

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 mým 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

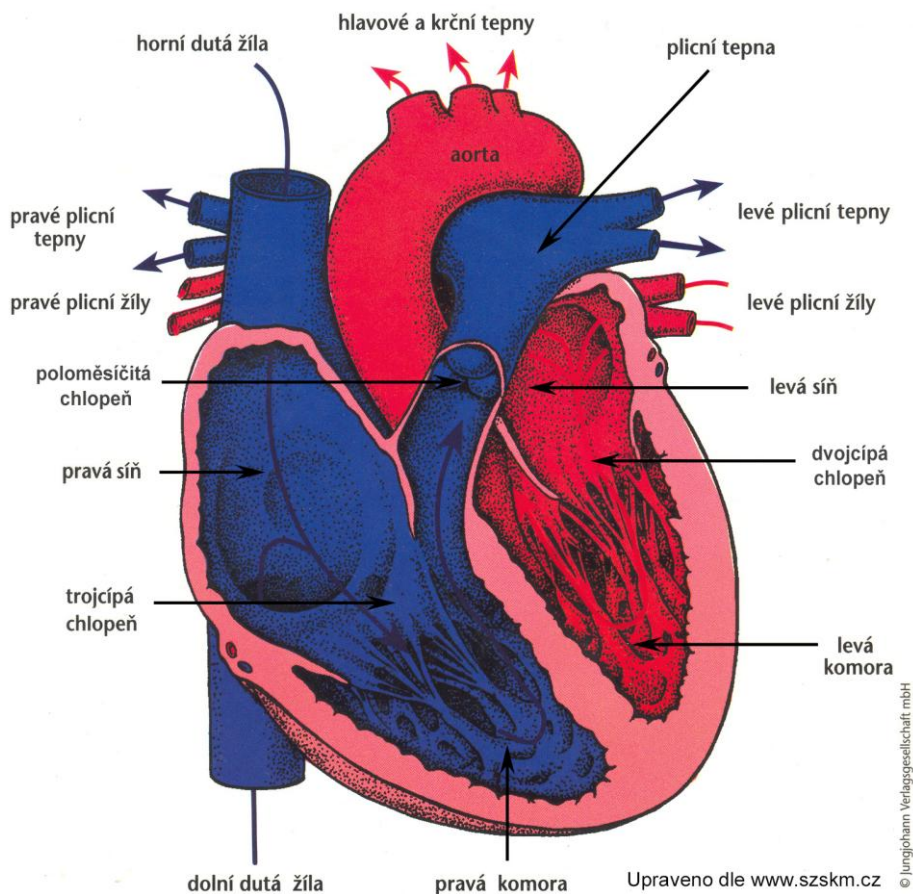
V současné době jsou v civilizovaném světě kardiovaskulární onemocnění nejčastější příčinou úmrtí. Se stárnutím populace přibývá srdečních arytmií a jejich výskyt bude v blízké budoucnosti s největší pravděpodobností stále častější. Arytmie významně snižují kvalitu života a jejich léčba je značně nákladná. 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).

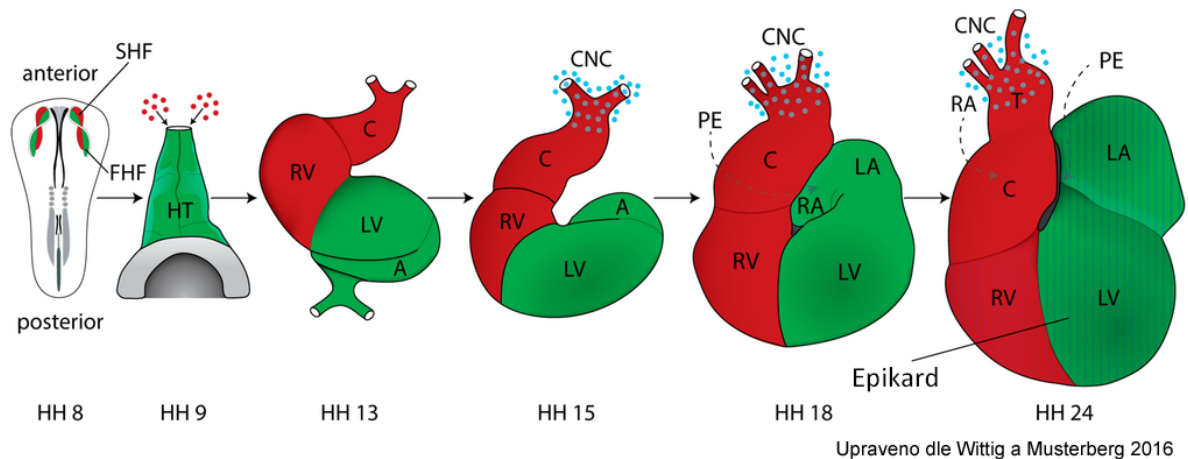
2.11 Vývoj srdce

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).



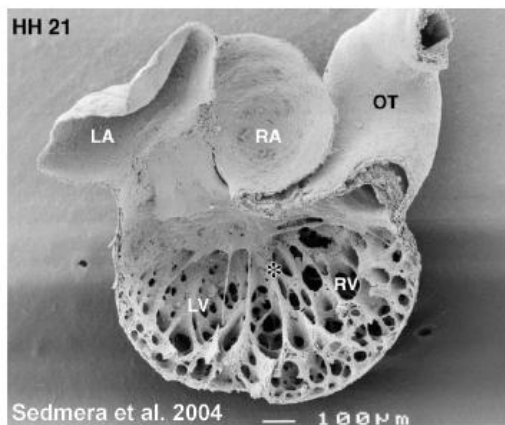
Obrázek 2

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 rozdělování 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

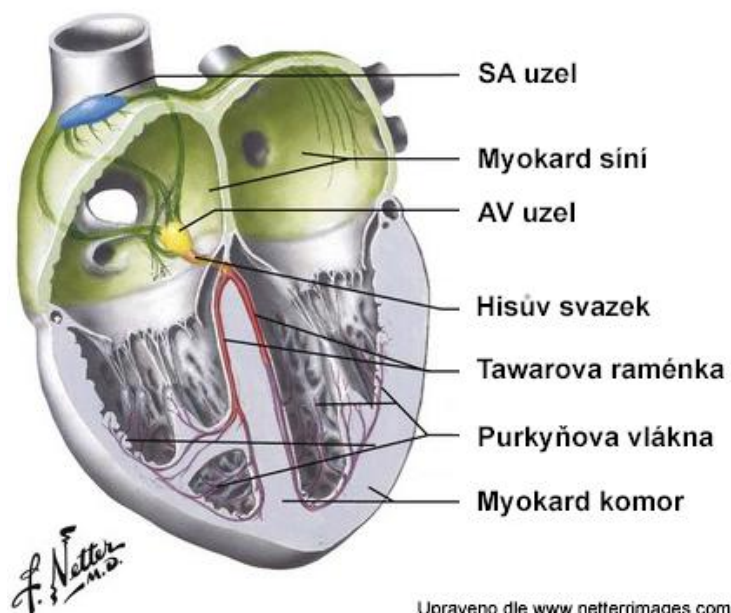
epikard (Hara et al., 2016). U stádia HH 24 (ED4,5) dochází ke zformování srdeční kličky ve tvaru písmene S (Manner et al., 1993, Manner, 2000, de la Cruz a Markwald, 1998). V této fázi jsou venózní a arteriální pól již umístěny vedle sebe na bázi srdce (Steding a Seidl, 1980). Myokard vnitřního zakřivení 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 arytmí 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

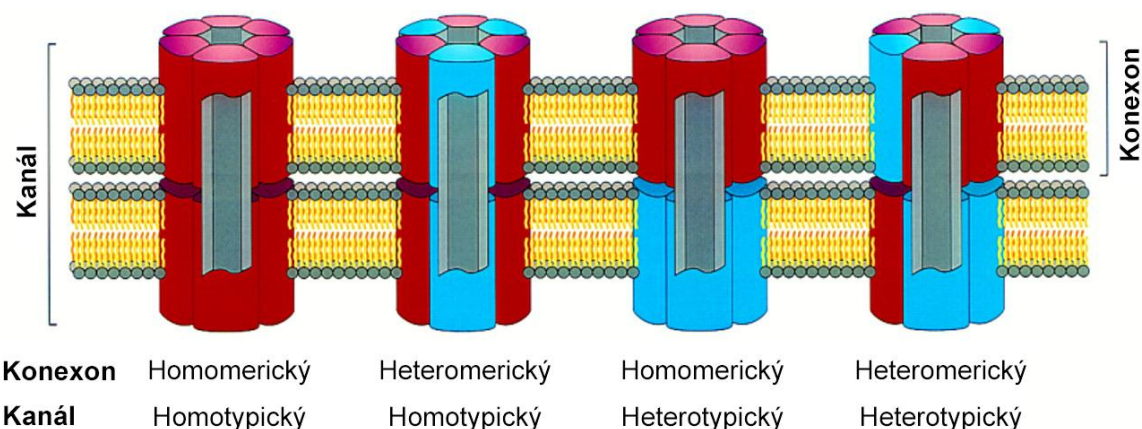
Atrioventrikulární uzel je po dominantním SA uzlu druhým pacemakerem s pomalejší spontánní frekvencí 40 – 50/min. Během normálních podmínek je jeho pomalejší pacemakerová aktivita zastíňována rychlejším SA uzlem. Pokud však dojde k pozastavení funkce hlavního pacemakeru nebo k blokádě převodu jím generovaných 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

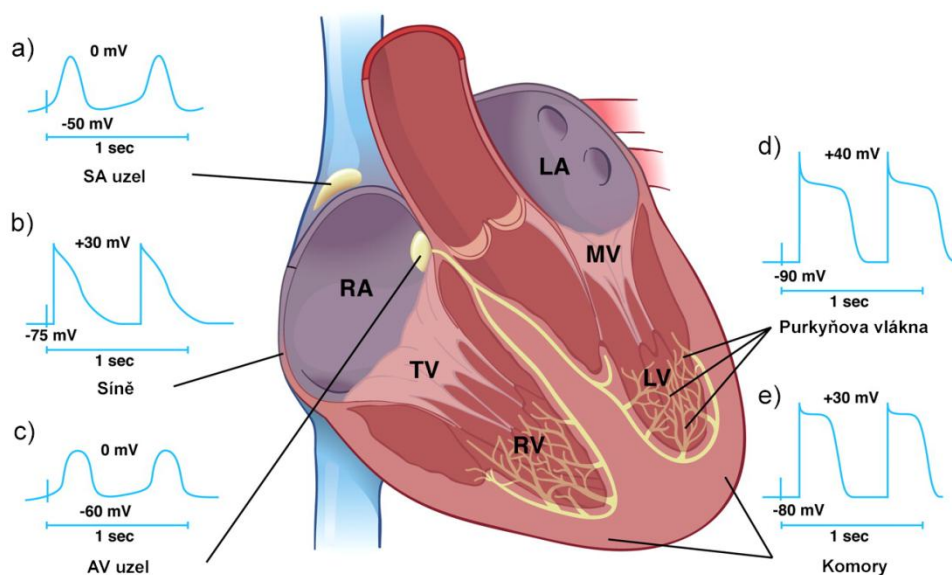
Obrázek 5

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

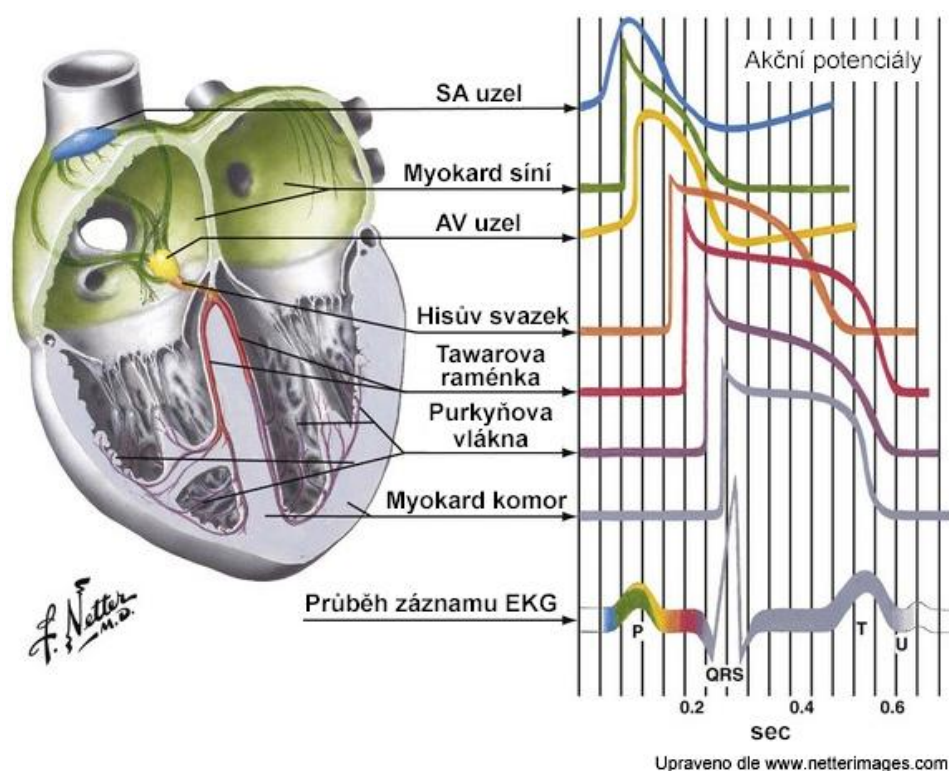
Pro pacemakerové buňky SA uzlu a AV uzlu jsou typické tzv. pacemakerové potenciály (Obr. 6a, c). Iontové mechanismy zajišťující akční potenciály zde uvedu pouze zjednodušeně. Průběh pacemakerového potenciálu se vyznačuje fází spontánní depolarizace, což znamená, že místo klidového membránového potenciálu, 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 arytmií často souvisí s funkcí převodního systému, což platí i během jeho vývoje. Aby bylo možné lépe vysvětlit, jakým způsobem dochází ke vzniku arytmií 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 nejpozději 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 řídících 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 strukturální 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 strukturální 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% případech 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 arytmiie 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 dávná 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 přídatných 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 bezesporu 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.

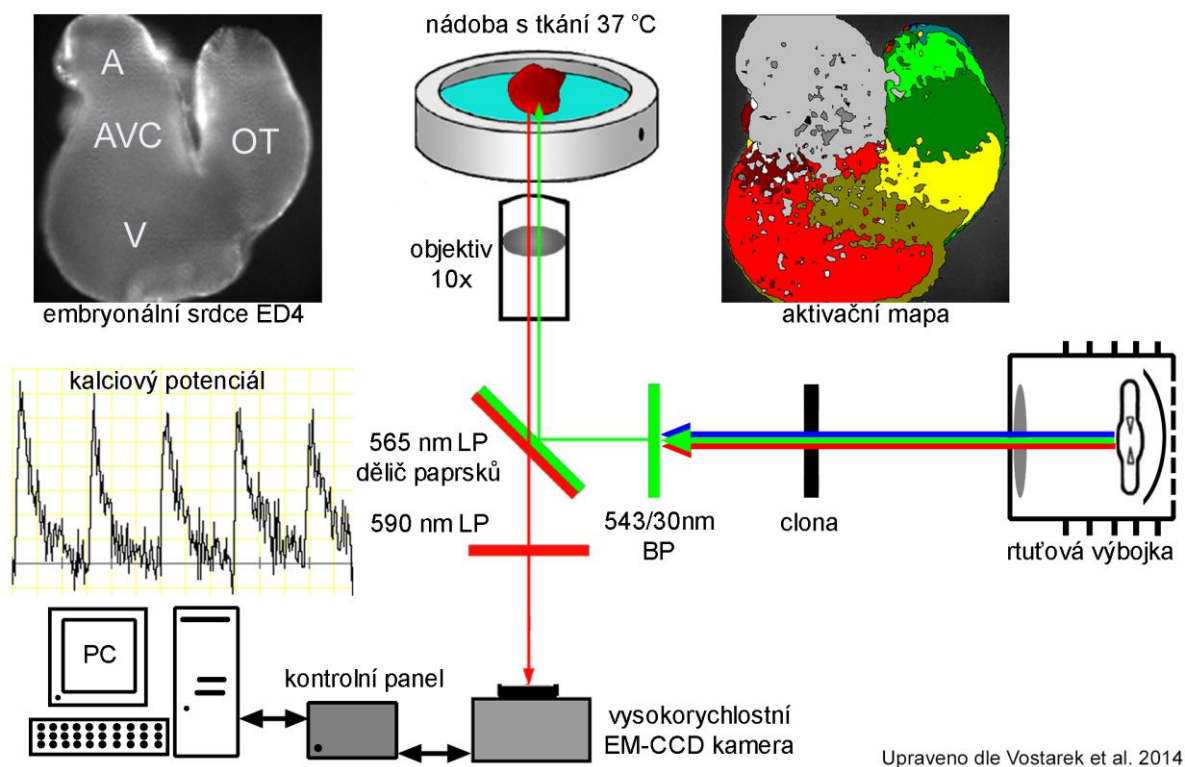
4. METODIKA

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 přehřátými 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 komory), 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 přiváděném 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 podrobeno 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 podrobeno 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

