutné ke kontrakci srdce. Na elektrické impulsy generované a rozváděné převodním systémem reaguje svým kontrahováním pracovní myokard, čímž je udáván vlastní autonomní rytmus kontrahování srdeční svaloviny (tzv. srdeční automacie), který má uspořádanou aktivační sekvenci a zajišťuje tak velmi efektivní pumpování krve. Funkce převodního systému je u dospělého srdce modulována vegetativním nervovým systémem.

Kapitola o převodním systému zastává v této práci velmi významnou roli, protože vznik arytmii je často spojen s funkcí převodního systému srdečního. Srdeční arytmie ve své podstatě znamená poruchu srdečního rytmu, tedy poruchu tvorby elektrických impulsů anebo jejich vedení.

2.21 Struktura a funkce převodního systému



Obrázek 4

Schéma převodního systému srdečního u dospělého lidského srdce.

Převodní systém srdeční je složen z několika segmentů, které jsou schopné tvořit a koordinovaně vést elektrický vzruch (Obr. 4). Rytmus je udáván prvním oddílem převodního systému tzv. sinoatriálním (SA) uzlem. Generovaný vzruch je rychle rozveden internodálními síňovými spoji a Bachmanovým svazkem skrze myokard síní a poté dorazí do atrioventrikulárního uzlu. V atrioventrikulárním uzlu je vedení mezi síněmi a komorami zpomaleno. Následuje Hisův svazek, který představuje jediný vodivý spoj ve vazivové elektrické izolaci mezi myokardem síní a komor. Dále pokračuje levé a pravé Tawarovo raménko, Purkyňova vlákna a nakonec je aktivován pracovní myokard komor (Bonow et al., 2008).

2.22 Sinoatriální uzel

U dospělého lidského srdce se jedná o kapkovitý útvar o velikosti cca 15 × 3 mm složený ze specializovaných buněk, který se nachází v oblasti ústí horní duté žíly do pravé síně asi 1 mm pod povrchem epikardu (Bonow et al., 2008). SA uzel zastává roli hlavního srdečního pacemakeru a je místem, kde dochází k tvorbě elektrických impulsů, čímž je udáván srdeční rytmus. Za normálních podmínek je rytmus o frekvenci 60 – 100 stahů/min udáván tímto hlavním pacemakerem, který je přirozeným zdrojem srdeční automacie. Tento výjimečný fenomén je umožněn díky přítomnosti speciálních iontových kanálů – hyperpolarizací a cyklickými nukleotidy aktivovaných (HCN) iontových kanálů (zejména HCN4), které jsou netradičně aktivovány během hyperpolarizace membrány. Během hyperpolarizace membrány se tyto kanály otevírají a způsobují pomalou depolarizaci, která překročením prahového potenciálu vyústí rychlou depolarizací v akční potenciál a celý cyklus se poté opakuje (DiFrancesco, 1993). SA uzel tvoří tzv. pacemakerové buňky, které se vyznačují právě expresí HCN4, což je všeobecně uznávaný pacemakerový marker (Mommersteeg et al., 2007a, Mommersteeg et al., 2007b, DiFrancesco, 2010)

2.23 Atrioventrikulární uzel a komorový převodní systém

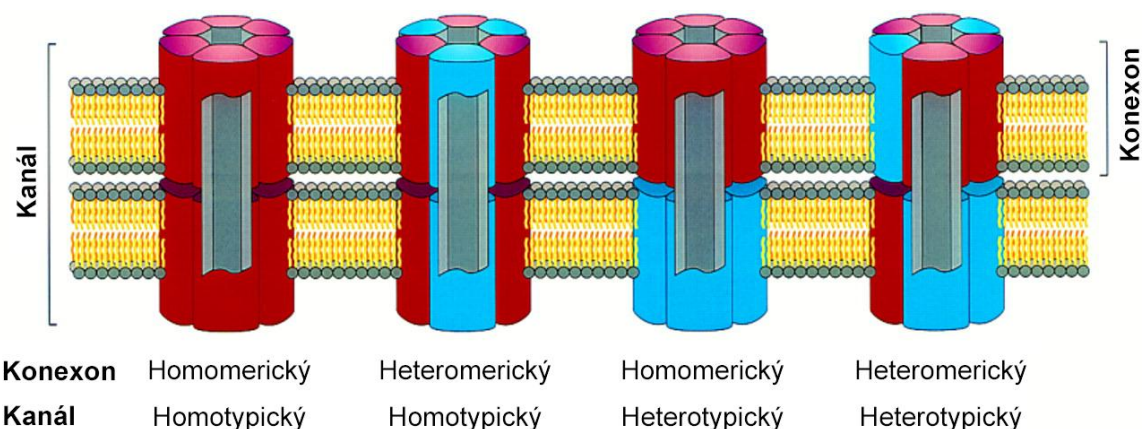
Atrioventrikulární uzel je po dominantním SA uzlu druhým pacemakerem s pomalejší spontánní frekvencí 40 – 50/min. Během normálních podmínek je jeho pomalejší pacemakerová aktivita zastíňována rychlejším SA uzlem. Pokud však dojde k pozastavení funkce hlavního pacemakeru nebo k blokádě převodu jím generovaných vzruchů, tak AV uzel přebere úlohu pacemakeru. V AV uzlu dochází po převodu vzruchu skrze myokard síní ke zpomalení vedení vzruchu, které se nazývá atrioventrikulární zpoždění. Toto zpoždění má své fyziologické opodstatnění, protože díky němu srdce pumpuje krev

s vysokou efektivitou. Na AV uzel navazuje Hisův svazek, což je jediné vodivé propojení mezi myokardem síní a komor. Pokud by tato elektrická izolace neexistovala, nemohlo by srdce efektivně pumpovat krev (Kolditz et al., 2007). Na Hisův svazek v mezikomorovém septu dále navazují pravé a levé Tawarovo raménko, která jsou od pracovního myokardu elektricky odizolována (Tawara, 1906). Nakonec se komorový převodní systém větví na Purkyňova vlákna, jež jsou elektricky napojena na pracovní myokard komor a elektricky ho aktivují zralým způsobem aktivace od hrotu směrem k bázi srdce. Tento způsob aktivace je dalším přizpůsobením funkce srdce pro zvýšení efektivity pumpování krve. V rámci myokardu komor probíhá transmurní aktivace směrem od endokardu do epikardu.

2.24 Role konexinů

Síňový a komorový myokard tvoří tzv. funkční syncitium (soubuní). To znamená, že buňky od sebe navzájem nejsou izolovány, ale jejich cytoplasma je propojena tzv. vodivými spoji neboli gap junctions. Proto podnět, který vznikne kdekoli v síních nebo komorách vyvolá pokaždé kompletní kontrakci srdce. Srdce tedy pracuje jako funkční celek podle zákona „vše nebo nic“ (Silbernagl a Despopoulos, 2004).

Propojení mezi sousedními kardiomyocyty vodivými spoji neboli nexy je zprostředkováno póry, které jsou tvořeny transmembránovými proteiny zvanými konexiny (Willecke et al., 2002). Konexiny se v membráně vyskytují ve formě hexamerů, které tvoří tzv. konexon. Konexony mohou být homomerické (složené z jednoho typu konexinu) anebo heteromerické (složené z různých konexinů). Spojením dvou konexonů vzniká pór či kanál, viz Obr. 5 (Wei et al., 2004).



Upraveno dle Wei et al. 2004

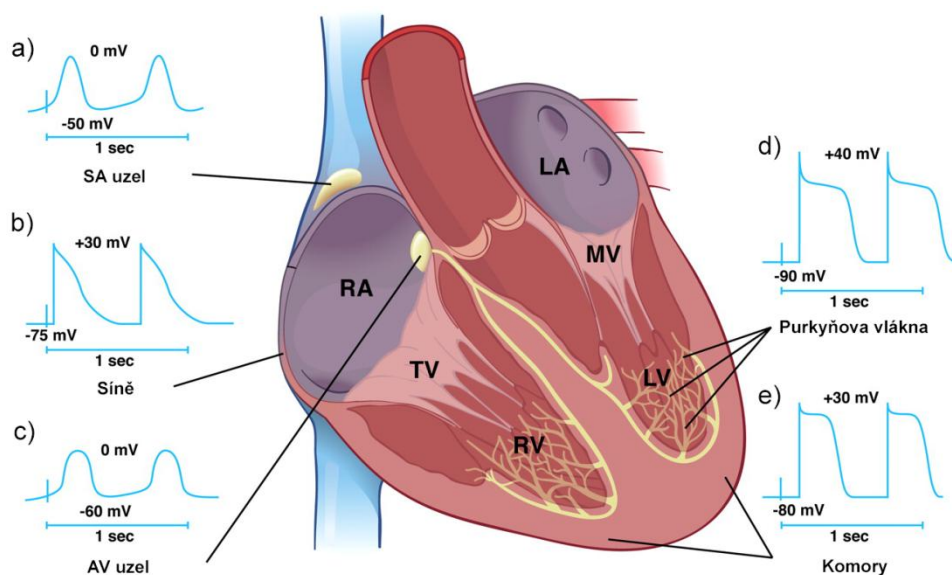
Obrázek 5

Typy vodivých spojení.

Druhy oligomerizace konexinů v konexony a možnosti jejich propojení při tvorbě kanálu.

U člověka bylo identifikováno více než 20 různých konexinů (Cx), v srdci je jich exprimováno ovšem pouze pět a nejvýznamnější z nich jsou Cx40, Cx43 a Cx45. Tyto konexiny mají odlišnou elektrickou vodivost (Davis et al., 1995, Coppen et al., 1998). Pro převodní systém jsou významné Cx40 a Cx45, Cx43 je exprimován v pracovním myokardu. Cx45 je exprimován v SA a AV uzlu a má na svědomí pomalé vedení vzruchu v těchto segmentech. Cx40 má nejvyšší vodivost a jeho exprese je typická pro rychle vedoucí síně a His-Purkyňův systém v komorách (Gros a Jongasma, 1996, Coppen et al., 1999). Právě oblasti předělu pomalého a rychlého vedení vzruchu, které se objevují již během časného vývoje srdce, si zaslouží zvýšenou pozornost, protože díky přítomnosti heterotypických vodivých spojení Cx40/Cx45 (viz Obr. 5) mohou mít sníženou vodivost a mohou být náchylné na vznik blokády vedení vzruchu (Desplantez, 2017).

2.25 Elektrofyziologie dospělého srdce



Upraveno dle Munshi et al. 2012

Obrázek 6

Akční potenciály jednotlivých segmentů u dospělého lidského srdce.

(a) Pacemakerové potenciály SA uzlu. (b) Akční potenciály síní. (c) Pacemakerové potenciály AV uzlu. (d) Akční potenciály Purkyňových vláken. (e) Akční potenciály komorového pracovního myokardu.

Jednotlivé části srdce a převodního systému se liší svými elektrickými vlastnostmi, protože jsou různou rychlostí převodu elektrického vzruchu uzpůsobeny pro koordinované kontrahování srdeční svaloviny, čímž může být zajištěno efektivní pumpování krve. Liší se zejména rozdílnou expresí iontových kanálů a také konexinů, jak bylo uvedeno v předchozí

kapitole. Díky rozdílné expresi iontových kanálů mají také různé oblasti srdce a převodního systému různý průběh akčního potenciálu (Obr. 6).

2.251 Akční potenciály srdečních segmentů

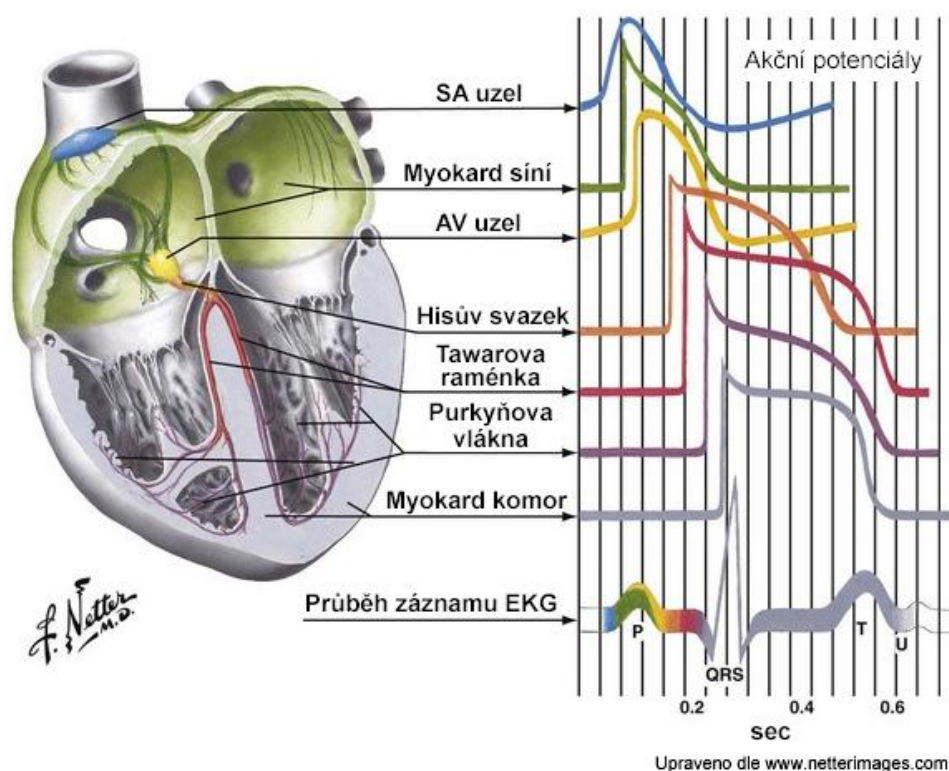
Pro pacemakerové buňky SA uzlu a AV uzlu jsou typické tzv. pacemakerové potenciály (Obr. 6a, c). Iontové mechanismy zajišťující akční potenciály zde uvedu pouze zjednodušeně. Průběh pacemakerového potenciálu se vyznačuje fází spontánní depolarizace, což znamená, že místo klidového membránového potenciálu, který je typický pro kardiomyocyty pracovního myokardu, membránový potenciál po průběhu akčního potenciálu opět začne pozvolna narůstat. Za tento jev je zodpovědný sodno-draselný iontový proud tzv. „funny current“ probíhající skrze HCN4 kanály, které propouštějí sodné a draselné kationty. Ke konci fáze spontánní depolarizace se postupně otevírají napěťově řízené kalciové kanály T-typu způsobující vtok kalcia. Až membránový potenciál dosáhne prahové hodnoty, tak dojde k rychlejší depolarizaci zvýšeným vtokem kalcia pomocí napěťově řízených kalciových kanálů L-typu. Po překročení membránového potenciálu do pozitivních hodnot se otevřou draslíkové kanály a odtokem draselných kationtů dojde k postupné hyperpolarizaci membrány, během níž dojde k uzavření kalciových kanálů L-typu. Rytmičným opakováním tohoto cyklu je zajištěna srdeční automacie a udávání rytmu pacemakerem (DiFrancesco, 1993, DiFrancesco, 2010). Aktivita pacemakeru je tedy vysoce závislá na intracelulární oscilaci kalcia, které hraje při udávání srdečního rytmu naprosto zásadní roli.

Kardiomyocyty pracovního myokardu a Purkyňových vláken mají proti pacemakerovým buňkám odlišný průběh akčního potenciálu (Obr. 6b, d, e) zejména díky přítomnosti rychlých napěťově řízených sodíkových kanálů Nav1.5 a také tím, že v době mezi akčními potenciály mají klidový membránový potenciál. Jakmile na membránu pracovního kardiomyocytu dorazí vlna depolarizace, otevřou se rychlé sodíkové kanály a rychlým vtokem sodných kationtů do buňky dojde k prudké depolarizaci. Poté nastupuje tzv. fáze *plató*, jsou otevřeny kalciové kanály L-typu a draslíkové kanály. Kationtové proudy těchto kanálů směřují každý opačným směrem a po určitou dobu (cca 200 ms) udržují membránový potenciál na víceméně konstantní hodnotě. Tato fáze, jež se nazývá absolutní refrakterní fáze, je velmi důležitá, protože zamezuje vzniku krouživých vzruchů a znemožňuje tetanickou kontrakci myokardu, která může nastat u kosterního svalu. Poté dojde k uzavření kalciových kanálů a draslíkové kanály postupně hyperpolarizují membránu až na hodnotu klidového membránového potenciálu (Silbernagl a Despopoulos, 2004).

2.252 Spřažení excitace a kontrakce

Během akčního potenciálu u pracovního kardiomyocytu dochází otevřením napěťově řízených kalciových kanálů k lokálnímu nárůstu intracelulární koncentrace kalcia v oblastech, kde se blízko membrány nachází membrána sarkoplazmatického retikula. Kalcium se poté váže na ryanodinové receptory (RyR), které se nacházejí na membráně sarkoplazmatického retikula, ze kterého poté dochází k masivnímu vyelití dalšího kalcia do cytosolu. Tento jev se v angl. originálu nazývá „calcium induced calcium release“. Výrazné zvýšení intracelulární koncentrace kalcia vede tímto způsobem až ke spuštění kontrakce příčně pruhované svaloviny kardiomyocytu. Tímto způsobem je spřažena excitace kardiomyocytu s jeho kontrakcí. Síla kontrakce se zvyšuje se stoupající koncentrací kalcia v cytosolu (Silbernagl a Despopoulos, 2004, Kho et al., 2012).

2.253 Záznam elektrické aktivity srdce pomocí EKG



Obrázek 7

Časový průběh akčních potenciálů a záznam EKG elektrické aktivity srdce.

Vpravo je vyobrazen časový průběh akčních potenciálů jednotlivých srdečních segmentů. Vpravo dole je vyobrazen záznam elektrokardiogramu (EKG), který barevně koresponduje s postupnou aktivací jednotlivých segmentů.

Elektrickou aktivitu srdce lze znamenávat pomocí elektrokardiografie. Pomocí povrchových svodů připevněných na kůži je možno snímat prostorové změny potenciálu vznikající při podráždění srdeční svaloviny. EKG může podat informaci o poloze srdce, tepové frekvenci, rytmu, původu a šíření vzruchů a o repolarizaci a poruchách těchto dějů. Nevypovídá však nic o kontraktilitě a přečerpávacím výkonu srdce. Potenciálové rozdíly, které jsou snímány, vznikají na rozhraní podrážděných a nepodrážděných oblastí myokardu. Záznam elektrické aktivity srdce pomocí jednoho ze svodů klasického dvanáctisvodového EKG je vyobrazen na Obr. 7. Aktivace síní odpovídá vlně P, komplex QRS je tvořen aktivací komorového pracovního myokardu a T vlna odpovídá repolarizaci komor (Silbernagl a Despopoulos, 2004).

2.26 Vývoj převodního systému

Vývoj srdce probíhá směrem od primitivní srdeční trubice až ke čtyřdutinovému srdci, přičemž v každé fázi vývoje je hlavním úkolem srdce efektivně pumpovat krev. V případě primitivní srdeční trubice je řešení tohoto úkolu v celku snadné, protože celý myokard je elektricky propojen. S postupem vývoje srdce je však nutné zajistit čím dál koordinovanější elektrickou aktivaci, aby byla zachována dostatečná efektivita pumpování. U čtyřdutinového srdce je, kromě udávání rytmu pacemakerem, hlavním úkolem převodního systému po rychlé aktivaci síní nechat dostatek času pro jejich kontrakci a vypuzení krve do komor, což je zajištěno zpomalením vedení vzruchu v AV uzlu, a potom rychle aktivovat komory směrem od hrotu k bázi. K tomuto cíli spěje vývoj převodního systému skrze různá vývojová stádia, kdy směr aktivační sekvence vždy odpovídá směru toku krve. Vývoj převodního systému jde tedy ruku v ruce s morfogenezí srdce a následuje nároky na zachování efektivního pumpování krve v každé fázi jeho vývoje.

Vznik arytmii často souvisí s funkcí převodního systému, což platí i během jeho vývoje. Aby bylo možné lépe vysvětlit, jakým způsobem dochází ke vzniku arytmii souvisejících s funkcí převodního systému během vývoje, je nejdříve nutné pochopit mechanismy řídicí jeho indukci a diferenciaci (Gourdie et al., 2003, Christoffels et al., 2010).

2.261 Mechanismy vývoje převodního systému

Během prvních peristaltických kontrakcí a počátku funkce primitivního trubicovitého embryonálního srdce není vyvinut žádný převodní systém. Jakmile se vývoj posune do stádia srdeční kličky, dochází ke vzniku přechodových zón mezi rychle a pomalu vedoucím myokardem, což lze považovat za počátek vývoje převodního systému. Buňky převodního

systemu se od pracovních kardiomyocytů liší zejména expresí HNK-1 (human natural killer, lidský přirozený zabíječ), Tbx3 (T-box transkripční faktor) a dalších faktorů (Blom et al., 1999, Hoogaars et al., 2004). Přechodové zóny se nacházejí v oblasti sinus venosus, kde dochází k formování budoucího SA uzlu, dále v oblasti AV kanálu, v oblasti primárního prstence, ze kterého se po dokončení septace formuje Hisův svazek a Tawarova raménka a v oblasti výtokové části srdce. U srdeční kličky díky rozdílu v rychlosti vedení jednotlivých zón již vzniká v AV kanálu atrioventrikulární zpoždění (Moorman et al., 1998). Pomocí retrovirových studií buněčných linií na kuřecím zárodku byla vyvrácena hypotéza, že převodní systém má svůj původ v buňkách neurální lišty. Bylo prokázáno, že AV uzel, Hisův svazek, Tawarova raménka a Purkyňova vlákna se diferencují výhradně z myocytů (Gourdie, 1995). Buňky neurální lišty se však podílejí na autonomní inervaci převodního systému a také na fibrózní izolaci Hisova svazku (Gurjarpadhye et al., 2007). Diferenciace buněk převodního systému spočívá v zablokování programu pro vývoj v pracovní kardiomyocyty a zachování „primitivního“ fenotypu převodního systému (Bakker et al., 2010), který se potom dále specializuje (Gourdie et al., 1998). Nejdříve se diferencuje a začíná fungovat SA uzel (Bressan et al., 2013). Později dochází k vývoji AV uzlu a nejpозději se diferencuje komorový převodní systém (Moorman et al., 2010). S maturací komorového převodního systému a souvisejícím vývojem trabekularizace se mění nezralý typ aktivace komor od báze k hrotu směrem ke zralé aktivaci od hrotu k bázi (Chuck et al., 1997, Reckova et al., 2003, Sedmera et al., 2004).

Sinoatriální uzel je výjimečný jak svou funkcí, tak svým vývojem. Je prvním oddílem převodního systému a dokonce i prvním oddílem srdce, který se začíná specifikovat. Pacemakerové buňky jsou totiž ještě předtím, než započne samotná morfogeneze srdce, fyzicky formovány a molekulárně programovány ve třetím kardiogenním poli procesem řízeným Wnt (signální proteiny rodiny Wnt) signalizací (Bressan et al., 2013). Pro správnou diferenciaci a konečný osud pacemakerových buněk je zásadní přítomnost transkripčního faktoru Shox2 (Short stature homeobox, homeobox transkripční faktor). Hlavní oblasti exprese tohoto faktoru byly pozorovány v myokardu sinus venosus včetně oblasti sinoatriálního uzlu a žilních chlopní (Mommersteeg et al., 2007b). Pro správnou funkci pacemakeru během vývoje je u savců důležitá také endotelinová signalizace (endotelin – signální peptid se silnými vazokonstrikčními účinky), která ovlivňuje frekvenci jeho rytmu (Karppinen et al., 2014). Lokalizace prvního místa aktivace pacemakeru byla zkoumána již před delší dobou na potkaních embryích (Hirota et al., 1985). Při úplném počátku funkce embryonálního srdce bylo místo aktivace lokalizováno v levé části sinus venosus,

během několika hodin se však místo první aktivace přesunulo na pravou stranu, kde byl posléze lokalizován definitivní pacemaker. Podobná situace byla popsána u ptačích embryí, kde zbytky levostranné aktivity byly pozorovány za normálních podmínek u malého zlomku pozdějších vývojových stádií (Sedmera et al., 2006). Žádná levostranná aktivace však u rozsáhlých skupin testovaných normálních myších embryí pozorována nebyla (Leaf et al., 2008, Ammirabile et al., 2012, Benes et al., 2014).

O mechanismech regulujících specifikaci ostatních segmentů převodního systému během jeho vývoje je známo výrazně méně než o vývoji pacemakeru. Jedním z popsaných mechanismů, který ovlivňuje diferenciaci komorových kardiomyocytů směrem k fenotypu převodního systému, je působení neuregulinu (signální protein vázající se na ErbB receptory – erythroblastic leukemia viral oncogene, receptory s tyrosin kinázovou aktivitou). Tato molekula má však pro embryonální kardiomyocyty ještě také mnoho dalších důležitých funkcí a její působení je zásadní pro přežití této buněčné populace (Liu et al., 2010). Důležitým mechanismem, který ovlivňuje diferenciaci Purkyňových vláken u kuřete, je signalizační kaskáda neuregulin/Erb společně s endotelinovou signalizací (Gourdie et al., 1998, Gourdie et al., 2003, Takebayashi-Suzuki et al., 2000, Sedmera et al., 2008). Dalšími významnými faktory, které se podílí konkrétně na formování Hisova svazku a Tawarových ramének, jsou Nkx2.5 (NK transcription factor-related protein, homeobox transkripční faktor), Irx3 (Iroquois-class homeodomain protein, homeobox transkripční faktor) a T-box transkripční faktory (Jay et al., 2004, Jerome a Papaioannou, 2001, Moskowicz et al., 2004, Hoogaars et al., 2007, Aanhaanen et al., 2009, Zhang et al., 2011, Frank et al., 2012).

2.262 Epigenetická determinace převodního systému

Diferenciace embryonálních myocytů směrem k převodnímu fenotypu je řízena také epigenetickými faktory, ze kterých je nejzásadnější mechanické zatížení. Experimenty s nezatíženými embryonálními srdci *in vitro* ukázaly, že komorový převodní systém u nezatížených srdcí podstoupil de-diferenciaci směrem k méně zralému fenotypu. Tomuto fenoménu bylo možné zabránit zatížením komor pomocí kapičky silikonového oleje injikovaného do komory (Sankova et al., 2010). Tyto experimenty pomohly k rozuzlení otázky, která vzešla z předchozích studií v prostředí *in vivo*. Bylo zde zjištěno, že zvýšené hemodynamické zatížení vedlo ke zrychlení a proti tomu snížené zatížení vedlo k inhibici diferenciaci převodního systému. Hlavním mechanismem bylo přímé působení na napětí myocytů spíše než signalizace z endokardu indukovaná smykovým napětím (Reckova et al., 2003, Hall et al., 2004).

Další studie na kuřecích embryích *in vivo* ukázala, že hypoxie může přispět k maturaci atrioventrikulárního kanálu a může vést k dřívějšímu přechodu ke zralému typu komorové aktivace od hrotu k bázi. Jedním z možných vysvětlení těchto jevů může být pozorované zvýšení apoptózy v oblasti myokardu AV kanálu (Nanka et al., 2008). Dalším faktorem ovlivňujícím správný vývoj vazivové izolace AV spojení je vývoj epikardu a jeho invaze do oblasti mezi síněmi a komorami přispívající k formování vazivového srdečního skeletu. Poruchy v jeho vývoji mohou vést až k pre-excitaci komor (Kolditz et al., 2007, Kolditz et al., 2008). Elektrická izolace Hisova svazku je také závislá na imigraci buněk srdeční neurální lišty (Gurjarpadhye et al., 2007).

2.263 Elektrofyziologie vyvíjejícího se srdce

Elektrická aktivita embryonálního srdce se odvíjí hlavně od vývoje exprese iontových kanálů, pump a přenašečů a také od vývoje propojení kardiomyocytů vodivými spoji. Během časných fází vývoje se kardiomyocyty primitivní srdeční trubice vyznačují akčními potenciály, které svým průběhem blízce odpovídají pacemakerovému potenciálu SA uzlu (viz Obr. 6a). Díky těmto vlastnostem jsou izolované časné embryonální kardiomyocyty schopné spontánní depolarizace (Sperelakis, 1982). Stoupající fáze akčního potenciálu embryonálního srdce je pomalá díky akci napětově řízených kalciových kanálů L- a T-typu. Akční potenciály nejsou ovlivněny působením blokátorů sodíkových kanálů, mohou být však kompletně inhibovány působením blokátorů kalciových kanálů. Pro elektrickou aktivitu embryonálního srdce je tedy naprosto klíčová intracelulární dynamika kalcia (Linden et al., 1982). Během pozdějšího vývoje pracovního myokardu je schopnost spontánní depolarizace omezena pouze na pacemakerové buňky. Rytmická aktivita je zajišťována pomocí vyvíjejícího se pacemakeru, který se nachází v oblasti sinus venosus hlavně díky akci HCN kanálů (Kamino et al., 1981, DiFrancesco, 1993, Chen et al., 2010). Funkce embryonálního pacemakeru během vývoje se odlišuje od mechanismů řídicích funkci SA uzlu u dospělého srdce. Během embryonálního vývoje funkce pacemakeru zásadně závisí na tzv. kalciových hodinách (calcium clock), kde důležitou roli zastává sodíkový a vápníkový výměník – NCX (sodium-calcium exchanger), který hraje významnou roli během časné fáze depolarizace (Haddock et al., 1997, Wakimoto et al., 2000).

2.3 Klinický význam poruch srdečního rytmu během vývoje srdce

Poruchy rytmu u vyvíjejícího se plodu mají značný vliv na jeho vývoj a mohou ve výjimečných případech vést až k jeho smrti. Vždy však ovlivňují životaschopnost a vývoj plodu a mohou mít trvalé následky pro život novorozence a poté i dospělého člověka. Proto je nutné jejich vznik odhalit co nejdříve a pokud dojde k diagnostikování vážné arytmie, je důležité rovněž přistoupit k odpovídající léčbě co nejdříve. Diagnostika arytmií u plodu však díky komplikované přístupnosti a elektrické aktivitě srdce matky není snadnou disciplínou (Sedmera et al., 2015).

2.31 Základní rozdělení srdečních arytmií

Srdeční arytmie ve své podstatě znamená poruchu srdečního rytmu, ke které může docházet během tvorby nebo šíření vzruchu. Arytmie tak můžeme obecně rozdělit do dvou skupin podle mechanismu jejich vzniku.