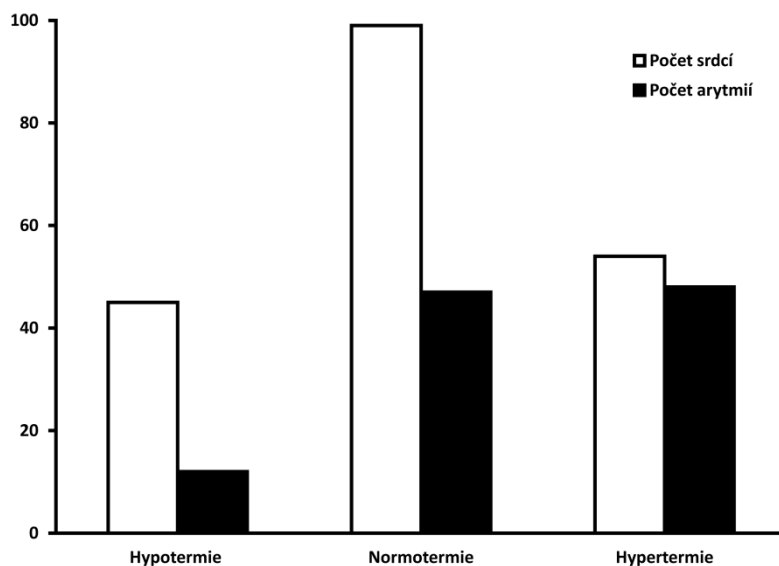
Pozorované jevy jsme rozdělili do třech hlavních skupin. První skupinu tvoří arytmie, které vznikaly samovolně, mimo jiné např. nestabilitou preparátu, v prostředí *in vitro*. Druhá skupina představuje jevy indukované cílenou změnou teploty. Třetí skupina shrnuje pozorování z experimentů elektrické stimulace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

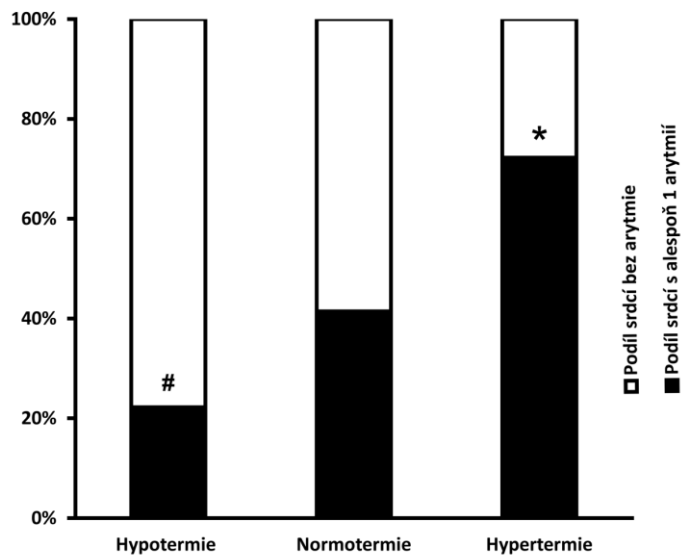
Naše experimenty v prostředí *in vitro* při standardní teplotě 37 °C ukázaly řadu různých pozorovaných arytmii (Tab. 1). Celkem jsme pozorovali při všech teplotách 107 jednotlivých arytmii, které se vyskytly u 99 srdcí (hypotermie n = 45 a hypertermie n = 54). Každé srdce bylo podrobeno normotermii a 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*.

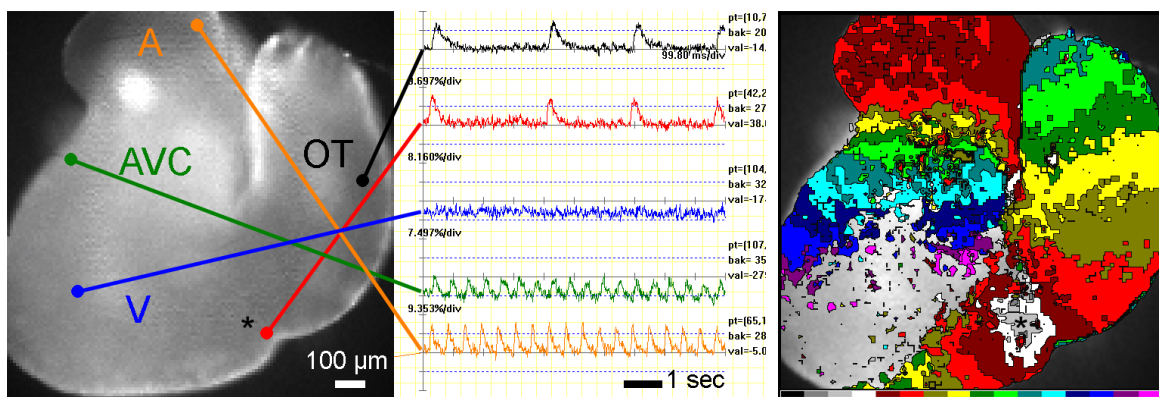
Alespoň jednou arytmií bylo při normotermii postiženo 41% srdcí. Při hypertermii jsme proti normotermii pozorovali výrazně vyšší výskyt arytmií, kde alespoň jednu arytmií vyvinulo 72% srdcí ($n = 54$, Pearsonův test – Chí kvadrát $*P < 0,001$). U hypotermie představoval počet srdcí postižených alespoň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

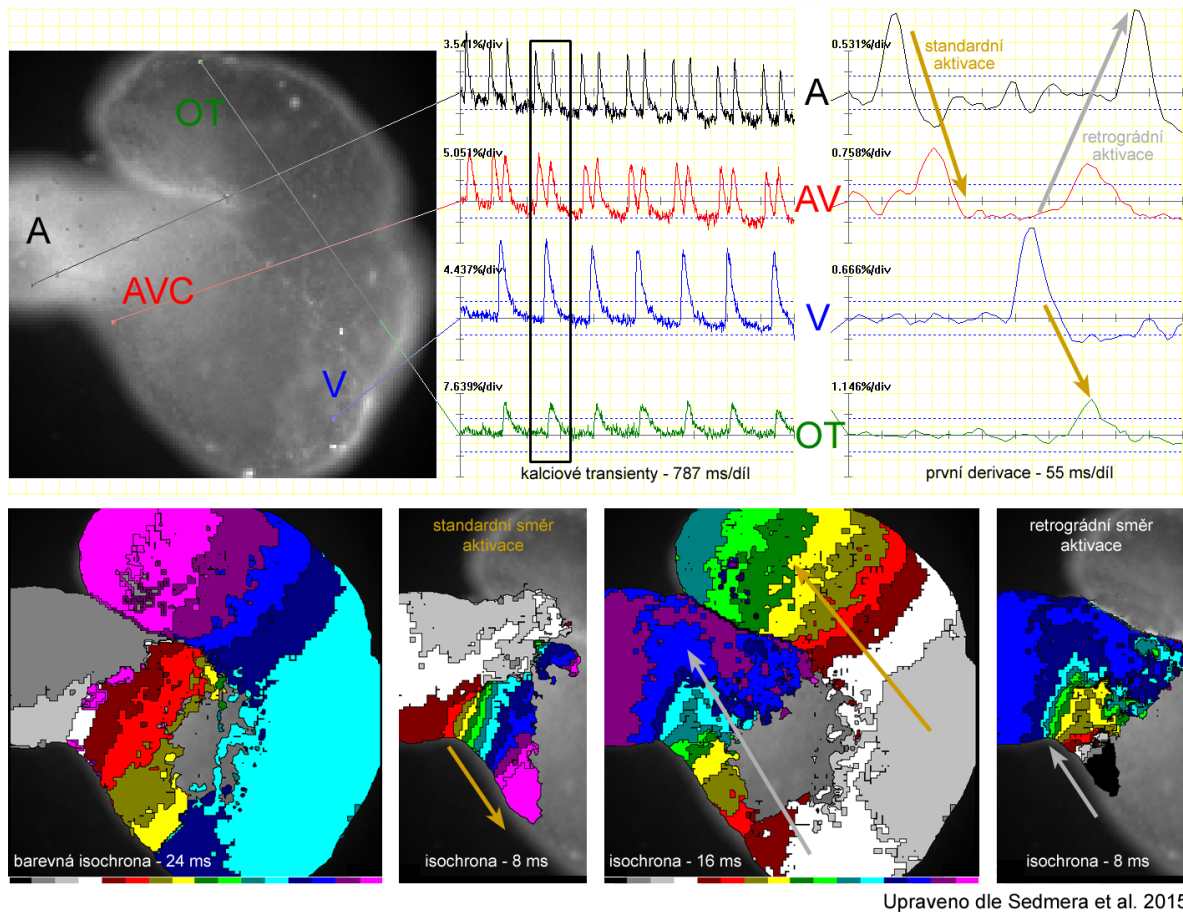


Obrázek 9

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

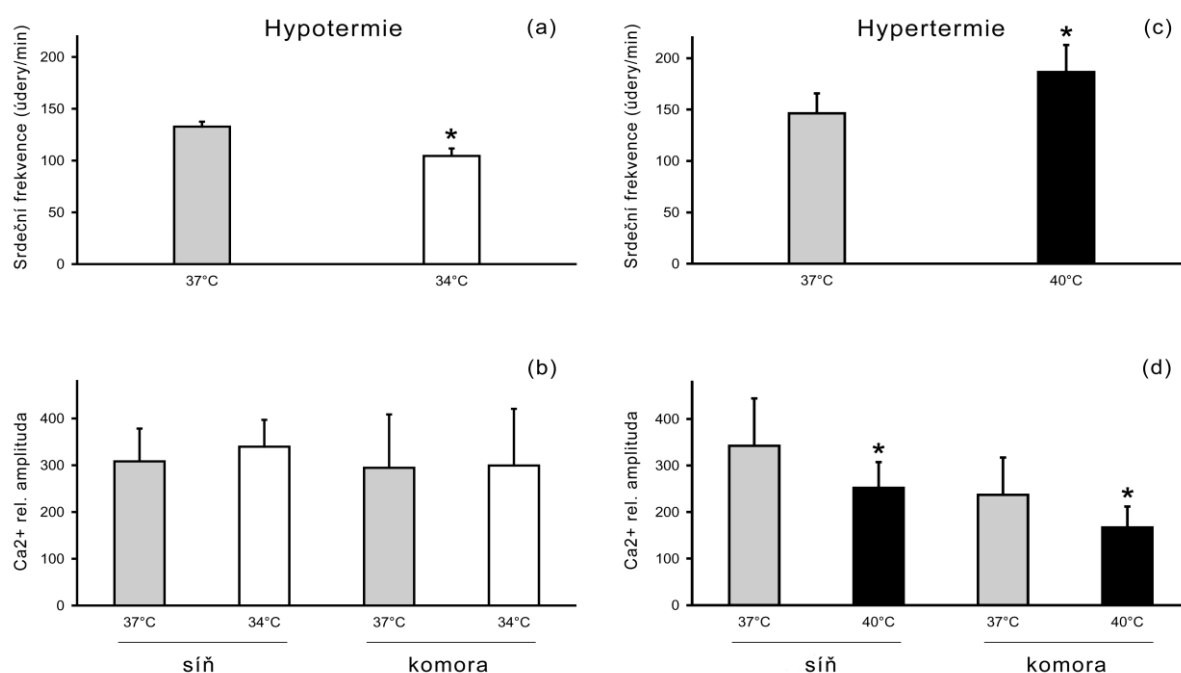
Atrioventrikulární reentry pozorované u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

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 ovlivněná 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

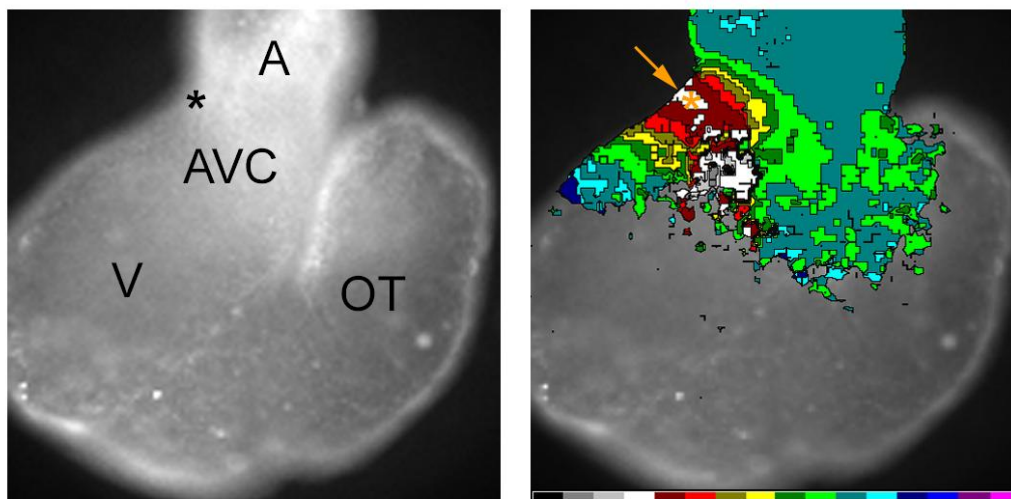
Přehled pozorovaných arytmií.

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

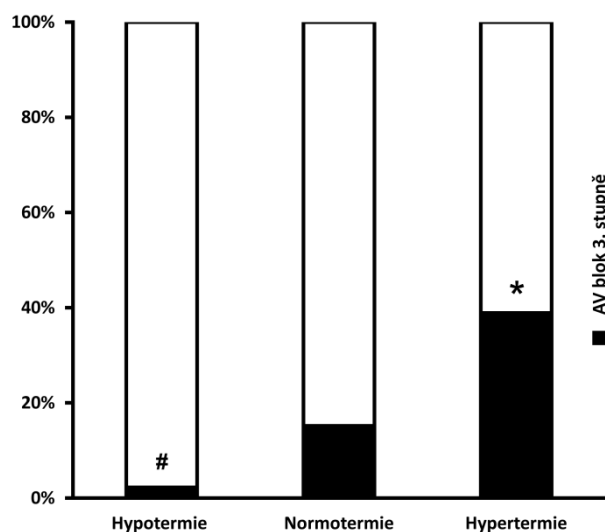
Junkční rytmus vycházející z oblasti AV kanálu pozorovaný u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro* v kompletním AV bloku.

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).



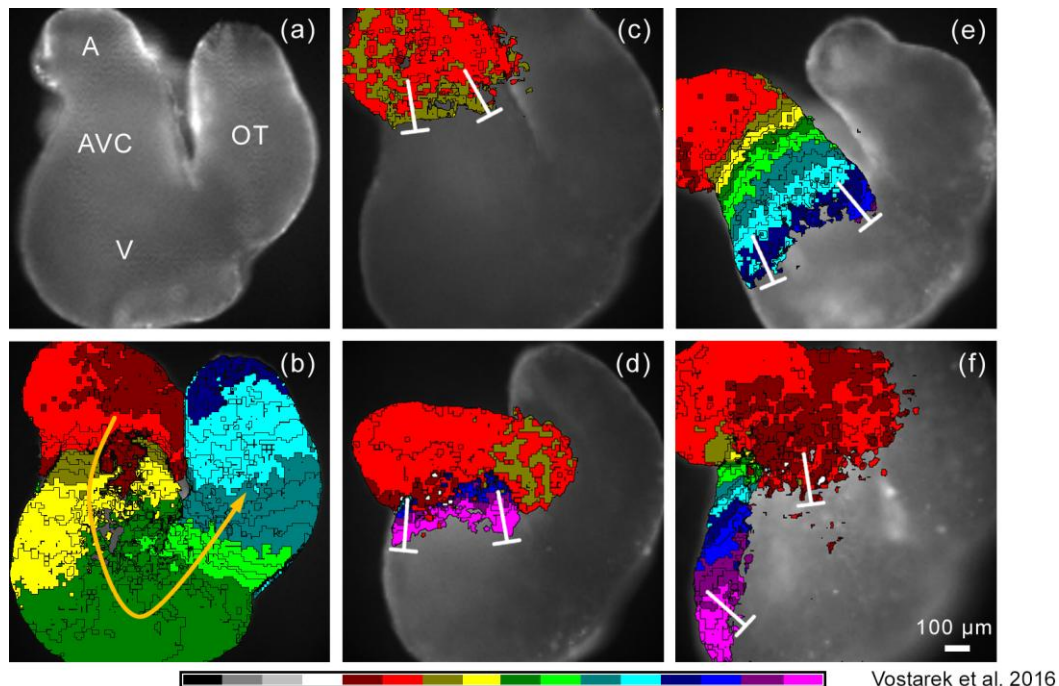
Graf 4

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

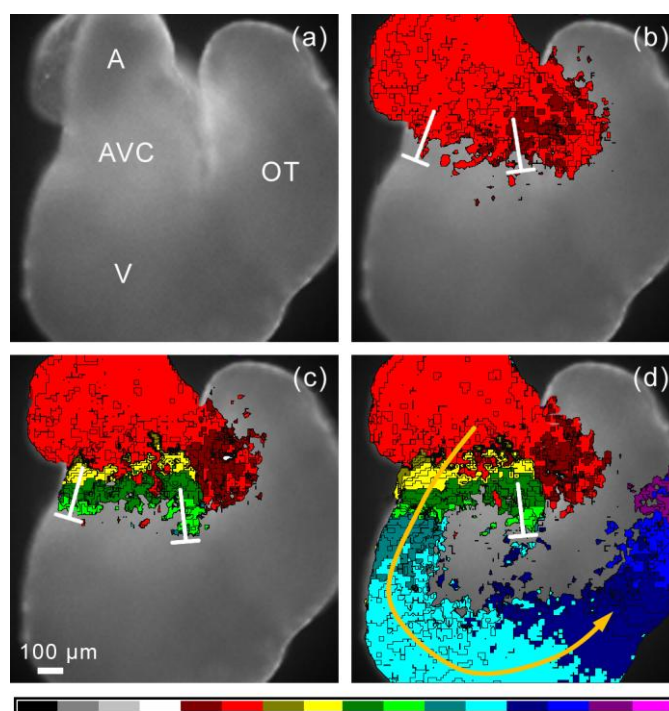
Porovnání lokalizace různých druhů AV bloku třetího stupně u ED4 kuřecího embryonálního srdce *in vitro*.

(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.



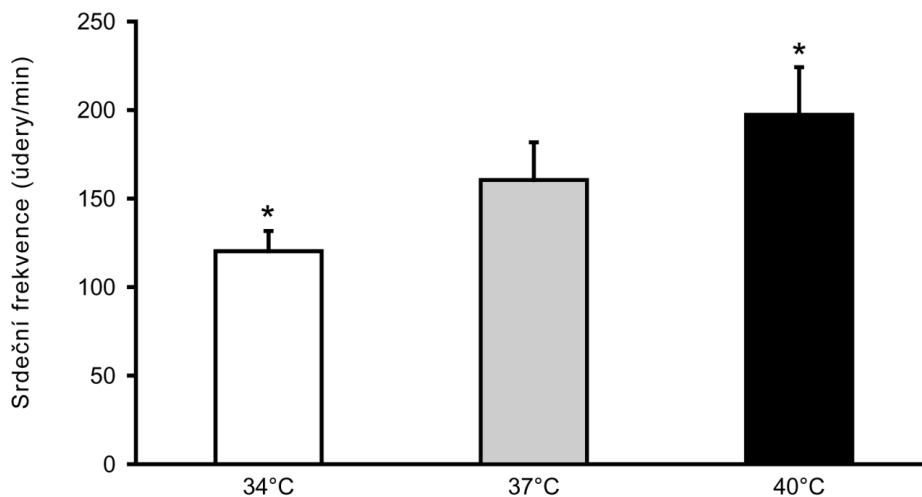
Obrázek 13

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*.

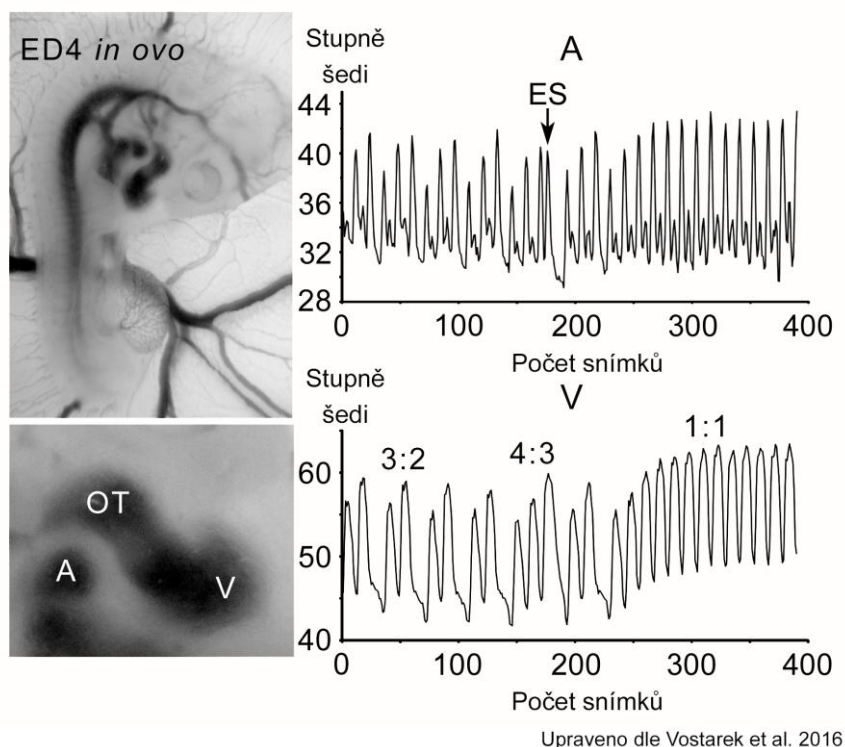


Graf 5

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.



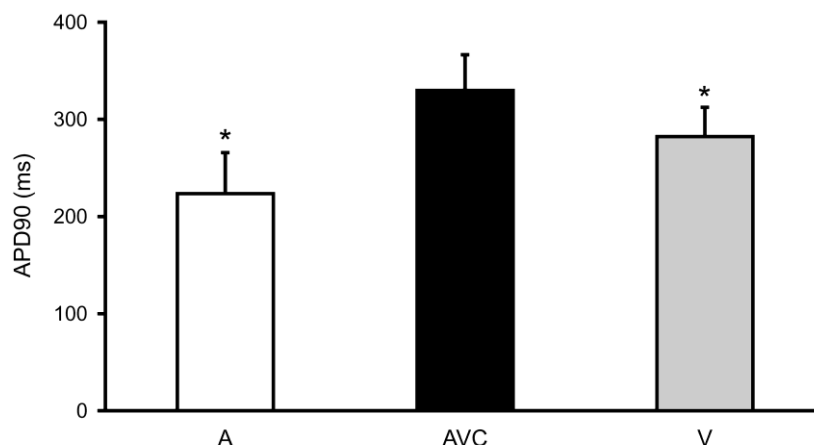
Obrázek 14

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, $P < 0,001$).



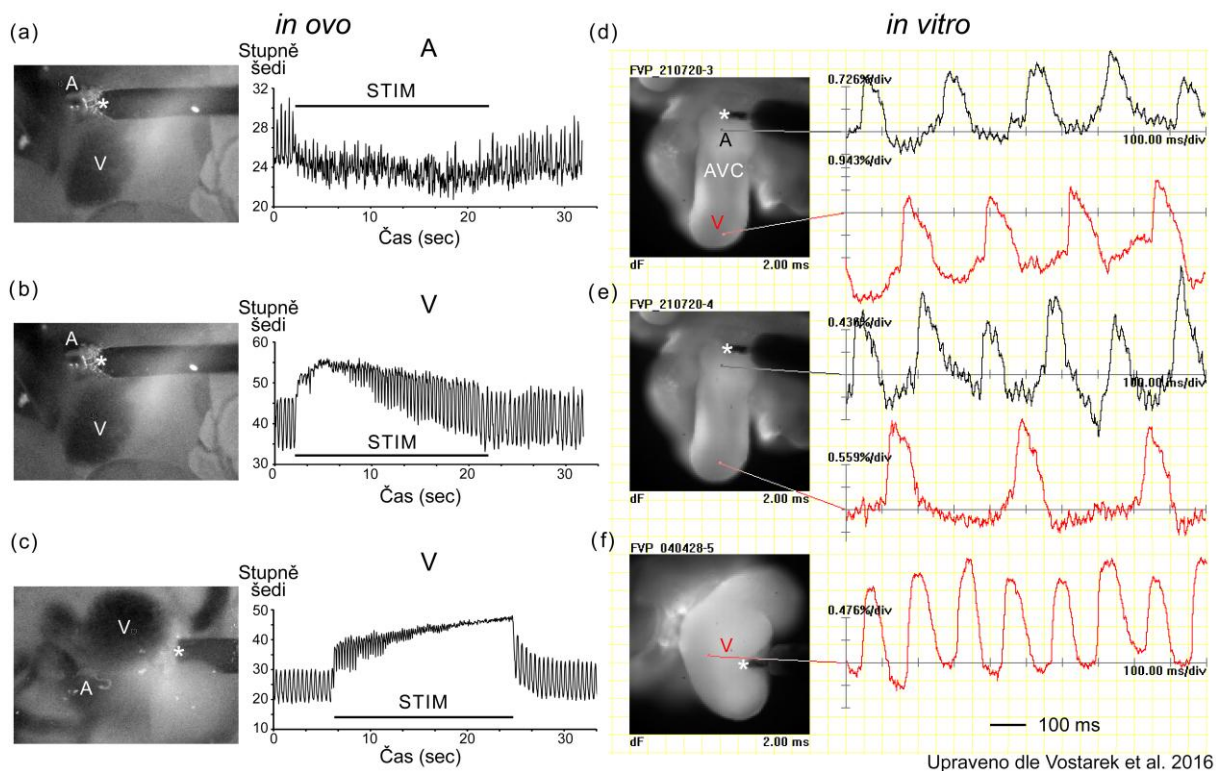
Graf 6

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. Síně 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. Síně 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). Síně 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 – síně, 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.

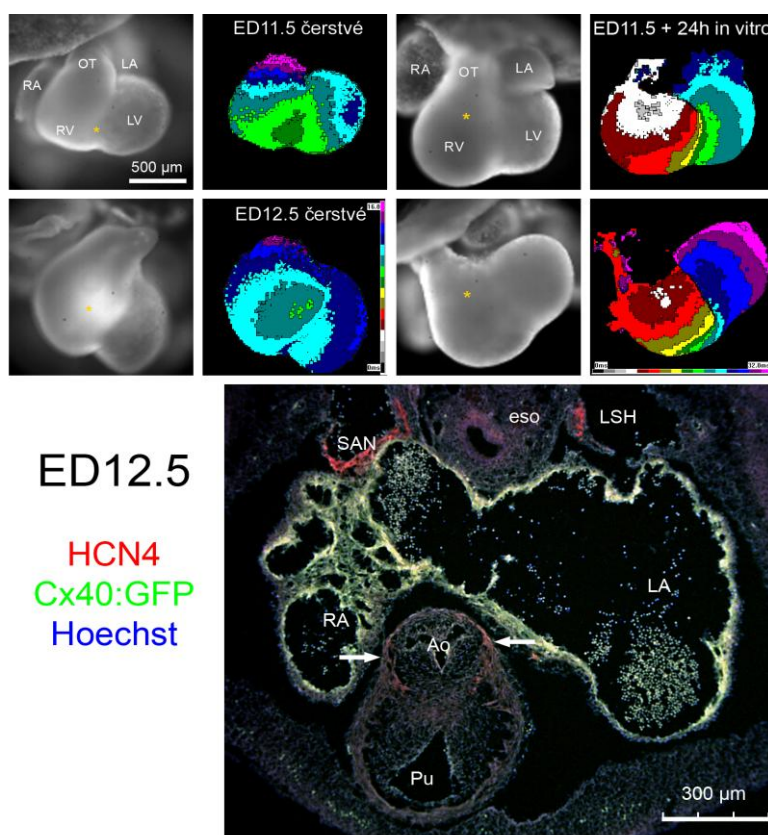
Velmi významnou roli při mapování intracelulární dynamiky kalcia hrají vysoce specializovaná barviva. Obecně mají barviva určená pro detekci kalcia ve své základní podobě charakter polární sloučeniny. Tato vlastnost ovšem zamezuje vstupu barviva do buněk přes nepolární fosfolipidovou membránu. Specializovaná 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 odstupu 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 myší 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 nejčtenější 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.

10. Publikace autora

Publikace autora jsou přiloženy v tomto pořadí:

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

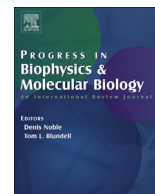
(IF = 3.377)

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

(IF = 4.251)

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)



Review

Studying dynamic events in the developing myocardium

Frantisek Vostarek^{a, b}, Barbora Sankova^{a, c}, David Sedmera^{a, c, *}^a Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic^b Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic^c Institute of Anatomy, First Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 19 June 2014

Keywords:

Optical mapping

Calcium imaging

High-speed cameras

Embryo

Heart

Cardiac conduction system

ABSTRACT

Differentiation and conduction properties of the cardiomyocytes are critically dependent on physical conditioning both *in vitro* and *in vivo*. Historically, various techniques were introduced to study dynamic events such as electrical currents and changes in ionic concentrations in live cells, multicellular preparations, or entire hearts. Here we review this technological progress demonstrating how each improvement in spatial or temporal resolution provided answers to old and provoked new questions. We further demonstrate how high-speed optical mapping of voltage and calcium can uncover pacemaking potential within the outflow tract myocardium, providing a developmental explanation of ectopic beats originating from this region in the clinical settings.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Biomechanics at cell and organ level	261
1.1. From whole hearts down to cellular level	261
1.2. Tissue geometry and conduction properties	262
1.3. Importance of physical conditioning for myocardial growth and differentiation	262
2. Functional imaging of the developing heart	263
2.1. History of electrophysiological recordings in impulse propagation studies	263
2.2. Optical methods for visualization of electrical impulse spreading	263
2.3. High-speed cameras for optical mapping	264
2.4. New developments in high-speed imaging: getting the high resolution, too	264
2.5. Calcium imaging in the developing heart	265
3. New frontiers in dynamic imaging	265
3.1. Ectopic or backup pacemaker in the outflow tract myocardium	265
3.2. Imaging the dispensable heart: lessons from the zebrafish	266
Editors' note	267
Acknowledgments	267
References	267

1. Biomechanics at cell and organ level

1.1. From whole hearts down to cellular level

To study dynamic electrical and mechanical events occurring in the heart, simplification of the complex, three-dimensional *in vivo* system is often advantageous. This can go down to the single cell level, since isolated cardiomyocytes can spontaneously beat *in vitro* and cell culture setup is useful for studying subcellular and

* Corresponding author. Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Physiology, Videnska 1083, 14220, Prague 4, Czech Republic.

E-mail address: dsedmera@biomed.cas.cz (D. Sedmera).

molecular events or drug screening purposes. If myocytes are grown *in vitro* for a prolonged period of time, they form a sheet – a functional syncytium connected by gap junctions, simplifying thus the three-dimensional geometry of myocardium into a single plane.

Historically, cells were cultivated just on plain plastic, or surfaces coated with various extracellular matrix molecules (collagen – isotropic or aligned, fibronectin) to promote attachment and influence cellular properties (Atance et al., 2004). A strong stimulus for muscle growth is work load, or stretch; so subjecting cell cultures grown on elastic membrane to mechanical loading using a pump-powered cell stretcher (Kofidis et al., 2004; Miller et al., 2000) is a way to model differentiation normally occurring during development. The next step in bringing the cell culture more closely to *in vivo* situation is growing the cells on more sophisticated 3D scaffolding (Atance et al., 2004; Evans et al., 2003) to form tissue constructs of various complexity (Tobita et al., 2006). Each of these new technological advancements, enabled by parallel development of chemistry (new polymers), mechanical engineering (stretching apparatuses) and biology (cell isolation protocols, differentiation of cardiomyocytes from stem cells) allowed answering new sets of questions. Similar to the situation *in vivo*, cell culture conditions markedly influence the functional parameters of cells; here we will focus on their conduction properties, and extend it back to the whole organ level. This area has so far received comparatively little interest in tissue engineering aimed at construction of implantable artificial myocardium (Yildirim et al., 2007), but in addition to perfusion and mechanical properties of tissue-engineered constructs, it is of vital importance for integration with the host myocardium and electrical stability.

1.2. Tissue geometry and conduction properties

Mechanical loading has profound effects on growth, behavior, differentiation and conduction properties in isolated myocytes (cell cultures). Similarly, for *in vivo* studies, people tend to view genes at the root of everything, and sometimes forget that muscles in particular are critically dependent on mechanical stimuli, and organisms in general on epigenetic influences (Pesevski and Sedmera, 2013). What is less clear is the importance of tissue geometry, also referred to as myocardial architecture, which can be elegantly simplified *in vitro*. Patterned cardiomyocyte cultures, enabled by combination of printed circuit technology and cell culture by the Rohr lab in Bern, Switzerland (Kucera et al., 1998; Rohr et al., 1999) are just an example how availability of new technology helped to document the importance of tissue geometry for cardiac electrical conduction. Strands of myocytes, mimicking bundles of conduction fibers, carry electrical impulses at much higher speed than a large expansion of planar myocardial sheet, which acts as a sink. In such system, effects of various pharmacological agents or gap junctional uncoupling can be studied with ease. It was long believed that the role of cardiac fibroblasts is mostly structural support of the heart, and electrically they function as a mere isolator. Importance of fibroblast–myocyte interactions was revealed in well-defined co-culture experiments (Rohr, 2012) and showed that gap junctional, and possibly also electrical, communication exists between these two cell types.

1.3. Importance of physical conditioning for myocardial growth and differentiation

Effect of altered mechanical loading – an epigenetic stimulus – on developing heart and its conduction system could be studied also at the organ level, *in vivo* as well as *in vitro*. Elegant studies by Thompson and associates (Thompson et al., 2003) showed that at the early developmental stages, the fate of cardiomyocytes in the

tubular heart (proliferation vs. differentiation) is plastic, and could be reversed by simply inverting the slice of the cardiac tube inside out. This gradient persists also in the trabeculated heart, and could be modeled mathematically (Damon et al., 2009). Cardiovascular development from biomechanical perspective was reviewed by Larry Taber (Taber, 2001). Growth and remodeling are two important processes occurring during both development and adaptations of the cardiovascular system to changing functional requirements. Most cardiac growth during prenatal development is based on hyperplasia (Clark et al., 1989; Sedmera and Thompson, 2011). At the tissue level, an important biomechanical parameter is the residual strain, changes in which are a sensitive indicator of active remodeling (Taber and Chabert, 2002). This regional growth can be easily measured as an opening angle obtained by cutting open a circular section of the vessel or heart. A decrease in opening angle following creation of pressure overload by conotruncal banding correlated with induced growth 12 h after the procedure. These events can be also modeled mathematically. Schroder and colleagues (Schroder et al., 2002) found that the material properties of the developing heart are regulated by mechanical loading and that microtubules play an important role in this adaptive response during cardiac morphogenesis. Specifically, there was an increased amount of both total and polymerized beta tubulin in the hypoplastic left ventricle. This smaller ventricle was also stiffer (analyzed by increased hysteresis loop); both parameters were normalized by the treatment with colchicine, which induced microtubule depolymerization.