2.311 Poruchy tvorby vzruchu

Při poruchách v tvorbě vzruchu dochází ke změnám sinusového rytmu. Normální sinusová frekvence u člověka je mezi 60 až 100/min. Pokud přesáhne 100/min jedná se o sinusovou tachykardii a frekvence pod 60/min je označována jako sinusová bradykardie. V obou případech je rytmus pravidelný, pokud je frekvence kolísavá jedná se o sinusovou arytmii. U dospělého srdce je sinusový rytmus řízen vegetativními nervy (sympatikus, parasympatikus) přes β -adrenergní a cholinergní receptory (Silbernagl a Despopoulos, 2004). Přílišná stimulace sympatikem způsobuje tachyarytmie a může vést až k srdeční zástavě. Dalším faktorem, který výrazně ovlivňuje funkci sinusového uzlu, je teplota. Vliv teploty na funkci pacemakeru nabývá značně na významu u embryonálního srdce, které ještě není inervováno. Změny teploty mění celkovou kinetiku a zejména zvýšení teploty vede až k tvorbě bloků vedení vzruchu. Pokud dojde k výpadku tvorby rytmu ze sinusového uzlu, projeví se jiná ohniska (AV uzel, komorový pacemaker) s pomalejší frekvencí (25 – 55/min). Všechny tyto ektopické pacemakery jsou za normálních podmínek aktivní, jejich aktivita je však přebita nejrychlejší frekvencí dominantního pacemakeru – sinusového uzlu. Tato i jiná potenciální ohniska ektopie hrají roli při vzniku arytmií, pokud dojde k jejich projevení a začnou narušovat přirozený rytmus. Velmi častým zdrojem nepravidelností rytmu je ektopická tvorba vzruchů mimo pacemaker, která způsobuje síňové či komorové extrasystoly (Silbernagl a Despopoulos, 2004, Sarre et al., 2006, Bonow et al., 2008).

2.312 Poruchy šíření vzruchu

Při poruše šíření vzruchu vznikají bloky vedení elektrického vzruchu, které většinou vedou k bradyarytmiím. Nejvýznamnější je blok atrioventrikulární, který má 3 stupně. U I. stupně dochází pouze ke zpomalování vedení. Při II. stupni dochází k občasnému výpadku AV převodu a III. stupeň znamená úplný blok vedení vzruchu ze síní do komor. Při AV bloku se mohou projevit ektopická centra aktivace – AV uzel nebo komorový pacemaker. Tyto důvěrně známé klinické situace se dají vypožorovat i u kuřecího zárodku od 3. dne vývoje (Sedmera et al., 2002). AV blokům během fetálního vývoje je níže věnována samostatná kapitola. Dalším mechanismem vzniku arytmií poruchou vedení vzruchu je krouživý vzruch, tzv. reentry. Jedná se o častý arytmogenní mechanismus, který způsobuje řadu tachyarytmií. Po depolarizační fázi srdečního akčního potenciálu následuje tzv. refrakterní fáze, kdy nelze k depolarizaci vybudit kardiomyocyty jakkoli silným stimulem. Vzruch v srdci vyhasne a je obnoven až dalším impulsem ze sinoatriálního uzlu. Pokud však nebyla nějaká část tkáně plně aktivována (např. poškozená tkáň po infarktu myokardu), vzruch se touto drahou vrátí na místo iniciace a nastane cyklická aktivace. Krouživý vzruch může vznikat v malé oblasti tkáně nebo se může vyskytovat až v rámci celého srdce, kdy se vzruch vrací vodivým spojením přes vazivovou elektrickou izolaci síní a komor mimo Hisův svazek, což skrze tzv. preexcitaci komor vede až k AV reentry tachykardii (Silbernagl a Despopoulos, 2004, Bonow et al., 2008).

2.32 Arytmie během vývoje lidského plodu

Poruchy srdečního rytmu u lidského plodu neboli fetální arytmie jsou běžně detekovány během standardního porodnického vyšetření u nejméně 2% těhotenství (Copel et al., 2000, Jaeggi a Nii, 2005). Arytmie tvoří zhruba 10 – 20% diagnóz stanovených při kardiologickém vyšetření srdce u vyvíjejícího se plodu (Srinivasan a Strasburger, 2008).

2.321 Klinické metody pro diagnostiku fetálních arytmií

Elektrokardiografický přístup není pro diagnózu funkce vyvíjejícího se srdce u plodu díky mnoha limitacím tou nejvhodnější metodou. Přesnější a efektivnější je relativně nová magnetokardiografie, pomocí které lze monitorovat elektrickou aktivitu vyvíjejícího se srdce (Strasburger et al., 2008, Strasburger a Wakai, 2010). Tato metoda však není zatím příliš rozšířená a je preferována až po 20. týdnu těhotenství, protože během časnějších fází těhotenství je méně spolehlivá. Díky svým výhodám zaujímá první místo v této oblasti diagnostiky echokardiografie a je hlavní metodou pro diagnostiku fetálních arytmií.

Pomocí echokardiografie je navíc možné, kromě podrobné analýzy srdečního rytmu, také rozpoznat další odchylky od normálního vývoje srdce, které se pojí s dlouhodobějšími nebo přetrvávajícími poruchami rytmu. Této výhody lze využít jak v časně fázi, tak také v pokročilejších fázích těhotenství. Typickým příkladem může být odhalení hydropsu plodu, jehož součástí bývá pleurální nebo perikardiální výpotek a ascites. Závažnost srdečního selhání může být monitorována a klasifikována pomocí skórovacího systému a tzv. „stupně srdečního selhání“ (Huhta, 2005). Pomocí tří základních echokardiografických módů (B-mód, M-mód a Doppler) je možné určit frekvence síňových a komorových kontrakcí a jejich časové souvztažnosti. Ekvivalentem pro P vlnu na kardiogramu je A vlna, která je detekována v pulzním Dopplerovském módu v mitrálním ústí anebo pomocí M-módu jako pohyb stěny síně. Analogicky je určen počátek síňové systoly jako začátek zpětného proudění v horní duté žíle. Začátek komplexu QRS je určen zavřením atrioventrikulární chlopně, otevřením poloměsíčitě chlopně a anterográdním Dopplerovým tokem v aortě. Současný záznam Dopplerova módu z horní duté žíly a aorty přináší informaci o časovém intervalu mezi síňovou a komorovou systolou, což odpovídá časům mezi P vlnou a komplexem QRS na záznamu z EKG. Díky těmto parametrům je možné stanovit rychlost srdečního tepu, AV zpoždění a také diagnostikovat různé typy poruch srdečního rytmu měřením mechanické reakce srdečních komor na elektrickou stimulaci (Sedmera et al., 2015).

2.322 Klasifikace a léčba fetálních arytmií

Fetální arytmie lze pro zjednodušení rozdělit do tří základních skupin (Jaeggi a Nii, 2005):

- 1) Nepravidelnosti v rytmu, které jsou způsobeny ektopickými úderý (extrasystolami) a které nejčastěji vycházejí z ektopických míst v oblasti síní
- 2) Tachyarytmie, které jsou definovány srdeční frekvencí vyšší než 180 úderů za minutu
- 3) Bradyarytmie, u kterých srdeční frekvence klesá pod 110 úderů za minutu

2.3221 Extrasystoly

Extrasystoly vycházejí z těchto tří základních skupin nejlépe, co se týče závažnosti dopadu na životaschopnost a další vývoj plodu (Reed, 1989). Vergani et al. uvádí, že u 38% případů z celkových 87 plodů s extrasystolami došlo k odeznění symptomů *in utero* a u 49% během porodu. Pouze u jednoho novorozence vyžadoval jeho stav navazující terapii a u dalších devíti novorozenců byla jeden rok po narození arytmie stále přítomná avšak bez nutnosti léčby. U dvou plodů došlo k proměně extrasystol na supraventrikulární tachykardii *in utero*.

Tyto dva případy podstoupily farmakologickou léčbu, která byla úspěšná, a díky tomu nedošlo k žádnému dopadu na další vývoj plodu. Žádný případ z celé skupiny 87 plodů nebyl spojen se strukturálními vadami srdce (Vergani et al., 2005).

2.3222 Tachyarytmie

Nejčastější tachyarytmií, která se vyskytuje u plodu, je supraventrikulární tachykardie. Tento typ arytmiie se vyskytuje ve třech různých formách: AV reentry tachykardie, dále permanentní junkční reciproční tachykardie a třetím typem je síňová ektopická tachykardie. Druhou nejčastější tachyarytmií u plodu je síňový flutter, který bývá zapříčiněn krouživým průběhem elektrického impulsu v tzv. makro-reentry okruhu lokalizovaném v síni. Konečná diagnóza, která přesně rozliší mezi těmito druhy tachyarytmií, je prováděna většinou až po narození, pokud arytmiie během těhotenství přetrvává, anebo se vrací. Strategie léčby většiny druhů tachyarytmií u plodů bez vyvinutého hydropsu je založena na transplacentální aplikaci digoxinu (srdeční glykosid). Léčiva jako sotalol (neselektivní beta-blokátor a antiarytmikum III. třídy), flekainid (antiarytmikum I. třídy – blokátor sodíkových kanálů) nebo amiodaron (antiarytmikum III. třídy – blokátor draslíkových kanálů) jsou většinou vyhrazena pro léčbu plodů s vyvinutým hydropsem anebo pro léčbu rezistentnějších druhů tachyarytmií. Léčba je na místě i v případech, když se jedná o čistě sinusovou tachykardii s typickými frekvencemi okolo 180 – 200/min, která bývá způsobena stresem působícím na plod, tyreotoxikózou plodu, anémií atd. (shrnutí v Sedmera et al., 2015). Jaeggi a Nii v rámci své observační studie uvádějí, že tachykardie byla přítomná u 57% ze skupiny 67 plodů s diagnostikovanou vážnou arytmií a byla zde nejčastější pozorovanou arytmií. Supraventrikulární tachykardie byla přítomná u 40% případů, síňový flutter u 11% případů a sinusová tachykardie se vyskytovala pouze u 6% případů (Jaeggi a Nii, 2005).

Dlouhodobá tachykardie u plodu má ve většině případů závažný charakter a často vede k hydropsu plodu anebo dokonce k jeho smrti. Simpson a Sharland uvádějí, že hydrops se vyskytoval u 41% ze skupiny 127 plodů s diagnostikovanou tachykardií. U 75 plodů, kde nebyl vyvinut hydrops, bylo přistoupeno k transplacentální léčbě (nejčastěji digoxinem) s kladnou odezvou a velmi vysokou úspěšností přežití do narození (96%). Proti tomu však pouze dvě třetiny plodů s vyvinutým hydropsem reagovaly na transplacentální léčbu pozitivně a pouze 73% z nich přežilo do narození (Simpson a Sharland, 1998). Je tedy patrné, že pokud dojde u plodu k vyvinutí hydropsu, jedná se o značně negativní prognostický faktor spojený s vážnými hemodynamickými dopady, které pramení buď ze samotných arytmií anebo arytmií spojených se strukturální vadou srdce. Jedna z nejnovějších studií však popisuje

i velmi efektivní léčbu plodů s vyvinutým hydropsem. Celkových 84 plodů s diagnostikovanou supraventrikulární tachykardií tvořily dvě skupiny. V první z nich (n = 50) byla zvolena léčba intravenózním podáním digoxinu těhotné a u druhé z nich (n = 34) bylo přistoupeno k orálnímu podání flekainidu. Jako úspěšná léčba zde bylo definováno snížení srdeční frekvence u plodu o více než 15%. U plodů bez hydropsu úspěšně účinkoval flekainid v 96% případů proti digoxinu, který byl účinný v 79% případů. U plodů s vyvinutým hydropsem byl digoxin úspěšný pouze ve 38% případů (n = 21), flekainid úspěšně účinkoval v 86% případů (n = 7) a při kombinaci flekainidu s amiodaronem dokonce byla léčba 100% úspěšná (n = 7). U plodů s hydropsem, které byly léčeny digoxinem, došlo během těhotenství anebo krátce po narození ke 43% úmrtnosti. Při léčbě flekainidem však k žádnému úmrtí nedošlo. (Sridharan et al., 2016).

2.3223 Bradyarytmie

Permanentní anebo dlouhodobé bradykardie představovaly v rámci již výše uvedené observační studie 43% případů s diagnostikovanou vážnou arytmií (Jaeggi a Nii, 2005). Těchto 43% tvořil 38% kompletní AV blok (3. stupně) a zbylých pouhých 5% tvořily sinusové bradykardie. Co se týče léčby bradykardií, její pole působnosti je výrazně omezenější a komplikovanější než je tomu u léčby tachykardií. Pokud se například jedná o kompletní AV blok způsobený maternálními protilátkami, doporučuje se léčba pomocí stimulantů beta-receptorů, kortikosteroidů anebo imunosupresiv. V případě, že je nutno přistoupit k implantaci umělého srdečního pacemakeru, je potřeba použít speciální pacemakery miniaturních rozměrů a zvolit minimálně invazivní techniky jako např. fetální endoskopii. Pokud dojde ke vzniku hydropsu, je nutno k zákroku přistoupit co nejdříve, aby mohl být úspěšný (Liddicoat et al., 1997, Sydorak et al., 2001, Eghtesady et al., 2011, Nicholson et al., 2012).

Sinusová bradykardie se vyznačuje pravidelným rytmem s AV převodem v poměru 1:1 a pomalou frekvencí kontrakcí síní. Jednoduchá sinusová bradykardie může být způsobena stresem plodu s epizodami hypoxie a opětovným obnovením krevního oběhu, kdy mozek a srdce jsou krví vyživovány preferenčně. Sinusová bradykardie také může být zapříčiněna syndromem prodlouženého QT intervalu. Proto všichni novorozenci, u nichž během vývoje došlo k poklesu srdeční frekvence pod třetí percentil, by měli být na toto téma pečlivě vyšetřeni co nejdříve po narození (Mitchell et al., 2012). Sinusové bradykardie jsou obecně jen velmi vzácně způsobeny přímou dysfunkcí SA uzlu. Pokud je u plodu diagnostikována bradykardie, je vždy nutné vyloučit supraventrikulární bigeminie nebo trigeminie

s doprovodným AV blokem. Poznávacím znakem těchto poruch bývá síňová frekvence vyšší než komorová a také výskyt nepravidelností v srdečním rytmu. Dopad na plod bývá v případě těchto nesrovnalostí nevýznamný a tento typ arytmií většinou nevyžaduje léčbu (shrnuto v Sedmera et al., 2015).

2.3224 Atrioventrikulární blok během fetálního vývoje

Nejčastější příčinou vzniku bradykardie u plodu je vrozený atrioventrikulární blok, kterému věnuji samostatnou kapitolu, protože v této práci zastává významnou úlohu. AV blok 1. stupně je charakterizován prodloužením intervalu AV převodu se zachovaným poměrem převodu 1:1. Je nutné si uvědomit, že interval AV převodu během vývoje plodu postupně narůstá a přesná čísla se v echokardiografii liší také podle použitých módů. Standardní hodnoty pro 30. – 34. týden vývoje jsou $122,7 \pm 11,1$ ms pro Dopplerův mód v levé komoře, $116,5 \pm 8,8$ ms pro Dopplerův mód v horní duté žíle a aortě, $142,4 \pm 14,2$ ms pro síňovou kontrakci a komorovou systolu měřenou pomocí TDI (Tissue Doppler Imaging, tkáňové Dopplerovské vyšetření) u báze volné stěny pravé komory (Nii et al., 2006).

AV blok 2. stupně rozlišujeme na dva různé typy. Prvním z nich je Wenckebachův typ (Mobitz I), který je charakterizován postupným prodlužováním intervalu AV převodu, až nakonec dojde k výpadku jedné komorové kontrakce, potom se celý proces opakuje. Druhý je Mobitzův typ (Mobitz II), který je charakteristický náhlým výpadkem komorové kontrakce, zatímco interval AV převodu se nemění. Specifický typ AV bloku typu Mobitz II je blok s AV převodem v poměru 2:1, kde každý druhý síňový impuls není převezen na komory.

Nejzávažnějším typem AV bloků je AV blok 3. stupně, tedy kompletní srdeční blok, který má vysoký negativní vliv na další vývoj plodu a často vede až k jeho smrti. Při tomto typu AV bloku je aktivita síní a aktivita komor naprosto nezávislá, což má většinou za důsledek závažnou a dlouhodobou bradykardii. Jediný fyziologický způsob, jak vykompenzovat snížený srdeční výdej, je Frank-Starlingův mechanismus, jehož kapacita je však během časných fází vývoje limitována, jak popisuje studie na kuřecím modelu (Benson et al., 1989, Kockova et al., 2013). Pokud zvýšení síly stahu nestačí na kompenzaci následků vážné bradykardie, následuje srdeční selhání, které celkem rychle vede ke vzniku hydrotsu plodu a posléze k jeho odúmrti.

Vznik kompletního srdečního bloku často souvisí s různými vrozenými strukturálními vadami srdce (Stewart et al., 1983, Jaeggi a Nii, 2005, Vergani et al., 2005). Schmidt uvádí, že 53%

plodů s diagnostikovaným kompletním srdečním blokem mělo vrozenou srdeční vadu (Schmidt et al., 1991). Další významnou příčinou vzniku kompletního srdečního bloku jsou mateřská autoimunitní onemocnění, jakými jsou např. lupus erythematosus, Sjögrenův syndrom, revmatická artritida či jiné revmatické onemocnění. Tato onemocnění se projevují zvýšenými hladinami protilátek anti-Ro/SSA (Anti-Sjögren's-syndrome-related antigen A, antigen Ro proteinu) a anti-La/SSB (Anti-Sjögren's-syndrome-related antigen B, antigen Lupus La proteinu) v krvi matek. Riziko vzniku kompletního srdečního bloku u matek s pozitivním nálezem protilátek anti-Ro/SSA se pohybuje okolo 2% (Brucato et al., 2001). Tyto protilátky způsobují zánět myokardu a specificky ovlivňují funkci AV uzlu, což vede k různým stupňům poruch AV převodu, které se zpravidla začínají projevovat okolo 20. – 24. týdne těhotenství. Dalším důsledkem působení těchto protilátek může být endomyokardiální fibróza u plodu nebo novorozence. Díky tomu, že kompletní srdeční blokáda je spojena s velmi vysokou mortalitou dosahující 18% až 43% případů (Jaeggi a Nii, 2005), bylo vyvinuto značné úsilí zaměřené na prevenci těchto autoimunitních onemocnění. Ženám s pozitivním nálezem autoprotilátek byly orálně anebo intravenózně podávány kortikosteroidy (Reinisch et al., 1978, Friedman et al., 2009), vyskytla se u nich však v reakci na tuto léčbu řada nežádoucích účinků. Jednalo se o oligohydroamnion, adrenální supresi plodu, retardaci intrauterinního růstu atd. Léčba kortikosteroidy je tedy doporučena pouze v případech, kdy se jedná o závažný typ AV bloku s výraznou dlouhodobou bradykardií a vysokým rizikem vzniku hydropsu. Samotné prodlužování intervalu AV převodu vede u anti-Ro a anti-La pozitivních matek jen vzácně k pokročilejším typům AV bloku (Jaeggi et al., 2011) a léčba kortikosteroidy v těchto případech není doporučena. V relativně nedávné době byla profesionálním sdružením American Heart Association sepsána doporučení týkající se diagnózy a léčby srdečních chorob u plodu včetně arytmií během prenatálního vývoje. Vše bylo shrnuto do dokumentu Scientific Statement (Donofrio et al., 2014).

2.323 Spojitost strukturálních poruch srdce se vznikem fetálních arytmií

Způsob, jakým souvisí vznik arytmií u plodu se strukturálními poruchami srdce, zatím není zřetelně popsán. Některé studie žádný jasný vztah mezi vznikem arytmií u plodu a strukturálními poruchami srdce nenalezly. V rámci jedné monitorovací studie bylo zjištěno, že ze 17 plodů, u kterých byly pozorovány ektopické úderky, pouze dva plody měly strukturální poruchy srdce. Žádné strukturální změny nenalezli u pěti plodů, které trpěly tachykardií. Proti tomu však čtyři z osmi plodů, které měly bradykardii, byly postiženy vážnými strukturálními poruchami srdce (Stewart et al., 1983). Další studie popisuje pouze 2 plody

postižené výraznou strukturální poruchou srdce ze skupiny deseti plodů, u kterých byla diagnostikována významná arytmie (supraventrikulární tachykardie a AV blok druhého stupně) z celkových 614 plodů s diagnostikovaným nepravidelným srdečním rytmem (Copel et al., 2000). Na druhou stranu je však také uváděno, že strukturální poruchy srdce s poruchy srdečního rytmu souvisejí. Schmidt et al. uvádí, že více než polovina z celkových 55 plodů s pozorovaným AV blokem třetího stupně měla přidružené strukturní poruchy srdce (izomerismus levé síně a poruchu AV napojení) (Schmidt et al., 1991). Vergani et al. pozorovali strukturální poruchy u pěti ze šesti plodů s bradykardií z celkového počtu 144 plodů s diagnostikovanou fetální arytmií. Pouze dva ze čtyř jedinců postižených AV blokem přežili (Vergani et al., 2005). Eronen uvádí, že u 12 plodů (tři supraventrikulární a tři ventrikulární ektopické aktivity, čtyři AV bloky a dvě sinusové bradykardie) byla spojená významná arytmie se strukturální poruchou z celkové skupiny 125 plodů s diagnostikovanou významnou arytmií (Eronen, 1997). Eronen dále pozorovala 95% úspěšnost přežití u plodů se samotnou významnou arytmií, kdežto skupina plodů, které měly významnou arytmií spojenou se strukturální poruchou, vykázala 75% úmrtnost. Zajímavé je, že úmrtnost u skupiny plodů, které měly pouze strukturální poruchu, činila pouze 67%. Na základě těchto observačních studií je možné předpokládat, že bradyarytmie jsou častěji spojené se strukturní vadou a mají také horší důsledky než tachyarytmie nebo nepravidelný rytmus, které jsou často léčitelné anebo odezní samy během dalšího vývoje srdce.

2.324 Převodní systém jako původce arytmií během fetálního vývoje

V klinické praxi je všeobecně známo, že převodní systém srdeční může být původcem poruch srdečního rytmu (Braunwald et al., 2001). Tato náchylnost v souvislosti s vývojem převodního systému byla zkoumána na myším transgenním modelu. Detailní analýza vyvíjejícího se převodního systému byla provedena na srdcích embryonálních stádií ED9,5 – 15,5 pomocí speciálního barvení a následné 3D rekonstrukce. Přítomnost markerů vyvíjejícího se převodního systému byla pozorována v sinoatriálním uzlu, levé a pravé žilní chlopni, v nepravém septu, v levém a pravém AV prstenci, v Hisově svazku, v Tawarových raménkách, v trabekule septomarginalis, v Bachmanově svazku, v zadní stěně levé síně v okolí ústí plicních žil a u pozdějších stádií i ve stěnách plicních žil (Jongbloed et al., 2004). Tato pozorování podporují hypotézu, že struktury odvozené během vývoje z převodního systému mohou později sloužit jako substrát pro vznik arytmií u dospělého srdce. Důležité pozorování provedl Gonzalez a kolektiv skrze srovnávací studii mezi skupinou pacientů s levostrannou síňovou tachykardií pramenící z oblasti, kde se spojuje mitrální

prsteneček s aortálním, a skupinou myších embryí. Odvodil, že k vývoji specializovaného převodního systému v této arytmogenní oblasti dochází na 11,5 dni embryonálního vývoje (Gonzalez et al., 2004). Výjimečnou pozornost si z vývojového hlediska však zaslouhuje původ myokardu plicních žil v oblasti jejich napojení na levou síň. Tato oblast má z pohledu vývoje svůj původ v druhém kardiogenním poli (Mommersteeg et al., 2007a). Oblast okolo ústí plicních žil je u člověka velmi frekventovaným zdrojem fibrilace síní, a proto bývá často proveden zákrok, ve kterém je tato oblast pomocí ablace skrze zavedený ablační katetr elektricky izolována od okolního myokardu. Tento zákrok (katetrizační ablace) je čím dál častější, protože výskyt fibrilace síní v populaci stále narůstá (Ames a Stevenson, 2006). Další studie na myších detailně popsala, jak přispívají buněčné linie prvního a druhého kardiogenního pole k formování převodního systému. V nejčasnějších fázích exprese byl HCN4 popsán jako marker prvního kardiogenního pole. Během pozdního prenatálního a časného postnatálního vývoje již HCN4 vystupoval jako marker celého převodního systému (Liang et al., 2013). Pokud dojde k narušení programu udržujícího přirozený fenotyp myokardu plicních žil (např. snížení exprese transkripčních faktorů Nkx2.5, Pitx2c – Pituitary homeobox, nebo zvýšení exprese Shox2), začne se v této oblasti projevovat pacemakerový fenotyp (Cx40 negativní, HCN4 pozitivní). Právě abnormální exprese HCN4 v oblasti ústí plicních žil může mít poté za následek tvorbu ektopických vzruchů vedoucích až k fibrilaci síní (Mommersteeg et al., 2007a, Ye et al., 2015).

2.325 Spontánní arytmie během embryonálního vývoje

Tato oblast embryonálních arytmií je díky několika důvodům prozkoumána zatím jen velmi málo. V první řadě výzkum naráží na metodologické komplikace, které jsou u savců způsobeny nízkou přístupností díky četným obalům chránícím embryo. Zásadním zlomem v tomto problému byl přínos ultrazvukových metod s vysokým rozlišením (Phoon et al., 2002, Phoon, 2006, Nomura-Kitabayashi et al., 2009, Lo et al., 2010). Současně k pokroku v tomto ohledu výrazně přispěl vývoj echokardiografie lidského plodu (Maeno et al., 1999, Pedra et al., 2002). Druhým důvodem nízké prozkoumanosti spontánních arytmií je jejich vzácný výskyt, díky němuž je nutné mapovat rozsáhlé skupiny embryí, aby bylo možné tyto jevy vůbec zpozorovat. Z výše uvedených důvodů byla většina spontánních embryonálních arytmií pozorována při „mírných“ odchylkách od fyziologických podmínek, protože monitorování srdeční funkce savčího embrya naprosto neinvazivní cestou je téměř nemožné.

Různé typy arytmií byly odhaleny pozorováním izolovaných myších embryonálních srdcí pomocí simultánního optického mapování membránového napětí a intracelulární dynamiky kalcia (Valderrabano et al., 2006). Hlavním předmětem této studie bylo šíření vzruchu skrze AV spojení během přechodu od nezralého vzorce aktivace komor od báze k hrotu směrem ke zralému způsobu aktivace od hrotu k bázi. Autor zde navrhuje, že po přechodu ke zralému způsobu aktivace komor mohou pozůstatky původního AV prstence stále přechodně převádět vzruch, což může přispívat ke vzniku arytmií a mohou takto vystupovat jako případný arytmogenní substrát. Během studie bylo zpozorováno, že za normálních podmínek se arytmie vyskytovaly jen vzácně. Bylo zaznamenáno pouze několik AV bloků (4%) a ve čtyřech případech z celkových 309 embryonálních srdcí došlo ke vzniku junkčního rytmu. Ovšem po přidání isoproterenolu (agonista β -adrenergických receptorů) frekvence výskytu arytmií výrazně narostla a v 6% případů se vyskytla komorová ektopická aktivita. Následný přídavek karcholu (agonista acetylcholinových receptorů) k srdcím již stimulovaným isoproterenolem způsobil v oblasti AV prstence disociaci převodu vzruchu na šíření směrem do komor ale zároveň také směrem opačným u 10% srdcí (ED10,5 – ED11,5). U srdcí starších než ED9,5 byl zpozorován také reentry mechanismus, který trval pouze po dobu několika úderů. Během studie rozsáhlé skupiny myších srdcí byly také zaznamenány ojedinělé případy spontánních nepravidelností rytmu. Jednalo se o sinoatriální bloky, AV bloky a proměnlivé aktivační vzorce síní (Sankova et al., 2010).

2.4 Experimentální modely pro výzkum arytmií během vývoje srdce

Pro výzkum embryonálních arytmií jsou hojně používané savčí modely, zejména myš (*Mus musculus*). Kuřecí embryonální model (*Gallus gallus*) je starý a klasický model výzkumu týkajícího se vývojové kardiologie. V poslední době je díky svým výhodám v této oblasti hojně používáno dánío pruhované (*Danio rerio*) neboli zebřička a pro výzkum arytmií byla používána i octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*). Dále však tyto poslední dva ani jiné modely, kromě teplokrevných modelových zvířat více rozvádět nebudu, protože nemají stálou tělesnou teplotu, a tudíž budou reagovat na její změny odlišně od homioiotečních organismů.

2.41 Savčí modely pro studium arytmií

2.411 Myš jako model pro genetické studie arytmií

Jak bylo uvedeno výše, spontánní arytmie se u srdcí za normálních podmínek vyskytují velmi vzácně, a proto je výhodnější je zkoumat za upravených experimentálních podmínek. Před nedávnou dobou bylo prokázáno, že pro diferenciaci a funkci převodního systému je velmi důležitá katecholaminergní signalizace (Baker et al., 2012). Tyto výsledky dobře korelují s předchozími studiemi, která uvádí, že u embryí s deficiencí exprese kinázy beta-adrenergických receptorů docházelo k vysoké úmrtnosti (Jaber et al., 1996). Longitudinální studie během vývoje myšního embrya v rozmezí ED10,5 – ED14,5 zkoumala vliv deficiencie genu NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells, jaderný faktor aktivovaných T-buněk), který je významný pro formování chlopní. Mutanti, kteří postrádali chlopně ve výtokové části srdce, umírali na srdeční selhání dříve, než byla dokončena septace komor. U stádií ED12,5, což je doba, kdy normálně dochází k formování chlopní ve výtokové části, bylo u mutantů pozorováno abnormální proudění krve. Snížení srdečního výdeje společně s diastolickou dysfunkcí přispělo značnou měrou ke vzniku srdečního selhání, přičemž kontraktilita překvapivě nijak ovlivněna nebyla. Jedinou arytmií, kterou se podařilo detekovat před úmrtím embrya, byla progresivní bradykardie, což značí, že k srdečnímu selhání docházelo během vývoje velmi rychle (Phoon et al., 2004). Mutace transkripčního faktoru Tbx3 způsobují dědičné poruchy u pacientů se Schinzelovým syndromem. Data získaná od pacientů a z experimentů na myších ukazují na vícečetnou roli tohoto transkripčního faktoru během morfogeneze a funkce převodního systému. Porušení funkce Tbx3 v různých oblastech vyvíjejícího se srdce vedlo k výraznému fenotypu a závažným arytmiím. Byly pozorovány sinusové pauzy, které se u dospělé myši normálně také ojediněle vyskytují, dále se objevila bradykardie naznačující dysfunkci SA uzlu. Výskyt preexcitace a vznik AV bloků zase poukazoval na dysfunkci AV spojení. Tyto arytmie byly doprovázeny poruchami exprese několika iontových kanálů. Přestože nebyla ovlivněna exprese výše zmíněných markerů převodního systému, došlo ke zvýšení exprese draslíkových kanálů Kcne3 a Kcnj4 a exprese byla snížena u sodíkového kanálu Scn7a (Frank et al., 2012). Toto pozorování poukazuje na možnou funkční poruchu u morfologicky normálně se jevícího převodního systému. Další studie AV spojení na myších ukázala, že pro správnou funkci AV převodu hraje důležitou roli signalizační kaskáda Notch (signální transmembránový protein). Aktivace Notch signalizace během vývoje konstantně vedla k nestandardním vzorcům AV převodu a k preexcitaci. Proti

tomu inhibice této kaskády způsobila hypoplazii AV uzlu a výrazné snížení exprese konexinu 30.2, což mělo za následek zkrácení doby AV zpoždění (Rentschler et al., 2011).