During the transition from the trabeculated to compact myocardium, spiraling of myofibers within the left ventricular compact layer is the major factor of fetal myocardial differentiation (Jouk et al., 1995; Sedmera et al., 2000). Tobita and associates analyzed the angle of myocyte inclination during normal and abnormal hemodynamic loading (Tobita et al., 2005); they found that increased pressure loading accelerated this normal morphogenetic process, while there was a delay in the settings of hemodynamically-induced left ventricular hypoplasia. Therefore, hemodynamically induced changes in myocardial architecture in these models (Sedmera et al., 1999) that are based on changes in cell proliferation (deAlmeida et al., 2007; Sedmera et al., 2002a) could be the morphological substrate of altered electrical pathways. These were investigated as well using optical mapping on isolated hearts (Hall et al., 2004; Reckova et al., 2003). We found that increased pressure loading accelerated maturation of ventricular conduction system, while there was a dysfunction of the (morphologically normal) left bundle branch in left ventricular hypoplasia. At the molecular level, these changes were paralleled by up/down regulation of conduction system differentiation marker connexin40.

The hemodynamic unloading of the developing heart could be easily taken to extreme by culturing the spontaneously beating, but not pumping heart *in vitro*. In such settings, we noticed not only an arrest of normal differentiation of the ventricular conduction system, but actually a regression towards even more immature conduction patterns (Sankova et al., 2010). To test whether these profound changes were not simply an artefact of organ culture, we performed re-loading of the ventricle by a droplet of viscous silicone oil, which stretches the ventricle and was shown previously to considerably increase myocardial oxygen and glucose consumption (Romano et al., 2001). Remarkably, this led to a complete rescue of conduction phenotype to *in vivo* values, showing that simple myocyte stretch, rather than hemodynamic shear stress transmitted through the endothelium, is the governing factor in early conduction system differentiation. It agreed well with our older data testing the importance of hemodynamically induced signaling via endothelin receptors, which was found to be important during

the later (bundle branches differentiation), but not the early stages of conduction system formation in the chick embryonic heart *in vivo* (Sedmera et al., 2008).

2. Functional imaging of the developing heart

2.1. History of electrophysiological recordings in impulse propagation studies

These functional studies, including those performed on cell cultures, would not be possible without adequate technology for recording of impulse propagation in the heart. The golden standard for action potential recordings are microelectrodes, including those arranged in arrays (sock, brush, or balloon electrodes). They work very well on large adult hearts (sheep, pig, human), but are of limited use in embryos (spatial issues, fragility). Nevertheless, a few carefully positioned electrodes poked into the isolated chick embryonic heart allowed determination of general direction of impulse propagation and enabled postulation of ventricular trabeculae as nascent network of the ventricular conduction system (Arguello et al., 1986; de Jong et al., 1992). Using just two electrodes, Chuck and colleagues (Chuck et al., 1997) discovered the transition in ventricular activation of the chick embryonic heart from primitive base-to-apex direction to mature apex-to-base pattern, and correlated this event with ventricular septation. These results were later confirmed using high-resolution optical mapping studies, discussed in more detail below. For certain question, and in particular in larger, late gestation avian hearts, microelectrodes are still useful, as was proved recently by the Leiden group (Kolditz et al., 2008, 2007). Two exploration electrodes, together with simultaneous recording of volume-conducted ECG, were enough to demonstrate the accessory atrio-ventricular pathways occurring normally during fetal avian development, and their increased frequency in a model of epicardial ablation that results in deficient formation of fibrous atrioventricular insulation.

2.2. Optical methods for visualization of electrical impulse spreading

However, alternative optical methods, recently reviewed (Boukens and Efimov, 2014), exist for studying spread of electrical activation in excitable tissue by means of supravital staining with voltage-sensitive dyes (Kamino et al., 1981). This approach depends on several technological platforms. First, of course, is the availability of suitable probes that must be stable and robust enough to give sufficient signal of either voltage or intracellular ion concentration. Then, epifluorescence microscope is commonly used for studying

smaller samples (embryonic hearts, cells), but for larger hearts, incident illumination systems (typically using light emitting diodes) and barrier filter in front of a macroscope lens are widely used (Fedorov et al., 2007). Last, the amount of data recorded from numerous channels (10×10 in the beginning, over 100×100 nowadays) at high sampling rate (typically over 1 kHz at 16 bits per channel) requires an adequate computing power – typically dedicated RAM as an intermediate step, either on-board or in the computer attached to the photodiode array or high speed camera. Improvements in any of these potential bottlenecks could, and often did, result in new discoveries.

Major problems of optical probes for studying dynamic events are their instability, photobleaching with associated toxicity of breakdown products, and low response. The most popular voltage-sensitive dye, di-4-ANEPPS (Witkowski et al., 1997) is excited by a broad range of wavelengths, but the voltage-dependent response in emitted fluorescence is in the range >590 nm. Once incorporated to the membrane, it is fairly rapidly internalized, so modification of the lipophilic part by a longer aliphatic chain (di-8-ANEPPS) is advantageous in some preparations, such as isolated cells (Kucera et al., 1998). Novel, longer wavelength dyes use excitation wavelengths better penetrating to the tissues and less toxic for the cells for improved survival (Sakai et al., 1998).

The first detectors employed were light-sensitive photodiodes, which are individually tunable and have an excellent signal to noise ratio. They were arranged into a customizable photodiode array, positioned over an image projected by the imaging setup. This approach was pioneered by the Kamino group in Japan (Hirota et al., 1985; Kamino, 1991; Kamino et al., 1981). The system was used to study the earliest sites of electrical activity in the chick and rat heart, as well as the effect of atrial myocardial architecture (pectinate muscles) on impulse propagation in frog atria (Komuro et al., 1986). Photodiode arrays are today commercially available, and still in use to study events from cell level (Kucera et al., 1998) to early rabbit embryonic heart (Chuck et al., 2004).

An interesting approach used another new technological breakthrough, notably laser scanning system, to study changes in voltage (Dillon and Morad, 1981). These authors showed in the frog heart that myocardial architecture is an important determinant of preferential conduction pathway. While this system did not become widely accepted, laser scanning confocal microscope in a line scan mode, which can achieve speeds up to 2 kHz, is rather popular to study calcium transients and sparks in isolated cells (Toischer et al., 2010), and is useable also for voltage sensitive dyes in isolated hearts (Fig. 1), where it has the advantage of possibility to select precisely the depth from which the signal is acquired, and makes thus data interpretation less complex.

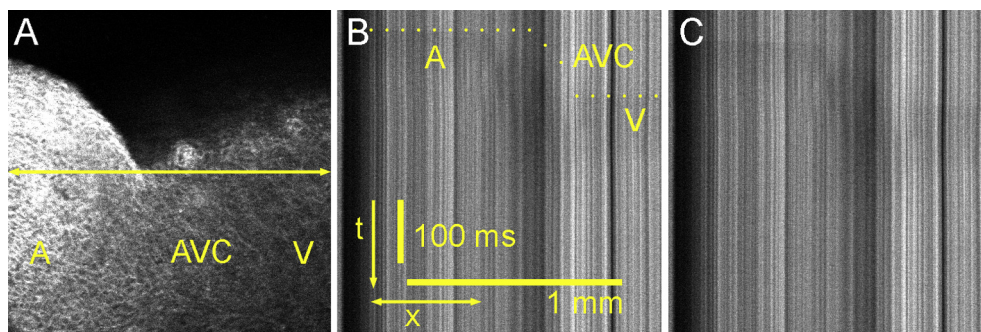


Fig. 1. Proof of principle demonstration of high speed line scan imaging of voltage in the embryonic heart. A: XY scan of a Stage 21 chick embryonic heart in a plane containing atrium (A), atrioventricular canal (AV) and ventricle (V). B: Xt recording at 1 kHz along the line indicated in A showing the slowing of the propagation velocity in the AV canal. Beginning of the action potential is indicated by the yellow dots. C: raw data from B.

2.3. High-speed cameras for optical mapping

However, significant new information about cardiac electrophysiology could be gathered from simultaneously increasing the temporal resolution to the domain of milliseconds, and spatial to micrometers. The Morley group relied on a Dalsa camera with frame rate just below 1000 fps and spatial resolution 64×64 pixels (Gutstein et al., 2001; Hall et al., 2000; Jalife et al., 1998, 1999; Morley and Jalife, 2000; Morley and Vaidya, 2001; Morley et al., 1999; Rentschler et al., 2001, 2002; Tamaddon et al., 2000; Vaidya et al., 2001). For dedicated systems, such resolution was deemed completely satisfactory, as any increase in spatial resolution would be tied with decreased pixel size and therefore number of photons hitting it per unit of time, and there would be a problem with data streaming (for example, one second recording of 100×100 pixels at 16 bits and 1 kHz takes about 25 Mb – a significant problem for the personal computers in the 1990s and even 2000s). Another plague of optical recordings of beating hearts are motion artifacts. In principle, such mechanical events could be, and were, used for analysis of the heart rhythm (Buechling et al., 2009; Raddatz, 1997), but for voltage studies they pose a considerable problem, especially for analysis of repolarization. Therefore, motion inhibitors (excitation-contraction uncoupling agents) such as BDM (Efimov et al., 1997), cytochalasin D (Biermann et al., 1998; Jalife et al., 1998), blebbistatin (Efimov et al., 1997; Fedorov et al., 2010, 2007; Jou et al., 2011; Sankova et al., 2012) were introduced. These agents enabled considerable improvement in signal quality and are considered indispensable by many investigators. However, they have caveats in their own respect due to their inherent toxicity, effects on action potential duration or pacemaking potentials. Alternative methods were therefore developed for improvement of signal to noise ratio, such as signal averaging (Rentschler et al., 2001, 2002) or pixel tracking using dual wavelength imaging (Leaf et al., 2008). They seem to work well as long as the heart beat is regular and the conduction pathway does not differ from one cycle to another, which is most of the time true (Sankova et al., 2012). However, pixel tracking

requires either two camera system or rapid wavelength switching, compromising somewhat the spatial and/or temporal resolution.

Unlike sock or balloon electrodes, which truly allow mapping of the heart chamber in three dimensions, the optical approach is typically restricted to a single view, reducing the three dimensional organ in a single plane. This is accentuated by some groups that further flatten the imaged surface to reduce the ambiguity of the curved surface (Larsen et al., 2012), but such artificial stretching could alter conduction properties of the myocardium due to physical uncoupling or action on stretch-sensitive ion channels. The problem of a limited area of view, particularly troublesome when studying complex arrhythmias such as ventricular fibrillation (Boukens and Efimov, 2014), could be solved by using dual/multiple camera systems (easily achieved in a hanging Langendorff preparation), flipping the heart (Ammirabile et al., 2012; Sedmera et al., 2004), or using angled mirror (Gurjarpadhye et al., 2007) for simultaneous viewing of $\pm 75\%$ of the heart surface. This last approach sacrifices some of the spatial resolution of the camera, but saves considerable expenses of the setup.

2.4. New developments in high-speed imaging: getting the high resolution, too

Increase in hardware performance and availability of ready-to-use systems enabled recordings of multiple parameters at once, such as simultaneous voltage and calcium imaging (Chen et al., 2010). The first such dual recording was reported by Efimov and associates (Efimov et al., 1994). The main advantage of such approach is to study electromechanical dissociation during ischemia. In such settings, long calcium transients with no ATP can occur without any voltage changes, but also alternans is possible either at the level of voltage or calcium changes (Choi and Salama, 2000). Dual simultaneous imaging can provide exact correlation, impossible with any other method.

Newer generation of cameras is marked by “competition” between two different designs – CCD vs. CMOS or sCMOS (for continuous

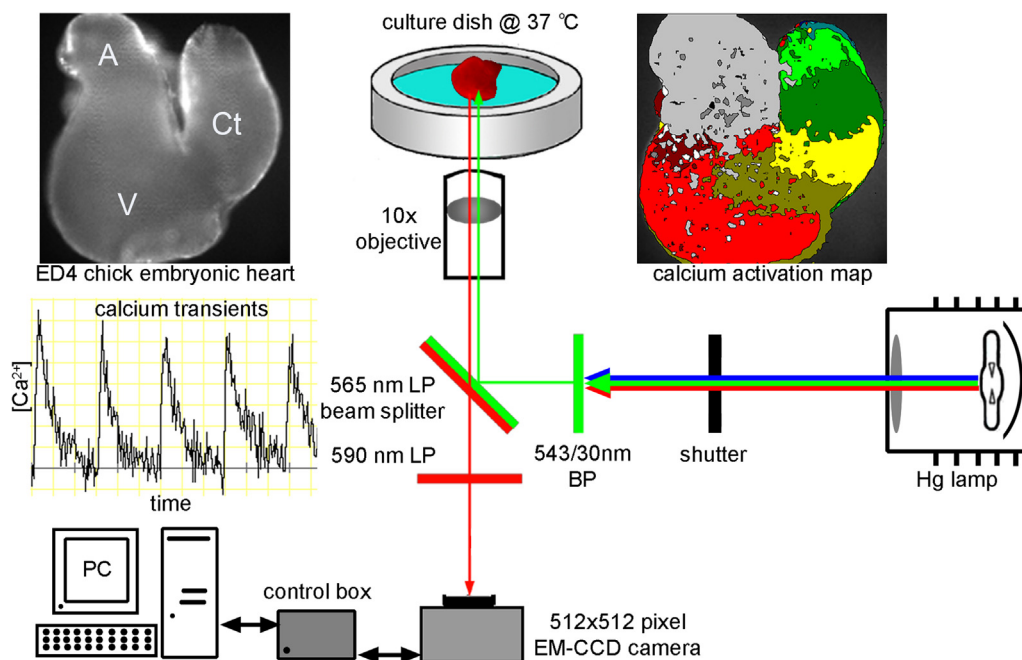


Fig. 2. Setup for voltage (di-4-ANEPPS) or calcium (rhod-2) imaging. The system is centered around an inverted microscope (Nikon Eclipse) with objectives ranging from $4\times$ (whole heart imaging) to $63\times$ water immersion (isolated cells). Current high-speed camera has a maximum resolution of 512×512 pixels and can achieve rate of 1300 fps, although not simultaneously.

updates and discussion of this topic, see <http://www.microscopy-analysis.com/>). While the use of add-on image intensifiers (Reckova et al., 2003; Sedmera et al., 2003) was gradually abandoned, EMCCD cameras still present very sensitive and reproducible detectors, and due to their speed at full frame rate are useful also in other low-light application (e.g. spinning disc confocal, light sheet microscopy). Newer CMOS sensors possess excellent sensitivity and readout speeds up to 10,000 fps in dedicated systems (Ultima L) are available in practice. Recent developments widen the spectrum of cameras usable for optical mapping – the newest cameras (e.g. Andor, Hamamatsu) allow full frame (over 1 megapixel) high resolution imaging at over hundred frames per second; with subarray and binning, rates over 1,000 fps could be easily achieved at still reasonable spatial resolution. Such versatile systems might open the door to the area of high-speed imaging even to labs that do not primarily intend to build such setups.

2.5. Calcium imaging in the developing heart

Measuring calcium concentrations in time at relatively low temporal resolution was successfully performed in the past in events such as egg fertilization or cell signaling (Brooker et al., 1990; Sun et al., 1992). High-speed imaging of calcium in embryonic mouse heart (Valderrabano et al., 2006) resulted in increased sensitivity and allowed signal detection also in the atrioventricular canal, enabling detection of various arrhythmias. As important events in the cardiac myocytes occur rather rapidly (e.g. calcium sparks) and at a small spatial scale (parts of cells), both high speed and high resolution are desirable. Thus, our experimental approach (Fig. 2) of imaging normal and stressed embryonic hearts from 100×100 to 512×512 pixel, 0.5–20 ms resolution presents a significant technological improvement that brings important new pieces of information, such as precise localization of sites of conduction block and uncovering of ectopic pacemakers (Ammirabile et al., 2012; Benes et al., 2014; Hoogaars et al., 2007; Leaf et al., 2008) in the isolated embryonic heart model.

Our current setup for high speed/high resolution calcium and voltage imaging is depicted in Fig. 2. It allows for speed from about 50 fps (full frame mode) up to 1300 fps (ROH mode – with 128×128 pixel subarray and 8×8 binning, 3/4 of the chip therefore being used for readout). Data acquisition and processing is performed as described previously (Nanka et al., 2008; Sankova et al., 2010), with the exception of different staining protocol with the rhod-2 calcium indicator. Calcium signal has the advantage over voltage in being positive (i.e., increase, rather than decrease of

fluorescence), and higher signal-to-noise ratio is especially advantageous in regions with lower signal amplitude, such as the atrioventricular canal and the outflow tract (Reckova et al., 2003).

Chick embryonic hearts subjected to hypoxia fall into atrioventricular conduction block (Sedmera et al., 2002b; Tran et al., 1996). This could unmask a potential backup pacemaker. We observed occasionally temporary conduction blocks during stabilization of the preparation prior to imaging. Our analysis showed that they were of different kinds, ranging from sino-atrial, atrioventricular, to ventriculo-conotruncal, similar to *in vivo* block induced by digoxin in ED4 embryo (Paff et al., 1964). The embryonic outflow tract is myocardial at this stage, and a distinct wave on ECG for corresponds to its activation (Sabourin et al., 2011; Sarre et al., 2006). Pacemaking activity of low frequency is known to be present in the isolated outflow tract (Raddatz, 1997; Sarre et al., 2009), but the exact location of this pacemaker was not known. In the settings of conduction block, we observed activity of the conotruncal pacemaker in two of 59 hearts; the activity originated at the base of the outflow tract with a frequency of 30 bpm at 37°C in the example depicted in Fig. 3. The atrial rate was in this case 142 bpm, typical for this stage *in vitro* (Sedmera et al., 2002b).