2.412 Savčí modely pro výzkum arytmií indukovaných farmakologicky

Teratogenní či embryotoxický potenciál farmakologických preparátů je pro lékaře při jejich předepisování těhotným ženám velmi významné téma. Mezi možné dopady na embryonální vývoj nepatří pouze zjevné morfologické defekty, ale i mírné neurologické poruchy a také srdeční arytmie, které v extrémních případech mohou vést až ke smrti plodu.

Náchylnost ke vzniku arytmií během embryonálního vývoje výrazně závisí na vývojovém stádiu. Během nejčasnějších fází vývoje, kdy je embryonální srdce velmi malé a rychlost vedení vzruchu je pomalá, jsou téměř jedinými vznikajícími arytmiemi změny v srdeční frekvenci. Nejzávažnější z nich jsou bradykardie, které způsobují snížení srdečního výdeje, což může vést až ke smrti embrya. Jakmile dojde ke zformování srdečních dutin budoucích komor a síní, dojde ke vzniku oblastí s rozdílnou rychlostí vedení vzruchu (Moorman et al. 2010). Oblast myokardu budoucích síní se vyznačuje rychlým vedením vzruchu, ke zpomalení rychlosti šíření dochází v AV kanálu, myokard budoucích komor opět vede vzruch rychle a ve výtokové části vzruch finálně zpomaluje. Se vzniklou heterogenitou v rychlosti vedení vzruchu může začít docházet také ke vzniku dalších arytmií. Mohou začít vznikat poruchy šíření vzruchu ve formě jednosměrných nebo dvousměrných bloků, reentry a další složitější arytmie (Valderrabano et al., 2006). Během následného vývoje koronárních cév a autonomní inervace začíná srdce fungovat komplexněji (Hildreth et al., 2009). Pozorovaná senzitivita předčasně narozených dětí na bradykardii naznačuje, že odpověď srdeční frekvence na cholinergní stimulaci se může během vývoje měnit. Tato hypotéza byla testována na izolovaných myších embryonálních srdcích (ED13 – ED22). Působení acetylcholinu (neurotransmitter) v mikromolárním rozmezí vedlo u ED13 – ED14 srdcí k poklesu srdeční frekvence o 50% v porovnání se stádiem ED21 – ED22, kde došlo při stejném dávkování ke snížení frekvence o pouhých 3%. Přídavek fysostigminu (selektivní inhibitor acetylcholinesterázy) u starších srdcí významně zesílil cholinergní odpověď, což poukazuje na pravděpodobný nárůst cholinesterázové aktivity související s úrovní vývoje srdce (Maurer, 1979).

Proti dospělému srdci, jehož energetický metabolismus je závislý hlavně na mastných kyselinách, představuje pro embryonální srdce hlavní zdroj energie glykolýza. Vliv inhibice glykolýzy na změny v membránovém napětí a intracelulární dynamice kalcia byl zkoumán

na myších embryonálních srdcích. Inhibice glykolýzy 10 mM 2-deoxyglukózou nebo 0,1 mM iodoacetátem výrazně snížila srdeční frekvenci a způsobila blíže nespecifikované arytmie u více než 50% testovaných srdcí. Podobných efektů bylo docíleno zablokováním oxidativní fosforylace pomocí 500 nM FCCP (karbonyl kyanid(trifluoromethoxy)fenylylhydrazon) během studie zaměřené na mechanismy funkce pacemakeru u časných myších stádií. Byly zde pozorovány také různé arytmie včetně AV reentry indukovaného přidavkem adenosinu. Tyto jevy byly pozorovány u stádií s již vyvinutým rychle vodivým myokardem síní a komor a pomalu vedoucím AV kanálem (Chen et al., 2010).

Antiepileptické preparáty často účinkují na vzrušivé tkáně skrze ovlivnění membránového napětí pomocí regulace funkce iontových kanálů. Ovšem některé z cílových iontových kanálů se nacházejí také ve vyvíjejícím se srdci, což může být jedním z možných vysvětlení pro známé teratogenní účinky těchto látek. Danielsson a jeho skupina zkoumali vliv fenytoinu na indukci embryonální hypoxie způsobenou nežádoucími účinky na funkci embryonálního srdce. Fenytoin působí jako blokátor draslíkových hERG (human ether-a-go-go-related gene) kanálů a tím inhibuje protékající draslíkový proud I_{Kr} , který je pro správnou funkci embryonálního srdce nezbytný. Používali experimentální model, kdy kultivovali celá myší embrya společně s testovanými preparáty. Zjistili, že fenytoin způsobil na koncentraci závislý pokles srdeční frekvence, který byl při nejvyšších dávkách doprovázen přechodnou anebo trvalou totální srdeční zástavou. Přesná účinnost dávkování, stejně jako vznik dalších arytmií, byly závislé na testovaném myším kmenu. Podobné výsledky byly pozorovány také na potkaních embryích (Danielsson et al., 1997). Arytmogenní potenciál fenytoinu byl na myších embryích testován v rámci dalších studií (Azarbayjani a Danielsson, 2002). Při mikromolárním koncentračním rozmezí v mateřské plasmě byly na stádiích ED9 a ED13 pozorovány na dávkování závislé bradykardie a také další blíže nespecifikované arytmie jako AV blok. Pomocí metody patch-clamp bylo na hERG-transfekovaných buňkách demonstrováno, že fenytoin inhibuje draslíkový proud směřující do buňky. Autoři připsali pozorované efekty na embryích na vrub reaktivním kyslíkovým radikálům, které byly generovány při reoxygenaci po znovunastolení normálního rytmu. Použití α -fenyl-N-tercbutylnitronu jako antioxidantu totiž prokázalo protektivní efekt. Podobný mechanismus byl navržen také v souvislosti s dalším antiepileptikem – trimetadionem, jehož aktivním metabolitem je dimetadion. Stejná výzkumná skupina dále v navazující studii popsala, že výše zmíněné efekty na embryo byly znásobeny při použití kombinace několika antiepileptik najednou (fenytoin, fenobarbital, dimetadion a karbamazepin). To poukazuje na zvýšené

riziko léčby epilepsie více preparáty najednou, které může vést ke značnému zvýšení rizika vzniku poruch rytmu vyvíjejícího se srdce (Danielsson et al., 2007).

Dalším z preparátů, které si zasluhují zvýšenou pozornost, je almokalant (antiarytmikum III. třídy). Během testování na myších byla u almokalantu pozorována vysoká embryotoxicita, která byla pravděpodobně důsledkem jeho sekundárního působení na funkci embryonálního srdce. U kultivovaných ED10 embryí docházelo ke vzniku na dávkování závislé bradykardie s periodami totální srdeční zástavy (Skold a Danielsson, 2000). Z výše uvedených pozorování je patrné, že při předepisování všech preparátů, které způsobují embryonální bradykardii, je nutné mít na zřeteli jejich embryotoxický potenciál a používat je během těhotenství pouze s nejvyšší obezřetností.

2.42 Kuřecí embryo jako model pro studium arytmií

Srdeční elektrická aktivita byla na kuřecích embryích zkoumána v průkopnických studiích již před značnou řadou let. Tento model byl pro svou jednoduchost a dostupnost používán při prvních studiích embryonálního srdce nejvíce. Nemalou výhodou je také značná velikost vyvíjejícího se srdce v poměru k velikosti embrya a v neposlední řadě také fakt, že vývoj kuřecího srdce je velmi podobný vývoji srdce u člověka (Ruijtenbeek et al., 2002, Tutarel et al., 2005). Experimenty byly prováděny v prostředí *in vivo* (Van Mierop, 1967, Rajala et al., 1984, Tazawa et al., 1989, Sugiyama et al., 1996), na celých izolovaných embryích (Hoff a Kramer, 1939), na samotných izolovaných srdcích (Paff et al., 1968, Paff a Boucek, 1975, Kasuya et al., 1977, Hirota et al., 1987), na izolovaných srdečních segmentech (Boucek et al., 1959, Arguello et al., 1986) a také na kulturách izolovaných kardiomyocytů (Shrier a Clay, 1982). Velkou výhodou je přístupnost k embryu v podmínkách *in vivo/in ovo*. Díky tomu je možné u kuřecích embryí získat záznam elektrické aktivity celého embryonálního srdce pomocí EKG. Časoprostorová interpretace EKG záznamu elektrické aktivity srdce u časných embryonálních stádií je zjednodušená díky tomu, že aktivace komor probíhá nezralým způsobem od báze k hrotu a ještě není přítomen diferenciovaný převodní systém. Pomocí PP či RR intervalu je možné stanovit srdeční frekvenci, dobu AV převodu je možné odvodit z PR intervalu, dobu trvání aktivace komor je možné určit z QT intervalu a proces vnitřní aktivace komor lze znázornit pomocí optického mapování otevřených srdcí (Reckova et al., 2003).

Základní typy arytmií, které byly pozorovány na ověřeném modelu čtyřdenního kuřecího embryonálního srdce vystavenému stresovým podmínkám (např. anoxie – reoxygenace) nebo farmakologickým preparátům jsou přechodná síňová tachykardie (v rozsahu 180 – 300/min)

a bradykardie (rozsah 110 – 140/min), síňová ektopie, AV blok prvního stupně, AV blok druhého stupně (od AV převodu 2:1 až po 8:1), Wenckebachův fenomén (Mobitz I), AV blok třetího stupně a záchvaty nepravidelné aktivity následované přechodnou zástavou síňové aktivity (Sarre et al., 2006). Některé z těchto arytmií se podobají arytmiím pozorovaným u lidského plodu (Strasburger a Wakai, 2010).

2.421 Arytmie indukované farmakologicky

Efekty farmakologických preparátů mohou být na kuřecím embryu studovány *in vivo* velmi pohodlně díky snadnému přístupu. Paff a jeho skupina popsali po podání digoxinu vznik srdečních bloků u velmi časných embryonálních stádií. Definovali tím stádium, kdy dochází k formování srdečních komor, jako kritický moment pro vznik konálních bloků (40 hodin inkubace embryí) a AV bloků (42 hodin inkubace). U mladších stádií docházelo v reakci na přidavek digoxinu pouze ke vzniku totální srdeční zástavy. Autoři uvádějí podobnost mezi pozorovanými AV bloky a situací u lidského embrya, kdy dochází k Wenckebachovu fenoménu (Paff et al., 1964). Jiná skupina zkoumala efekty různých antiarytmik na vyvíjející se kardiovaskulární systém. Přídavek isoproterenolu v teratogenní koncentraci způsobil zvýšenou vaskulární rezistenci a vedl ke snížení srdečního výdeje, což naznačuje přítomnost funkční adrenergní signalizace u ED4 kuřecího embryonálního srdce (Clark et al., 1985). Proti tomu chronická infuze verapamilu (antagonista vápníkových kanálů) způsobila snížení srdečního i embryonálního růstu díky sníženému srdečnímu výdeji a vedla ke zpožděné morfogenezi komor (Clark et al., 1991, Sedmera et al., 1998). V nedávné studii byly předmětem zkoumání efekty beta-blokátorů a ivabradinu na embryonální srdeční funkci a přežití embryí. Vysoké dávky vedly k úmrtnosti skrze snížení srdečního výdeje, který byl způsoben bradykardií a nedostatečnou Frank-Starlingovou kompenzací. U obou zkoumaných stádií (ED4 a ED8) byly pozorovány také částečné AV bloky (Kockova et al., 2013).

2.422 Arytmie vznikající během anoxie a reoxygenace

Hlavním modelem pro studium arytmií indukovaných anoxií a reoxygenací na kuřeti je čtyřdenní embryonální srdce (ED4). Během 30 min anoxie a následné 60 min reoxygenace byly na tomto modelu pozorovány změny v chrono-, dromo- a ionotropii a také došlo k modifikaci buněčných struktur (zvětšení objemu mitochondrií a jader). Pozorované změny byly reverzibilní. Reverzibilita změn se však u pozdějších embryonálních stádií s postupujícím vývojem a narůstajícími metabolickými nároky snižovala (Raddatz et al., 1997, Sedmera et al., 2002, Sarre et al., 2006). Anoxie vedla k bradykardii, síňové ektopii,

AV bloku prvního, druhého a třetího stupně a také k přechodné srdeční zástavě. Reoxygenace způsobila také Wenckebachův fenomén a uniklé komorové stahy. Na počátku reoxygenace docházelo k významnému nárůstu PR a QT intervalu a elektromechanického zpoždění komor, což poukazuje na zpomalení ve spřažení excitace s kontrakcí. Elektromechanické zpoždění síní však ovlivněno nebylo. Během anoxie a následné reoxygenace se významně snížila kontraktilita komor (apikální komorové zkrácení) a došlo k významnému zpomalení převodu vzruchu skrze komory (prodloužení QRS intervalu). Nebyly pozorovány žádné fibrilace, AV reentry ani komorové ektopie. Jedním z navržených mechanismů způsobujícím arytmie během reoxygenace jsou náhlé nárůsty produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS – reactive oxygen species, reaktivní kyslíkové radikály). V přítomnosti antioxidantu (10 mM kyselina askorbová) byla četnost vzniku arytmií značně snížena (Sarre et al., 2005, Raddatz et al., 2011). Ačkoli přítomnost glukózy ve fyziologické koncentraci (8 mM) prodlužuje dobu srdeční aktivity při anoxii, zvyšuje se tím ovšem produkce ROS během reoxygenace a také četnost výskytu arytmií proti podmínkám bez použití glukózy (Tran et al., 1996, Raddatz et al., 2011). Tato pozorování naznačují, že změny v glykolytické aktivitě mohou hrát roli v arytmogenezí spojené s ROS.

Během déletrvající anoxie se může vyskytnout acidóza (přechod pH od 7,4 na 6,5), která má negativní chrono-, dromo- a ionotropický efekt, jež se projevuje během přechodné síňové a komorové aktivity. Při pH = 6,5 zůstala srdeční frekvence a rychlost AV převodu významně snižena, zatímco komorová kontraktilita se po 5 min navrátila do normálu. Inaktivace mechanismů závislých na HCO_3^- vede při anoxii s přítomnou acidózou a během reoxygenace ke zvýšené četnosti vzniku arytmií. To naznačuje, že u embryonálního srdce vystavenému anoxii a reoxygenaci je regulace pH výrazně závislá na dostupnosti a transportu HCO_3^- (Meilz et al., 1998).

Jak již bylo výše uvedeno, HCN kanály hrají v elektrické funkci embryonálního srdce velmi důležitou roli. Tyto kanály jsou během kardiogeneze exprimovány již velmi brzy a díky jejich působení dochází k řízení frekvence diastolické depolarizace v pacemakerových buňkách v síních, komorách a výtokové části srdce. Inhibice HCN kanálů ivabradinem vede při normoxii k negativnímu chronotropickému efektu ve všech srdečních segmentech a stabilizuje PR interval. Inhibice HCN kanálů během anoxie a reoxygenace neovlivňuje vznik určitých druhů arytmií ani dobu jejich trvání (Sarre et al., 2010).

Příliš vysoká intracelulární koncentrace kalcia (calcium overload) je dalším významným arytmogenním faktorem. Může být u embryonálních kardiomyocytů způsobeno vstupem kalcia do cytoplasmy zejména skrze napěťově řízené kalciové kanály L-typu (Cav1.2)

a T-typu (Cav3.1). Působení verapamilu (10 nM), který je antagonistou kalciových kanálů L-typu, vedlo k protekci vzniku arytmií indukovaných anoxií a reoxygenací (Tenthorey et al., 1998). Napětově řízené kalciové kanály L-typu (Cav1.2) proti kanálům T-typu (Cav3.1) hrají navíc naprosto zásadní roli při spontánní elektrické aktivitě kuřecího embryonálního srdce. Není tedy překvapující, že inhibice Cav1.2 kanálu nifedipinem vedla k významnému a progresivnímu zkrácování QT intervalu a způsobila prodloužení elektromechanického zpoždění komor, zatímco inhibice kanálů Cav3.1 mifebradilem měla na elektrickou aktivitu srdce jen velmi malý vliv (Sabourin et al., 2011).

Klíčovým regulátorem vyvíjejícího se kardiovaskulárního systému je adenosin, který vzniká při intracelulární a extracelulární degradaci adenosintrifosfátu (ATP) a během hypoxie nebo ischemie se hromadí v myokardiální intersticiální tekutině. U kuřecího embryonálního srdce, které se přirozeně vyvíjí v prostředí s nízkým obsahem kyslíku, je fyziologická koncentrace adenosinu mnohem vyšší než u dospělého srdce fungujícího v podmínkách normoxie (Robin et al., 2011).

2.423 Teplotní model

Hlavním faktorem, na který jsme se v této práci zaměřili a který souvisí s arytmogenezí, je teplota. Funkce embryonálního srdce je silně závislá na teplotě prostředí. Teplota má mimo jiné vliv na kinetiku procesů, které probíhají skrze iontové kanály, pumpy a přenašeče a zásadně tedy ovlivňuje iontovou dynamiku během tvorby a šíření elektrických vzruchů (Sperelakis a Lehmkuhl, 1967, Chen a DeHaan, 1993).

Navzdory homoiotermii si ptačí embrya zachovala od jejich poikilotermních předků určitou flexibilitu a tolerují mírné odchylky v inkubační teplotě. Vliv teploty na vyvíjející se kuřecí embryonální srdce je předmětem výzkumu již značnou řadu let. Jedny z prvních studií k tomuto tématu provedl již téměř před půl stoletím Warbanow. Jeho záměrem bylo prozkoumání vlivu dlouhodobé hypotermie (32 – 36 °C) na embryonální vývoj kuřecího srdce. Při těchto experimentech došel k pozoruhodným výsledkům. Dlouhodobé vystavení vyvíjejícího se embrya *in ovo* (ED11 – ED18) snížené inkubační teplotě způsobilo vznik srdeční hypertrofie, která se projevovala nejsilněji při inkubaci během 33,5 °C. Dalšími efekty dlouhodobé hypotermie byla bradykardie a snížení systolického tlaku v komorách (Warbanow, 1970). Tato hypertrofie vedla ke zdvojnásobení poměru hmotnosti srdce k hmotnosti těla embrya a také ke dvojnásobnému zvýšení kontraktility srdcí (Warbanow, 1971). Další studie byla zaměřená na vliv hypotermie během vývoje srdce u časných embryonálních stádií (HH18 – 24). Při snížení teploty prostředí ze 34,7 °C na 31,1 °C došlo

k významnému poklesu srdeční frekvence o 25%, zvýšila se vaskulární rezistence, snížil se krevní tlak a průtok krve. Tato bradykardická reakce na snížení teploty byla nezávislá na autonomní inervaci, která se vyvíjí až v pozdějších fázích vývoje. Pozorované změny v hemodynamice způsobené hypotermií vedly ke snížení srdečního vývoje a mohou vést až k teratogenickým efektům během vývoje kuřecího embrya (Nakazawa et al., 1985). Současnější studie na stádiu HH 17 popsala, že hypotermie vedla k bradykardii a snížení rychlosti proudění krve během systoly (Lee et al., 2011). Hypertermie inkubačního prostředí (37 – 40 °C) způsobuje u stádia HH 21 nárůst srdeční frekvence o 22% bez významných změn systolického objemu. V této studii byl popsán významný nárůst bazální srdeční frekvence u stádií HH 18 a 24 (Nakazawa et al., 1986). Dlouhodobá (ED1 – 9) hypotermie (31 – 36 °C) a hypertermie (38 °C – 42 °C) vedla k teratogenním až letálním efektům (Peterka et al., 1996).

Zásadní studie, kterou provedl Sarre a kolegové, se týkala vlivu ochlazení ze 37 °C na 0 °C s následným opětovným ohřátím na původní teplotu 37 °C. Výrazné změny teploty vedly ke dramatickým změnám ve funkci kuřecího srdce na stádiu HH 24. Vlivem hluboké hypotermie srdce přestávala bít při dosažení kritické teploty 18 °C a poté opět začala bít při překročení stejné kritické teploty během ohřívání. Změny v srdeční frekvenci byly lineární v teplotním rozsahu 34 – 37 °C (Sarre et al., 2006). Nedávná studie popsala pomocí optického mapování efekty akutního vlivu teploty na rybí srdce dávaná pruhovaného v podmínkách *ex vivo* v rozsahu 18 – 28 °C. Ochlazení na teplotu 18 °C způsobilo pokles srdeční frekvence o 40% a trojnásobně, respektive dvojnásobně snížilo hodnoty síňového a komorového APD₅₀ (action potential duration, doba trvání akčního potenciálu v polovině jeho amplitudy). Tato studie popisuje, že APD₅₀ u síní bylo jedním z parametrů, které akutní změny ovlivnily nejvýrazněji, a že tento jev je mezi obratlovci obecně konzervován (Lin et al., 2014).

Doba trvání akčního potenciálu se u jednotlivých segmentů srdce liší. Nejdélší dobu trvání akčního potenciálu má AV kanál. Studie AV kanálu na kuřecích embryonálních srdcích nabízí, že nejdélší doba trvání akčního potenciálu (APD₉₀ – doba trvání akčního potenciálu v 10% jeho amplitudy) u AV kanálu může souviset se skutečností, že v této oblasti proti síním a komorám během vývoje dlouho přetrvává závislost na pomalých kalciových a sodíkových iontových proudech (Arguello et al., 1986).

Jak zde bylo popsáno, tak teplota představuje velmi významný faktor, který zásadně moduluje funkci embryonálního srdce a pokud je její změna proti přirozené teplotě dlouhodobá anebo výrazná, může být pro vývoj srdce i velmi nebezpečná.

2.5 Metody pro studium arytmií během vývoje srdce

Zkoumání arytmií u vyvíjejícího se srdce vyžaduje a vždy vyžadovalo speciální technický přístup, zejména když se jedná o záznam jeho elektrické aktivity. Právě záznam elektrické aktivity však může podat velmi podrobnou informaci o vzniklých arytmiích, která může být posléze na modelovém organismu lépe popsána a nakonec v lepším případě v klinické praxi úspěšně léčena.

2.51 Historie elektrofyziologických technik záznamu šíření elektrického vzruchu

Úspěšné studie elektrické aktivity vyvíjejícího srdce se začaly objevovat koncem minulého století. Zlatým standardem pro záznam průběhu akčního potenciálu jsou mikroelektrody (punčoškové, kartáčové nebo balónkové elektrody), které velmi dobře plní svou funkci při záznamu aktivity dospělého srdce, u malého a křehkého embryonálního srdce je ovšem jejich použití značně limitováno. I přesto bylo provedeno několik úspěšných studií, kde jejich použití u izolovaného kuřecího embryonálního srdce bylo dostatečně šetrné a pečlivé. Tímto byl umožněn přibližný záznam šíření elektrického vzruchu a díky němu bylo postulováno, že vývoj trabekulizace v budoucích komorách souvisí vývojem sítě komorového převodního systému (Arguello et al., 1986, de Jong et al., 1992). Pomocí pouhých dvou mikroelektrod se podařilo Chuckovi a jeho kolegům objevit u kuřecího embryonálního srdce přechod mezi nezralým typem aktivace komor od báze k hrotu směrem ke zralému typu aktivace od hrotu k bázi. Tento jev přiřadili do souvislosti s procesem septace komor (Chuck et al., 1997). Jejich výsledky byly později potvrzeny pomocí vysokorychlostního optického mapování (Reckova et al., 2003, Sedmera et al., 2004), které bude předmětem následující kapitoly. Mikroelektrody jsou stále přínosné k řešení konkrétních otázek, jak bylo předvedeno na starších stádiích kuřecích embryonálních srdcí, kde pomocí dvou elektrod společně s EKG pozorovali abnormální vedení vzruchu mezi síněmi a komorami (Kolditz et al., 2007, Kolditz et al., 2008).

2.52 Optické metody pro vizualizaci šíření elektrického vzruchu

Šíření elektrického vzruchu vzrušivými tkáněmi lze studovat optickými metodami, které u embryonálního srdce byly zavedeny díky supravitálnímu barvení indikátory citlivými na změnu membránového napětí (Kamino et al., 1981). Optické mapování je elektrofyziologická metoda, která pro studium elektrické aktivity embryonálního srdce využívá namísto klasických mikroelektrod, používaných pro dospělá srdce, tzv. virtuální elektrody. Je to metoda, pomocí které se získává záznam elektrické aktivity na povrchu

epikardu nepřímo skrze snímání změn intenzity fluorescence barviva citlivého na změny membránového napětí anebo koncentrace určitého druhu kationtů. Ze záznamu je možné získat dvojrozměrné časoprostorové aktivační mapy a videa šíření elektrického vzruchu. Systém používaný pro dvojdimenzionální optické mapování embryonálních srdcí byl již detailně popsán (Tamaddon et al., 2000, Rentschler et al., 2001). Tento přístup závisí na několika faktorech. Prvním z nich je dostupnost vhodných indikátorů, které musí být stabilní a musí poskytovat dostatečně silný signál změny membránového napětí anebo intracelulární koncentrace iontů. V další řadě se jedná o systém snímání. Pro menší embryonální srdce je používán epifluorescenční mikroskop a pro větší dospělá srdce jsou používány speciální iluminační systémy se světelnými diodami a makroskopickými čočkami (Fedorov et al., 2007). A nakonec se jedná o velký objem dat získaných při snímání skrze mnoho kanálů (v počátcích 10×10 a nyní přes 100×100) s vysokou vzorkovací frekvencí (běžně přes 1 kHz, 16 bitů/kanál), který klade vysoké nároky na výpočetní techniku a představuje velkou zátěž zejména pro operační paměť, která je mezikrokem při snímání dat fotodiodovým polem anebo vysokorychlostní kamerou. Technický pokrok v těchto slabých místech často vedl k novým objevům.

Mezi hlavní problémy barviv a indikátorů dynamických jevů patří jejich nestabilita, fotobleaching (vysvicování) – ztráta fluorescence a rozklad fluoroforu po osvětlení intenzivním světlem, které je spojeno s fototoxicitou produktů rozkladu a nakonec také slabý signál. Mezi nejpopulárnější barviva citlivá na změnu membránového napětí patří 4- β -[2(di-*n*-butylamino)-6-naphthyl]vinyl}pyridinium – di-4-ANEPPS (Witkowski et al., 1997), které je excitováno širokým rozsahem vlnových délek, ale signál emitované fluorescence odpovídající změně membránového napětí je v pásmu > 590 nm. Tento indikátor je díky svému lipofilnímu alifatickému řetězci inkorporován do cytoplasmatické membrány a v některých případech (např. na izolovaných buňkách) může být výhodnější použít di-8-ANEPPS, který má delší alifatický řetězec (Kucera et al., 1998). Novější barviva jsou excitována delšími vlnovými délkami, které lépe pronikají do tkání a jsou pro buňky méně toxická, což je značná výhoda (Sakai et al., 1998).

První zavedené detektory tvořily světlocitlivé fotodiody, které jsou jednotlivě laditelné a mají výborný poměr signálu k šumu. Fotodiodová pole byla volně upravitelná a umísťovala se před projekci snímacího zařízení. Největším průkopníkem tohoto přístupu byl Kamino a jeho skupina (Kamino et al., 1981, Hirota et al., 1985, Kamino, 1991). Tento systém byl používán ke studiu nejčasnějších míst počátku elektrické aktivity u kuřecích a potkaních embryonálních srdcí, stejně jako byl použit k pozorování efektů architektury síňového myokardu na šíření

vzruchu v síních u žabího srdce (Komuro et al., 1986). Fotodiodová pole jsou v dnešní době stále komerčně dostupná a jsou používána ke studování dějů od buněčné úrovně (Kucera et al. 1998) až po časná embryonální králičí srdce (Chuck et al., 2004).

Velmi zajímavý přístup vyžívající technického pokroku je laserový skenovací systém používaný pro studium změn membránového napětí (Dillon a Morad, 1981). Tito autoři ukázali na žabím srdci, jak architektura myokardu síní významně ovlivňuje preferenční cesty šíření vzruchu. Tento systém však nebyl příliš široce přijat. Populárnější se stala spíše laserová skenovací konfokální mikroskopie využívající čárového skenovacího módu, pomocí které lze dosáhnout rychlostí až 2 kHz a lze s ní studovat velmi rychlé děje jako např. kalciové transienty (pulzy) a záblesky na izolovaných buňkách (Toischer et al., 2010). Je vhodná také v kombinaci s použitím barviv citlivých na změnu membránového napětí na izolovaných embryonálních srdcích, kde je její výhodou možnost přesného nalezení hloubky, ze které pochází signál a tímto značně zjednodušuje komplexnost dat.