3. New frontiers in dynamic imaging

3.1. Ectopic or backup pacemaker in the outflow tract myocardium

We then set to investigate whether similar properties are present also in the mammalian heart. In the mouse, experimental creation of complete AV block by cutting the atrioventricular junction with fine scissors did not result in manifestation of ectopic activity (24 fresh hearts cut at ED11.5 or 12.5), analyzed by voltage sensitive dye method described in detail previously (Sankova et al., 2012). However, when ED11.5 mouse embryonic hearts were cultured (originally for different purposes – mechanical unloading and pharmacology, to build upon previous studies of Sankova et al. (2010) and Rentschler et al. (2002)) for 24 h in M16 media, we observed frequently (in 36%, 9 of 25 spontaneously beating hearts) a complete atrioventricular block with atrial rate of 88 ± 28 bpm, while the ventricles were activated retrogradely by a low-frequency (37 ± 9 bpm) ectopic backup pacemaker in the base of the outflow tract (Fig. 4). This phenomenon was also observed in hearts cultured from ED10.5 to ED11.5, although at lower frequency (2 of 9 hearts). The retrograde propagation was different from the activation of the freshly isolated chick heart in block (compare with

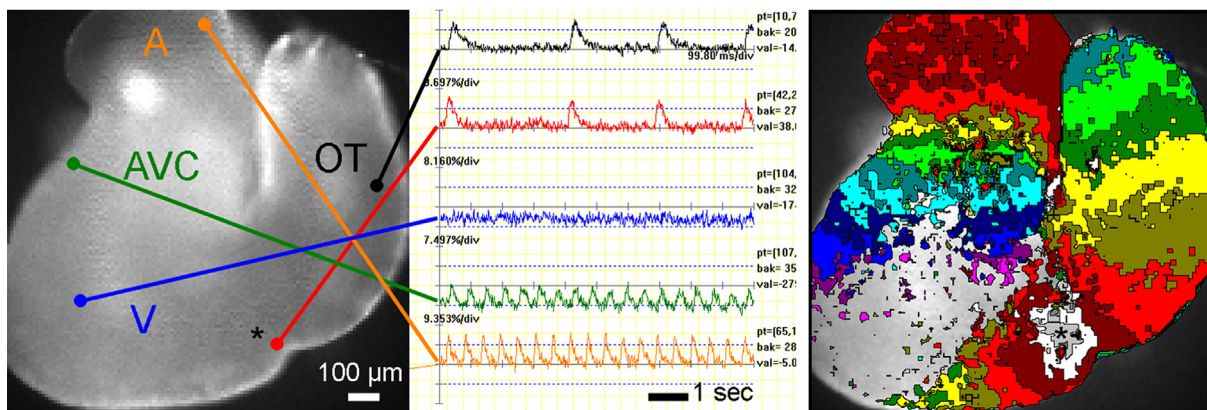


Fig. 3. Ectopic pacemaker in the outflow tract of ED4 chick embryonic heart. The heart is in complete atrioventricular block, located at the transition of the atrioventricular canal and ventricle; by co-incidence, the timing of the ectopic beat correlates with the normal cardiac cycle initiation. A, atrium; AV, atrioventricular canal; OT, outflow tract; V, ventricle. Color isochrones are in 7.68 ms intervals. Scale bar 1 mm.

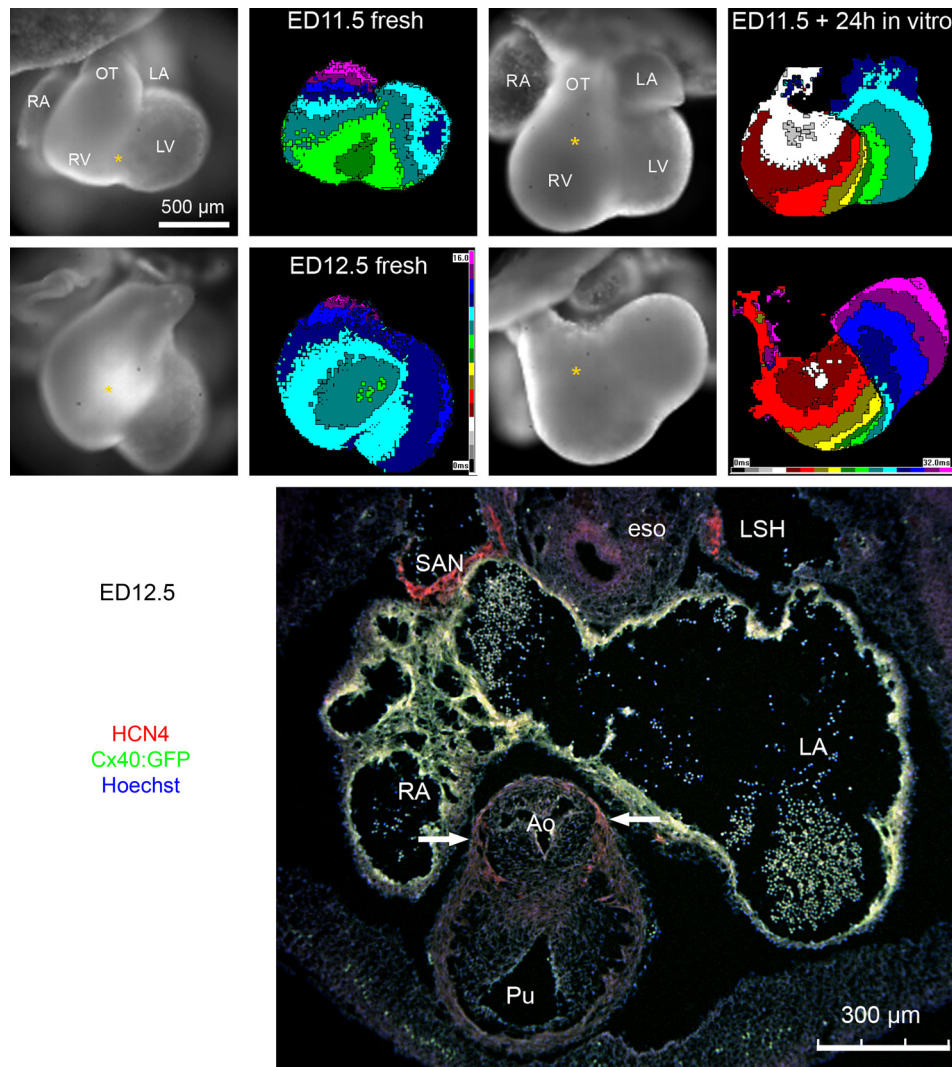


Fig. 4. Ectopic activation of cultured mouse embryonic hearts. Typical ventricular activation of freshly isolated hearts proceeds either via the primary interventricular ring (ED11.5), or from the right apical breakthrough (ED12.5). The site of first activation is marked with an asterisk. Colors represent 1 ms isochronal intervals. Two examples showing the ventricular activation from the outflow tract region illustrate the position of the ectopic pacemaker at the base of the outflow tract (OT; orange asterisks). Note that the conduction is considerably slower, color isochronal intervals being 2 ms. Transverse histological section through this region shows higher intensity of staining for HCN₄, responsible for the pacemaking activity, in this region; normally, the highest levels are found in the area of the sinoatrial node (SAN), with some remnants in the left sinus horn (LSH) myocardium. Staining performed in conjunction of study by Benes et al. (2014). Ao, aorta; eso, esophagus; LA, left atrium; LV, left ventricle; Pu, pulmonary artery; RA, right atrium; RV, right ventricle.

Fig. 3), where the wavefront did not propagate back to the ventricular myocardium.

During development, the outflow tract (as well as inflow) myocardium is added to the cardiac tube from the pharyngeal mesenchyme (van den Berg et al., 2009). This cell source is referred to as the second heart field and it is distinguished by Isl-1 expression (Kelly et al., 2001; Kelly and Buckingham, 2002). Right ventricular outflow tract is a frequent site of ectopic activity in humans (Braunwald et al., 2001); our results showing the location of the ectopic pacemaker site coinciding with stronger HCN₄ expression might be responsible to a large extent for the spontaneous depolarization (Fig. 4), and thus could provide a developmental explanation for this phenomenon. In this context, a paper by Boukens and colleagues analyzed the origin of ectopic pacemaking in the outflow tract in Brugada patients (Boukens et al., 2013). Study in a mouse model revealed expression of Tbx2 in the outflow tract myocardium, responsible for maintaining the primitive phenotype (i.e., slow conduction and automaticity potential).

This feature disappeared in the adulthood, but could be unmasked by either genetic or pharmacological sodium channel blockade. Persistence (Reaume et al., 1995) of very slowly conducting (our unpublished data) outflow tract myocardium was also noted in the mouse fetuses with Cx43 deletion, which have generally severe conduction problems and predisposition for ventricular arrhythmias (Vaidya et al., 2001).

3.2. Imaging the dispensable heart: lessons from the zebrafish

Zebrafish heart is of considerably simpler design than its mammalian counterpart, possessing only a single atrial and single ventricular chamber (Hu et al., 2001). In addition, its transparency and self-contained early development make it ideal for longitudinal imaging studies. Its small size enables use of high-power optics, allowing excellent 3D rendering and cell counting; furthermore, coupled with its low metabolic requirements due to poikilothermy, heart function is not essential for embryonic survival during the

first week of development. All these features allow functional studies of genes crucial for cardiovascular development that are not feasible in the mouse model due to early embryonic lethality. It is thus not surprising that new technical advances in developmental imaging come from this field.

Particularities of this model organism allowed calcium imaging after dye injection at a single cell stage (Milan et al., 2006). Motion control, critical for optical mapping, was elegantly achieved by using the *silent heart* mutant with normal cardiac morphology and electrical behavior but no contraction. Combination of this approach allowed imaging of previously inaccessible early stages of conduction system differentiation, and showed critical requirement of neuregulin and notch signaling for atrioventricular delay development.

Optogenetics approach was used to localize the pacemaker region at various stages of zebrafish heart development (Arrenberg et al., 2010). Stable transfection with halorhodopsin and channelrhodopsin-2 allowed precise temporal and spatial control of cardiac function. In this way, patterned light illumination enabled disabling and pacing studies that allowed mapping of pacemaker shift during heart development. Light-sheet microscopy setup also bypassed the photobleaching and phototoxicity problems, reported earlier (Sedmera et al., 2003).

Confocal and 3D particles imaging using zebrafish embryos expressing fluorescent proteins under myocardial and endocardial promoters (Hove and Craig, 2012) allowed detailed, 3D monitoring of cardiac function from the earliest time points. This setup permitted fairly precise biomechanical studies and resolution of early cardiac mechanics at much higher resolution than other imaging modalities, such as ultrasound biomicroscopy (McQuinn et al., 2007).

Advantages and drawbacks of genetically encoded vs. injected calcium indicators in zebrafish studies were reviewed recently (Kettunen, 2012). It is important to mention fruitful transfer of techniques from the mouse model, where genetically encoded calcium indicators were originally reported (Tallini et al., 2007) and used to study calcium dynamics specifically in the Purkinje fibers. Transmembrane voltage indicator acting via FRET ('mermaid') was recently transfected into zebrafish embryos (Tsutsui et al., 2010), and allows screening for potentially arrhythmogenic drugs or functional evaluation of different ion channel mutations in a whole heart model.

In conclusion, we have structured this paper around new technologies, pinpointing what unexpected piece of information they uncovered in the field. Technological progress for its own sake is of little value if it does not bring any novel findings or opens new questions. In our opinion, fruitful avenues of future research in this arena will involve three-dimensional imaging studies of cardiac excitation, enabled by simultaneous improvement in light sources, optics, and computing power. This will allow precise definition of conduction pathways, hitherto inferred only from 2D recordings. Genetically encoded fluorescent probes are also of high value, both for large-scale screening as well as for spatially precise electrophysiological studies.

Editors' note

Please see also related communications in this issue by Fedorchak et al. (2014) and Ambrosi et al. (2014).

Acknowledgments

We would like to thank Ms. Alena Kvasilova for performing the histological staining shown in Fig. 4. Supported by Ministry of Education PRVOUK P35/LF1/5, and institutional RVO: 67985823. Further support comes from the Grant Agency of the Czech Republic P302/11/1308 and 13-12412S. B.S. was supported by Charles

University in Prague, First Faculty of Medicine training fellowship program. F.V. is supported by GA UK training grant no. 716214.

References

- Ambrosi, C.M., Klimas, A., Yu, J., Entcheva, E., 2014. Cardiac applications of optogenetics. *Prog. Bio. Mol. Biol.* 115 (2-3), 294–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.07.001>.
- Ammirabile, G., Tessari, A., Pignataro, V., Szumska, D., Sardo, F.S., Benes Jr., J., Balistreri, M., Bhattacharya, S., Sedmera, D., Campione, M., 2012. Ptx2 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, 971–974.
- Atance, J., Yost, M.J., Carver, W., 2004. Influence of the extracellular matrix on the regulation of cardiac fibroblast behavior by mechanical stretch. *J. Cell. Physiol.* 200, 377–386.
- Benes Jr., J., Ammirabile, G., Sankova, B., Campione, M., Krejci, E., Kvasilova, A., Sedmera, D., 2014. The role of connexin40 in developing atrial conduction. *FEBS Lett.* 588, 1465–1469.
- 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, 1348–1357.
- Boukens, B.J., Efimov, I., 2014. A century of optocardiography. *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 7, 115–125.
- Boukens, B.J., Sylva, M., de Gier-de Vries, C., Remme, C.A., Bezzina, C.R., Christoffels, V.M., Coronel, R., 2013. Reduced sodium channel function unmasks residual embryonic slow conduction in the adult right ventricular outflow tract. *Circ. Res.* 113, 137–141.
- Braunwald, E., Zipes, D.P., Libbt, P., 2001. *Heart Disease: a Textbook of Cardiovascular Medicine*. Saunders, Philadelphia, p. 2281.
- 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, 2813–2817.
- 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, 483–492.
- 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, 1941–1949.
- 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), 171–188.
- 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, 470–476.
- 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.* 280A, 990–1000.
- Clark, E.B., Hu, N., Frommelt, P., Vandekieft, G.K., Dummett, J.L., Tomanek, R.J., 1989. Effect of increased pressure on ventricular growth in stage 21 chick embryos. *Am. J. Physiol.* 257, H55–H61.
- Damon, B.J., Remond, M.C., Bigelow, M.R., Trusk, T.C., Xie, W., Perucchio, R., Sedmera, D., Denslow, S., Thompson, R.P., 2009. Patterns of muscular strain in the embryonic heart wall. *Dev. Dyn.* 238, 1535–1546.
- de Jong, F., Opthof, T., Wilde, A.A., Janse, M.J., Charles, R., Lamers, W.H., Moorman, A.F., 1992. Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts. *Circ. Res.* 71, 240–250.
- deAlmeida, A., McQuinn, T., Sedmera, D., 2007. Increased ventricular preload is compensated by myocyte proliferation in normal and hypoplastic fetal chick left ventricle. *Circ. Res.* 100, 1363–1370.
- Dillon, S., Morad, M., 1981. A new laser scanning system for measuring action potential propagation in the heart. *Science* 214, 453–456.
- Efimov, I., Rendt, J.M., Salama, G., 1994. Optical maps of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ transients and action potentials from surface of perfused guinea pig heart. *Circulation* 90, 632.
- 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.
- Evans, H.J., Sweet, J.K., Price, R.L., Yost, M., Goodwin, R.L., 2003. Novel 3D culture system for study of cardiac myocyte development. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H570–H578.
- Fedorchak, G.R., Kaminski, A., Lammerding, J., 2014. Cellular mechanosensing: Getting to the nucleus of it all. *Prog. Bio. Mol. Biol.* 115 (2-3), 76–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.009>.
- Fedorov, V.V., Glukhov, A.V., Chang, R., Kostecki, G., Aferol, H., Hucker, W.J., Wuskell, J.P., Loew, L.M., Schuessler, R.B., Moazami, N., Efimov, I.R., 2010. Optical

- mapping of the isolated coronary-perfused human sinus node. *J. Am. Coll. Cardiol.* 56, 1386–1394.
- 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, 619–626.
- 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–H1300.
- 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, 333–339.
- 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, 581–592.
- 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.
- 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, 209–227.
- 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, 1098–1112.
- Hove, J.R., Craig, M.P., 2012. High-speed confocal imaging of zebrafish heart development. *Methods Mol. Biol.* 843, 309–328.
- Hu, N., Yost, H.J., Clark, E.B., 2001. Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *Anat. Rec.* 264, 1–12.
- Jalife, J., Morley, G.E., Tallini, N.Y., Vaidya, D., 1998. A fungal metabolite that eliminates motion artifacts. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 9, 1358–1362.
- Jalife, J., Morley, G.E., Vaidya, D., 1999. Connexins and impulse propagation in the mouse heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10, 1649–1663.
- Jou, C.J., Spitzer, K.W., Tristani-Firouzi, M., 2011. Blebbistatin effectively uncouples the excitation-contraction process in zebrafish embryonic heart. *Cell. Physiol. Biochem.* 25, 419–424.
- Jouk, P.S., Usson, Y., Michalowicz, G., Parazza, F., 1995. Mapping of the orientation of myocardial cells by means of polarized light and confocal scanning laser microscopy. *Microsc. Res. Technol.* 30, 480–490.
- 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, 595–597.
- Kelly, R.G., Brown, N.A., Buckingham, M.E., 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev. Cell.* 1, 435–440.
- Kelly, R.G., Buckingham, M.E., 2002. The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. *Trends Genet.* 18, 210–216.
- Kettunen, P., 2012. Calcium imaging in the zebrafish. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740, 1039–1071.
- Kofidis, T., Balsam, L., de Bruin, J., Robbins, R.C., 2004. Distinct cell-to-fiber junctions are critical for the establishment of cardiotypical phenotype in a 3D bioartificial environment. *Med. Eng. Phys.* 26, 157–163.
- 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, 1508–1517.
- 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.
- 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, 123–137.
- 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, 1493–1500.
- 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, 1001–1008.
- McQuinn, T.C., Bratoeva, M., Dealmeida, A., Remond, M., Thompson, R.P., Sedmera, D., 2007. High-frequency ultrasonographic imaging of avian cardiovascular development. *Dev. Dyn.* 236, 3503–3513.
- Milan, D.J., Giokas, A.C., Serluca, F.C., Peterson, R.T., Macrae, C.A., 2006. Notch1b and neuregulin are required for specification of central cardiac conduction tissue. *Development* 133, 1125–1132.
- Miller, C.E., Donlon, K.J., Toia, L., Wong, C.L., Chess, P.R., 2000. Cyclic strain induces proliferation of cultured embryonic heart cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 36, 633–639.
- Morley, G.E., Jalife, J., 2000. Cardiac gap junction remodeling by stretch: is it a good thing? *Circ. Res.* 87, 272–274.
- 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, 241–250.
- Morley, G.E., Vaidya, D., Samie, F.H., Lo, C., Delmar, M., Jalife, J., 1999. Characterization of conduction in the ventricles of normal and heterozygous Cx43 knockout mice using optical mapping. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10, 1361–1375.
- 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, 1187–1199.
- Paff, G.H., Boucek, R.J., Klopfenstein, H.S., 1964. Experimental heart block in the chick embryo. *Anat. Rec.* 149, 217–224.
- Pesevski, Z., Sedmera, D., 2013. Prenatal adaptations to overload. In: Ostadal, B., Dhalla, N.S. (Eds.), *Cardiac Adaptations*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 41–57.
- Raddatz, E., 1997. Response of the embryonic heart to hypoxia and reoxygenation: an in vitro model. *Exp. Clin. Cardiol.* 2, 128–134.
- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., Rossant, J., 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831–1834.
- 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.
- Rentschler, S., Vaidya, D.M., Tamaddon, H., Degenhardt, K., Sassoon, D., Morley, G.E., Jalife, J., Fishman, G.I., 2001. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development* 128, 1785–1792.
- Rentschler, S., Zander, J., Meyers, K., France, D., Levine, R., Porter, G., Rivkees, S.A., Morley, G.E., Fishman, G.I., 2002. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10464–10469.
- Rohr, S., 2012. Arrhythmogenic implications of fibroblast-myocyte interactions. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 5, 442–452.
- Rohr, S., Kleber, A.G., Kucera, J.P., 1999. Optical recording of impulse propagation in designer cultures. Cardiac tissue architectures inducing ultra-slow conduction. *Trends Cardiovasc. Med.* 9, 173–179.
- Romano, R., Rochat, A.C., Kucera, P., De Ribaupierre, Y., Raddatz, E., 2001. Oxidative and glycolytic capacities within the developing chick heart. *Pediatr. Res.* 49, 363–372.
- 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, 226–236.
- 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, 61–69.
- Sankova, B., Benes Jr., J., Krejci, E., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Miquerol, L., Sedmera, D., 2012. The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. *Cardiovasc. Res.* 25, 469–479.
- 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–H1576.
- 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, 1350–1359.
- Sarre, A., Pedretti, S., Gardier, S., Raddatz, E., 2009. 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.
- Schroder, E.A., Tobita, K., Tinney, J.P., Foldes, J.K., Keller, B.B., 2002. Microtubule involvement in the adaptation to altered mechanical load in developing chick myocardium. *Circ. Res.* 91, 353–359.
- 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, 1746–1753.
- Sedmera, D., Hu, N., Weiss, K.M., Keller, B.B., Denslow, S., Thompson, R.P., 2002a. Cellular changes in experimental left heart hypoplasia. *Anat. Rec.* 267, 137–145.
- Sedmera, D., Kucera, P., Raddatz, E., 2002b. Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R379–R388.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Rychterova, V., Hu, N., Clark, E.B., 1999. Remodeling of chick embryonic ventricular myoarchitecture under experimentally changed loading conditions. *Anat. Rec.* 254, 238–252.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R.P., Anderson, R.H., 2000. Developmental patterning of the myocardium. *Anat. Rec.* 258, 319–337.
- 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.* 280A, 1001–1009.
- 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 the zebrafish and Xenopus heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284, H1152–H1160.

- Sedmera, D., Thompson, R.P., 2011. Myocyte proliferation in the developing heart. *Dev. Dyn.* 240, 1322–1334.
- 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, 947–956.
- Taber, L.A., 2001. Biomechanics of cardiovascular development. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 3, 1–25.
- Taber, L.A., Chabert, S., 2002. Theoretical and experimental study of growth and remodeling in the developing heart. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 1, 29–43.
- Tallini, Y.N., Brekke, J.F., Shui, B., Doran, R., Hwang, S.M., Nakai, J., Salama, G., Segal, S.S., Kotlikoff, M.I., 2007. Propagated endothelial Ca²⁺ waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice. *Circ. Res.* 101, 1300–1309.
- 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, 929–936.
- Thompson, R.P., Reckova, M., DeAlmeida, A., Bigelow, M., Stanley, C.P., Spruill, J.B., Trusk, T., Sedmera, D., 2003. The oldest, toughest cells in the heart. In: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds.), *Development of the Cardiac Conduction System*, vol. 250. Wiley, Chichester, pp. 157–176.
- Tobita, K., Garrison, J.B., Li, J.J., Tinney, J.P., Keller, B.B., 2005. Three-dimensional myofiber architecture of the embryonic left ventricle during normal development and altered mechanical loads. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 283, 193–201.
- Tobita, K., Liu, L.J., Janczewski, A.M., Tinney, J.P., Nonemaker, J.M., Augustine, S., Stolz, D.B., Shroff, S.G., Keller, B.B., 2006. Engineered early embryonic cardiac tissue retains proliferative and contractile properties of developing embryonic myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H1829–H1837.
- 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., Linke, W.A., Backs, J., Regitz-Zagrosek, V., Schafer, K., Field, L.J., Maier, L.S., Hasenfuss, G., 2010. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122, 993–1003.
- 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, 766–773.
- Tsutsui, H., Higashijima, S., Miyawaki, A., Okamura, Y., 2010. Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. *J. Physiol.* 588, 2017–2021.
- 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, 1196–1202.
- 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, 543–549.
- van den Berg, G., Abu-Issa, R., de Boer, B.A., Hutson, M.R., de Boer, P.A., Soufan, A.T., Ruijter, J.M., Kirby, M.L., van den Hoff, M.J., Moorman, A.F., 2009. A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube. *Circ. Res.* 104, 179–188.
- 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, 1077–1082.
- Yildirim, Y., Naito, H., Didie, M., Karikkineth, B.C., Biermann, D., Eschenhagen, T., Zimmermann, W.H., 2007. Development of a biological ventricular assist device: preliminary data from a small animal model. *Circulation* 116, 116–123.

REVIEW

Arrhythmias in the developing heart

D. Sedmera,^{1,2} R. Kockova,^{2,3} F. Vostarek² and E. Raddatz⁴¹ Institute of Anatomy, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic² Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic³ Department of Cardiology, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic⁴ Department of Physiology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

Received 13 August 2014,
revision requested 8 September
2014,
revision received 1 October
2014,
accepted 23 October 2014
Correspondence: D. Sedmera,
Academy of Sciences of the
Czech Republic, Institute of
Physiology, Videnska 1083, 14220
Prague 4, Czech Republic.
E-mail: dsedmera@biomed.cas.cz

Abstract

Prevalence of cardiac arrhythmias increases gradually with age; however, specific rhythm disturbances can appear even prior to birth and markedly affect foetal development. Relatively little is known about these disorders, chiefly because of their relative rarity and difficulty in diagnosis. In this review, we cover the most common forms found in human pathology, specifically congenital heart block, pre-excitation, extrasystoles and long QT syndrome. In addition, we cover pertinent literature data from prenatal animal models, providing a glimpse into pathogenesis of arrhythmias and possible strategies for treatment.

Keywords anti-arrhythmic drugs, cardiac development, chick embryo, conduction system, hypoxia, mouse.

Disturbances of cardiac rhythm in the human foetus

During routine obstetric examination, foetal rhythm disturbances may be detected in at least 2% of pregnancies (Copel *et al.* 2000, Jaeggi & Nii 2005). Foetal arrhythmias account for about 10–20% of referrals for foetal cardiology assessment (Srinivasan & Strasburger 2008). Due to a number of limitations, a foetal electrocardiogram (cardiotocogram) is not the ideal method for assessment of arrhythmias. A relatively novel and efficient method for foetal heart electrical activity recording is foetal magnetocardiography (Strasburger *et al.* 2008, Strasburger & Wakai 2010). However, this method is not widely available and is preferred only after the 20th week of gestation because it is less reliable in the earlier stages of pregnancy. Thus, echocardiography remains the principal method in evaluation of heart rhythm disturbance in the foetus. In addition to heart rhythm analysis, echocardiography may reveal other signs associated with prolonged or persistent foetal rhythm disturbances, such as hydrops (pleural or pericardial effusion, ascites) in its early as well as more advanced stages. The severity of foetal heart failure can be then monitored

using the ‘heart failure score’ presented by Huhta (2005).

Using all three standard echocardiographic modalities (B-mode, M-mode and Doppler), we can assess atrial and ventricular contraction frequencies and their time relations. An equivalent for P wave on electrocardiogram is the A wave detected by pulse wave Doppler in mitral inflow or atrial wall motion detected by M-mode. Similarly, the beginning of retrograde flow in the superior vena cava indicates the beginning of atrial systole. Atrioventricular (AV) valve closure, semilunar valve opening and positive Doppler flow in the aorta are equivalents of the beginning of QRS complex. Simultaneous Doppler recording in the superior vena cava and the aorta shows the time correlation between the atrial and ventricular systole – times corresponding to the P wave and QRS complex on the ECG. These parameters allow us to calculate the heart rate, AV delay and diagnose different types of arrhythmias by measuring the mechanical response of the heart chambers to the electrical stimulus.

The relationship between foetal arrhythmia and structural heart disease is not clearly established. Stewart and Copel found no clear relationship between foetal arrhythmia and structural heart disease

(Stewart *et al.* 1983, Copel *et al.* 2000). In the observational study published by Stewart and associates, only two fetuses from 17 with documented ectopic beats had structural heart disease. No structural heart disease was found in five fetuses with tachycardia (heart rate over 180 bpm), but four of eight fetuses with documented bradycardia had severe structural heart disease. Copel and colleagues reported only two of 10 fetuses diagnosed with significant arrhythmia – one with supraventricular tachycardia and one with a second-degree AV block – associated with structural heart disease of all 614 fetuses with irregular heart rhythm. On the other hand, there is evidence that foetal arrhythmia may be associated with structural heart disease. Schmidt *et al.* (1991) reported that 53% of fetuses (of a total of 55) with complete AV block had concomitant structural heart disease (left atrial isomerism, discordant AV connection). Vergani *et al.* (2005) reported structural heart anomalies in five of six fetuses with bradycardia from a total cohort of 114 infants with foetal arrhythmias. Only two of four fetuses with AV block survived. Eronen reported 12 fetuses (three supraventricular and three ventricular ectopic activities, four AV blocks and two sinus bradycardias) with significant arrhythmia associated with structural heart disease from a total of 125 fetuses with significant arrhythmia (Eronen 1997). She also found 95% survival in fetuses with sole significant arrhythmia compared to a 75% mortality in those with arrhythmia associated with structural heart disease. Interestingly, the total mortality in the group of fetuses with structural heart disease was only 67%. Based on these two observational studies, it could be speculated that bradyarrhythmias are more frequently associated with structural heart disease and have a worse outcome than tachyarrhythmias or irregular heart rhythm, which are frequently curable or might resolve spontaneously during development.

For simplicity, we may divide foetal arrhythmias into the three groups (Fig. 1): ectopic beats, mostly originating in atrial ectopic foci; tachyarrhythmias, which are defined as heart rates over 180 bpm; and bradyarrhythmias, defined as heart rates below 110 bpm (Jaeggi & Nii 2005).

Of these three types, extrasystoles typically have the best outcomes (Reed 1989). Vergani *et al.* (2005) reported that 38% of cases with extrasystoles (in 87 fetuses) resolved *in utero* and 49% at birth. Only one neonate required postnatal therapy, and in nine neonates, the arrhythmia was still present at 1-year follow-up without need for therapy. Two fetuses with extrasystoles converted to supraventricular tachycardia *in utero* and were successfully treated pharmacologically with no impact on their further development.

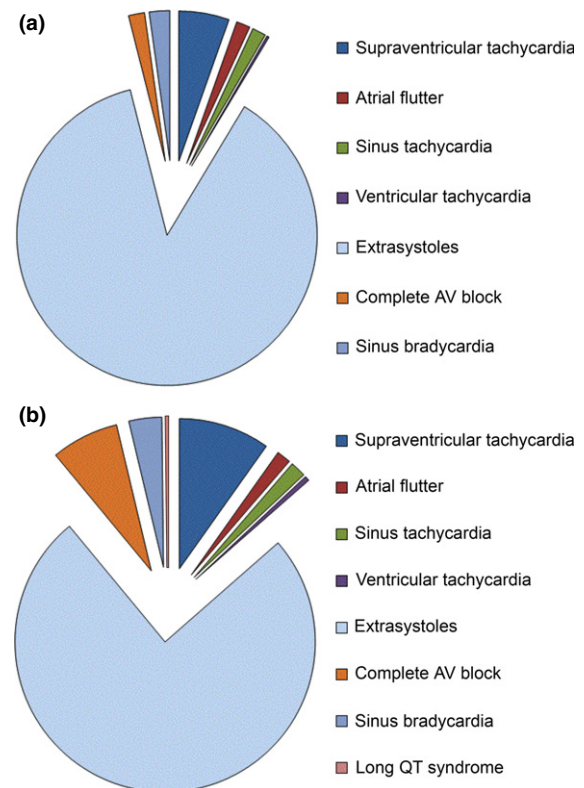


Figure 1 Epidemiology of foetal arrhythmias in humans. (a) Incidence of various types of arrhythmias in non-selected population ($N = 406$, collated from references (Copel *et al.* 2000), (Vergani *et al.* 2005)). (b) Incidence in highly selected population ($N = 591$, collated from references (Stewart *et al.* 1983), (Reed *et al.* 1990), (Eronen 1997), (Vergani *et al.* 2005), (Zhao *et al.* 2006)).

None of these were associated with structural heart disease.

Prolonged foetal tachycardia is usually a serious condition often leading to foetal hydrops or even death. Simpson & Sharland (1998) reported hydrops occurrence in 41% of 127 fetuses diagnosed with tachycardia. Seventy-five non-hydropic fetuses from this cohort responded well to transplacental treatment (mostly with digoxin) with an excellent survival to birth (96%). Conversely, only two-thirds of hydropic fetuses with tachycardia responded to transplacental treatment, and of these, only 73% survived till birth. Thus, foetal hydrops is a negative prognostic sign suggesting severe hemodynamic consequences from the underlying causes – for example, arrhythmia and/or structural heart disease.

Sustained or prolonged bradycardia (heart rates <100 bpm) or tachycardia (heart rates over 180 bpm) are of clinical significance and might have a significant impact on further foetal development *in utero*; even later postnatal development might be affected. Jaeggi

and Nii reported foetal tachycardia as the most frequent arrhythmia in the foetus and was present in 57% of 66 foetuses examined with proven serious arrhythmia (Jaeggi & Nii 2005). Supraventricular tachycardia was present in 40% of cases, atrial flutter accounted for 11%, and sinus tachycardia was present in 6%.

Diagnosis, classification and management of foetal arrhythmias

The 12-lead ECG that is so useful in newborn or adult cardiology suffers from major limitations in the foetus. Echocardiography is typically the only way to diagnose tachyarrhythmia in the foetus, and it is not easy to differentiate between different types of tachyarrhythmias. Supraventricular tachycardia with mostly 1 : 1 AV conduction can be distinguished from atrial flutter, with mostly 2 : 1 AV conduction block, due to excessive atrial frequency in flutter (about 440–480 bpm) translating into a 220–240 bpm ventricular rate. In AV re-entry, the time interval between the ventricular and atrial activity would be short, while in atrial tachycardia originating from ectopic foci, this time interval is usually prolonged. Ventricular tachycardia with typical dissociation of ventricular and atrial rhythm or conducted 1 : 1 from ventricles to atria is extremely rare in the foetus as most tachyarrhythmias originate in the atria. In such cases, it is clear that only an experienced physician trained in echocardiography can make the correct diagnosis.