2.53 Vysokorychlostní kamery pro optické mapování

Pokrok v získávání nových významných informací o srdeční elektrofyzilogii pomocí optického mapování je úzce spjat se zvyšováním časového rozlišení do řádu milisekund a prostorového rozlišení do řádu mikrometrů. Morleyho skupina pracovala s kamerou Dalsa se snímací frekvencí pod 1000 snímků za vteřinu a prostorovým rozlišením 64×64 pixelů (Gutstein et al., 2001, Hall et al., 2000, Jalife et al., 1998, Jalife et al., 1999, Morley et al., 2000, Morley a Vaidya, 2001, Rentschler et al., 2001, Rentschler et al., 2002, Tamaddon et al., 2000, Vaidya et al., 2001). Jejich systém byl naprosto dostačující, protože další zvýšení prostorového rozlišení by vedlo ke zmenšení velikosti pixelů a tím ke snížení počtu fotonů dopadajících za jednotku času a došlo by také k problému s přenosem dat (např. 1 sekunda snímání s rozlišením 100×100 pixelů, 16 bit, 1 kHz odpovídá 25Mb dat, což byl významný problém pro PC během devadesátých let a dokonce i po roce 2000). Další komplikací optického mapování bijících srdcí jsou pohybové artefakty. Mechanické pohyby bijícího srdce byly jinými metodami využity a použity pro analýzu (Buechling et al., 2009, Raddatz et al., 1997), ale pro optické mapování představují značný problém, což platí zejména pro analýzu repolarizace. Z tohoto důvodu byly zavedeny inhibitory pohybu srdcí, které fungují na principu odpřažení excitace a kontrakce. Do praxe byly zavedeny BDM – 2,3-butandion monoxim (inhibitor myosinu II, Efimov et al., 1997), cytochalasin D (inhibitor polymerizace F-aktinu, Biermann et al., 1998, Jalife et al., 1998) a blebbistatin (inhibitor myosinu II, Efimov et al., 1997, Fedorov et al., 2007, Jou et al., 2010, Sankova et al., 2012). Tyto látky

umožnily významné zlepšení kvality signálu a jsou v dnešní době mnoha vědci již považovány za nepostradatelné. Přinášejí s sebou však také určité nevýhody. V první řadě se jedná o jejich toxicitu, vliv na dobu trvání akčního potenciálu anebo pacemakerového potenciálu. Za účelem zlepšení kvality signálu byly vyvinuty také alternativní metody, jako průměrování signálu (Rentschler et al., 2001, Rentschler et al., 2002) anebo sledování pixelu skrze snímání pomocí duální vlnové délky (Leaf et al., 2008). Zdá se, že svoji úlohu plní dobře, dokud je srdeční rytmus pravidelný a vzorec šíření vzruchu se v jednotlivých cyklech neliší, což je po většinu času splněno (Sankova et al., 2012). Nicméně, sledování pixelu vyžaduje buď dvě kamery anebo velmi rychlé přepínání vlnových délek, což je buď na úkor časového či prostorového rozlišení, případně obou.

Proti punčoškovým nebo balónkovým elektrodám, které doopravdy umožňují trojrozměrné mapování elektrické aktivity celého srdce, je optické mapování omezeno na pohled z jednoho úhlu, což redukuje trojrozměrný orgán na jedinou plochu. Některé skupiny zdůrazňují, že je důležité povrch snímaného orgánu mechanicky narovnat, aby byla snížena nejednotnost zakřiveného povrchu (Larsen et al., 2012), ovšem toto nepřírozené natahování může ovlivnit převodní vlastnosti myokardu díky ovlivnění funkce iontových kanálů citlivých na mechanický podnět. Problém s limitací oblasti snímání, který může být opravdovou komplikací při snímání komplexnějších typů arytmií jako např. fibrilace komor (Boukens a Efimov, 2014), může být vyřešen pomocí duálního anebo vícečetného kamerového systému (což lze snadno dosáhnout v případě zavěšené Langendorffovy preparace). Jednoduché řešení je otáčení srdce (Sedmera et al., 2004, Ammirabile et al., 2012). Možné je také použití soustavy dvou zrcadel v úhlu 45 stupňů (Gurjarpadhye et al., 2007), která umožňuje pozorovat přibližně 75% povrchu srdce. Při tomto přístupu dochází ovšem ke snížení prostorového rozlišení kamery, ale jedná se o levné a technicky velmi jednoduché řešení.

2.54 Pokroky ve vysokorychlostním zobrazování

Pokroky ve výkonu a zvýšení dostupnosti přístrojového vybavení umožnilo snímání několika parametrů najednou, jako např. současné snímání změn membránového napětí a intracelulární dynamiky kalcia (Chen et al., 2010). První duální záznam tohoto typu byl popsán Efimovem a jeho kolegy (Efimov et al., 1994). Hlavní výhodou tohoto přístupu je umožnění studia elektromechanické disociace během ischemie. Za těchto podmínek lze pozorovat např. dlouhé kalciové transienty, které se za nepřítomnosti ATP mohou vyskytnout bez jakýchkoliv změn membránového napětí, ale může dojít ke změnám na úrovni membránového napětí i kalcia zároveň (Choi a Salama, 2000). Duální simultánní snímání dokáže poskytnout přesné

srovnání pozorovaných parametrů, což je s takovouto přesností zatím nemožné dosáhnout jinou známou metodou.

Nové generace kamer se dělí podle svého provedení na dvě soupeřící skupiny – CCD vs. CMOS nebo sCMOS. Zatímco používání přídavných zesilovačů signálu (Reckova et al., 2003, Sedmera et al., 2003) bylo postupně opuštěno, EM-CCD kamery díky jejich rychlosti a citlivosti stále představují velmi citlivé a reprodukovatelné detektory a jsou využitelné také při jiných technikách pracujících s nízkou intenzitou světla (spinning disc, lightsheet mikroskopie). Novější CMOS senzory, které skrývá např. veřejně dostupná kamera Ultima L, disponují excelentní citlivostí a jejich rychlost snímání se posunula až na 10 000 snímků/sek. Poslední vývoj rozšířil spektrum kamer vhodných pro optické mapování – nejnovější kamery (Andor, Hamamatsu) poskytují při plném rozlišení (> 1 megapixel) rychlost snímání > 100 snímků/sek či ještě více při binningu. Takovéto variabilní systémy mohou díky svým výhodám a své dostupnosti otevřít pole vysokorychlostních zobrazovacích technik širšímu spektru laboratoří.

Revoluční technologií vysokorychlostního zobrazování poslední doby je bez sporu lightsheet fluorescenční mikroskopie, která využívá výhod SPIM (selective plane illumination microscope, mikroskop pracující s tenkou vrstvou světla) mikroskopu. Tato metoda umožnila při vysokém časovém rozlišení dlouhodobé snímání dějů během vývoje v prostředí *in vivo* v trojrozměrném prostorovém rozlišení na rotujícím vzorku. Přínos této metody pro vývojovou biologii je obrovský. O znovuobjevení tohoto mikroskopu a vybroušení této metody se zasloužil zejména Huisken a jeho skupina. V zásadní práci popsali aktivaci embryonálního srdce zebřičky *in vivo* ve 3D rozlišení a pomocí optogenetického přístupu lokalizovali srdeční pacemaker a simulovali různé typy arytmií (Arrenberg et al., 2010). Zásadní výhodou této metody je nízká fototoxicita a možnost snímání dlouhých dějů *in vivo*. K jejím limitacím na druhou stranu patří velmi vysoké nároky na výpočetní techniku díky značným objemům získaných dat a také díky vysoké náročnosti 3D rekonstrukce dat.

2.55 Optické mapování intracelulární dynamiky kalcia

Měření změn koncentrace kalcia v čase bylo v minulosti při relativně nízkém časovém rozlišení úspěšně aplikováno např. při pozorování oplození vajíčka anebo při studiu buněčné signalizace (Brooker et al., 1990, Sun et al., 1992). Vysokorychlostní mapování kalcia, které bylo úspěšně provedeno na myším embryonálním srdci (Valderrabano et al., 2006) přineslo zvýšení citlivosti a tím umožnilo detekci signálu i v místech, která poskytují signál velmi slabý, jakým je např. AV kanál, a umožnilo tak i nové možnosti detekce

různých arytmií. Důležité dynamické jevy probíhají v kardiomyocytech značnou rychlostí (např. kalciové transienty), a proto je při jejich detekci nutná vysoká rychlost snímání a zároveň vysoké rozlišení. Náš experimentální přístup při pozorování změn v elektrické funkci normálních a stresovaných embryonálních srdcí s rozlišením do 512×512 pixelů a rychlostí snímání do 2000 snímků/sek, což je při rychlosti námi pozorovaných jevů naprosto dostačující. Náš přístup tímto představuje významný technologický pokrok, který přináší nové důležité poznatky, kterými jsou např. lokalizace míst ektopické aktivity či podrobná lokalizace vzniku blokády vedení vzruchu (Ammirabile et al., 2012, Benes et al., 2014, Vostarek et al., 2014, Vostarek et al., 2016).

3. HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Aktivace mechanismů způsobujících indukci a diferenciaci buněk převodního systému za vývoje se uplatňuje rovněž při vzniku arytmií za různých patologických stavů v dospělosti. Testovali jsme pracovní hypotézu, že vybrané epigenetické faktory (teplota, stres prostředí *in vitro*) ovlivňují za vývoje funkci převodního systému a mohou vést ke vzniku arytmií, a to jak mechanismem působícím na tvorbu vzruchu, tak na jeho vedení.

Hlavním cílem této práce bylo podrobně popsat změny ve funkci izolovaného embryonálního kuřecího srdce v reakci na akutní změny teploty a stresové podmínky v prostředí *in vitro*. Pozorování v prostředí *in vitro* jsme chtěli porovnat s reakcí embryonálního srdce v přirozeném prostředí *in ovo*, kde je srdce připojeno na krevní oběh.

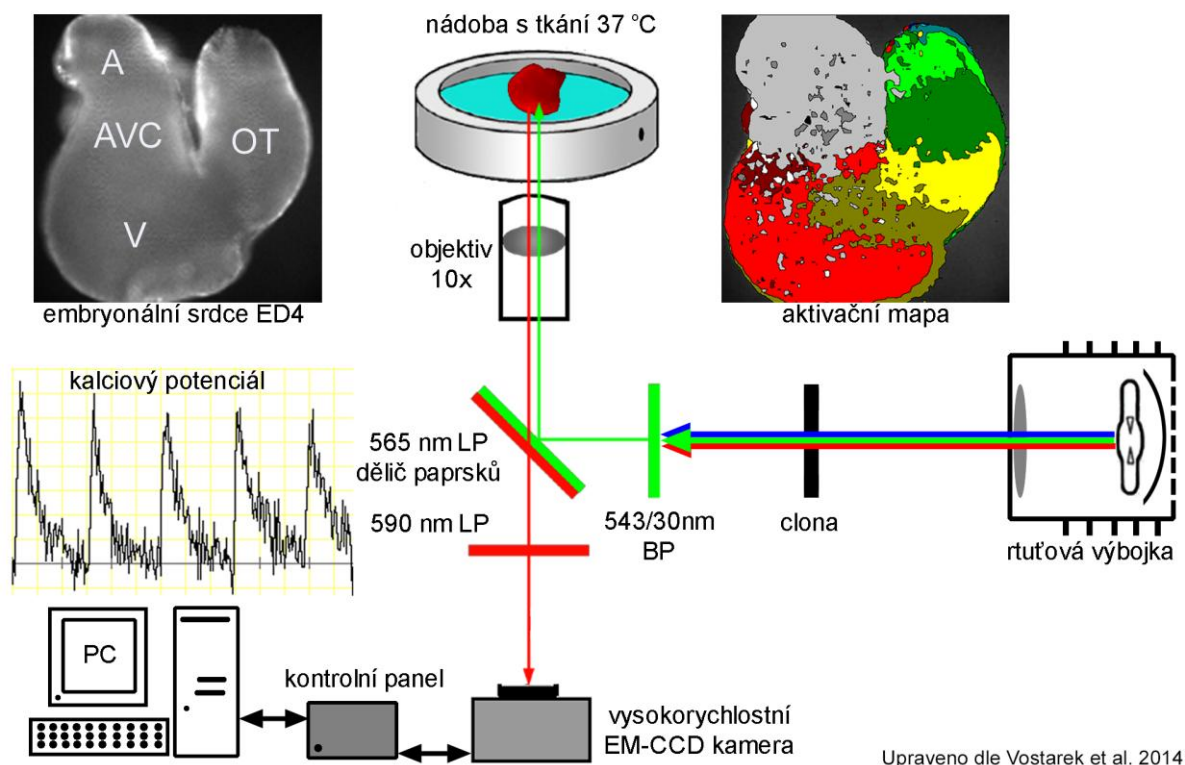
4. METODIKA

4.1 Experimentální model

Vejce od nosnic druhu bílá leghornka (Ústav molekulární genetiky, Koleč, ČR) byla před inkubací uchovávána při stálé teplotě 16 °C. Inkubace vajec probíhala při teplotě 37,5 °C v inkubátoru se zvlhčováním vzduchu až do čtvrtého embryonálního dne (ED4), což odpovídá dle Hamburgera a Hamiltona, kteří popsali 46 stádií vývoje kuřecího embrya, stádiím HH 21 – 23 (Hamburger a Hamilton, 1951). Poté byla kuřecí embrya vyjmuta z vajec a přemístěna do Tyrodova roztoku (složení: NaCl 145 mM, KCl 5,9 mM, CaCl₂ 1,1 mM, MgCl₂ 1,2 mM, glukóza 11 mM, HEPES 5 mM; pH = 7,4). Z embryí byla pod disekčním mikroskopem šetrně vyjmuta srdce, která byla následovně barvena a použita pro optické mapování.

4.2 Optické mapování

V našem provedení jsme použili invertovaný epifluorescenční mikroskop (Nikon Eclipse TE 2000-S, Tokio, Japonsko) ve spojení s vysokorychlostní digitální kamerou s EM-CCD čipem (Andor iXon3, Andor, Belfast, Velká Británie). Popsané schéma je znázorněno na Obr. 8 (Vostarek et al., 2014). EM-CCD kamera poskytuje při své vysoké citlivosti také vysoké časoprostorové rozlišení (naše rozlišení bylo 512 × 512 pixelů s frekvencí snímání 130 snímků/sec). Proto je vhodná ke sledování velmi rychlých dějů, jakými je např. intracelulární oscilace kalcia. Právě tento děj byl hlavním předmětem našeho zkoumání. U systému, který jsme použili pro optické mapování intracelulárních změn koncentrace kalcia u kuřecích embryonálních srdcí, jsme vycházeli ze zavedeného přístupu (Valderrabano et al., 2006).



Upraveno dle Vostarek et al. 2014

Obrázek 8

Experimentální schéma optického mapování intracelulární dynamiky kalcia u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

A – síň, AVC – AV kanál, V – komora, OT – výtoková část.

4.21 Vysokorychlostní zobrazování změn intracelulární koncentrace kalcia

Při samotném experimentu jsme postupovali následovně. Izolovaná srdce byla za laboratorní teploty 60 minut barvena bez přístupu světla ve 2,5 ml 1,78 mM barviva Rhod-2 (Rhodamin 2, Invitrogen, Carlsbad, USA) v Tyrodově roztoku. Následovala další inkubace ve tmě ve 2,5 ml čistého Tyrodova roztoku bez barviva, nyní však při vyšší teplotě 37 °C, opět po dobu 60 minut. Srdce obarvená tímto způsobem byla přemístěna do speciální optické Petriho misky se skleněným průhledem (Wilco Wells, Amsterdam, Holandsko), která obsahovala 2 ml Tyrodova roztoku s přidaným blebbistatinem (0,15 μM, disociátor excitace kontrakce, Sigma-Aldrich, Německo) kvůli redukci pohybu srdcí při kontrakcích. Teplota roztoku byla regulována termoregulační podložkou s digitálním ovladačem a teploměrem (Linkam DC-60, Tadworth, Velká Británie). Excitace vzorku probíhala pomocí zeleného světla v rozmezí 510 – 560 nm, které vyvolalo fluorescenci s emisí červeného (> 590 nm) světla. Elektrická aktivita srdcí byla snímána opticky vysokorychlostní kamerou jako změna intenzity fluorescence indikátoru v čase, což odpovídalo oscilacím koncentrace

kalcia v cytoplasmě myocytů, kdy nárůst intenzity fluorescence odpovídal nárůstu koncentrace kalcia. Měření probíhala při třech různých teplotách. Teplota 37 °C byla základní a zároveň kontrolní teplotou a představovala normotermii. Teplota 34 °C simulovala podmínky hypotermie a 40 °C představovalo hypertermii. S každým srdcem byla provedena pouze dvě měření za různých teplot kvůli jeho omezené stabilitě *in vitro*. Před každým měřením předcházelo 5 minut pro stabilizaci a vytemperování vzorku na požadovanou teplotu. Teplota lázně byla buďto zvyšována ze 34 °C na 37 °C či ze 37 °C na 40 °C, anebo snižována ze 37 °C na 34 °C.

4.22 Vysokorychlostní zobrazování změn membránového napětí

S indikátory pro mapování změn membránového napětí jsme, proti kalciovým indikátorům, pracovali spíše okrajově. Tuto metodu jsme využili pouze v experimentech s elektrickou stimulací embryonálních srdcí *in vitro*. V porovnání s kalciovými indikátory je u mapování membránového napětí výhodou, že průběh změn fluorescence analogicky odpovídá průběhu akčního potenciálu se všemi iontovými proudy. Jediným rozdílem mezi průběhem akčního potenciálu a průběhem změny fluorescence je, že fluorescence s depolarizací klesá. Jako indikátor jsme použili barvivo di-4-ANEPPS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), které bylo excitováno modrozeleným světlem o vlnové délce 480 – 550 nm. Při osvětlení tímto světlem dochází k fluorescenci s emisí červeného (> 590 nm) světla, kdy pokles intenzity fluorescence odpovídá průběhu akčního potenciálu (Witkowski et al., 1997). Detailnější popis postupu je uveden níže (viz kapitola 4.5).

4.3 Analýza dat

Získaná data byla analyzována pomocí softwaru NIS Elements (Nikon, Tokyo, Japonsko) a BV_Ana Analysis (SciMedia Ltd, Costa Mesa, CA, USA). Srdeční frekvence (počet úderů za minutu) byla stanovena v programu NIS Elements z počtu kalciových transientů v intervalu 6 sekund jako desetinásobek zjištěného počtu. Amplitudy kalciových transientů v síních a komorách byly analyzovány pomocí aplikace NIS Elements Tools. Počátek kalciového potenciálu byl stanoven jako bod, kdy křivka pozitivního signálu kalciového pulzu při svém nárůstu opouští základní osu. Velikost amplitudy potenciálu jsme stanovili jako výšku maxima pulzu od základní osy. Délky trvání akčního potenciálu (APD₉₀) různých částí srdce byly odvozeny z doby trvání kalciového pulzu a byly získány ze záznamů ze síní, atrioventrikulárního kanálu a komor normotermických srdcí (n = 10), jejichž záznam neobsahoval žádné arytmie ani pohybové artefakty. Časoprostorové aktivační mapy jsme

vytvořili na základě originálních dat ze softwaru NIS Elements pomocí programu BV_Analysis. Při zpracování dat jsme používali high pass/low pass a mediánové filtry. První derivaci jsme určovali numericky podle algoritmu zabudovaného v softwaru BV_Analysis. Maximum první derivace bylo použito jako čas aktivace jednotlivých pixelů na aktivačních mapách. Analýza dat z mapování membránového napětí probíhala podobným způsobem, jako analýza dat z mapování kalcia podle již zavedeného postupu (Sankova et al., 2010).

4.4 Videomikroskopie

Reakce srdeční funkce na změny teploty u čtyřdenních kuřecích embryí (ED4) inkubovaných *in ovo* jsme pozorovali pomocí videomikroskopie. Každé embryo jsme podrobili třem měřením za rozdílných teplot přímo ve vejci. První měření probíhalo v hypotermii při 34 °C, další následovala normotermie 37 °C a třetí měření představovalo hypertermii 40 °C. Kuřecí embrya *in ovo* byla při stanovené teplotě udržována pomocí ručně vyrobené hliníkové komůrky, z vnější strany izolované polystyrenem a vyplněné předeřátými hliníkovými pecičkami (Bath Armor, Nickel-Electro Ltd., Weston-super-Mare, Velká Británie), která byla umístěna na termoregulačním podstavci (Echotherm chilling/heating plate, Torrey Pines Scientific, Carlsbad, CA, USA). U vajec jsme vytvořili ve skořápce kruhové otvory o průměru cca 1 – 1,5 cm a opatrně jsme odebrali část papírové blány chránící embryo, aby bylo možné pod mikroskopem opticky zaznamenávat srdeční aktivitu. Měření probíhalo pomocí digitálního fotoaparátu (Nikon D7000, rozlišení 640 × 480 pixelů, rychlost snímání 30 snímků/sek) připojeného na disekční mikroskop (Leica 125, Leica Microsystems, Wetzlar, Německo) se světelným zdrojem (150 W halogenová výbojka). Během měření byl kvůli zvýšení kontrastu proudění krve použit zelený interferenční filtr zabudovaný ve světelném zdroji. Při každé teplotě byl pořízen videozáznam o délce 10 sekund. Analýza získaných dat byla prováděna pomocí programu ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Zvolili jsme vždy dvě oblasti zájmu (síně a komoru), u kterých byla srdeční frekvence stanovena ze záznamu změn úrovně šedi, která odpovídala změnám proudění krve v čase (Sedmera et al., 1999, Kockova et al., 2013).

4.5 Elektrická stimulace *in ovo*

Elektrickou stimulaci síní a komor u ED4 kuřecích embryonálních srdcí *in ovo* jsme prováděli pomocí platinové bipolární elektrody (WPI, Sarasota, Florida, USA), kterou jsme umístili do cílové oblasti pomocí mikromanipulátoru (Narishige International USA, Inc., Amityville,

NY, USA) skrze otvor ve skořápce. Vejce a embrya byla během stimulace udržována při 37 °C pomocí stejných pomůcek, jako je popsáno výše. Před samotnou stimulací byl vždy pořízen záznam přirozené činnosti srdce. Srdce byla poté stimulována s postupně narůstající nebo klesající frekvencí stimulace (od 120/min do 600/min) pomocí 2 ms pulzů o dvakrát vyšší intenzitě než byl elektrický práh diastoly, který se pohyboval v rozmezí 1,5 – 2,5 mA (Sedmera et al., 1999). Hlavním cílem elektrické stimulace bylo stanovit převodní limity jednotlivých segmentů srdce. Jako převodní limit pro udržitelnou frekvenci srdečního segmentu jsme stanovili frekvenční práh, nad kterým se již začaly objevovat nepravidelnosti v srdečním rytmu převáděném ze stimulující elektrody. Videozáznamy elektrické stimulace byly získány a analyzovány stejným postupem, jako bylo již výše uvedeno v kapitole o videomikroskopii.

4.6 Elektrická stimulace *in vitro* – mapování změn membránového napětí

Výchozím materiálem pro mapování změn membránového napětí při stimulaci v podmínkách *in vitro* byla srdce kuřecích embryí (ED4), u kterých jsme ponechali dorzální část hrudní stěny, aby bylo možné vzorky přišpendlit na silikonové dno mapovací misky. Izolovaná srdce jsme dále 5 minut barvili v 500 µl chlazeného roztoku barviva di-4-ANEPPS (zásobní roztok 1,25 mg/ml v DMSO – dimetylsulfoxid, finální koncentrace 2,5 mM v Tyrodově roztoku), které je citlivé na změny membránového napětí změnou intenzity své fluorescence. Poté jsme srdce krátce opláchli chlazeným Tyrodovým roztokem a skrze část hrudní stěny je upevnili entomologickými mikrošpendlíky (Minutien pins, Fine Science Tools, Heidelberg, Německo) na silikonem pokryté dno ručně vyrobené měděné mapovací komůrky, která obsahovala 20 ml Tyrodova roztoku s přidáním blebbistatinem (0,1 µM) kvůli redukci pohybu srdcí. Teplota lázně byla udržovaná při 37 °C a roztok byl téměř nepřetržitě oxygenován probubláváním 100% kyslíkem. Elektrická stimulace síní a komor byla prováděna pomocí stimulatoru (Isostim A320, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) spojeného s platinovou bipolární elektrodou (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), kterou jsme umísťovali na cílovou oblast srdce pomocí mikromanipulátoru. Stimulace probíhala na síních ve frekvencích od 200 do 400/min a na komorách ve frekvencích mezi 300 a 600/min. Cílem stimulace bylo stanovit převodní limity pro jednotlivé úseky srdce, stejným způsobem jak již bylo uvedeno výše v kapitole o elektrické stimulaci *in ovo*. Záznam elektrické aktivity srdcí byl snímán pomocí epifluorescenčního mikroskopu (Olympus BX51WI, Olympus, Tokio, Japonsko) spojeného s vysokorychlostní kamerou Ultima L (SciMedia Ltd, Costa Mesa, CA, USA) s přidruženým softwarem. Jako světelný zdroj sloužila 150 W Xe výbojka

(Cairn Research, Faversham, Velká Británie) propojená se softwarem ovládanou závěrkou (VMM-D1/T1, Uniblitz, Vincent Associates, Rochester, NY, USA). Výsledné prostorové rozlišení s použitím 10 × vodního imerzního objektivu bylo 100 × 100 pixelů, kde velikost pixelu odpovídala 16 μm a časové rozlišení bylo 1 kHz. Širší popis optického mapování změn membránového napětí byl popsán již dříve (Sankova et al., 2010).

4.7 Statistická analýza

Data z optického mapování *in vitro* jsme rozdělili do dvou skupin podle teploty, při které probíhala měření. Každé srdce testované *in vitro* bylo podrobena dvěma měřeními při různých teplotách. První skupinu tvořila srdce testovaná na hypotermii (kontrolní teplota – normotermie 37 °C a hypotermie 34 °C). Druhá skupina zahrnovala srdce testovaná na hypertermii (kontrolní teplota – normotermie 37 °C a hypertermie 40 °C). Každá ze dvou skupin obsahovala alespoň 45 testovaných embryonálních srdcí. Četnost výskytu AV bloku třetího stupně ve třech teplotních skupinách *in vitro* rozdělených na hypotermii, normotermii a hypertermii, byla testována pomocí Pearsonova testu dobré shody – Chí kvadrátu (χ^2). Skupina srdcí testovaných *in ovo* čítala celkem 19 srdcí, přičemž každé z nich bylo podrobena třem měřeními při různých teplotách (34 °C, 37 °C a 40 °C). Hodnoty, které uvádíme ve výsledcích, prezentujeme jako hodnotu aritmetického průměru ± směrodatná odchylka. Statistickou hladinu významnosti našich pozorování jsme testovali pomocí Studentova t-testu a jako signifikantní jsme označili hodnoty s $P < 0,05$.

5. VÝSLEDKY

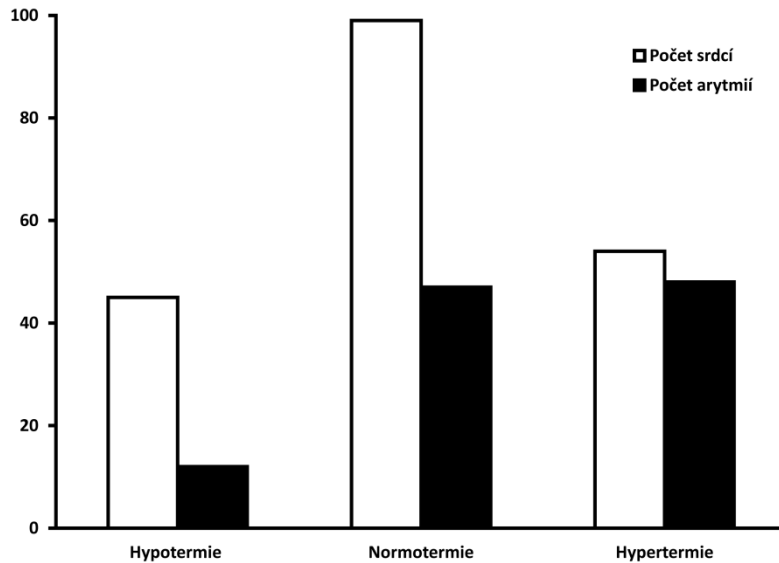
Pozorované jevy jsme rozdělili do třech hlavních skupin. První skupinu tvoří arytmie, které vznikaly samovolně, mimo jiné např. nestabilitou preparátu, v prostředí *in vitro*. Druhá skupina představuje jevy indukované cílenou změnou teploty. Třetí skupina shrnuje pozorování z experimentů elektrické stimulace embryonálních srdcí.

5.1 Samovolně vznikající arytmie v prostředí *in vitro*

Tento fenomén jsme pozorovali výhradně v prostředí *in vitro*, ve kterém byla srdce oddělena od vaskulární sítě a průtoku krve, a tudíž byla odkázána pouze na látky obsažené v Tyrodově roztoku (O₂, glukóza, ionty). Během normotermie docházelo ke vzniku arytmii samovolně, díky náročnějším podmínkám a tedy nižší stabilitě preparátů *in vitro* proti prostředí *in ovo*. K samovolnému vzniku arytmii svou měrou mohl přispět také stres při mikrochirurgické izolaci srdcí a následná nedostatečně šetrná manipulace.

V podmínkách *in vitro* při standardní teplotě 37 °C – normotermii jsme pozorovali poloviční četnost výskytu arytmii (47 arytmii, n = 99 srdcí) proti zvýšené teplotě 40 °C – hypertermii (48 arytmii, n = 54 srdcí). Podmínky hypotermie 34 °C celkově přinesly četnost výskytu arytmii výrazně nejnižší (12 arytmii, n = 45 srdcí). Celková četnost výskytu arytmii je uvedena na Grafu 1. Podrobnější komentář k těmto fenoménům je uveden v Diskuzi.