The most frequent foetal tachyarrhythmia is supraventricular tachycardia represented by three different types: AV re-entrant tachycardia, permanent junctional reciprocating tachycardia and atrial ectopic tachycardia. The second most frequent foetal tachyarrhythmia is atrial flutter caused by a macro-re-entry circuit located in the atria. The final differentiation is often made only after birth when the arrhythmia persists or reoccurs, or a delta wave typical for the accessory pathway is present on the 12-lead ECG. The treatment strategy for most types of tachyarrhythmias is based on transplacental digoxin administration in non-hydrotic foetuses. Sotalol, flecainide or amiodarone is mostly reserved for hydrotic foetuses or more resistant tachyarrhythmias. Treatment is required for pure sinus tachycardia with typical heart rates of 180–200 bpm usually caused by foetal distress, foetal thyrotoxicosis, anaemia etc.

Sustained or prolonged bradycardia is present in 43% of significant foetal arrhythmia cases, as presented by Jaeggi & Nii (2005). Complete AV block accounts for 38%, and only 5% manifest as sinus bradycardia cases. The treatment of foetal bradycardia is

limited. For significant number of foetuses with complete heart block caused by maternal autoantibodies, transplacental treatment with beta-receptor-stimulating agents, corticosteroids or immunosuppressives is recommended. In principle, foetal pacemaker implantation (Liddicoat *et al.* 1997) should be considered using minimally invasive techniques (Sydorak *et al.* 2001, Eghtesady *et al.* 2011, Nicholson *et al.* 2012).

During sinus bradycardia, there is 1 : 1 AV coupling with a slow frequency of atrial contractions (<100 bpm). Simple sinus bradycardia may be caused by foetal distress with episodes of hypoxia and blood flow redistribution, while brain and heart are supplied preferentially. Sinus bradycardia can be a manifestation of foetal long QT syndrome, and all newborns with a history of foetal heart rate below the 3rd percentile should be assessed for this entity early after birth (Mitchell *et al.* 2012). Sinus bradycardia may be a rare manifestation of sinus node dysfunction. Supraventricular bigeminy or trigeminy with AV block must always be excluded when assessing the foetus for bradycardia. The telltale sign would be an atrial frequency above that of the ventricle and an irregular heart rhythm. The outcome is usually benign and this arrhythmia mostly does not require treatment.

Foetal AV block

The most frequent cause of bradycardia is congenital AV block. First-degree AV block is characterized by prolonged AV conduction with 1 : 1 AV coupling. It is necessary to realize that AV conduction time increases during gestation and the exact numbers also differ for various ECHO modalities. Normal values for 30–34 weeks of gestational stage are 122.7 ± 11.1 ms by left ventricle inflow/outflow Doppler method, 116.5 ± 8.8 ms by Doppler method in the superior vena cava/aorta, 142.4 ± 14.2 by atrial contraction/ventricular systole as measured via Tissue Doppler Imaging (TDI) of the basal right ventricular free wall (Nii *et al.* 2006).

We distinguish two types of second-degree AV block. Wenckebach type (Mobitz I) second-degree AV block is characterized by the gradual lengthening of AV conduction time terminated by a dropped ventricular contraction. Mobitz type (Mobitz II) of second-degree AV block is typified by sudden loss of ventricular contraction, while AV conduction time remains unchanged. A specific type of Mobitz II AV block is 2 : 1 conduction when every second atrial beat is not conducted to the ventricles.

The third-degree AV block (complete heart block) has the most serious impact on further foetal development leading frequently to foetal demise. Atrial and

ventricular electrical and mechanical activities are completely independent in this type of AV block. This always leads to significant and prolonged bradycardia. The only physiological pathway to compensate the decrease in cardiac output caused by bradycardia is the Frank-Starling mechanism which might be limited at early stages according to data from animal experiments (Kockova *et al.* 2013). When increased stroke volume fails to compensate severe foetal bradycardia, heart failure occurs leading to foetal hydrops.

Foetal complete heart block occurs more frequently in conjunction with various congenital structural heart diseases (Stewart *et al.* 1983, Jaeggi & Nii 2005, Vergani *et al.* 2005). Schmidt reported that 53% of foetuses diagnosed with complete heart block had associated complex congenital heart disease (Schmidt *et al.* 1991). Another major reason for congenital complete heart block is maternal autoimmune disease such as lupus erythematosus, Sjögren syndrome, rheumatoid arthritis or unclassified systemic rheumatoid disease. Elevated titres of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies are typically found in mothers affected by the above-mentioned autoimmune diseases. The risk of developing foetal complete heart block in pregnant women with positive anti-Ro/SSA antibodies is about 2% (Brucato *et al.* 2001). These antibodies cause myocardial inflammation specifically affecting the AV node leading to various degrees of AV conduction impairment, which usually occurs around 20–24 gestational weeks. This might also present as endomyocardial fibrosis in the foetus or newborn. Because complete heart block has been shown to be associated with very high mortality rates ranging between 18% and 43% (Jaeggi & Nii 2005), there has been a major effort to prevent this autoimmune disease. Corticosteroids were administered to pregnant women with positive titres of autoantibodies intravenously or orally (Reinisch *et al.* 1978, Friedman *et al.* 2009), but major side effects were noticed afterwards including oligohydramnion, foetal adrenal suppression, intrauterine growth retardation and so on. Corticosteroid treatment is recommended only for advanced heart block with significant and prolonged bradycardia with a high risk of hydrops development. Isolated prolongation of AV conduction only rarely leads to progressive AV block, as shown by Jaeggi *et al.* (2011) in anti-Ro and anti-La positive mothers, and corticosteroid treatment is therefore not recommended. Recently, current recommendations of the American Heart Association regarding diagnosis and management of foetal heart disease, including prenatal arrhythmias, were summarized in a form of Scientific Statement (Donofrio *et al.* 2014).

Importance of the cardiac conduction system for the origin of arrhythmias

It is widely recognized in clinical practice that the cardiac conduction system (CCS) can be a focal point of arrhythmogenesis (Braunwald *et al.* 2001). This propensity was extensively analysed from developmental perspective by Jongbloed and associates (Jongbloed *et al.* 2004) using CCS-LacZ transgenic mouse model. Detailed analysis of the developing CCS was performed on hearts at embryonic day (ED) 9.5–15.5 stained for beta-galactosidase activity and co-stained with the myocardial marker HNF35 followed by three-dimensional reconstruction. CCS-lacZ expression detected by X-gal staining was observed in the sinoatrial node, left and right venous valves, septum spurium, right and left AV ring, His bundle, bundle branches, moderator band, Bachmann's bundle, left atrial posterior wall surrounding the pulmonary venous orifice and later on in the pulmonary vein wall. These data supported the idea that areas derived from the developing CCS may form the arrhythmogenic substrate in adult hearts.

A comparative study between patients with left atrial tachycardia originating from the junction of mitral annulus and aortic ring and mouse embryos demonstrated the presence of the developing specialized conduction system in this region starting at embryonic age 11.5 (Gonzalez *et al.* 2004).

Particular attention was focused on the developmental origin of pulmonary vein myocardium (Mommesteeg *et al.* 2007a), which is derived from the second heart field. The area around the pulmonary veins entrance is in humans a frequent site of origin of atrial fibrillation, so its electrical insulation by catheter intervention is a frequent procedure during clinical intervention for ablation of this increasingly prevalent human arrhythmia. A recent study based on HCN4-Cre mouse line with LacZ or eGFP reporter (Liang *et al.* 2013) precisely delineated relative contributions of first and second heart lineages to the CCS and provided a time line of developmental expression of this CCS marker in concert with other markers during its formation.

Genetic and epigenetic determination of the CCS

To better appreciate the developmental potential of CCS to generate arrhythmias, one needs to consider the mechanisms governing its induction and patterning (reviewed in (Gourdie *et al.* 2003), (Christoffels *et al.* 2010)). Lineage tracing experiments performed by the Mikawa lab have shown that cardiac pacemaker cells

are physically segregated and molecularly programmed in a tertiary heart field prior to the onset of cardiac morphogenesis, and this process depends on Wnt signalling (Bressan *et al.* 2013). Recently, the genetic cascade governing specification of cardiac pacemaking tissues was elucidated by the Amsterdam group (Mommersteeg *et al.* 2007b). Restricted expression pattern of the homeodomain transcription factor *Shox2* in the sinus venosus myocardium, including the sinoatrial nodal region and the venous valves, was found to be important for the recruitment of these cells to the pacemaking fate (Blaschke *et al.* 2007). The authors furthermore demonstrated aberrant expression of gap junction proteins connexin 40 and 43 as well as the transcription factor *Nkx2.5* specifically within the sinoatrial nodal region, leading to embryonic lethality between ED11.5 and ED13.5 in *Shox2*^{-/-} mice. Finally, they showed that *Shox2* deficiency interferes with pacemaking function in embryonic zebrafish *in vivo*. Particular attention was also devoted to specification of pulmonary venous myocardium (Mommersteeg *et al.* 2007a), which is a significant source of atrial fibrillation. Genetic labelling reveals that atrial cells do not contribute to this specific population, characterized by *Nkx2.5* expression distinguishing it from the systemic venous return. Maintenance of this phenotype is dependent on *Pitx2c*, which prevents it from adopting the Cx40-negative, *Hcn4*-positive pacemaking phenotype of the right-sided sinoatrial node.

Embryonic pacemaking differs in details from the mechanisms operating in the adult sinoatrial node. The early stages are crucially dependent on the calcium clock, as demonstrated by Wakimoto *et al.* (2000) who studied the functional importance of sodium-calcium exchanger (NCX) for heartbeat initiation and maintenance. To address this question, they generated *Ncx1*-deficient mice by gene targeting to determine the *in vivo* function of the exchanger. The hearts of *Ncx*^{-/-} embryonic deficiency in *Ncx*, embryos did not beat, and cardiomyocytes frequently underwent apoptosis leading to embryonic lethality between ED9 and ED10.

To study cardiac physiology near the onset of the heartbeat in embryonic mouse hearts, Chen and associates performed dual optical mapping of membrane voltage and intracellular calcium (Chen *et al.* 2010). Action potentials and calcium transients were detected in approx. 50% of mouse embryo hearts at ED8.5 and 100% at E9.0, indicating that the heartbeat starts between ED8 and ED9. Cardiac activity was abolished by calcium channel blocker nifedipine and the I (f) blocker ZD7288, suggesting that both *Hcn4* and voltage-dependent calcium channels are important for embryonic pacemaking. The role of sodium channels

and intracellular calcium cycling is of lesser importance at this early stage.

From the functional side, endothelin signalling was shown to be necessary not for specification like in birds (Gourdie *et al.* 1998), but normal function of the embryonic pacemaker in mammals (Karppinen *et al.* 2013). Stimulation with endothelin-1 increased beating frequency of ED9–ED11 cardiomyocytes. Inhibition by receptor antagonist tezosentan led to dose-dependent bradycardia *in vitro* as well as *in utero*, but only during the early (ED12.5) and not late (ED18.5) embryonic stages. Irregular rhythm was also observed, and use of specific antagonists indicated that the effects are mediated via endothelin receptor B.

Location of the first activation site in the rat embryonic heart was investigated by the Kamino group (Hirota *et al.* 1985). At the time of heartbeat initiation, the first pacemaking activity was located in the left side of the sinus venosus, but within a few hours migrated to the right side, where the definitive pacemaker is located. A similar situation was reported also in avian embryos; remnants of this initial left-sided activity were reported in a small proportion of normal avian hearts at later stages of development (Sedmera *et al.* 2006); under normal conditions, no such left-sided activity was reported in a large series of embryonic mice (Leaf *et al.* 2008, Ammirabile *et al.* 2012, Benes *et al.* 2014).

Considerably less is known about the mechanisms regulating specification of the remaining components of the CCS. Neuregulin was proposed as a factor influencing differentiation of the ventricular myocytes towards the conduction phenotype (Rentschler *et al.* 2002), but this secreted molecule has many important functions in the embryonic cardiomyocytes, such as their survival (Liu *et al.* 2010). The neuregulin/Erb signalling cascade could function in concert with endothelin signalling, which was shown to be important in Purkinje fibre differentiation in the chick (Gourdie *et al.* 1998, 2003, Takebayashi-Suzuki *et al.* 2000, Sedmera *et al.* 2008). Other important factors participating in formation of the His bundle and its branches include *Nkx2.5* (Jay *et al.* 2004), *Irx3* (Zhang *et al.* 2011) and T-box transcription factors (Jerome & Papaioannou 2001, Moskowitz *et al.* 2004, Hoogaars *et al.* 2007, Aanhaanen *et al.* 2009, Frank *et al.* 2012).

Differentiation of embryonic myocytes into the conducting phenotype is governed also by the epigenetic factors, of which mechanical loading is of the most critical importance. *In vitro* unloading of chick embryonic hearts (Sankova *et al.* 2010) led to de-differentiation of the ventricular conduction system that could be rescued by ventricular stretching using a droplet of silicone oil. These experiments resolved the issue

arising from previous *in vivo* studies using altered haemodynamics models (Reckova *et al.* 2003, Hall *et al.* 2004) that showed that increased hemodynamic loading accelerated, while reduced ventricular preload inhibited ventricular CCS differentiation by attributing the stimulus to myocyte stretching, rather than to shear stress-induced signalling from the endocardium.

Studies on chick embryos *in vivo* showed that hypoxia can accelerate maturation of the AV junction and lead to earlier appearance of mature (apex-to-base) ventricular activation patterns (Nanka *et al.* 2008), possibly through increased apoptosis of the AV myocardium. Another player in developing proper fibrous insulation of the AV junction is the developing epicardium (Kolditz *et al.* 2007, 2008), and perturbations of this process may lead to ventricular pre-excitation. Electrical insulation of the His bundle is also dependent on immigrating cardiac neural crest cells (Gurjarpadhye *et al.* 2007).

Spontaneously occurring arrhythmias in embryos

This area of embryonic arrhythmias is not well investigated for numerous reasons. First, there are the methodological difficulties inherent to all observational studies of mammalian embryos that are shielded *in utero* by maternal tissues. The most significant breakthrough in this respect was availability of high-resolution ultrasound (Phoon *et al.* 2002, Phoon 2006, Nomura-Kitabayashi *et al.* 2009, Lo *et al.* 2010), paralleling the advances in human embryonic echocardiography (Maeno *et al.* 1999, Pedra *et al.* 2002). The second obstacle is the relative rarity of such events (compare with the situation in clinical settings, discussed above) necessitating the examination of large numbers of embryos. Therefore, most arrhythmias detected in the embryonic hearts could be at least in part be due to 'gentle' alterations of physiological conditions, as it is close to impossible to monitor the embryonic mammalian heart in a completely non-invasive manner.

Various arrhythmias in the isolated mouse embryonic heart were revealed using simultaneous voltage and calcium optical mapping (Valderrabano *et al.* 2006). The focus of this study was on AV conduction during transition from immature base-to-apex to mature apex-to-base ventricular activation pattern. The authors hypothesized that after this transition, the remnants of the myocardial AV ring remain transiently able to conduct, providing a possible substrate for arrhythmias. They noted that arrhythmias were rare under normal conditions, with only occasional AV blocks (4%) and junctional rhythms in four of 309 embryonic hearts analysed. The frequency notably

increased after isoproterenol stimulation with 6% incidence of ventricular ectopic rhythms. Addition of carbachol after isoproterenol caused dissociated antegrade and retrograde AV ring conduction in almost 10% of ED10.5–ED11.5 hearts. Re-entry persisting for multiple beats was also observed, but none occurred at ED9.5. Rare cases of irregular rhythm (sinoatrial and AV block, alternating patterns of ventricular activation) were also observed in our large mouse series (Sankova *et al.* 2012), while ectopics originating from the outflow tract myocardium were seen exclusively in ED10.5–ED11.5 hearts cultured for 24 h (Vostarek *et al.* 2014). AV re-entry was observed as a rarity in one ED4 chick heart (Fig. 2).

Genetic mouse models of arrhythmias

As noted above, spontaneous arrhythmias are very rare in normal embryonic hearts, thus facilitating analysis of results in experimental perturbation models. The importance of catecholaminergic signalling in development and function of the CCS was recently reported by Steve Ebert's group (Baker *et al.* 2012). These results are in good agreement with previous studies showing lethality of mouse embryos deficient in a component of adrenergic signalling, beta-adrenergic receptor kinase (Jaber *et al.* 1996).

Studies by Collin Phoon validated ultrasound biomics as a prime tool for *in vivo* identification of abnormal mouse embryonic heart function, including arrhythmias. Using this technique, they studied longitudinally embryonic ED10.5–ED14.5 NFATc1^{-/-} embryos and control littermates (Phoon *et al.* 2004). The null embryos, lacking the outflow valves, die prior to completion of ventricular septation from presumed heart failure. The authors showed that abnormal blood flow was present at E12.5 when outflow valves normally first develop. Reduced cardiac output and diastolic dysfunction contributed to heart failure, but contractile function remained unexpectedly normal. The only arrhythmia detected prior to embryonic demise was progressive bradycardia, indicating that embryonic heart failure occurs rapidly in this mouse model.