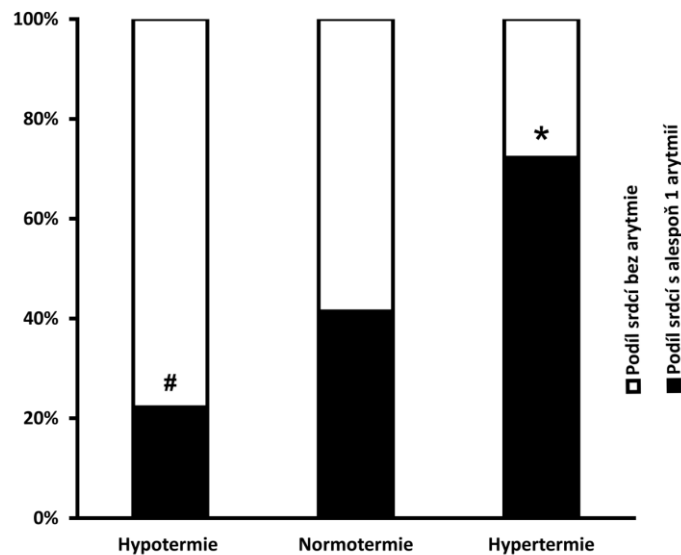
Naše experimenty v prostředí *in vitro* při standardní teplotě 37 °C ukázaly řadu různých pozorovaných arytmii (Tab. 1). Celkem jsme pozorovali při všech teplotách 107 jednotlivých arytmii, které se vyskytly u 99 srdcí (hypotermie n = 45 a hypertermie n = 54). Každé srdce bylo podrobeno normotermii a skupina normotermie tedy čítala všech 99 srdcí. Celkem jsme při normotermii pozorovali 47 arytmii vzniklých samovolně díky nestabilitě preparátů v podmínkách *in vitro*. Alespoň jednou arytmii bylo při normotermii postiženo 41% srdcí. V porovnání s normotermií jsme při hypertermii pozorovali výrazně vyšší výskyt arytmii, kde alespoň jednu arytmii vykazalo 72% srdcí (n = 54, Pearsonův test – Chí kvadrát $P < 0,001$). U hypotermie představoval počet srdcí postižených alespoň jednou arytmii pouze 22% (n = 45, Pearsonův test – Chí kvadrát $P < 0,05$). Četnost výskytu srdcí s alespoň 1 arytmii při jednotlivých teplotách je pro ilustraci vyobrazena na Grafu 2, originální statistika je založena na počtech srdcí nikoliv na procentech. Samovolně vzniklé arytmie jsme dále rozdělili do dvou hlavních skupin. První z nich představuje samovolně vznikající poruchy tvorby vzruchu v prostředí *in vitro* a druhá skupina zahrnuje samovolně vznikající poruchy při šíření elektrického impulsu v prostředí *in vitro*.



Graf 1

Celková četnost výskytu arytmií u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

Četnost výskytu arytmií s rostoucí teplotou výrazně narůstala. V podmínkách *in vitro* při standardní teplotě 37 °C – normotermii jsme pozorovali poloviční četnost výskytu arytmií (47 arytmií, n = 99 srdcí) proti zvýšené teplotě 40 °C – hypertermii (48 arytmií, n = 54 srdcí). Podmínky hypotermie 34 °C celkově přinesly četnost výskytu arytmií výrazně nejnižší (12 arytmií, n = 45 srdcí).



Graf 2

Četnost výskytu srdcí s alespoň 1 arytmií u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

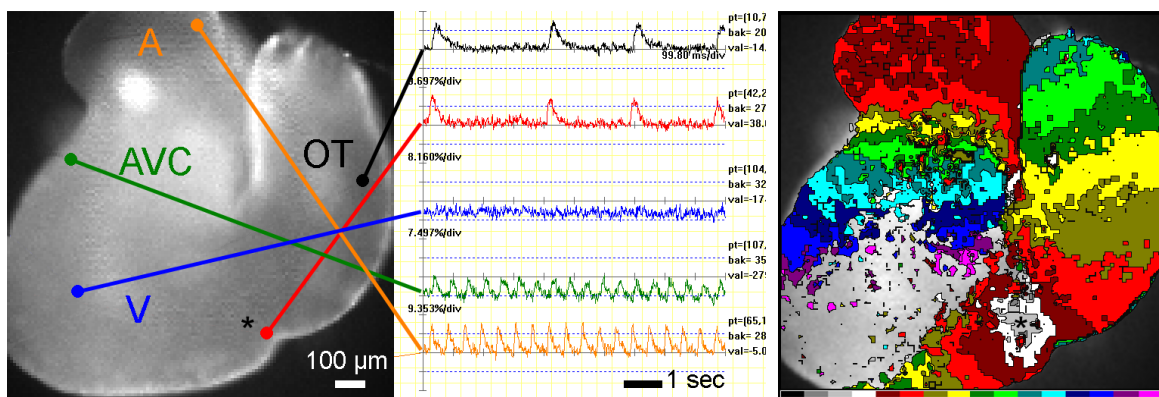
Alespoň jednou arytmií bylo při normotermii postiženo 41% srdcí. Při hypertermii jsme proti normotermii pozorovali výrazně vyšší výskyt arytmií, kde alespoň jednu arytmií vyvinulo 72% srdcí (n = 54, Pearsonův test – Chí kvadrát *P < 0,001). U hypotermie představoval počet srdcí postižených alespoň jednou arytmií pouze 22% (n = 45, Pearsonův test – Chí kvadrát #P < 0,05).

5.11 Samovolně vznikající poruchy tvorby vzruchu v prostředí *in vitro*

Samovolné poruchy tvorby vzruchu *in vitro* se týkaly 24% arytmii pozorovaných při normotermii (n = 47). Nejčastější byly sinusové pauzy, které tvořily 15% arytmii vzniklých při normotermii a zbylých 9% zaujímaly síňové extrasystoly. Jiné typy samovolných poruch tvorby vzruchu *in vitro* jsme nepozorovali.

5.12 Samovolně vznikající poruchy šíření elektrického impulsu v prostředí *in vitro*

Poruchy šíření vzruchu vznikající samovolně v prostředí *in vitro* tvořily 76% arytmii pozorovaných při normotermii (n = 47) a představovaly tak naprostou většinu arytmii vzniklých samovolně. Nejfrekventovanějším typem arytmie za těchto podmínek byl AV blok třetího stupně, který tvořil 32% arytmii při normotermii. Druhým nejčastějším typem poruchy byl AV blok druhého stupně, jehož četnost dosáhla 21%. Komoro-konotrunkální blok zaujímal 13% a dále jsme pozorovali dva nitrokomorové bloky a jeden blok síňový. Pozorovali jsme také výjimečný jev, kterým byla ektopická aktivita z oblasti předělu komory a výtokové části. K projevu tohoto fenoménu došlo za podmínek kompletního AV bloku, kdy byla v komoře a výtokové části odstíněna aktivita SA uzlu s frekvencí 142/min a došlo tak k odkrytí pomalejšího pacemakeru s frekvencí 30/min. Z této oblasti docházelo k šíření vzruchu jak směrem ke konci výtokové části, tak v opačné orientaci směrem do komory (Obr. 9). Ektopickou aktivaci se nám podařilo odhalit pomocí vysokorychlostního mapování kalcia, díky jeho vysoké citlivosti a rozlišovací schopnosti.

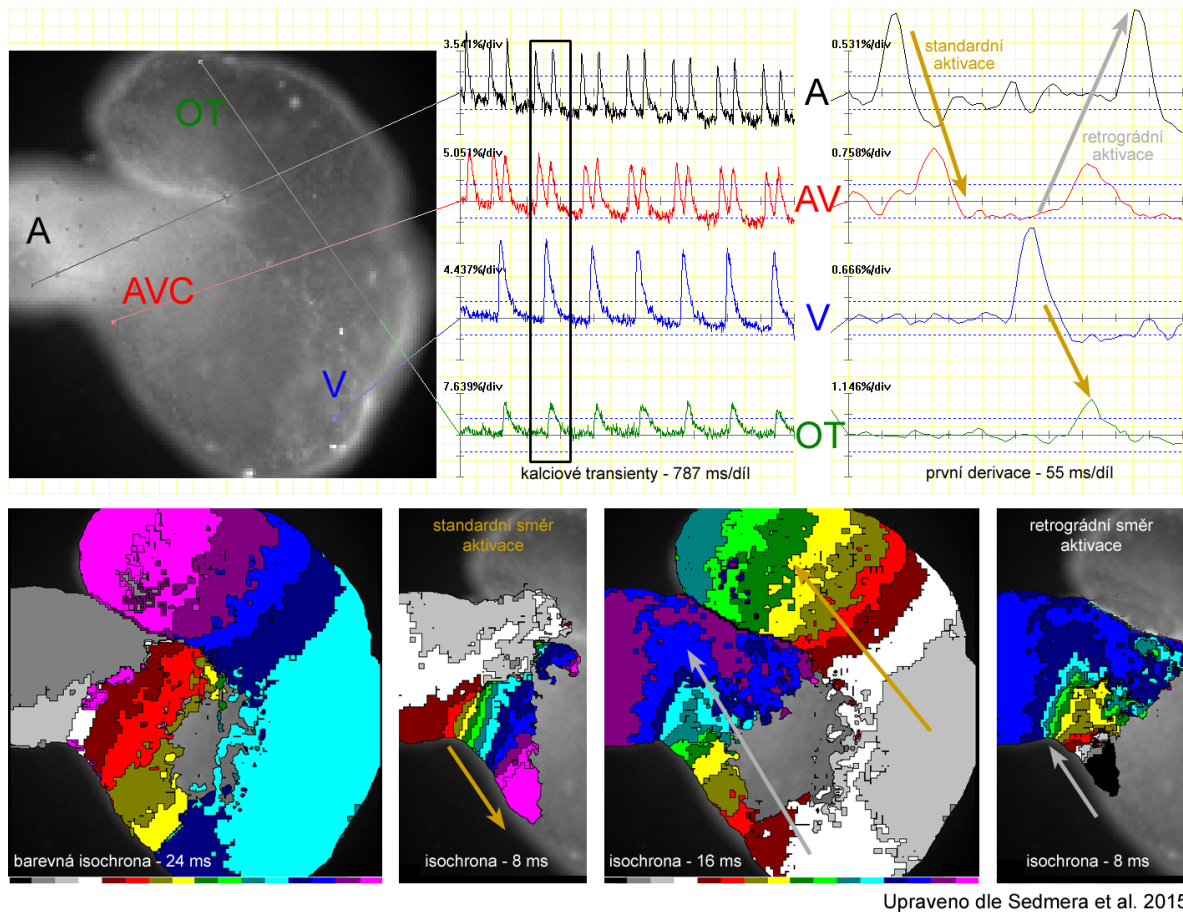


Obrázek 9

Ektopická aktivita pozorovaná u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

Aktivita ektopického pacemakeru (30/min), která se šíří prográdně i retrográdně, byla odhalena na předělu výtokové části a komory (označeno hvězdičkou) díky přítomnosti kompletního AV bloku na předělu AV kanálu a komory (frekvence SA uzlu 142/min). ED4 kuřecí srdce – vlevo, záznam elektrické aktivity – uprostřed, epikardiální aktivační mapa – vpravo. Barevná isochrona – 8 ms. A – síň, AVC – AV kanál, V – komora, OT – výtoková část.

Stejnou metodou jsme narazili také na další vzácnou arytmii vzniklou samovolně při normotermii v podmínkách *in vitro*, kterou bylo AV reentry. Pomocí aktivačních map jsme pozorovali, jak dochází k šíření vzruchu z AV kanálu do komory a dále se šířil vzruch z komory do výtokové části, ale také se vracel zpětně přes AV kanál až do síně, která se aktivovala retrográdně (Obr. 10). Díky tomu byla utlumena aktivita dalšího vzruchu ze sinoatriálního uzlu, což mělo za následek komorovou bradykardii (50/min) AV reentry jsme pozorovali během experimentů celkem třikrát (dvakrát při hypotermii).



Obrázek 10

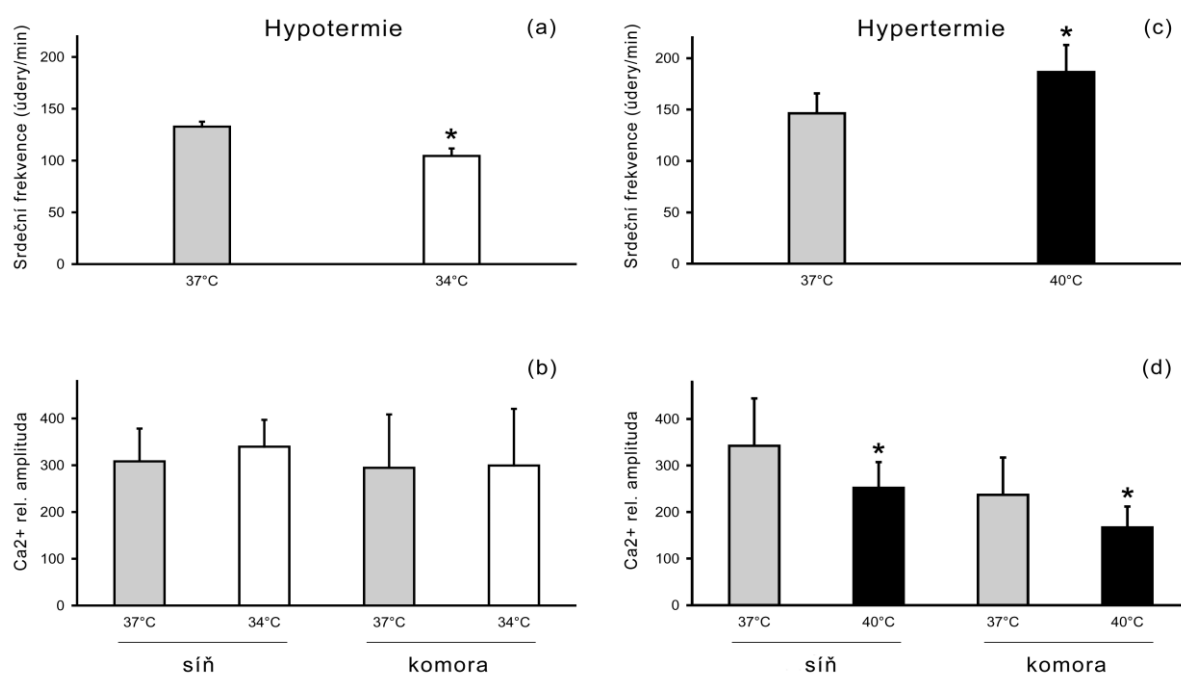
Atrioventrikulární reentry pozorované u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

Detailní záznam elektrické aktivace epikardu ED4 kuřecího embryonálního srdce in vitro. Po aktivaci komory dochází, kromě šíření vzruchu ve standardním směru, také k šíření vzruchu ve směru opačném. Po standardní aktivaci síně se tedy vzruch opět vrací a aktivuje síň reverzibilně. A – síň, AVC – AV kanál, V – komora, OT – výtoková část.

5.2 Změny ve funkci embryonálního srdce indukované změnami teploty

5.21 Vliv teploty na sinusovou frekvenci a intracelulární dynamiku kalcia

Pomocí optického mapování jsme zjistili, že akutní změny teploty mají na elektrickou aktivitu embryonálního srdce zásadní vliv. Nejvýrazněji byla ovlivněna sinusová frekvence, kterou udává pacemaker (budoucí SA uzel) a která určuje srdeční frekvenci. Testovali jsme tři zvolené teploty – 34 °C (hypotermii), 37 °C (normotermii – kontrolní teplota) a 40 °C (hypertermii). Za těchto teplotních podmínek jsme pozorovali téměř lineární závislost sinusové frekvence na teplotě. Sinusová frekvence se v porovnání s normotermií změnila přibližně o 20% v podmínkách hypotermie (Graf 3a, $P < 0,001$) a stejnou změnu v sinusové frekvenci jsme pozorovali také u hypertermie ($P < 0,001$), jak je znázorněno na Grafu 3c. Dále jsme se zaměřili na změny amplitudy kalciových transientů. Nárůst sinusové frekvence během hypertermie měl za následek významný pokles amplitudy kalciových transientů u síní i komor (viz Graf. 3d). Proti tomu během hypotermie při zpomalení frekvence k významným změnám amplitudy kalciových transientů nedošlo (viz Graf 3b).



Graf 3

Upraveno dle Vostarek et al. 2016

Vliv akutních změn teploty na sinusovou frekvenci a amplitudu kalciových transientů u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

(a) Snížení teploty ze 37 °C na 34 °C vedlo v podmínkách *in vitro* k poklesu sinusové frekvence o 22% ($n = 45$). (b) Během hypotermie nedošlo k významným změnám v amplitudě kalciových transientů ($n = 45$). (c) Zvýšení teploty ze 37 °C na 40 °C vedlo v podmínkách *in vitro* k nárůstu sinusové frekvence o 20% ($n = 54$). (d) Hypertermie vedla k významnému poklesu amplitudy kalciových transientů v síních o 35% a v komorách o 38% ($n = 54$, $* P < 0,001$).

5.22 Poruchy srdečního rytmu pozorované *in vitro*

5.221 Poruchy tvorby vzruchu – přímý vliv teploty na funkci pacemakeru

Nepravidelnosti při tvorbě elektrických impulzů pacemakerem představovaly 28% všech pozorovaných arytmií *in vitro* (n = 107). Nejčastěji se vyskytovaly síňové extrasystoly a sinusové pauzy, které dohromady činily 23% všech arytmií pozorovaných *in vitro* (Tab. 1). Síňové extrasystoly a sinusové pauzy se vyskytovaly proti normotermii dvakrát častěji během hypertermie, zatímco při hypotermii k jejich vzniku nedocházelo téměř vůbec. Totální srdeční zástavu jsme pozorovali ve třech případech z celkových 99 pozorovaných srdcí.

Tabulka 1

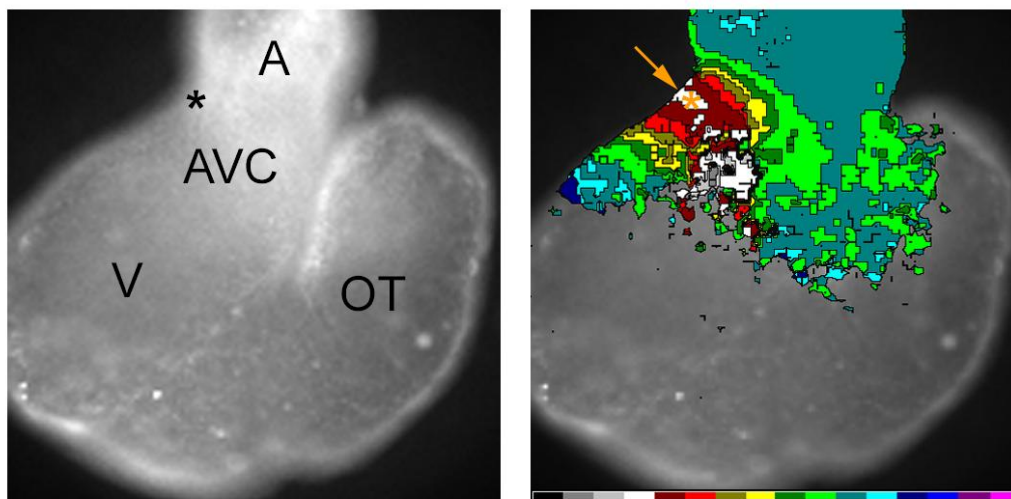
Přehled pozorovaných arytmií.

Arytmie pozorované u ED4 kuřecích embryonálních srdcí in vitro. Kompletní spektrum výskytu arytmií pozorovaných při hypotermii, normotermii a hypertermii (n = 107).

Druh arytmie	Výskyt (%)
Totální srdeční zástava	3
Síňové extrasystoly	10
Sinusové pauzy	13
Junkční rytmus a ektopie	3
Síňový blok	3
AV blok druhého stupně	21
AV blok třetího stupně	35
Nitrokomorový blok	2
Komoro-konotrunkální blok	7
AV reentry	3
Celkem	100

Upraveno dle Vostarek et al. 2016

Jeden ze vzácnějších fenoménů jsme pozorovali pouze u dvou případů. Byl jím junkční rytmus, který vycházel z AV kanálu a dosahoval značně vysokých frekvencí (160 a 180/min), viz Obr. 11.



Obrázek 11

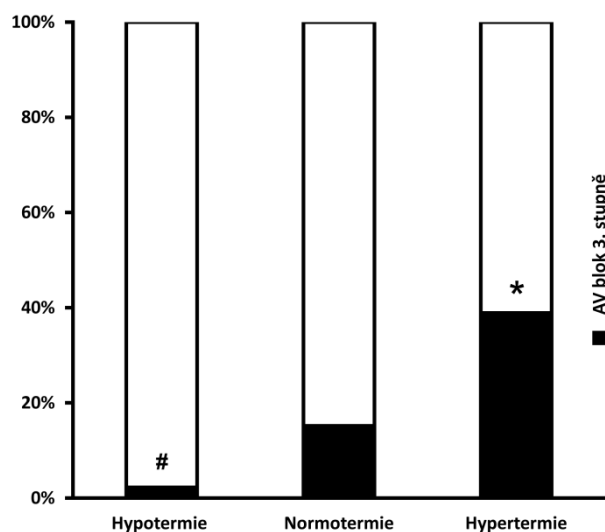
Junkční rytmus vycházející z oblasti AV kanálu pozorovaný u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro* v kompletním AV bloku.

Detailní záznam elektrické aktivace epikardu ED4 kuřecího embryonálního srdce in vitro, která vychází z místa aktivace (označeno hvězdičkou a šipkou) prográdně i retrográdně. Srdce je v kompletním AV bloku – komora ani výtoková část aktivovány nejsou. Barevná isochrona – 8 ms. A – síň, AVC – AV kanál, V – komora, OT – výtoková část.

5.222 Poruchy šíření elektrického impulsu *in vitro*

Tento fenomén jsme pozorovali jako výrazně dominantní při hypertermii. Během normotermie k němu docházelo s nižší četností, kde byl zapříčiněn nestabilitou srdcí v podmínkách *in vitro*. Během hypotermie se tento typ poruch vyskytoval ojediněle a pozorovali jsme pouze několik blokád vedení impulsu. Celkově představovaly poruchy šíření elektrického impulsu 72% všech pozorovaných arytmií (n = 107). Ve třech případech došlo k poruše vedení vzruchu již v síních (síňový blok), pouze ve dvou případech byla blokáda vedení impulsu pozorována uprostřed komor (nitrokomorový blok) a u 7% případů (n = 107) došlo k zastavení šíření vzruchu na předělu komory a výtokové části srdce (komoro-konotrunkální blok). Naše pozornost byla však zaměřena zejména na šíření vzruchu v oblasti AV kanálu. Blokády vedení vzruchu v této oblasti (AV blok druhého a třetího stupně) představovaly 56% ze všech pozorovaných arytmií. Nejčastější pozorovanou arytmií byl

AV blok třetího stupně (Graf 4), který se vyskytl pouze v jednom případě při hypotermii (n = 45 srdcí, Pearsonův test – Chí kvadrát $P < 0,05$). Během stabilizace preparátů při normotermii došlo ke vzniku AV bloku třetího stupně v 15% případů (n = 99 srdcí) a při hypertermii se vyvinul AV blok třetího stupně ve 39% případů (n = 54 srdcí, Pearsonův test – Chí kvadrát $P < 0,001$). AV blok třetího stupně v celkovém počtu arytmií (n = 107) představoval úctyhodných 35%. Druhou nejčastější arytmií byl AV blok druhého stupně, který vzniknul v 21% případů (n = 107). Během hypotermie jsme pozorovali AV blok druhého stupně v 11% případů (n = 45), při normotermii tvořil 10% případů (n = 99) a během hypertermie jeho výskyt dosáhl 14% případů (n = 54). Nejčastější variantou byl přechodný AV blok druhého stupně, který tvořil 65% všech pozorovaných AV bloků druhého stupně, Wenckebachův typ představoval 30% AV bloků druhého stupně a blok typu Mobitz II jsme pozorovali pouze v jednom případě. Ojediněle jsme pozorovali také méně běžný druh arytmie jako AV reentry, který se vyskytl pouze ve třech případech ze všech pozorovaných arytmií (n = 107), ve dvou případech při hypotermii a jednou samovolně při normotermii (viz kap. 5.12).



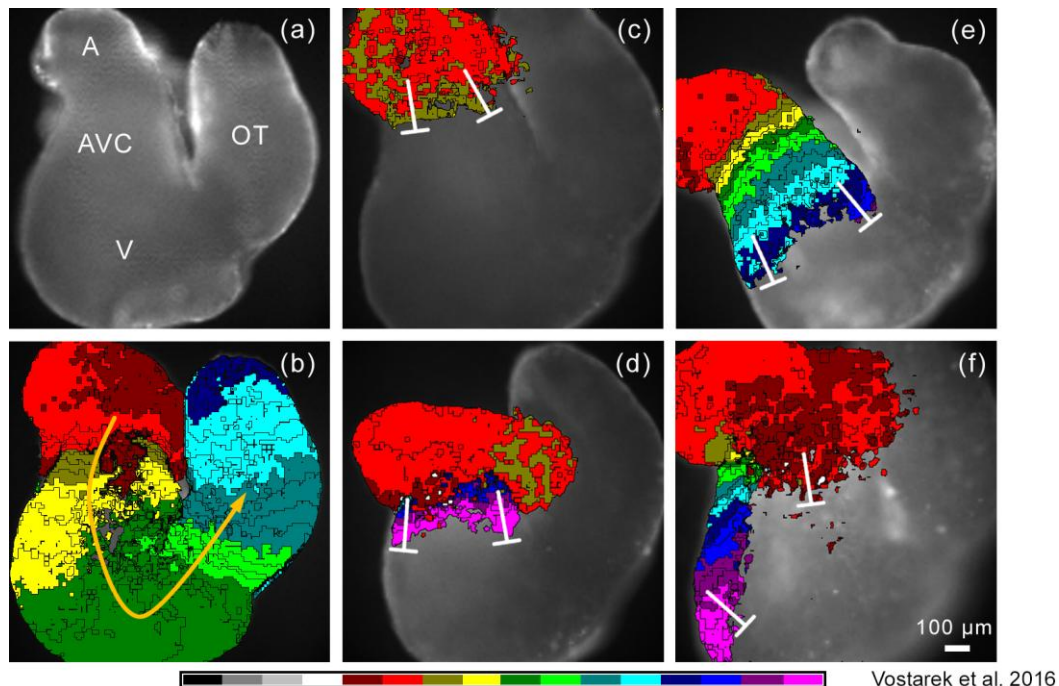
Graf 4

Četnost výskytu AV bloku třetího stupně u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

AV blok třetího stupně byl nejčastější pozorovanou arytmií. Vyskytl se pouze v jednom případě při hypotermii (n = 45 srdcí, Pearsonův test – Chí kvadrát # $P < 0,05$). Během stabilizace preparátů při normotermii došlo k jeho vzniku v 15% případů (n = 99 srdcí) a při hypertermii se vyvinul ve 39% případů (n = 54 srdcí, Pearsonův test – Chí kvadrát * $P < 0,001$).

5.2221 Lokalizace AV bloku třetího stupně – optické aktivační mapy

Optické mapování kalcia nám díky svým možnostem dovolilo detailně pozorovat místa lokalizace AV bloků třetího stupně. Díky tomu se nám podařilo nově popsat a klasifikovat několik různých typů AV bloků třetího stupně podle místa, kde končilo vedení vzruchu v oblasti AV kanálu. Aktivační mapy jsme vytvořili pomocí programu BV_Ana Analysis. Porovnání standardního vedení vzruchu při normotermii s různými typy AV bloků třetího stupně je znázorněno na Obr. 12.



Obrázek 12

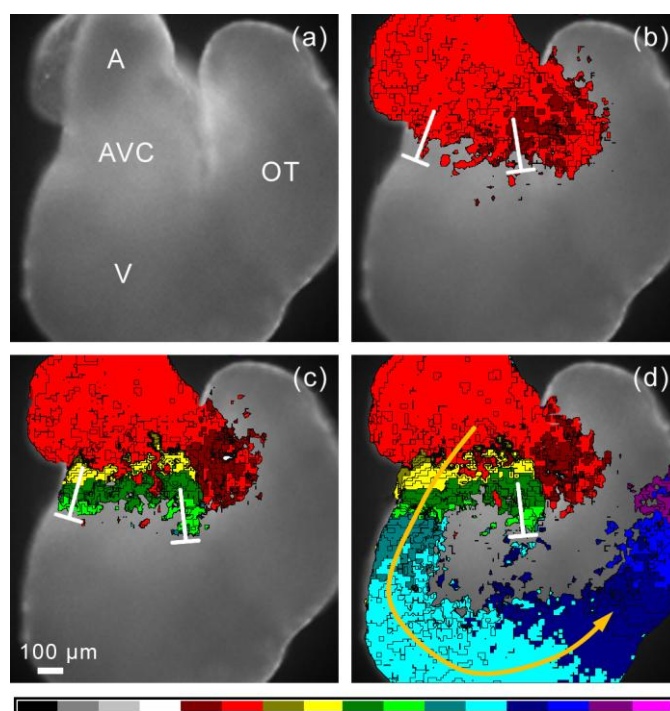
Porovnání lokalizace různých druhů AV bloku třetího stupně u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

(a) ED4 kuřecí srdce. (b) Standardní elektrická aktivace epikardu. (c) Proximální AV blok třetího stupně. (d) Střední AV blok třetího stupně. (e) Distální AV blok třetího stupně. (f) Distální AV blok třetího stupně s preferenčním vedením vzruchu podél vnějšího zakřivení AV kanálu. Jednotlivé barvy odpovídají časovým intervalům 32 ms u obr. (b) a 16 ms u (c–f). A – síň, AVC – AV kanál, V – komora, OT – výtoková část.

Pozorovali jsme, že vedení vzruchu se v AV kanálu zastavovalo dvěma různými způsoby. Vedení vzruchu se u prvního způsobu zastavovalo uniformně a víceméně kolmo na průběh trubice AV kanálu (Obr. 12c – e). První způsob byl dominantní a pozorovali jsme ho při 59% případů AV bloku třetího stupně. Zbývajících 41% představoval druhý způsob zastavení vzruchu, u kterého ustávalo šíření impulzu podél vnitřního zakřivení AV kanálu a předělu AV kanálu a komory (Obr. 12f).

Celkově nejkritičtější oblast pro převod impulzu v AV kanálu byla jeho distální část, kde dochází k napojení AV kanálu na komoru. V distální oblasti AV kanálu jsme pozorovali 53% výskyt blokády šíření vzruchu ze všech pozorovaných AV bloků třetího stupně. Druhou nejčastější oblastí blokády byla proximální část AV kanálu, kde se vyskytnulo 37% AV bloků třetího stupně. Nejméně častou oblastí výskytu blokády byla střední část AV kanálu, kde vzniklo pouhých 10% AV bloků třetího stupně.

Výjimečným fenoménem, který jsme pozorovali v 6 případech při hypotermii (snížení teploty ze 37 °C na 34 °C) a dvakrát při normotermii (zvýšení teploty ze 34 °C na 37 °C), bylo obnovení normálního vedení vzruchu po předchozí blokádě anebo arytmií nebo alespoň tzv. zvýšení efektivity převodu (tj. snížení stupně blokády). Během snížení teploty ze 37 °C na 34 °C došlo v 6 případech k úplné obnově vedení po předchozí AV blokádě. Obnovení vedení vzruchu po předchozí AV blokádě třetího stupně je znázorněno na Obr. 13. Při zvýšení teploty ze 34 °C na 37 °C v jednom případě zmizely původní sinusové pauzy a v jednom případě totální srdeční zástava po zvýšení teploty přešla do AV bloku třetího stupně.



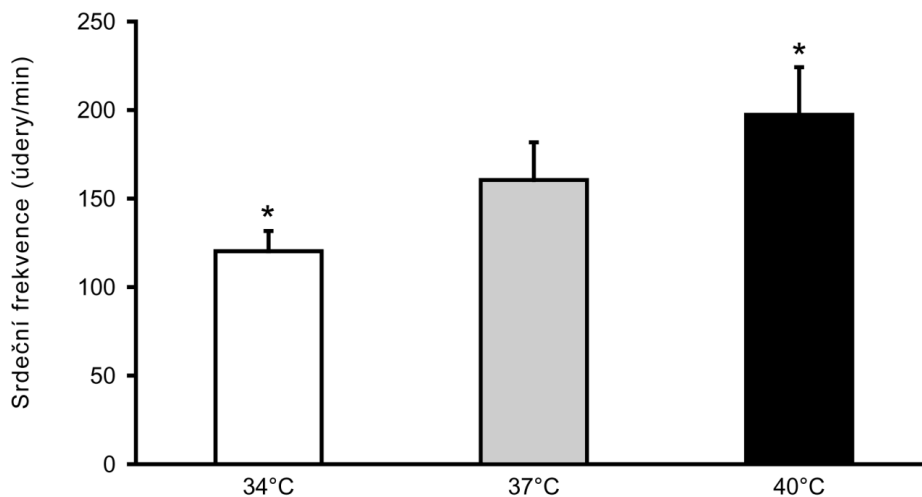
Obrázek 13

Obnovení vedení vzruchu při snížení teploty po předchozím AV bloku třetího stupně u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

(a) ED4 kuřecí srdce. (b) Proximální AV blok třetího stupně. (c) Postupná obnova vedení vzruchu skrze AV kanál. (d) Obnova vedení vzruchu až do výtokové části srdce. Jednotlivé barvy odpovídají časovým intervalům 16 ms (b – d). A – síň, AVC – AV kanál, V – komora, OT – výtoková část.

5.23 Vliv teploty na srdeční funkci *in ovo*

Rozhodli jsme se porovnat naše pozorování v podmínkách *in vitro* s experimenty *in ovo*, kde je embryonální srdce ve svém přirozeném prostředí a je napojeno na vaskulární systém. Zkoumali jsme vliv změn teploty na funkci srdce *in ovo* pomocí videomikroskopie celkem u 19 embryí. Experimentální teploty jsme zvolili shodné s naším postupem při pokusech *in vitro*. Naše pozorování *in ovo* ohledně přímého vlivu na funkci SA uzlu nám přinesla podobné závěry jako experimenty *in vitro* (viz Graf 5). V podmínkách *in ovo* došlo při zvýšení teploty z hypotermie 34 °C na normotermii 37 °C k nárůstu srdeční frekvence ze $120 \pm 11/\text{min}$ na $160 \pm 21/\text{min}$ a po zvýšení teploty z normotermie na hypertermii 40 °C narostla srdeční frekvence na $197 \pm 27/\text{min}$ ($P < 0,001$). Došlo opět k téměř lineárnímu ($R^2 = 0,999$) nárůstu srdeční frekvence v závislosti na teplotě podobně jako při experimentech *in vitro*. Naše pozorování *in ovo* jsou v tomto ohledu v dobré shodě s pozorováními *in vitro*.

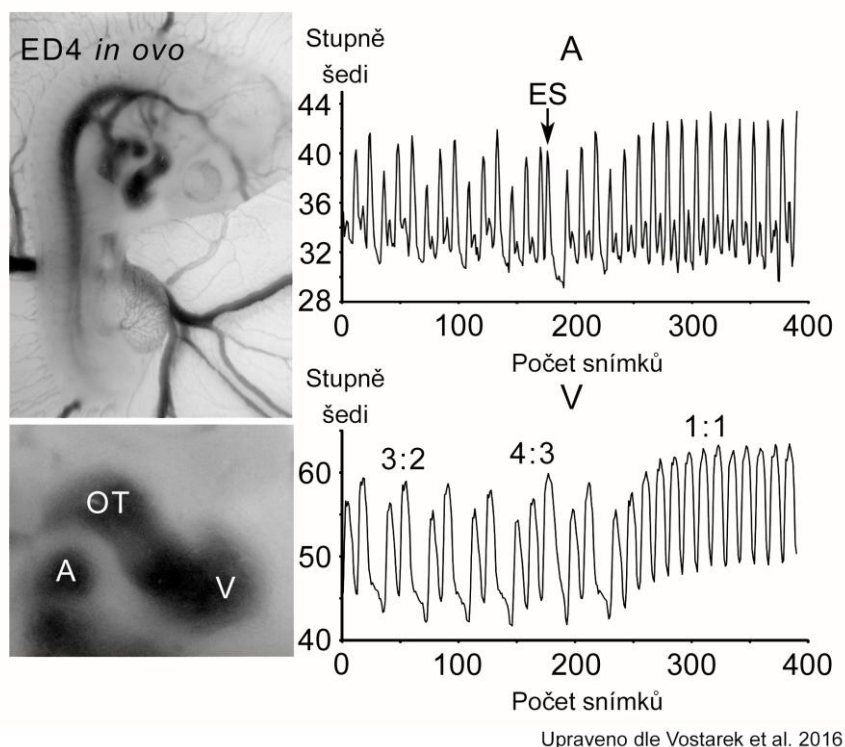


Graf 5

Vliv akutních změn teploty na srdeční frekvenci u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in ovo*.

Zvýšení teploty ze 34 °C na 37 °C vedlo v podmínkách *in ovo* k nárůstu srdeční frekvence ze $120 \pm 11/\text{min}$ na $160 \pm 21/\text{min}$ a po zvýšení teploty ze 37 °C na 40 °C se zvýšila srdeční frekvence na $197 \pm 27/\text{min}$ ($n = 19$ srdcí, $*P < 0,001$).

V prostředí *in ovo* jsme také pozorovali poruchy srdečního rytmu, které vznikaly zřídka a pouze při hypertermii. Nejčastější z nich byly sinusové pauzy. Pozorovali jsme jeden AV blok druhého stupně (Obr. 14) a ke vzniku AV bloku třetího stupně nedošlo vůbec.



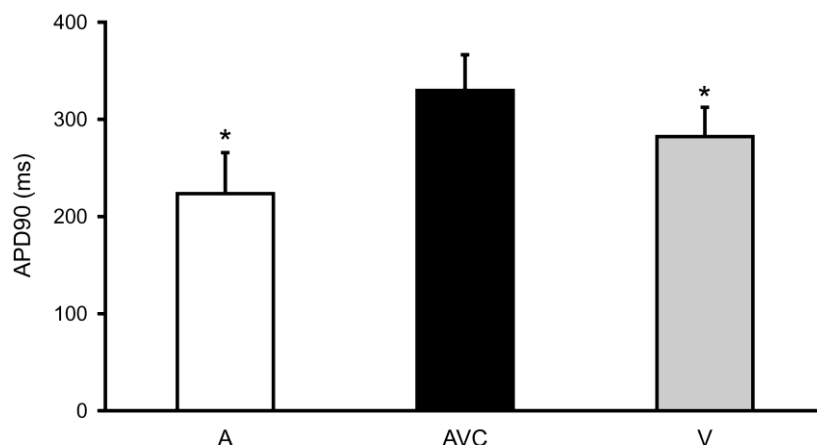
Obrázek 14

Videomikroskopický záznam přechodného AV bloku druhého stupně u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in ovo*.

*Záznam rytmu ze síně a komory poukazuje na přechodný AV blok druhého stupně typu Mobitz I tzv. Wenckebachův fenomén. V podmínkách *in ovo* toto byla jediná pozorovaná významnější arytmie. A – síň, V – komora, OT – výtoková část, ES – extrasystola.*

5.3 Elektrická stimulace embryonálních srdcí

Na základě naší hypotézy jsme předpokládali, že jednou z hlavních příčin vzniku AV bloků třetího stupně by mohla být relativní tkáňová hypoxie, která zásadně ovlivňuje vedení vzruchu skrze AV kanál (Tran et al., 1996, Sedmera et al., 2002). Abychom prověřili naši hypotézu, navrhli jsme experimenty, které pomocí elektrické stimulace testovaly schopnost AV kanálu převádět vysoké srdeční frekvence ze síní na komory. Měření na skupině srdcí ($n = 10$ srdcí) při normotermii a pravidelném spontánním rytmu bez bradykardie ani tachykardie ukázala, že nejdelší dobu trvání akčního potenciálu (APD_{90}) měl ze všech srdečních segmentů AV kanál (viz Graf 6). Nejdelší doba trvání akčního potenciálu během spontánního rytmu (v našem případě 330 ms) staví AV kanál do role srdečního segmentu, který zásadně limituje převod vysokých frekvencí ze síní na komory. Pozorovaná hodnota APD_{90} u komor (282 ms, $P < 0,001$) byla vyšší než u síní (223 ms, $P < 0,001$).



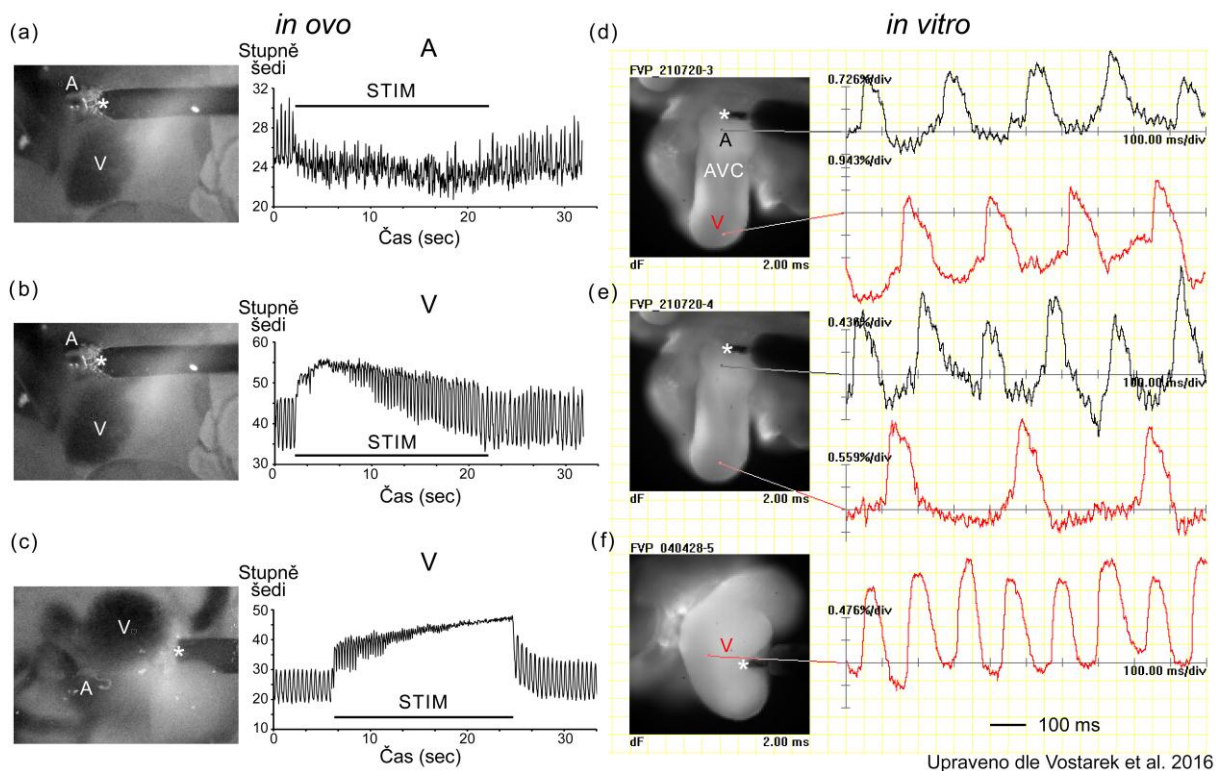
Graf 6

Doby trvání akčního potenciálu během přirozeného pravidelného rytmu při normotermii u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

*Nejdelší doba trvání akčního potenciálu během spontánního pravidelného rytmu (v našem případě 330 ms) staví AV kanál do role srdečního segmentu, který zásadně limituje převod vysokých frekvencí ze síně na komory. Pozorovaná hodnota APD₉₀ u komor byla 282 ms a u síně 223 ms (n = 10 srdcí, *P < 0,001). A – síň, AVC – AV kanál, V – komora.*

Elektrická stimulace *in ovo* ukázala, že AV kanál byl schopen u všech testovaných srdcí (n = 7) převádět frekvence až do tempa 300/min (AV převod 1:1). V jednom případě dokonce AV kanál dovedl převádět frekvenci 360/min (Obr. 15a, b). Během stimulace síně dosáhla maximální frekvence komor dosažitelná stimulací 360/min. Jinak řečeno, pokud stimulace přesáhla frekvenci vyšší než 300/min, docházelo ve většině případů ke vzniku AV bloků druhého stupně. Srdce byla schopná bít při takto vysokých frekvencích bez vzniku AV bloku druhého stupně pouze několik vteřin. Během stimulace komor dosáhla maximální frekvence dosažitelná stimulací 600/min (Obr. 15c). Tyto výsledky podporují naši hypotézu, že hypoxie by mohla být jednou z příčin vzniku AV bloků. Nešlo tedy s nejvyšší pravděpodobností o neschopnost AV kanálu převádět vysoké sinusové frekvence při tachykardiích.

Experimenty s elektrickou stimulací jsme provedli také na izolovaných embryonálních srdcích v prostředí *in vitro* (n = 23), s cílem určit převodní limity jednotlivých segmentů u srdce bez napojení na vaskulární systém a bez průtoku krve. Pro AV kanál byl zjištěn převodní limit 261/min (Obr. 15d). U stejného srdce dosáhla maximální frekvence dosažitelná stimulací pro síně 353/min, ale při takto vysoké frekvenci již byl vyvinut AV blok druhého stupně (Obr. 15e). Další dvě nejvyšší úspěšně převáděné (AV převod 1:1) stimulační frekvence byly 232/min a 200/min. Pro komory dosáhla maximální frekvence dosažitelná stimulací 476/min (Obr. 15f).



Obrázek 15

Stanovení maximálních převoditelných frekvencí u ED4 kuřecích embryonálních srdcí dosažených pomocí elektrické stimulace v prostředí *in ovo* a *in vitro*.

Levá polovina obrázku zobrazuje záznamy maximálních převoditelných frekvencí dosažených při elektrické stimulaci *in ovo* zachycené pomocí videomikroskopie ($n = 7$). Maximální převoditelná frekvence AV kanálu dosažená pomocí elektrické stimulace síně *in ovo* byla 360/min. Síň byla stimulována postupně klesající frekvencí od 400/min až do 120/min. (a) Pohybový signál ze síně. (b) Záznam pohybu rozhraní komory. (c) Maximální převoditelná frekvence komory dosažená pomocí elektrické stimulace komory *in ovo* byla 600/min. Komora byla stimulována postupně narůstající frekvencí od 200/min až do 600/min. Pravá polovina obrázku zobrazuje záznamy maximálních převoditelných frekvencí dosažených při elektrické stimulaci *in vitro* zachycené při mapování změn membránového napětí ($n = 23$). (d) Maximální převoditelná frekvence AV kanálu dosažená pomocí elektrické stimulace síně *in vitro* byla 261/min. Síň byla stimulována postupně až do frekvence 300/min. (e) Maximální převoditelná frekvence síně dosažená pomocí elektrické stimulace síně *in vitro* byla 353/min, při takto vysoké frekvenci ovšem došlo ke vzniku AV bloku druhého stupně (2:1). Síň byla stimulována postupně až do frekvence 400/min. (f) Maximální převoditelná frekvence komory dosažená pomocí elektrické stimulace komory *in ovo* byla 476/min. Komora byla stimulována postupně narůstající frekvencí až do 600/min. A – síň, AVC – AV kanál, V – komora, OT – výtoková část.

6. DISKUZE

6.1 Studium arytmií embryonálního srdce

Pro jasnější opodstatnění naší metodiky nejdříve ve stručnosti uvedu několik širších souvislostí. Embryonální srdce, díky své malé velikosti, poskytuje zejména během časných stádií při optickém mapování nepřiliš silný signál. U některých oblastí srdce bylo tedy jejich podrobnější zkoumání díky slabému signálu limitováno. Pokroky ve vysokorychlostním mapování intracelulární dynamiky kalcia, které provedl na myších embryonálních srdcích Valderrabano a kolektiv (Valderrabano et al., 2006), s sebou však proti mapování změn membránového napětí přinesly vyšší citlivost snímání. Tímto se otevřel nový prostor pro pozorování oblastí, které poskytují velmi slabý signál. Jednou z těchto oblastí v embryonálním srdci je AV kanál, který hraje zásadní roli při převodu elektrických impulzů ze síní na komory. Díky technickému pokroku bylo tak umožněno pozorovat vznik arytmií souvisejících s touto klíčovou oblastí.

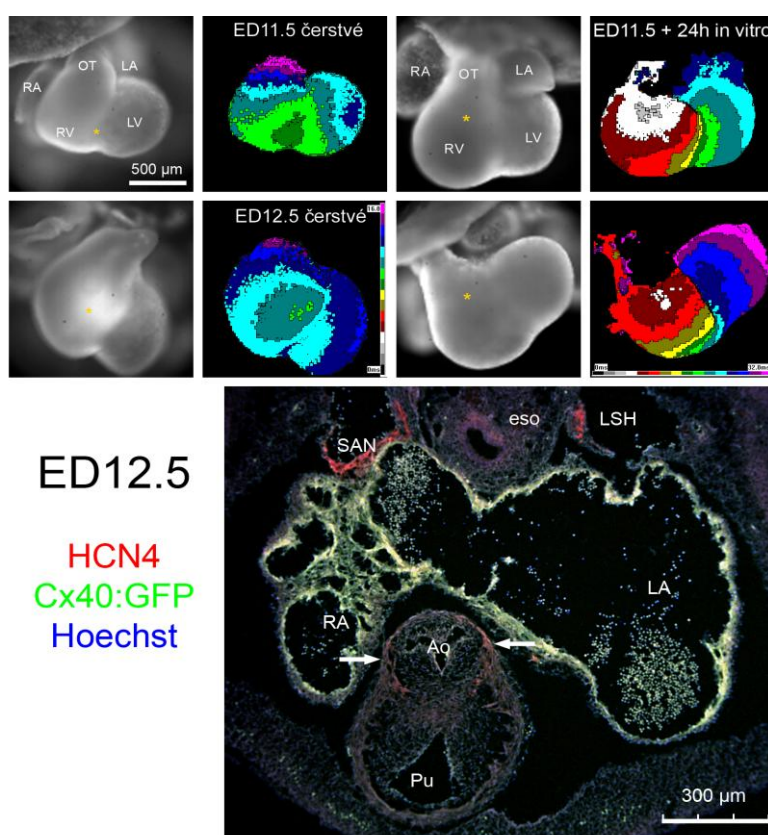
Velmi významnou roli při mapování intracelulární dynamiky kalcia hrají vysoce specializovaná barviva. Obecně mají barviva určená pro detekci kalcia ve své základní podobě charakter polární sloučeniny. Tato vlastnost ovšem zamezuje vstupu barviva do buněk přes nepolární fosfolipidovou membránu. Specializovaná barviva určená pro detekci kalcia uvnitř buněk však dokážou tento problém obejít. Ve své původní podobě mají nepolární charakter esteru a po vstupu do buňky jsou posléze hydrolyticky štěpeny do své aktivní formy, která je polární. Tento proces je zajištěn zvýšením teploty inkubace izolovaných srdcí s barvivem, kdy dochází mimo jiné i k aktivaci hydrolytických enzymů štěpících esterovou vazbu – esteráz. U barviva, které během předchozí inkubace prostoupilo do myocytů ve své nepolární podobě, jsou při 37 °C esterázami štěpeny esterové vazby na chráněných karboxylových skupinách, čímž se zvyšuje jeho polarita a ztrácí tak schopnost opět prostoupit cytoplasmatickou membránou ven z buněk. Touto reakcí je tedy zaručeno, že barvivo po štěpení zůstane v cytoplasmě, kde bude detekovat změny v koncentraci vápenatých kationtů změnou intenzity své fluorescence. Pro náš účel jsme jako indikátor elektrické aktivity embryonálního srdce zvolili barvivo Rhodamin 2 konkrétně Rhod-2 AM. Z chemického hlediska je tato varianta barviva ve formě acetoxymetyl esteru (AM). Excitace tohoto indikátoru probíhá pomocí zeleného světla v rozmezí 510 – 560 nm, která vyvolává fluorescenci s emisí červeného světla. Nárůst fluorescence indikátoru je přímo úměrný narůstající koncentraci vápenatých kationtů. Získaný signál je pozitivní, což je výhoda kalciových indikátorů proti indikátorům membránového napětí, které na depolarizaci reagují poklesem fluorescence. Další výhodou mapování kalcia proti mapování membránového

napětí je vyšší poměr odstupe signálu od šumu, což je výhodné obzvláště v oblastech s nízkou amplitudou signálu, jakými jsou např. AV kanál nebo výtoková část srdce (Reckova et al., 2003). Na druhou stranu určitou nevýhodou mapování pomocí kalciových indikátorů může být fakt, že získaný signál odpovídá pouze průběhu kalciových proudů a ne celkovému průběhu akčního potenciálu se všemi iontovými proudy. V našem případě jsme volili mapování kalcia, protože jedním z cílů práce bylo pozorovat změny v amplitudě kalciových transientů v závislosti na teplotě. Teplotní rozsah (34 – 40 °C) byl zvolen cíleně kvůli zachování fyziologických podmínek pro funkci embryonálního srdce a byl v souladu s dlouhodobými podmínkami pro přežití vyvíjejícího se embrya. Zároveň však byl tento teplotní rozsah zvolen tak, aby bylo možné pozorovat co největší změny v srdeční funkci. Mapování kalcia jsme volili také díky tomu, že během časného embryonálního vývoje hrají kalciové proudy v celé elektrofyzilogii srdce majoritní a klíčovou roli (Bers, 1991).

Kvůli zachování dostatečné kvality signálu jsme byli nuceni použít disociátor excitace a kontrakce – blebbistatin. Bez použití blebbistatinu by záznam elektrické aktivity srdce obsahoval vysoké množství pohybových artefaktů, které by výrazně navýšily šum a snížily kvalitu dat. Blebbistatin, jenž je selektivním inhibitorem myosinu II, se používá jako disociátor, který způsobuje odpřažení kontrakce myokardu od jeho elektrické aktivity, která však zůstává zachována. Mechanismus účinku blebbistatinu spočívá v jeho navázání na aktivní místo globulárního segmentu těžkého řetězce myosinu II v komplexu s ADP a fosfátem, což výrazně snižuje afinitu nevázaného komplexu myosinu k aktinu, zároveň však údajně nedochází k ovlivnění elektrofyzilogie srdeční tkáně (Limouze et al., 2004, Kovacs et al., 2004, Fedorov et al., 2007, Jou et al., 2010). Další výzkumy však naznačují, že blebbistatin elektrofyzilogii srdce ovlivňuje a to zejména prodloužením doby trvání akčního potenciálu a jeho fototoxicitou (Kolega, 2004, Brack et al., 2013). Blebbistatin je však v porovnání s ostatními disociátory excitace a kontrakce pro optické mapování kuřecích embryonálních srdcí stále nejvhodnější volbou. Kvůli nutnosti použití disociátoru z důvodu omezení pohybových artefaktů jsme proto blebbistatin, i s vědomím jeho možného dopadu na elektrofyzilogii, použili.

Náš experimentální set-up (Vostarek et al., 2014), kterým zobrazujeme elektrickou aktivitu normálních a stresovaných embryonálních srdcí, významně přispívá k dalšímu technologickému pokroku. Díky jeho výhodám můžeme na izolovaných embryonálních srdcích detailně lokalizovat a popsat poruchy šíření vzruchu anebo ektopickou aktivitu (Hoogaars et al., 2007, Leaf et al., 2008, Ammirabile et al., 2012, Benes et al., 2014, Sedmera et al., 2015, Vostarek et al., 2014, Vostarek et al., 2016).

Oblast ektopické aktivity, kterou jsme lokalizovali u ED4 kuřecího srdce *in vitro* se nacházela na předělu komory a výtokové části. Analogický jev také pozorovala kolegyně Dr. Šaňková pomocí optického mapování membránového napětí jako vedlejší produkt experimentů během studie Dr. J. Beneše Jr. u ED11,5 – ED12,5 myších srdcí kultivovaných po dobu 24 h *in vitro* (Benes et al., 2014, Vostarek et al., 2014). Z Obr. 16 je patrné, že v místě ektopické aktivity je zvýšená exprese HCN4 kanálů, které jsou zodpovědné za pacemakerovou aktivitu. Výtoková část je v této fázi vývoje tvořena primárním myokardem, který se vyznačuje pomalým vedením vzruchu a vysokou automaticitou, což zvýšenou expresí HCN4 opodstatňuje (Moorman et al., 1998, Liang et al., 2013).



Upraveno dle Vostarek et al. 2014

Obrázek 16 (výsledek B. Šaňkové)

Ektopická aktivita u ED11,5 – ED12,5 myšního embryonálního srdce po 24 h kultivace *in vitro*.

Ektopická aktivita byla u myších srdcí pozorována ve stejné oblasti jako u ED4 kuřecího srdce in vitro. Vlevo nahoře – ED11,5 čerstvé myšící srdce a epikardiální aktivační mapa, isochrona – 1 ms. Vpravo nahoře – epikardiální aktivační mapy ED11,5 myších srdcí po 24 h kultivace in vitro, isochrona – 2 ms Dole – imunohistochemické barvení transverzálního histologického řezu oblasti výtokové části vykazuje zvýšenou expresí HCN4 kanálů – červeně (označeno šipkami), zodpovědnou za pacemakerovou aktivitu. Vysoká exprese HCN4 je pro srovnání v SA uzlu (SAN). Ao – aorta, eso – esofagus, RA – pravá síň, LA – levá síň, Pu – plicnice, RV – pravá komora, LV – levá komora, OT – výtoková část, SAN – sinoatriální uzel, LSH – levý roh sinus venosus.

V podmínkách hypotermie, normotermie a hypertermie jsme u embryonálních kuřecích srdcí měřili PQ interval, ale v tomto parametru jsme nezaznamenali vůbec žádné změny. Také PR interval nebyl teplotou nebo srdeční frekvencí významně ovlivněn, podobně jak pozoroval Sarre a kolektiv (Sarre et al., 2006). Nicméně, v další navazující studii tato skupina pozorovala mírnou tendenci k prodloužení PR intervalu, kterou podložila pozorováním bradykardických efektů ivabradinu (Sarre et al., 2010). Tento fenomén pravděpodobně odráží limity iontových pump a přenašečů pro přečerpávání iontů při obnově membránového potenciálu během vysokých sinusových frekvencí u preinervačních stádií kardiogeneze. Na druhou stranu bylo také popsáno, že mechanický PQ interval u lidského plodu koreloval negativně se srdeční frekvencí. Je však nutno vzít v úvahu, že měření probíhala v podmínkách *in vivo* a jednalo se o vyvinutější fetální srdce s plně vyvinutou autonomní inervací (Tomek et al., 2011).

6.2 Akutní vliv teploty na srdeční frekvenci a dynamiku kalciových transientů

Výsledky měření dynamiky kalciových transientů ukázaly, že srdeční frekvence je v rozmezí mezi 34 °C a 40 °C lineárně závislá na teplotě. Toto pozorování se dobře shoduje s výsledky předchozí studie, ve které byl použit rampový protokol (Sarre et al., 2006). Změny v srdeční frekvenci, které jsme pozorovali u preinervačního srdce, byly zapříčiněny přímým působením teploty na funkci pacemakeru skrze změny v jeho kinetice. Při experimentech s hypotermií jsme zkoušeli teplotu měnit oběma směry. První způsob bylo ochlazení ze 37 °C na 34 °C a druhý způsob bylo ohřátí ze 34 °C na 37 °C. Mezi těmito dvěma způsoby jsme ve výsledném efektu nepozorovali žádný rozdíl ve vlivu na funkci embryonálního pacemakeru. Dalším faktorem, jehož změnu jsme očekávali, byla amplituda kalciových transientů. Během hypertermie skutečně došlo k významnému poklesu amplitudy kalciových transientů, jak v síních, tak i komorách. Předpokládáme, že tento jev byl zapříčiněn zvýšenou srdeční frekvencí a tím také kratší dobou pro ustanovení kalciového transientu skrze kalciové kanály, pumpy a přenašeče. Domníváme se, že snížení amplitudy kalciových transientů může mít za následek snížení kontraktility, což může po čase vyústit až ve snížení efektivity pumpování krve. Tyto negativní efekty na srdeční výdej mohou být kompenzovány zvýšenou srdeční frekvencí, zásadní roli zde ovšem hrají limitace energetického metabolismu. Proti tomu během hypotermie jsme žádné významné změny v amplitudě kalciových transientů nezaznamenali. To pravděpodobně odpovídá adaptaci kuřecích embryí na občasnou přirozenou hypotermii ve vejci. Snížená aktivita kalciových kanálů, pump a přenašečů

je vykompenzována delším intervalem pro přečerpání iontů. Srdeční výdej je tak zachován díky Frank-Starlingově kompenzaci zvýšením systolického objemu (Benson et al., 1989).

6.3 Teplota a srdeční výdej

Experimenty provedené v prostředí *in ovo*, kde srdce zůstalo napojeno na vaskulární systém a oběh krve, vykazaly stejnou lineární závislost srdeční frekvence na teplotě jako experimenty *in vitro*. Čtyřdenní kuřecí embryonální srdce ještě nejsou inervována, ale β -adrenergní receptory v tomto stádiu již exprimovány jsou. Bylo popsáno, že ED4 kuřecí srdce reaguje na stimulaci adrenalinem významným zvýšením srdeční frekvence (až o 60%). Vystavení různým β -blokátorům má u ED4 kuřecích srdcí za následek významný pokles srdeční frekvence (Kockova et al., 2013). Srdeční funkce u ektotermních zvířat, jakými jsou např. ryby anebo plazi, je silně ovlivněná a limitovaná hypertermií, dokonce i když mají již plně vyvinutou autonomní inervaci. Jejich hlavní regulační mechanismy jsou velmi podobné jako u kuřecího embryonálního srdce. To se vyvíjí při víceméně konstantní teplotě, kterou udržuje kvočna sedící na vejcích. Embryo samo o sobě ještě není schopno produkovat vlastní tělesné teplo a je tedy velmi dobře adaptováno na krátká období hypotermie, kdy kvočna vejce dočasně opustí. Zásadním limitujícím faktorem je oxidativní fosforylace v mitochondriích a zejména dostatečná syntéza ATP, která je závislá na teplotě (Power et al., 2014).

6.4 Mechanismy poruch šíření vzruchu indukované změnami teploty

Se zvýšením teploty jde ruku v ruce také zvýšení metabolických nároků a dostatečný přísun kyslíku do srdeční tkáně se může stát hlavním limitujícím faktorem její funkce. Tento fenomén hraje zásadní roli zejména v prostředí *in vitro*, kde ztluštělá oblast AV kanálu, která je normálně vyživována a okysličována z lumen, pravděpodobně v těchto podmínkách není oxygenována dostatečně. Díky tomu jsme zaměřili naši pozornost zejména na tento srdeční segment, který hrál klíčovou roli u téměř 60% všech pozorovaných arytmií ($n = 107$, Tab. 1). U těchto arytmií docházelo k blokádám vedení vzruchu v AV kanálu a jednalo se o AV bloky druhého a třetího stupně. Pomocí podrobné analýzy se nám podařilo detailně popsat různé druhy AV bloků třetího stupně (Obr. 12). AV blok třetího stupně jsme pozorovali pouze jednou během hypotermie ($n = 45$), při normotermii se vyskytnul u 15% srdcí ($n = 99$) a během hypertermie došlo k jeho vzniku u 39% srdcí ($n = 54$). Tato pozorování v prostředí *in vitro* naznačují, že zvýšení vzniku kompletního AV bloku (Graf 4) a celkové zvýšení četnosti vzniku arytmií (Graf 2) pravděpodobně souvisí se zvýšením teploty anebo jiným faktorem souvisejícím s hypertermií. Svou roli, společně

se zvýšenými metabolickými nároky srdcí, bude s nejvyšší pravděpodobností hrát při zvýšené teplotě také snížená koncentrace kyslíku v orgánové lázni díky snížení jeho fyzikální rozpustnosti. V prostředí *in ovo* arytmie totiž obecně vznikaly pouze ojediněle. Všechny pozorované arytmie v prostředí *in ovo* ovšem vznikaly výhradně až při hypertermii, při které jsme pozorovali i jeden přechodný AV blok druhého stupně (Obr. 14). Díky tomu lze i v přirozeném prostředí *in ovo* korelovat zvýšení četnosti vzniku arytmií a náchylnost AV kanálu na vznik blokády vedení vzruchu se zvýšením teploty. Na druhou stranu snížení teploty v několika případech obnovilo vedení vzruchu AV kanálem po předchozím AV bloku (Obr. 13), což pravděpodobně souvisí se snížením metabolických nároků.

Významnou vlastností AV kanálu je zpomalování rychlosti vedení vzruchu přicházejícího ze síní, které je úzce spojeno s přítomností srdečního rosolu a endokardiálních polštářků (Bressan et al., 2014). Zpomalení převodní rychlosti v AV kanálu je ovlivněno hlavně specifickou morfologií tohoto srdečního segmentu, která je charakterizována velkými mezibuněčnými prostory, řídkým kontaktem membrán a aniontovým prostředím extracelulární matrix. Výslednou souhrou těchto vlastností není jen zpomalení rychlosti vedení vzruchu, ale při odchylkách od standardních *in vivo* podmínek také významné snížení pravděpodobnosti, zda bude vzruch tímto segmentem vůbec převeden či nikoliv (Arguello et al., 1986). K dalšímu vysvětlení těchto vlastností přispěly také poměrně nedávné nové poznatky týkající se nového konceptu vedení vzruchu mezi kardiomyocyty tzv. „ephaptického“ vedení (z angl. ephaptic conduction), které se odehrává mimo vodivé spoje myocytů. K tomuto jevu dochází pravděpodobně skrze interakci elektrických polí anebo pulzaci iontů mezi dvěma těsně přisedlými (< 15 nm) myocyty na štěrbině ohraničující vodivý spoj, která se nazývá perinexus (Rhett a Gourdie, 2012, Veeraraghavan et al., 2014).

Během nejčasnějších fází vývoje je pro primitivní srdeční trubici charakteristická uniformní pomalá rychlost vedení vzruchu a je exprimován pouze jeden konexin tvořící vodivé spoje – konexin 45, pro který je charakteristická právě pomalá rychlost vedení vzruchu. Vedení vzruchu AV kanálem je pomalé, ale během raných embryonálních stádií robustní, jak uvedli Paff a kolektiv (Paff et al., 1964) a později také Sedmera a kolektiv (Sedmera et al., 2002), kteří také popsali, že u kuřecích embryonálních srdcí mladších než ED3 není možné farmakologicky nebo pomocí anoxie a reoxygenace indukovat AV blok. U pozdějších stádií ED4, kterými jsme se zabývali my, dochází s rozšířením exprese konexinů již také ke vzniku rozdílů v rychlosti vedení vzruchu u jednotlivých srdečních segmentů. Komorový a síňový myokard se začíná odlišovat rychlým vedením vzruchu od AV kanálu a výtokové části, kde pomalé vedení vzruchu přetrvává. Komorový a síňový myokard je,

mimo jiné specifické exprese proteinů, charakterizován expresí konexinu 40, což je zásadní konexin umožňující rychlé vedení vzruchu. Klíčová oblast pro převod vzruchu je předěl mezi pomalu vedoucím AV kanálem a rychle vedoucími komorami, kde jsme pozorovali nejčastější lokalizaci AV blokády a kde se mohou nacházet heterotypické vodivé spoje (viz Obr. 5) tvořené konexiny 45 a 40, které díky své heterogenitě mohou mít proti homotypickým spojům nižší elektrickou vodivost (Desplantez, 2017). Předpokládáme, že z funkčního hlediska je nejkritičtější oblast napojení trabekul na tkáň AV kanálu. Tento předpoklad dobře koreluje s experimenty Coppena a kolektivu provedených na embryonálních a dospělých hlodavčích srdcích, pomocí kterých objevili u myši analogické ostré rozhraní mezi částí AV kanálu exprimující konexin 45 a Hisovým svazkem exprimujícím konexin 40 (Coppen et al., 1999).

Pro AV kanál jsou typické akční potenciály s pozvolným počátečním vzestupem a poměrně delší dobou trvání proti rychle vedoucím segmentům (Sanders et al., 1984, de Jong et al., 1987, de Jong et al., 1992). Pro otestování hypotézy, že AV kanál je svou dlouhou dobou trvání akčního potenciálu (APD) limitujícím srdečním segmentem, jsme se rozhodli změřit APD u síní, AV kanálu a u komor. V rámci měření APD bylo naším cílem pouze zjistit poměr hodnot APD u jednotlivých srdečních segmentů. APD je parametr, který je, mimo jiné, modulován srdeční frekvencí a proto považujeme naměřené hodnoty pouze jako relativní a orientační. Hodnoty, které jsme naměřili pomocí optického mapování, byly vyšší než hodnoty získané mikroelektrodami (Arguello et al., 1986), nejspíše kvůli prodloužení APD působením blebbistatinu podobně jako působí cytochalasin D (Sedmera et al., 2006).

6.5 Role hypoxie během vývoje embryonálního srdce

Během vývoje srdce bylo popsáno několik oblastí myokardu, kde se přirozeně vyskytuje hypoxie (Nanka et al., 2006, Nanka et al., 2008, Wikenheiser et al., 2006). Tyto oblasti korelují s místy, kde dochází k formování převodního systému (Wikenheiser et al., 2006). Hypoxie byla dále také detekována v oblastech s největší tloušťkou myokardu (AV kanál, mezikomorová přepážka, výtoková část) a mimo jiné je hypoxie popisována jako jeden z významných stimulů pro koronární vaskulogenezi (Nanka et al., 2008). Není překvapením, že AV kanál jako jeden ze segmentů s největší tloušťkou myokardu, který postrádá trabekuly a je od okysličování krví z lumen separován endokardiálními polštářky, je velmi citlivý na hypoxii. Protože u kuřecího srdce do stádia ED9 (počátek koronární perfuze) normální proces okysličování probíhá z lumen, není s podivem, že proti prostředí *in ovo* byla srdce *in vitro*, kde je směr difuze a gradient O_2 pozměněn, silně náchylná ke vzniku AV blokády.

Pro otestování hypotézy, zda AV blokády souvisí pouze s hypoxií anebo při jejich vzniku hraje roli také omezená schopnost AV kanálu převádět vysoké sinusové frekvence na komoru, jsme provedli experimenty s elektrickou stimulací. Hlavním smyslem těchto experimentů bylo prokázat, jestli AV blokády vznikající během mírné tachykardie při hypertermii nebyly způsobeny pouze nízkým převodním limitem AV kanálu. Experimenty s elektrickou stimulací ukázaly, že maximální převoditelná frekvence dosažitelná pomocí stimulace pro AV kanál byla v prostředí *in ovo* o mnoho vyšší (360/min) než v prostředí *in vitro* (261/min). Také frekvenční limity síní a komor byly v prostředí *in ovo* vyšší (síně 360/min, komora 600/min) než v prostředí *in vitro* (síně 353/min, komora 476/min). Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben výrazně lepší oxygenací srdeční krve z lumen *in ovo*. Naše výsledky naznačují, že pozorované AV blokády byly pravděpodobně způsobeny spíše relativní tkáňovou hypoxií než limity AV kanálu převádět vysoké sinusové frekvence.

7. ZÁVĚR

Tato studie předkládá podrobný popis akutního vlivu teploty na funkci čtyřdenního kuřecího embryonálního srdce s hlavním důrazem na arytmogenezi. Změny teploty měly nejvýznamnější dopad na funkci pacemakeru a AV kanálu. V porovnání s přirozeným prostředím *in ovo*, kde jsme pozorovali minimum arytmii a to pouze při hypertermii, nastal v podmínkách *in vitro* značný výskyt arytmii již samovolně při normotermii pouze díky nestabilitě a stresu izolovaných srdcí. Hypertermie přidala další stres a zvýšené metabolické nároky, což vedlo ke zvýšení výskytu arytmii a pozorovali jsme při ní přechodný AV blok II. stupně dokonce i v prostředí *in ovo*. Hypotermie byla u srdcí obecně tolerována výrazně lépe než hypertermie, což blízce odpovídá přirozené adaptaci ptačích zárodků na přechodnou hypotermii. Snížení teploty dokonce v několika případech vedlo k obnovení vedení vzruchu po předchozím AV bloku, což pravděpodobně souviselo se snížením metabolických nároků. Zdaleka nejčetnější pozorovanou arytmií *in vitro* byl AV blok (II. a III. stupně), jehož četnost s rostoucí teplotou výrazně narůstala. Tato blokáda vedení vzruchu vznikala nejčastěji na předělu mezi AV kanálem a komorou, kde dochází k napojení dvou molekulárně a morfologicky odlišných tkání. Tímto je patrné, že morfologické a molekulární rozdíly mezi různými segmenty vyvíjejícího se srdce mají při zvýšené teplotě a zvýšených metabolických nárocích významné dopady na jeho fyziologii, což se projevilo zejména zvýšenou arytmogenezí. Akutní zvýšení teploty lze tedy na základě našich pozorování v prostředí *in vitro* a *in ovo* korelovat se zvýšením arytmogeneze.

8. LITERATURA

Aanhaanen, W. T., Brons, J. F., Dominguez, J. N., Rana, M. S., Norden, J., Airik, R., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., Brown, N. A., Kispert, A., Moorman, A. F. & Christoffels, V. M. 2009. The Tbx2+ primary myocardium of the atrioventricular canal forms the atrioventricular node and the base of the left ventricle. *Circ Res*, 104, 1267-74.

Ames, A. & Stevenson, W. G. 2006. Cardiology patient page. Catheter ablation of atrial fibrillation. *Circulation*, 113, 666-8.

Ammirabile, G., Tessari, A., Pignataro, V., Szumska, D., Sutera Sardo, F., Benes, J., Jr., Balistreri, M., Bhattacharya, S., Sedmera, D. & Campione, M. 2012. Pitx2 confers left morphological, molecular, and functional identity to the sinus venosus myocardium. *Cardiovasc Res*, 93, 291-301.

Arguello, C., Alanis, J., Pantoja, O. & Valenzuela, B. 1986. Electrophysiological and ultrastructural study of the atrioventricular canal during the development of the chick embryo. *J Mol Cell Cardiol*, 18, 499-510.

Arrenberg, A. B., Stainier, D. Y., Baier, H. & Huisken, J. 2010. Optogenetic control of cardiac function. *Science*, 330, 971-4.

Azarbayjani, F. & Danielsson, B. R. 2002. Embryonic arrhythmia by inhibition of HERG channels: a common hypoxia-related teratogenic mechanism for antiepileptic drugs? *Epilepsia*, 43, 457-68.

Baker, C., Taylor, D. G., Osuala, K., Natarajan, A., Molnar, P. J., Hickman, J., Alam, S., Moscato, B., Weinshenker, D. & Ebert, S. N. 2012. Adrenergic deficiency leads to impaired electrical conduction and increased arrhythmic potential in the embryonic mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 423, 536-41.

Bakker, M. L., Christoffels, V. M. & Moorman, A. F. 2010. The cardiac pacemaker and conduction system develops from embryonic myocardium that retains its primitive phenotype. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56, 6-15.

Benes, J., Jr., Ammirabile, G., Sankova, B., Campione, M., Krejci, E., Kvasilova, A. & Sedmera, D. 2014. The role of connexin40 in developing atrial conduction. *FEBS Lett*, 588, 1465-9.

Benson, D. W., Jr., Hughes, S. F., Hu, N. & Clark, E. B. 1989. Effect of heart rate increase on dorsal aortic flow before and after volume loading in the stage 24 chick embryo. *Pediatr Res*, 26, 438-41.

Bers, D. M. 1991. Ca regulation in cardiac muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 23, 1157-62.

Biermann, M., Rubart, M., Moreno, A., Wu, J., Josiah-Durant, A. & Zipes, D. P. 1998. Differential effects of cytochalasin D and 2,3 butanedione monoxime on isometric twitch force and transmembrane action potential in isolated ventricular muscle: implications for optical measurements of cardiac repolarization. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 9, 1348-57.

Blom, N. A., Gittenberger-de Groot, A. C., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., Mentink, M. M. & Ottenkamp, J. 1999. Development of the cardiac conduction tissue in human embryos using HNK-1 antigen expression: possible relevance for understanding of abnormal atrial automaticity. *Circulation*, 99, 800-6.

- Bonow, R. O., Libby, P. P., Mann, D. L. & Zipes, D. P. 2007. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 8th edition. Philadelphia: Elsevier Science.
- Boucek, R. J., Murphy, W. P., Jr. & Paff, G. H. 1959. Electrical and mechanical properties of chick embryonic heart chambers. *Circ Res*, 7, 787-93.
- Boukens, B. J. & Efimov, I. R. 2014. A century of optocardiography. *IEEE Rev Biomed Eng*, 7, 115-25.
- Brack, K. E., Narang, R., Winter, J. & Ng, G. A. 2013. The mechanical uncoupler blebbistatin is associated with significant electrophysiological effects in the isolated rabbit heart. *Exp Physiol*, 98, 1009-27.
- Braunwald, E., Zipes, D. P. & Libby, P. 2001. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, p. 2281. Saunders, Philadelphia.
- Bressan, M., Liu, G. & Mikawa, T. 2013. Early mesodermal cues assign avian cardiac pacemaker fate potential in a tertiary heart field. *Science*, 340, 744-8.
- Bressan, M., Yang, P. B., Louie, J. D., Navetta, A. M., Garriock, R. J. & Mikawa, T. 2014. Reciprocal myocardial-endocardial interactions pattern the delay in atrioventricular junction conduction. *Development*, 141, 4149-57.
- Brooker, G., Seki, T., Croll, D. & Wahlestedt, C. 1990. Calcium wave evoked by activation of endogenous or exogenously expressed receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2813-7.
- Brucato, A., Frassi, M., Franceschini, F., Cimaz, R., Faden, D., Pisoni, M. P., Muscara, M., Vignati, G., Stramba-Badiale, M., Catelli, L., Lojcono, A., Cavazzana, I., Ghirardello, A., Vescovi, F., Gambari, P. F., Doria, A., et al. 2001. Risk of congenital complete heart block in newborns of mothers with anti-Ro/SSA antibodies detected by counterimmunoelectrophoresis: a prospective study of 100 women. *Arthritis Rheum*, 44, 1832-5.
- Buckingham, M., Meilhac, S. & Zaffran, S. 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*, 6, 826-35.
- Buechling, T., Akasaka, T., Vogler, G., Ruiz-Lozano, P., Ocorr, K. & Bodmer, R. 2009. Non-autonomous modulation of heart rhythm, contractility and morphology in adult fruit flies. *Dev Biol*, 328, 483-92.
- Clark, E. B. 1984 Functional aspects of cardiac development. In: *Growth of the Heart in Health and Disease*. Zak, R., ed. Raven Press, New York.
- Clark, E. B., Hu, N. & Dooley, J. B. 1985. The effect of isoproterenol on cardiovascular function in the stage 24 chick embryo. *Teratology*, 31, 41-7.
- Clark, E. B., Hu, N., Turner, D. R., Litter, J. E. & Hansen, J. 1991. Effect of chronic verapamil treatment on ventricular function and growth in chick embryos. *Am J Physiol*, 261, H166-71.

- Copel, J. A., Liang, R. I., Demasio, K., Ozeren, S. & Kleinman, C. S. 2000. The clinical significance of the irregular fetal heart rhythm. *Am J Obstet Gynecol*, 182, 813-7; discussion 817-9.
- Coppen, S. R., Dupont, E., Rothery, S. & Severs, N. J. 1998. Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res*, 82, 232-43.
- Coppen, S. R., Severs, N. J. & Gourdie, R. G. 1999. Connexin45 (alpha 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet*, 24, 82-90.
- Danielsson, B. R., Azarbayjani, F., Skold, A. C. & Webster, W. S. 1997. Initiation of phenytoin teratogenesis: pharmacologically induced embryonic bradycardia and arrhythmia resulting in hypoxia and possible free radical damage at reoxygenation. *Teratology*, 56, 271-81.
- Danielsson, C., Azarbayjani, F., Skold, A. C., Sjogren, N. & Danielsson, B. R. 2007. Polytherapy with hERG-blocking antiepileptic drugs: increased risk for embryonic cardiac arrhythmia and teratogenicity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 79, 595-603.
- Davis, L. M., Rodefeld, M. E., Green, K., Beyer, E. C. & Saffitz, J. E. 1995. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 6, 813-22.
- de Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T. & Sonnenberg, H. 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, 28, 89-94.
- de Jong, F., Geerts, W. J., Lamers, W. H., Los, J. A. & Moorman, A. F. 1987. Isomyosin expression patterns in tubular stages of chicken heart development: a 3-D immunohistochemical analysis. *Anat Embryol (Berl)*, 177, 81-90.
- de Jong, F., Opthof, T., Wilde, A. A., Janse, M. J., Charles, R., Lamers, W. H. & Moorman, A. F. 1992. Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts. *Circ Res*, 71, 240-50.
- de la Cruz, M. V., Castillo, M. M., Villavicencio, L., Valencia, A. & Moreno-Rodriguez, R. A. 1997. Primitive interventricular septum, its primordium, and its contribution in the definitive interventricular septum: in vivo labelling study in the chick embryo heart. *Anat Rec*, 247, 512-20.
- De la Cruz, M. V. & Markwald, R. R. 1998. *Living Morphogenesis of the Heart*. Birkhauser, Boston.
- De la Cruz, M. V., Gimenez-Ribotta, M., Saravalli, O. & Cayre, R. 1983. The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to the development of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. *Am J Anat*, 166, 63-72.
- Desplantez, T. 2017. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: involvement of connexins epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels. *BMC Cell Biol*, 18, 3.
- DiFrancesco, D. 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol*, 55, 455-72.
- DiFrancesco, D. 2010. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res*, 106, 434-46.
- Dillon, S. & Morad, M. 1981. A new laser scanning system for measuring action potential propagation in the heart. *Science*, 214, 453-6.

- Donofrio, M. T., Moon-Grady, A. J., Hornberger, L. K., Copel, J. A., Sklansky, M. S., Abuhamad, A., Cuneo, B. F., Huhta, J. C., Jonas, R. A., Krishnan, A., Lacey, S., Lee, W., Michelfelder, E. C., Sr., Rempel, G. R., Silverman, N. H., Spray, T. L., et al. 2014. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 129, 2183-242.
- Efimov, I. R., Fahy, G. J., Cheng, Y., Van Wagoner, D. R., Tchou, P. J. & Mazgalev, T. N. 1997. High-resolution fluorescent imaging does not reveal a distinct atrioventricular nodal anterior input channel (fast pathway) in the rabbit heart during sinus rhythm. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 8, 295-306.
- Efimov, I. R., Huang, D. T., Rendt, J. M. & Salama, G. 1994. Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts. *Circulation*, 90, 1469-80.
- Eghtesady, P., Michelfelder, E. C., Knilans, T. K., Witte, D. P., Manning, P. B. & Crombleholme, T. M. 2011. Fetal surgical management of congenital heart block in a hydropic fetus: lessons learned from a clinical experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 141, 835-7.
- Eronen, M. 1997. Outcome of fetuses with heart disease diagnosed in utero. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 77, F41-6.
- Fedorov, V. V., Lozinsky, I. T., Sosunov, E. A., Anyukhovskiy, E. P., Rosen, M. R., Balke, C. W. & Efimov, I. R. 2007. Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm*, 4, 619-26.
- Frank, D. U., Carter, K. L., Thomas, K. R., Burr, R. M., Bakker, M. L., Coetzee, W. A., Tristani-Firouzi, M., Bamshad, M. J., Christoffels, V. M. & Moon, A. M. 2012. Lethal arrhythmias in *Tbx3*-deficient mice reveal extreme dosage sensitivity of cardiac conduction system function and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E154-63.
- Friedman, D. M., Kim, M. Y., Copel, J. A., Llanos, C., Davis, C. & Buyon, J. P. 2009. Prospective evaluation of fetuses with autoimmune-associated congenital heart block followed in the PR Interval and Dexamethasone Evaluation (PRIDE) Study. *Am J Cardiol*, 103, 1102-6.
- Gittenberger-de Groot, A. C., Bartelings, M. M & Poelmann, R. E. 1995. Overview: Cardiac Morphogenesis. In: *Developmental mechanisms of heart disease*. Clark, E. B, Markwald, R. R. & Takao, A. Eds Futura Publishing Co, Armonk, 157-168.
- Gonzalez, M. D., Contreras, L. J., Jongbloed, M. R., Rivera, J., Donahue, T. P., Curtis, A. B., Bailey, M. S., Conti, J. B., Fishman, G. I., Schalij, M. J. & Gittenberger-de Groot, A. C. 2004. Left atrial tachycardia originating from the mitral annulus-aorta junction. *Circulation*, 110, 3187-92.
- Gourdie, R. G. 1995. A map of the heart: gap junctions, connexin diversity and retroviral studies of conduction myocyte lineage. *Clin Sci (Lond)*, 88, 257-62.
- Gourdie, R. G., Harris, B. S., Bond, J., Justus, C., Hewett, K. W., O'Brien, T. X., Thompson, R. P. & Sedmera, D. 2003. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69, 46-57.

Gourdie, R. G., Wei, Y., Kim, D., Klatt, S. C. & Mikawa, T. 1998. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6815-8.

Gros, D. B. & Jongsma, H. J. 1996. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays*, 18, 719-30.

Gurjarpadhye, A., Hewett, K. W., Justus, C., Wen, X., Stadt, H., Kirby, M. L., Sedmera, D. & Gourdie, R. G. 2007. Cardiac neural crest ablation inhibits compaction and electrical function of conduction system bundles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H1291-300.

Gutstein, D. E., Morley, G. E., Tamaddon, H., Vaidya, D., Schneider, M. D., Chen, J., Chien, K. R., Stuhlmann, H. & Fishman, G. I. 2001. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res*, 88, 333-9.

Haddock, P. S., Coetzee, W. A. & Artman, M. 1997. Na⁺/Ca²⁺ exchange current and contractions measured under Cl(-)-free conditions in developing rabbit hearts. *Am J Physiol*, 273, H837-46.

Hall, C. E., Hurtado, R., Hewett, K. W., Shulimovich, M., Poma, C. P., Reckova, M., Justus, C., Pennisi, D. J., Tobita, K., Sedmera, D., Gourdie, R. G. & Mikawa, T. 2004. Hemodynamic-dependent patterning of endothelin converting enzyme 1 expression and differentiation of impulse-conducting Purkinje fibers in the embryonic heart. *Development*, 131, 581-92.

Hall, D. G., Morley, G. E., Vaidya, D., Ard, M., Kimball, T. R., Witt, S. A. & Colbert, M. C. 2000. Early onset heart failure in transgenic mice with dilated cardiomyopathy. *Pediatr Res*, 48, 36-42.

Hamburger, V. & Hamilton, H. L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88, 49-92.

Hara, Y., Wake, K., Inoue, K., Kuroda, N., Sato, A., Inamatsu, M., Tateno, C. & Sato, T. 2016. Development of the Heart Endocardium at an Early Stage of Chick Embryos Evaluated at Light- and Electron-Microscopic Levels. *Anat Rec (Hoboken)*, 299, 1080-9.

Hildreth, V., Anderson, R. H. & Henderson, D. J. 2009. Autonomic innervation of the developing heart: origins and function. *Clin Anat*, 22, 36-46.

Hirota, A., Kamino, K., Komuro, H. & Sakai, T. 1987. Mapping of early development of electrical activity in the embryonic chick heart using multiple-site optical recording. *J Physiol*, 383, 711-28.

Hirota, A., Kamino, K., Komuro, H., Sakai, T. & Yada, T. 1985. Early events in development of electrical activity and contraction in embryonic rat heart assessed by optical recording. *J Physiol*, 369, 209-27.

Hoff, E. C. & Kramer, T. C. 1939. The development of the electrocardiogram of the embryonic heart. *Am Heart J*, 17, 471-488.

Hoogaars, W. M., Engel, A., Brons, J. F., Verkerk, A. O., de Lange, F. J., Wong, L. Y., Bakker, M. L., Clout, D. E., Wakker, V., Barnett, P., Ravesloot, J. H., Moorman, A. F., Verheijck, E. E. & Christoffels, V. M. 2007. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev*, 21, 1098-112.

Hoogaars, W. M., Tessari, A., Moorman, A. F., de Boer, P. A., Hagoort, J., Soufan, A. T., Campione, M. & Christoffels, V. M. 2004. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res*, 62, 489-99.

Huhta, J. C. 2005. Fetal congestive heart failure. *Semin Fetal Neonatal Med*, 10, 542-52.

Chen, F., De Diego, C., Chang, M. G., McHarg, J. L., John, S., Klitzner, T. S. & Weiss, J. N. 2010. Atrioventricular conduction and arrhythmias at the initiation of beating in embryonic mouse hearts. *Dev Dyn*, 239, 1941-9.

Chen, Y. H. & DeHaan, R. L. 1993. Temperature dependence of embryonic cardiac gap junction conductance and channel kinetics. *J Membr Biol*, 136, 125-34.

Choi, B. R. & Salama, G. 2000. Simultaneous maps of optical action potentials and calcium transients in guinea-pig hearts: mechanisms underlying concordant alternans. *J Physiol*, 529 Pt 1, 171-88.

Christoffels, V. M., Mommersteeg, M. T., Trowe, M. O., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Soufan, A. T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R. P., Moorman, A. F. & Kispert, A. 2006. Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res*, 98, 1555-63.

Christoffels, V. M., Hoogaars, W. M. & Moorman, A. F. 2010. Patterning and development of the conduction system of the heart: origins of the conduction system in development. In: N. Rosenthal & R.P. Harvey (eds) *Heart Development and Regeneration*, pp. 171-194. Elsevier, London.

Chuck, E. T., Freeman, D. M., Watanabe, M. & Rosenbaum, D. S. 1997. Changing activation sequence in the embryonic chick heart. Implications for the development of the His-Purkinje system. *Circ Res*, 81, 470-6.

Chuck, E. T., Meyers, K., France, D., Creazzo, T. L. & Morley, G. E. 2004. Transitions in ventricular activation revealed by two-dimensional optical mapping. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280, 990-1000.

Jaber, M., Koch, W. J., Rockman, H., Smith, B., Bond, R. A., Sulik, K. K., Ross, J., Jr., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. & Giros, B. 1996. Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12974-9.

Jaeggi, E. T. & Nii, M. 2005. Fetal brady- and tachyarrhythmias: new and accepted diagnostic and treatment methods. *Semin Fetal Neonatal Med*, 10, 504-14.

Jaeggi, E. T., Silverman, E. D., Laskin, C., Kingdom, J., Golding, F. & Weber, R. 2011. Prolongation of the atrioventricular conduction in fetuses exposed to maternal anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies did not predict progressive heart block. A prospective observational study on the effects of maternal antibodies on 165 fetuses. *J Am Coll Cardiol*, 57, 1487-92.

Jalife, J., Morley, G. E., Tallini, N. Y. & Vaidya, D. 1998. A fungal metabolite that eliminates motion artifacts. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 9, 1358-62.

Jalife, J., Morley, G. E. & Vaidya, D. 1999. Connexins and impulse propagation in the mouse heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10, 1649-63.

Jay, P. Y., Harris, B. S., Maguire, C. T., Buerger, A., Wakimoto, H., Tanaka, M., Kupershmidt, S., Roden, D. M., Schultheiss, T. M., O'Brien, T. X., Gourdie, R. G., Berul, C. I. & Izumo, S. 2004. Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *J Clin Invest*, 113, 1130-7.

Jerome, L. A. & Papaioannou, V. E. 2001. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet*, 27, 286-91.

Jongbloed, M. R., Schalij, M. J., Poelmann, R. E., Blom, N. A., Fekkes, M. L., Wang, Z., Fishman, G. I. & Gittenberger-De Groot, A. C. 2004. Embryonic conduction tissue: a spatial correlation with adult arrhythmogenic areas. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 15, 349-55.

Jou, C. J., Spitzer, K. W. & Tristani-Firouzi, M. 2010. Blebbistatin effectively uncouples the excitation-contraction process in zebrafish embryonic heart. *Cell Physiol Biochem*, 25, 419-24.

Kamino, K. 1991. Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development. *Physiol Rev*, 71, 53-91.

Kamino, K., Hirota, A. & Fujii, S. 1981. Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature*, 290, 595-7.

Karppinen, S., Rapila, R., Makikallio, K., Hanninen, S. L., Rysa, J., Vuolteenaho, O. & Tavi, P. 2014. Endothelin-1 signalling controls early embryonic heart rate in vitro and in vivo. *Acta Physiol (Oxf)*, 210, 369-80.

Kasuya, Y., Matsuki, N. & Shigenobu, K. 1977. Changes in sensitivity to anoxia of the cardiac action potential plateau during chick embryonic development. *Dev Biol*, 58, 124-33.

Kho, C., Lee, A. & Hajjar, R. J. 2012. Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling--targets for heart failure therapy. *Nat Rev Cardiol*, 9, 717-33.

Kirby, M. L. 2007. *Cardiac Development*. Oxford University Press, New York.

Kirby, M. L., Gale, T. F. & Stewart, D. E. 1983. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*, 220, 1059-61.

Kockova, R., Svatunkova, J., Novotny, J., Hejnova, L., Ostadal, B. & Sedmera, D. 2013. Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304, H895-902.

Kolditz, D. P., Wijffels, M. C., Blom, N. A., van der Laarse, A., Hahurij, N. D., Lie-Venema, H., Markwald, R. R., Poelmann, R. E., Schalij, M. J. & Gittenberger-de Groot, A. C. 2008. Epicardium-derived cells in development of annulus fibrosus and persistence of accessory pathways. *Circulation*, 117, 1508-17.

- Kolditz, D. P., Wijffels, M. C., Blom, N. A., van der Laarse, A., Markwald, R. R., Schalij, M. J. & Gittenberger-de Groot, A. C. 2007. Persistence of functional atrioventricular accessory pathways in postseptated embryonic avian hearts: implications for morphogenesis and functional maturation of the cardiac conduction system. *Circulation*, 115, 17-26.
- Kolega, J. 2004. Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light. *Biochem Biophys Res Commun*, 320, 1020-5.
- Komuro, H., Sakai, T., Hirota, A. & Kamino, K. 1986. Conduction pattern of excitation in the amphibian atrium assessed by multiple-site optical recording of action potentials. *Jpn J Physiol*, 36, 123-37.
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A. & Sellers, J. R. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*, 279, 35557-63.
- Kucera, J. P., Kleber, A. G. & Rohr, S. 1998. Slow conduction in cardiac tissue, II: effects of branching tissue geometry. *Circ Res*, 83, 795-805.
- Larsen, A. P., Sciuto, K. J., Moreno, A. P. & Poelzing, S. 2012. The voltage-sensitive dye di-4-ANEPPS slows conduction velocity in isolated guinea pig hearts. *Heart Rhythm*, 9, 1493-500.
- Leaf, D. E., Feig, J. E., Vasquez, C., Riva, P. L., Yu, C., Lader, J. M., Kontogeorgis, A., Baron, E. L., Peters, N. S., Fisher, E. A., Gutstein, D. E. & Morley, G. E. 2008. Connexin40 imparts conduction heterogeneity to atrial tissue. *Circ Res*, 103, 1001-8.
- Lee, S. J., Yeom, E., Ha, H. & Nam, K. H. 2011. Cardiac outflow and wall motion in hypothermic chick embryos. *Microvasc Res*, 82, 296-303.
- Liang, X., Wang, G., Lin, L., Lowe, J., Zhang, Q., Bu, L., Chen, Y., Chen, J., Sun, Y. & Evans, S. M. 2013. HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors. *Circ Res*, 113, 399-407.
- Liddicoat, J. R., Klein, J. R., Reddy, V. M., Klautz, R. J., Teitel, D. F. & Hanley, F. L. 1997. Hemodynamic effects of chronic prenatal ventricular pacing for the treatment of complete atrioventricular block. *Circulation*, 96, 1025-30.
- Limouze, J., Straight, A. F., Mitchison, T. & Sellers, J. R. 2004. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil*, 25, 337-41.
- Lin, E., Ribeiro, A., Ding, W., Hove-Madsen, L., Sarunic, M. V., Beg, M. F. & Tibbits, G. F. 2014. Optical mapping of the electrical activity of isolated adult zebrafish hearts: acute effects of temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 306, R823-36.
- Linden, J., Vogel, S. & Sperelakis, N. 1982. Sensitivity of Ca-dependent slow action potentials to methacholine is induced by phosphodiesterase inhibitors in embryonic chick ventricles. *J Pharmacol Exp Ther*, 222, 383-8.

- Liu, J., Bressan, M., Hassel, D., Huisken, J., Staudt, D., Kikuchi, K., Poss, K. D., Mikawa, T. & Stainier, D. Y. 2010. A dual role for ErbB2 signaling in cardiac trabeculation. *Development*, 137, 3867-75.
- Lo, C. W., Yu, Q., Shen, Y., Leatherbury, I., Francis, R., Xiao-Quing, Z., Zhang, Z., Wessels, A., Huang, G. & Chatterjee, B. 2010. Exploring the genetic basis for congenital heart disease with mouse ENU mutagenesis. In: N. Rosenthal & R.P. Harvey (ed.) *Heart Development and Regeneration*, pp. 753–778. Elsevier, London.
- Maekawa, K., Sudoh, T., Furusawa, M., Minamino, N., Kangawa, K., Ohkubo, H., Nakanishi, S. & Matsuo, H. 1988. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for porcine brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 157, 410-6.
- Maeno, Y. V., Boutin, C., Hornberger, L. K., McCrindle, B. W., Cavalle-Garrido, T., Gladman, G. & Smallhorn, J. F. 1999. Prenatal diagnosis of right ventricular outflow tract obstruction with intact ventricular septum, and detection of ventriculocoronary connections. *Heart*, 81, 661-8.
- Malpighi, M. 1672. *De formatione pulli in ovo*. Royal Society; London.
- Manner, J. 2000. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec*, 259, 248-62.
- Manner, J., Seidl, W. & Steding, G. 1993. Correlation between the embryonic head flexures and cardiac development. An experimental study in chick embryos. *Anat Embryol (Berl)*, 188, 269-85.
- Maurer, M., Jr. 1979. Developmental factors contributing to the susceptibility to bradycardia in isolated, cultured fetal mouse hearts. *Pediatr Res*, 13, 1052-7.
- Meiltz, A., Kucera, P., de Ribaupierre, Y. & Raddatz, E. 1998. Inhibition of bicarbonate transport protects embryonic heart against reoxygenation-induced dysfunction. *J Mol Cell Cardiol*, 30, 327-35.
- Mitchell, J. L., Cuneo, B. F., Etheridge, S. P., Horigome, H., Weng, H. Y. & Benson, D. W. 2012. Fetal heart rate predictors of long QT syndrome. *Circulation*, 126, 2688-95.
- Mommersteeg, M. T., Brown, N. A., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Harvey, R. P., Moorman, A. F. & Christoffels, V. M. 2007a. *Pitx2c* and *Nkx2-5* are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res*, 101, 902-9.
- Mommersteeg, M. T., Hoogaars, W. M., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Wiese, C., Clout, D. E., Papaioannou, V. E., Brown, N. A., Harvey, R. P., Moorman, A. F. & Christoffels, V. M. 2007b. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res*, 100, 354-62.
- Moorman, A. F., de Jong, F., Denyn, M. M. & Lamers, W. H. 1998. Development of the cardiac conduction system. *Circ Res*, 82, 629-44.
- Moorman, A. F. & Lamers, W. H. 1992. [Current developments in cardiovascular embryology. I. How the embryonal heart can function without valves and without conduction system]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 136, 2503-8.

- Moorman, A. F., van den Berg, G., Anderson, R. H. & Christoffels, V. M. 2010. Early cardiac growth and the ballooning model of cardiac chamber formation. In: N. Rosenthal & R.P. Harvey (eds) *Heart Development and Regeneration*, pp. 219–236. Elsevier, London.
- Morley, G. E. & Vaidya, D. 2001. Understanding conduction of electrical impulses in the mouse heart using high-resolution video imaging technology. *Microsc Res Tech*, 52, 241-50.
- Morley, G. E., Vaidya, D. & Jalife, J. 2000. Characterization of conduction in the ventricles of normal and heterozygous Cx43 knockout mice using optical mapping. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 11, 375-7.
- Moskowitz, I. P., Pizard, A., Patel, V. V., Bruneau, B. G., Kim, J. B., Kupersmidt, S., Roden, D., Berul, C. I., Seidman, C. E. & Seidman, J. G. 2004. The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development*, 131, 4107-16.
- Nakazawa, M., Clark, E. B., Hu, N. & Wispe, J. 1985. Effect of environmental hypothermia on vitelline artery blood pressure and vascular resistance in the stage 18, 21, and 24 chick embryo. *Pediatr Res*, 19, 651-4.
- Nakazawa, M., Miyagawa, S., Takao, A., Clark, E. B. & Hu, N. 1986. Hemodynamic effects of environmental hyperthermia in stage 18, 21, and 24 chick embryos. *Pediatr Res*, 20, 1213-5.
- Nanka, O., Krizova, P., Fikrle, M., Tuma, M., Blaha, M., Grim, M. & Sedmera, D. 2008. Abnormal myocardial and coronary vasculature development in experimental hypoxia. *Anat Rec (Hoboken)*, 291, 1187-99.
- Nanka, O., Valasek, P., Dvorakova, M. & Grim, M. 2006. Experimental hypoxia and embryonic angiogenesis. *Dev Dyn*, 235, 723-33.
- Nicholson, A., Chmait, R., Bar-Cohen, Y., Zheng, K. & Loeb, G. E. 2012. Percutaneously injectable fetal pacemaker: electronics, pacing thresholds, and power budget. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2012, 5730-3.
- Nii, M., Hamilton, R. M., Fenwick, L., Kingdom, J. C., Roman, K. S. & Jaeggi, E. T. 2006. Assessment of fetal atrioventricular time intervals by tissue Doppler and pulse Doppler echocardiography: normal values and correlation with fetal electrocardiography. *Heart*, 92, 1831-7.
- Nomura-Kitabayashi, A., Phoon, C. K., Kishigami, S., Rosenthal, J., Yamauchi, Y., Abe, K., Yamamura, K., Samtani, R., Lo, C. W. & Mishina, Y. 2009. Outflow tract cushions perform a critical valve-like function in the early embryonic heart requiring BMPRIA-mediated signaling in cardiac neural crest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, H1617-28.
- Oosthoek, P. W., Wenink, A. C., Vrolijk, B. C., Wisse, L. J., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E. & Gittenberger-de Groot, A. C. 1998. Development of the atrioventricular valve tension apparatus in the human heart. *Anat Embryol (Berl)*, 198, 317-29.
- Paff, G. H. & Boucek, R. J. 1975. Conal contribution to the electrocardiogram of chick embryo hearts. *Anat Rec*, 182, 169-73.

- Paff, G. H., Boucek, R. J. & Harrell, T. C. 1968. Observations on the development of the electrocardiogram. *Anat Rec*, 160, 575-82.
- Paff, G. H., Boucek, R. J. & Klopfenstein, H. S. 1964. Experimental Heart-Block in the Chick Embryo. *Anat Rec*, 149, 217-23.
- Patten, B. M., Kramer, T. C. & Barry, A. 1948. Valvular action in the embryonic chick heart by localized apposition of endocardial masses. *Anat Rec*, 102, 299-311.
- Patten, B. M. 1964. *Foundations of embryology*. 2nd edition. McGraw Hill, New York.
- Pedra, S. R., Smallhorn, J. F., Ryan, G., Chitayat, D., Taylor, G. P., Khan, R., Abdolell, M. & Hornberger, L. K. 2002. Fetal cardiomyopathies: pathogenic mechanisms, hemodynamic findings, and clinical outcome. *Circulation*, 106, 585-91.
- Peterka, M., Peterkova, R. & Likovsky, Z. 1996. Teratogenic and lethal effects of long-term hyperthermia and hypothermia in the chick embryo. *Reprod Toxicol*, 10, 327-32.
- Phoon, C. K. 2006. Imaging tools for the developmental biologist: ultrasound biomicroscopy of mouse embryonic development. *Pediatr Res*, 60, 14-21.
- Phoon, C. K., Aristizabal, O. & Turnbull, D. H. 2002. Spatial velocity profile in mouse embryonic aorta and Doppler-derived volumetric flow: a preliminary model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H908-16.
- Phoon, C. K., Ji, R. P., Aristizabal, O., Worrada, D. M., Zhou, B., Baldwin, H. S. & Turnbull, D. H. 2004. Embryonic heart failure in NFATc1^{-/-} mice: novel mechanistic insights from in utero ultrasound biomicroscopy. *Circ Res*, 95, 92-9.
- Power, A., Pearson, N., Pham, T., Cheung, C., Phillips, A. & Hickey, A. 2014. Uncoupling of oxidative phosphorylation and ATP synthase reversal within the hyperthermic heart. *Physiol Rep*, 2.
- Raddatz, E., Kucera, P. & De Ribaupierre, Y. 1997. Response of the embryonic heart to hypoxia and reoxygenation: an in vitro model. *Exp Clin Cardiol* 2, 128-134.
- Raddatz, E., Thomas, A. C., Sarre, A. & Benathan, M. 2011. Differential contribution of mitochondria, NADPH oxidases, and glycolysis to region-specific oxidant stress in the anoxic-reoxygenated embryonic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300, H820-35.
- Rajala, G. M., Kuhlmann, R. S. & Kolesari, G. L. 1984. The role of dysrhythmic heart function during cardiovascular teratogenesis in epinephrine-treated chick embryos. *Teratology*, 30, 385-92.
- Reckova, M., Rosengarten, C., deAlmeida, A., Stanley, C. P., Wessels, A., Gourdie, R. G., Thompson, R. P. & Sedmera, D. 2003. Hemodynamics is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system. *Circ Res*, 93, 77-85.
- Reed, K. L. 1989. Fetal arrhythmias: etiology, diagnosis, pathophysiology, and treatment. *Semin Perinatol*, 13, 294-304.

Reinisch, J. M., Simon, N. G., Karow, W. G. & Gandelman, R. 1978. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science*, 202, 436-8.

Rentschler, S., Harris, B. S., Kuznekoff, L., Jain, R., Manderfield, L., Lu, M. M., Morley, G. E., Patel, V. V. & Epstein, J. A. 2011. Notch signaling regulates murine atrioventricular conduction and the formation of accessory pathways. *J Clin Invest*, 121, 525-33.

Rentschler, S., Vaidya, D. M., Tamaddon, H., Degenhardt, K., Sassoon, D., Morley, G. E., Jalife, J. & Fishman, G. I. 2001. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development*, 128, 1785-92.

Rentschler, S., Zander, J., Meyers, K., France, D., Levine, R., Porter, G., Rivkees, S. A., Morley, G. E. & Fishman, G. I. 2002. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10464-9.

Rhett, J. M. & Gourdie, R. G. 2012. The perinexus: a new feature of Cx43 gap junction organization. *Heart Rhythm*, 9, 619-23.

Robin, E., Sabourin, J., Benoit, R., Pedretti, S. & Raddatz, E. 2011. Adenosine A1 receptor activation is arrhythmogenic in the developing heart through NADPH oxidase/ERK- and PLC/PKC-dependent mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 945-54.

Ruijtenbeek, K., De Mey, J. G. & Blanco, C. E. 2002. The chicken embryo in developmental physiology of the cardiovascular system: a traditional model with new possibilities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283, R549-50; author reply R550-1.

Sabourin, J., Robin, E. & Raddatz, E. 2011. A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. *Cardiovasc Res*, 92, 226-36.

Sakai, T., Yada, T., Hirota, A., Komuro, H. & Kamino, K. 1998. A regional gradient of cardiac intrinsic rhythmicity depicted in embryonic cultured multiple hearts. *Pflugers Arch*, 437, 61-9.

Sanders, E., Moorman, A. F. & Los, J. A. 1984. The local expression of adult chicken heart myosins during development. I. The three days embryonic chicken heart. *Anat Embryol (Berl)*, 169, 185-91.

Sankova, B., Benes, J., Jr., Krejci, E., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Miquerol, L. & Sedmera, D. 2012. The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. *Cardiovasc Res*, 95, 469-79.

Sankova, B., Machalek, J. & Sedmera, D. 2010. Effects of mechanical loading on early conduction system differentiation in the chick. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298, H1571-6.

Sarre, A., Lange, N., Kucera, P. & Raddatz, E. 2005. mitoKATP channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H1611-9.

Sarre, A., Maury, P., Kucera, P., Kappenberger, L. & Raddatz, E. 2006. Arrhythmogenesis in the developing heart during anoxia-reoxygenation and hypothermia-rewarming: an in vitro model. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 17, 1350-9.

- Sarre, A., Pedretti, S., Gardier, S. & Raddatz, E. 2010. Specific inhibition of HCN channels slows rhythm differently in atria, ventricle and outflow tract and stabilizes conduction in the anoxic-reoxygenated embryonic heart model. *Pharmacol Res*, 61, 85-91.
- Sedmera, D., Grobety, M., Reymond, C., Baehler, P., Kucera, P. & Kappenberger, L. 1999. Pacing-induced ventricular remodeling in the chick embryonic heart. *Pediatr Res*, 45, 845-52.
- Sedmera, D., Harris, B. S., Grant, E., Zhang, N., Jourdan, J., Kurkova, D. & Gourdie, R. G. 2008. Cardiac expression patterns of endothelin-converting enzyme (ECE): implications for conduction system development. *Dev Dyn*, 237, 1746-53.
- Sedmera, D., Kockova, R., Vostarek, F. & Raddatz, E. 2015. Arrhythmias in the developing heart. *Acta Physiol (Oxf)*, 213, 303-20.
- Sedmera, D., Kucera, P. & Raddatz, E. 2002. Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283, R379-88.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Hu, N. & Clark, E. B. 1997. Developmental changes in the myocardial architecture of the chick. *Anat Rec*, 248, 421-32.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Hu, N. & Clark, E. B. 1998. A quantitative study of the ventricular myoarchitecture in the stage 21-29 chick embryo following decreased loading. *Eur J Morphol*, 36, 105-19.
- Sedmera, D., Reckova, M., Bigelow, M. R., Dealmeida, A., Stanley, C. P., Mikawa, T., Gourdie, R. G. & Thompson, R. P. 2004. Developmental transitions in electrical activation patterns in chick embryonic heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280, 1001-9.
- Sedmera, D., Reckova, M., deAlmeida, A., Sedmerova, M., Biermann, M., Volejnik, J., Sarre, A., Raddatz, E., McCarthy, R. A., Gourdie, R. G. & Thompson, R. P. 2003. Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H1152-60.
- Sedmera, D., Wessels, A., Trusk, T. C., Thompson, R. P., Hewett, K. W. & Gourdie, R. G. 2006. Changes in activation sequence of embryonic chick atria correlate with developing myocardial architecture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H1646-52.
- Shrier, A. & Clay, J. R. 1982. Comparison of the pacemaker properties of chick embryonic atrial and ventricular heart cells. *J Membr Biol*, 69, 49-56.
- Schmidt, K. G., Ulmer, H. E., Silverman, N. H., Kleinman, C. S. & Copel, J. A. 1991. Perinatal outcome of fetal complete atrioventricular block: a multicenter experience. *J Am Coll Cardiol*, 17, 1360-6.
- Silbernagl, S. & Despopoulos, A. 2004. Atlas fyziologie člověka. Grada Publishing, Praha.
- Simpson, J. M. & Sharland, G. K. 1998. Fetal tachycardias: management and outcome of 127 consecutive cases. *Heart*, 79, 576-81.

Skold, A. C. & Danielsson, B. R. 2000. Developmental toxicity of the class III antiarrhythmic agent almokalant in mice. Adverse effects mediated via induction of embryonic heart rhythm abnormalities. *Arzneimittelforschung*, 50, 520-5.

Snarr, B. S., O'Neal, J. L., Chintalapudi, M. R., Wirrig, E. E., Phelps, A. L., Kubalak, S. W. & Wessels, A. 2007. Isl1 expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development. *Circ Res*, 101, 971-4.

Sperelakis, N. & Lehmkuhl, D. 1967. Effects of temperature and metabolic poisons on membrane potentials of cultured heart cells. *Am J Physiol*, 213, 719-24.

Sperelakis, N. 1982. Pacemaker mechanisms in myocardial cells during development of chick embryonic heart. In: *Cardiac Rate and Rhythm*. ed. Bouman, L. N & Jongsma, H. J. Martinus Nijhoff, Leiden, 129-165.

Sridharan, S., Sullivan, I., Tomek, V., Wolfenden, J., Skovranek, J., Yates, R., Janousek, J., Dominguez, T. E. & Marek, J. 2016. Flecainide versus digoxin for fetal supraventricular tachycardia: Comparison of two drug treatment protocols. *Heart Rhythm*, 13, 1913-9.

Srinivasan, S. & Strasburger, J. 2008. Overview of fetal arrhythmias. *Curr Opin Pediatr*, 20, 522-31.

Steding, G. & Seidl, W. 1980. Contribution to the development of the heart. Part 1: normal development. *Thorac Cardiovasc Surg*, 28, 386-409.

Stewart, P. A., Tonge, H. M. & Wladimiroff, J. W. 1983. Arrhythmia and structural abnormalities of the fetal heart. *Br Heart J*, 50, 550-4.

Strasburger, J. F., Cheulkar, B. & Wakai, R. T. 2008. Magnetocardiography for fetal arrhythmias. *Heart Rhythm*, 5, 1073-6.

Strasburger, J. F. & Wakai, R. T. 2010. Fetal cardiac arrhythmia detection and in utero therapy. *Nat Rev Cardiol*, 7, 277-90.

Sugiyama, T., Miyazaki, H., Saito, K., Shimada, H. & Miyamoto, K. 1996. Chick embryos as an alternative experimental animal for cardiovascular investigations: stable recording of electrocardiogram of chick embryos in ovo on the 16th day of incubation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 138, 262-7.

Sun, F. Z., Hoyland, J., Huang, X., Mason, W. & Moor, R. M. 1992. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development*, 115, 947-56.

Sydorak, R. M., Nijagal, A. & Albanese, C. T. 2001. Endoscopic techniques in fetal surgery. *Yonsei Med J*, 42, 695-710.

Takebayashi-Suzuki, K., Yanagisawa, M., Gourdie, R. G., Kanzawa, N. & Mikawa, T. 2000. In vivo induction of cardiac Purkinje fiber differentiation by coexpression of preproendothelin-1 and endothelin converting enzyme-1. *Development*, 127, 3523-32.

- Tamaddon, H. S., Vaidya, D., Simon, A. M., Paul, D. L., Jalife, J. & Morley, G. E. 2000. High-resolution optical mapping of the right bundle branch in connexin40 knockout mice reveals slow conduction in the specialized conduction system. *Circ Res*, 87, 929-36.
- Tazawa, H., Suzuki, Y. & Musashi, H. 1989. Simultaneous acquisition of ECG, BCG, and blood pressure from chick embryos in the egg. *J Appl Physiol* (1985), 67, 478-83.
- Tawara, S. 1906. Das Reizleitungssystem des Säugetierherzen. Eine anatomish-histologische studie über das Atrioventricularbündel und die Purkinjeschen Fäden. Jena, Verlag v. Gustav Fischer.
- Tenthorey, D., de Ribaupierre, Y., Kucera, P. & Raddatz, E. 1998. Effects of verapamil and ryanodine on activity of the embryonic chick heart during anoxia and reoxygenation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31, 195-202.
- Toischer, K., Rokita, A. G., Unsold, B., Zhu, W., Kararigas, G., Sossalla, S., Reuter, S. P., Becker, A., Teucher, N., Seidler, T., Grebe, C., Preuss, L., Gupta, S. N., Schmidt, K., Lehnart, S. E., Kruger, M., et al. 2010. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation*, 122, 993-1003.
- Tomek, V., Janousek, J., Reich, O., Gilik, J., Gebauer, R. A. & Skovranek, J. 2011. Atrioventricular conduction time in fetuses assessed by Doppler echocardiography. *Physiol Res*, 60, 611-6.
- Tran, L., Kucera, P., de Ribaupierre, Y., Rochat, A. C. & Raddatz, E. 1996. Glucose is arrhythmogenic in the anoxic-reoxygenated embryonic chick heart. *Pediatr Res*, 39, 766-73.
- Tutarel, O., Norozi, K., Hornung, O., Orhan, G., Wubbolt-Lehmann, P., Wessel, A. & Yelbuz, T. M. 2005. Images in cardiovascular medicine. Cardiac failure in the chick embryo resembles heart failure in humans. *Circulation*, 112, e352-3.
- Vaidya, D., Tamaddon, H. S., Lo, C. W., Taffet, S. M., Delmar, M., Morley, G. E. & Jalife, J. 2001. Null mutation of connexin43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development. *Circ Res*, 88, 1196-202.
- Valderrabano, M., Chen, F., Dave, A. S., Lamp, S. T., Klitzner, T. S. & Weiss, J. N. 2006. Atrioventricular ring reentry in embryonic mouse hearts. *Circulation*, 114, 543-9.
- Van Mierop, L. H. 1967. Location of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heartbeat. *Am J Physiol*, 212, 407-15.
- Veeraraghavan, R., Gourdie, R. G. & Poelzing, S. 2014. Mechanisms of cardiac conduction: a history of revisions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306, H619-27.
- Vergani, P., Mariani, E., Ciriello, E., Locatelli, A., Strobelt, N., Galli, M. & Ghidini, A. 2005. Fetal arrhythmias: natural history and management. *Ultrasound Med Biol*, 31, 1-6.
- Vostarek, F., Sankova, B. & Sedmera, D. 2014. Studying dynamic events in the developing myocardium. *Prog Biophys Mol Biol*, 115, 261-9.
- Vostarek, F., Svatunkova, J. & Sedmera, D. 2016. Acute temperature effects on function of the chick embryonic heart. *Acta Physiol (Oxf)*, 217, 276-86.

Wakimoto, K., Kobayashi, K., Kuro, O. M., Yao, A., Iwamoto, T., Yanaka, N., Kita, S., Nishida, A., Azuma, S., Toyoda, Y., Omori, K., Imahie, H., Oka, T., Kudoh, S., Kohmoto, O., Yazaki, Y., et al. 2000. Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat. *J Biol Chem*, 275, 36991-8.

Warbanow, W. 1970. [Morphologic and functional studies of the hypothermia-induced hypertrophy of the embryonic chick heart]. *Acta Biol Med Ger*, 25, 281-93.

Warbanow, W. 1971. Contractility of the embryonic chick heart in hypothermia-induced cardiac hyperplasia and hypertrophy. *Acta Biol Med Ger*, 26, 859-61.

Wei, C. J., Xu, X. & Lo, C. W. 2004. Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 811-38.

Wikenheiser, J., Doughman, Y. Q., Fisher, S. A. & Watanabe, M. 2006. Differential levels of tissue hypoxia in the developing chicken heart. *Dev Dyn*, 235, 115-23.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U. & Sohl, G. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*, 383, 725-37.

Witkowski, F. X., Clark, R. B., Larsen, T. S., Melnikov, A. & Giles, W. R. 1997. Voltage-sensitive dye recordings of electrophysiological activation in a Langendorff-perfused mouse heart. *Can J Cardiol*, 13, 1077-82.

Wittig, J. G. & Munsterberg, A. 2016. The Early Stages of Heart Development: Insights from Chicken Embryos. *J. Cardiovasc. Dev Dis* 2016, 12, 1-17.

Ye, W., Wang, J., Song, Y., Yu, D., Sun, C., Liu, C., Chen, F., Zhang, Y., Wang, F., Harvey, R. P., Schrader, L., Martin, J. F. & Chen, Y. 2015. A common *Shox2-Nkx2-5* antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node. *Development*, 142, 2521-32.

Zhang, S. S., Kim, K. H., Rosen, A., Smyth, J. W., Sakuma, R., Delgado-Olguin, P., Davis, M., Chi, N. C., Puvion-Randall, V., Gaborit, N., Sukonnik, T., Wylie, J. N., Brand-Arzamendi, K., Farman, G. P., Kim, J., Rose, R. A., et al. 2011. Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 13576-81.

9. Seznam publikací autora a jeho podíl na práci

Články přímo související s prací:

1. **Vostarek, F.**, Sankova, B. & Sedmera, D. 2014. **Studying dynamic events in the developing myocardium.** *Prog Biophys Mol Biol*, **115**, 261-9.

(IF = 3.377)

Podíl F.V. na práci: optické mapování, analýza dat, podíl na zpracování publikace.

2. Sedmera, D., Kockova, R., **Vostarek, F.** & Raddatz, E. 2015. **Arrhythmias in the developing heart.** *Acta Physiol (Oxf)*, **213**, 303-20.

(IF = 4.251)

Podíl F.V. na práci: optické mapování, analýza dat, podíl na zpracování publikace.

3. **Vostarek, F.**, Svatunkova, J. & Sedmera, D. 2016. **Acute temperature effects on function of the chick embryonic heart.** *Acta Physiol (Oxf)*, **217**, 276-86.

(IF = 4.066)

Podíl F.V. na práci: optické mapování, optimalizace technik, analýza dat, hlavní podíl na zpracování publikace.

Podpis vyjádření vedoucího práce:

Prof. MUDr. David Sedmera, DSc.