Mutations in TBX3 cause congenital anomalies in patients with ulnar-mammary syndrome (Frank *et al.* 2012). Data from both mice and humans suggest multiple roles of this transcription factor in morphogenesis and function of the CCS. Disruption of Tbx3 function in different regions of the developing heart caused discrete phenotypes and lethal arrhythmias. Sinus pauses (normally present at low frequency in adult mice) and bradycardia indicated sinoatrial node dysfunction; pre-excitation and AV block revealed problems in the AV junction. These arrhythmias were accompanied by perturbed expression of several ion

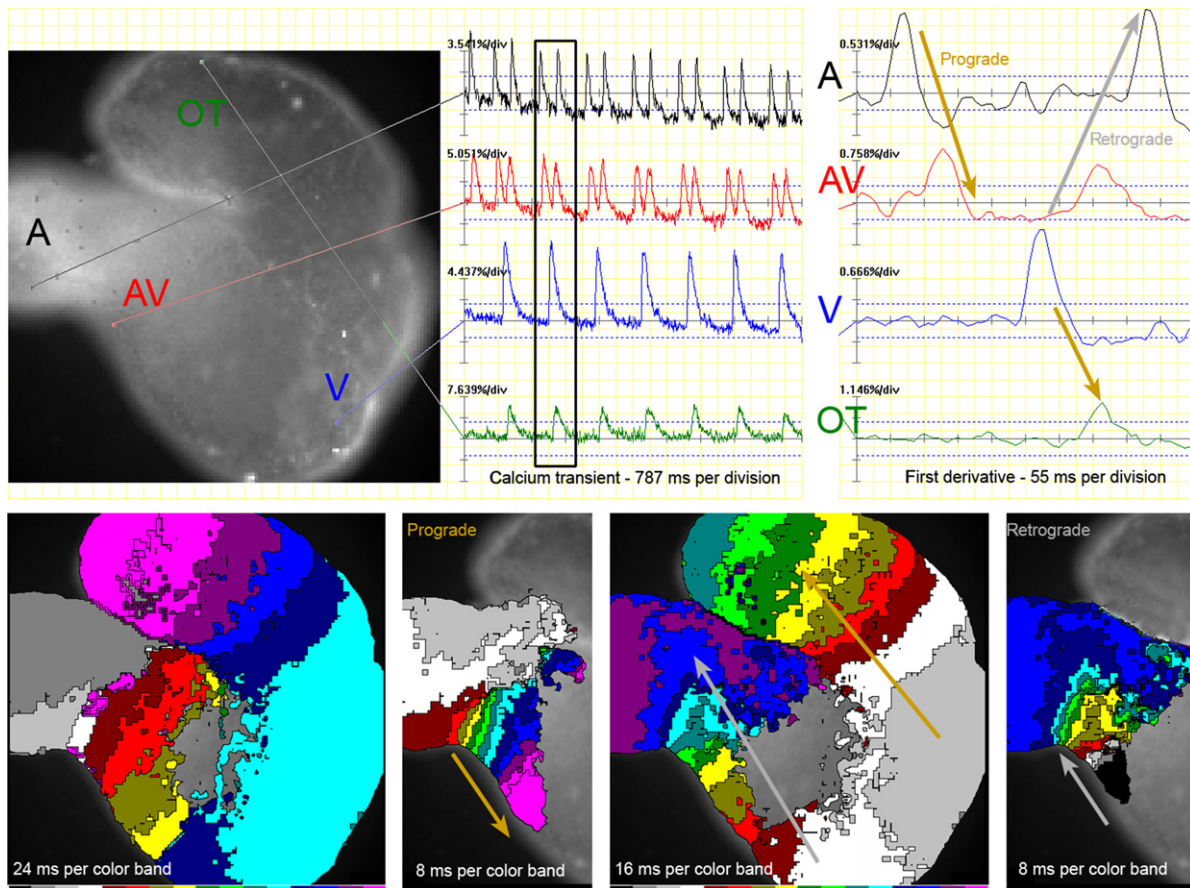


Figure 2 Atrioventricular re-entry in ED4 chick embryonic heart. Top panels show the embryonic heart from the back and time course of calcium transients. The first derivative panel shows both prograde activation (from the atrium to the ventricle to the outflow tract, orange arrow) and retrograde activation from the ventricle back to the AV canal and atrium (grey arrow). Activation maps in the bottom depict this phenomenon at different temporal scales. Note that the activation pattern of the atrium differs between prograde and retrograde activation. A, atrium; AV, atrioventricular canal; V, ventricle; OT, outflow tract. For better visualization of the activation sequence, see the Movie S1.

channel components (e.g. upregulation of *Kcne3*, *Chac1*, *Kcnj4* and downregulation of *Scn7a*), despite normal expression of previously identified CCS markers, raising the possibility of functional disturbances in apparently morphologically normal CCS.

The Notch signalling cascade was found to be important in regulation of AV conduction in the mouse (Rentschler *et al.* 2011), and activation of Notch signalling during development consistently led to accessory AV pathways and pre-excitation. On the other hand, inhibition of this cascade led to AV node hypoplasia and loss of expression of slowly conducting connexin 30.2 gap junction channels, resulting in shortened AV delay.

Drug-induced arrhythmias in mammalian models

A significant worry of every clinician taking care of women of childbearing age is the teratogenic potential

of prescribed medicines. This does not only impact overt morphological anomalies, but also more subtle functional alterations, such as mild neurological defects, or indeed, embryonic arrhythmias that in extreme cases can lead to embryonic or foetal death.

As mentioned above, propensity to arrhythmia depends considerably on developmental stage. At the earliest stages, where the heart is small and conduction generally slow, the only ‘allowed’ arrhythmias are alterations of heart rate of which bradycardia is the most dangerous as it can lead to reduced cardiac output and embryonic death. Once the cardiac chambers are formed (Moorman *et al.* 2010), alternating regions of fast and slow conduction develop, creating a heterogeneity in conduction that can lead to unidirectional or bidirectional blocks, re-entry and more complex arrhythmias (Valderrabano *et al.* 2006). With further development, the heart becomes more complex with the establishment of the coronary vascular network and autonomic innervation (Hildreth

et al. 2009). In humans, sensitivity to bradycardia in premature infants suggests that the heart rate response to cholinergic stimulation may change during development (Maurer 1979). This hypothesis was tested on isolated intact foetal mouse hearts (ED13–ED22). Acetylcholine led to a marked (–50%) heart rate decrease in the micromolar range in ED13–ED14 hearts, but the decrease was progressively blunted with increasing age with a mere 3% drop at ED21–ED22 with the same dose. Physostigmine significantly enhanced the cholinergic response in older hearts, suggesting that the effect is at least in part due to increasing intrinsic cholinesterase activity with gestational age.

Unlike the adult heart, whose energy needs are mostly met by fatty acid oxidation, the developing myocardium relies mostly on glycolysis. Chen *et al.* (2007) investigated how inhibition of glycolysis affects membrane voltage and calcium transients in embryonic mouse hearts. Glycolysis inhibition by 10 mM 2-deoxyglucose or 0.1 mM iodoacetate decreased significantly heart rate and induced (unspecified) arrhythmias in over 50% of the treated hearts. Similar effects were noted when oxidative phosphorylation was blocked by 500 nM p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine. During experiments aimed at elucidation of pace-making mechanisms in early mouse heart (Chen *et al.* 2010), the investigators observed various arrhythmias, including AV re-entry induced by adenosine (ADO). This occurred at stages that had already differentiated fast-conducting atrial and ventricular chamber myocardium and slowly conducting AV canal.

Anti-epileptic drugs frequently act on ion channels regulating membrane potential in excitable tissues; some of these channels are present also in the developing heart. This could be one explanation for the known teratogenic potential of these substances. Danielsson *et al.* (1997) investigated the capacity of phenytoin, a hERG channel blocker inhibiting the IKr that is critical for embryonic heart function, to induce embryonic hypoxia via adverse effects on the embryonic heart using a whole embryo culture model. In these mouse embryo studies, phenytoin caused a concentration-dependent decrease in embryonic heart rate, with temporary or permanent cardiac arrest at the highest dosage. The exact concentration, as well as incidence of other arrhythmias, was strain-dependent. Similar results were obtained in rat embryos.

Arrhythmogenic properties of phenytoin were examined in mouse (Azarbayjani & Danielsson 2002). Between ED9 and ED13, a dose-dependent bradycardia and other unspecified arrhythmias such as AV block were observed at maternal plasma concentrations in the micromolar range. Patch-clamp recording on HERG-transfected cells demonstrated that

phenytoin inhibits the inward rectifier potassium current. The authors attributed these effects to reactive oxygen species (ROS) generated at reoxygenation after resumption of normal rhythm, as an antioxidant agent alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron showed protective effects. A similar mechanism was proposed for another teratogenic anti-epileptic drug, trimethadione and its pharmacologically active metabolite dimethadione. The same group of investigators then followed up by showing that these effects were exacerbated in combination with several anti-epileptics (phenytoin, phenobarbital, dimethadione and carbamazepine), supporting the idea that the increased risk for malformations following polytherapy is linked to an increased risk for cardiac rhythm disturbance (Danielsson *et al.* 2007).

Almokalant, a class III anti-arrhythmic drug, caused embryotoxicity in the mouse (Skold & Danielsson 2000), most likely secondary to its adverse effects on the embryonic heart, as dose-dependent bradycardia and periods of cardiac arrest were observed in whole embryo culture at ED10. Thus, all drugs capable of causing embryonic bradycardia should be regarded as potentially embryotoxic and used during pregnancy with extreme caution.

Chick embryonic model

The cardiac electrical activity in the chick embryo has been investigated in pioneering works, *in vivo* (Van Mierop 1967, Rajala *et al.* 1984, Tazawa *et al.* 1989, Sugiyama *et al.* 1996), in the intact embryo (Hoff & Kramer 1939, Paff *et al.* 1964), the dissected heart (Paff *et al.* 1968, Paff & Boucek 1975, Kasuya *et al.* 1977, Hirota *et al.* 1987), isolated cardiac chambers (Boucek *et al.* 1959, Arguello *et al.* 1986) and in cultured cardiomyocytes (Shrier & Clay 1982). In particular, ECG of the whole heart displays characteristic P, QRS and T components which allows assessment of the beating rate from PP or RR interval, AV conduction from PR interval, duration of the ventricular activation from QT interval and intraventricular conduction from of the QRS complex width. The spatio-temporal interpretation of the ECG is facilitated by the fact that ventricular activation occurs in a ‘base-to-apex’ fashion, and there is no differentiated conduction system at early developmental stages (Chuck *et al.* 1997, Reckova *et al.* 2003).

The principal types of arrhythmias observed in the validated 4-day-old embryonic chick heart model under various stresses (e.g. anoxia–reoxygenation) or exposed to pharmacological agents are transient atrial tachycardia (range 180–300 bpm) and bradycardia (range 110–140 bpm), atrial ectopy, first-degree atrio-ventricular blocks (AVB), second-degree AVB (2 : 1 to

8 : 1), Wenckebach phenomenon (Mobitz type I), third-degree AVB (ventricular escape beats) and bursts of irregular activity followed by intermittent atrial arrest (cardioplegia) as previously documented (Sarre *et al.* 2006) and presented in Figure 3. Some of these arrhythmias resemble those observed in the human foetus (Strasburger & Wakai 2010).

Effects of drugs inducing arrhythmias can be conveniently studied in the chick embryo *in vivo*. Paff and

collaborators described heart blocks after digoxin treatment (Paff *et al.* 1964), defining the stage of chamber formation as critical for induction of conal (40 h of incubation) and AV block (42 h). Before these stages, the only reaction of the embryonic heart to drug treatment was complete cardiac arrest. The authors noted similarity between this AV block and the situation in humans, including the Wenckebach phenomenon. The Rochester group studied effects of

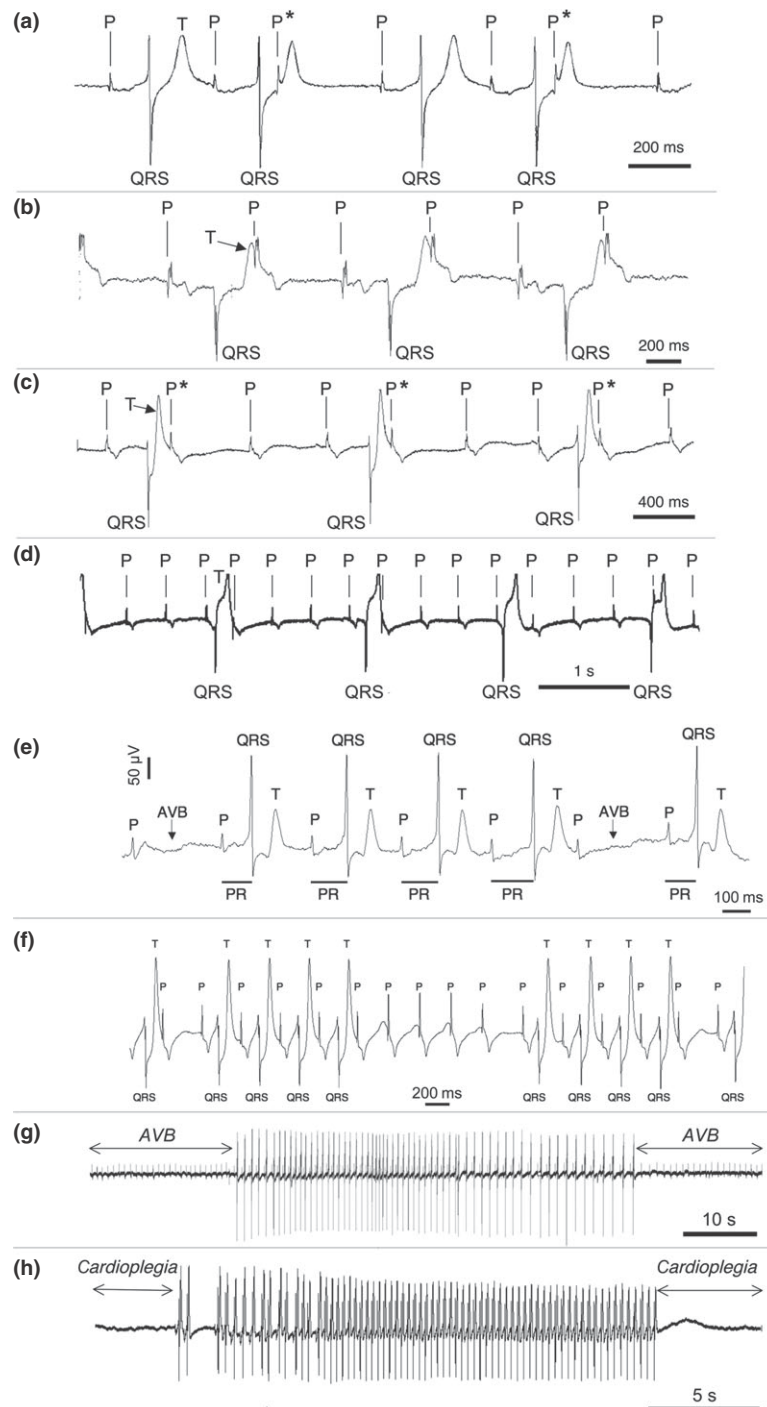


Figure 3 Examples of major types of arrhythmias observed in the 4-day-old embryonic chick heart. ECG of the isolated heart displays characteristic P wave, QRS complex and T wave components. (a) Atrial ectopy, (b) 2 : 1 AVB, (c) atrial ectopy + 3 : 1 AVB, (d) ventricular escape beats (third-degree AVB), (e) Wenckebach phenomenon (Mobitz type I), (f) episode of heart block + Wenckebach, (g) third-degree AVB + bursting activity and (h) intermittent sinoatrial arrest (cardioplegia) + bursting activity. AVB, atrioventricular block. Asterisk indicates atrial premature beat.

various cardiac drugs on the developing cardiovascular system. Isoproterenol at a teratogenic dose induced increased vascular resistance and reduced cardiac output (Clark *et al.* 1985), suggesting the presence of a functional adrenergic signalling system in the 4-day-old embryonic heart. On the other hand, chronic verapamil (calcium antagonist) infusion decreased both cardiac and embryonic growth through decreased cardiac performance (Clark *et al.* 1991, Sedmera *et al.* 1998) and led to delayed ventricular morphogenesis (increased trabeculation, decreased compact layer thickness). Recently, Kockova and colleagues studied the effects of beta blockers and ivabradine on cardiac function and embryonic survival (Kockova *et al.* 2013). High doses led to mortality through decreased cardiac output, based upon bradycardia and insufficient Frank-Starling compensation. Partial AV blocks were also observed in both early (day 4) and later (day 8) embryos.

Arrhythmias during anoxia–reoxygenation

In the 4-day-old embryonic chick heart model (Raddatz *et al.* 1997, Sarre *et al.* 2006), the chrono-, dromo- and inotropic disturbances and the ultrastructural modifications (e.g. mitochondrial and nuclear swelling) induced by 30-min anoxia followed by 60-min reoxygenation are reversible within a period of time depending on the developmental stage; the older the embryo, the lower the reversibility (Sedmera *et al.* 2002). Anoxia induces bradycardia, atrial ectopy, first-, second-, and third-degree AVB and transient cardioplegia. Reoxygenation provokes also the Wenckebach phenomenon and ventricular escape beats. At the onset of reoxygenation, PR, QT and ventricular electro-

mechanical delay (reflecting excitation-contraction (EC) coupling) significantly increase, whereas atrial EC coupling remains unchanged. Ventricular contractility at the apex and intraventricular conduction are also significantly reduced by anoxia–reoxygenation (Fig. 4), but no fibrillations, no re-entry and no ventricular ectopic beats are observed. At reoxygenation, arrhythmias and conduction disturbances are associated with a burst of ROS production (Sarre *et al.* 2005, Raddatz *et al.* 2011) and reduced by the antioxidant ascorbic acid (Fig. 5). Although the presence of glucose at the physiological concentration of 8 mM prolongs cardiac activity during anoxia, it enhances the reoxygenation-induced ROS production and arrhythmias relative to glucose-free conditions (Tran *et al.* 1996, Raddatz *et al.* 2011). This observation underscores the role that alterations of glycolytic activity may play in arrhythmogenesis associated with ROS. Nitric oxide (NO) at supraphysiological concentration delays post-anoxic recovery of AV propagation, and sinoatrial pacemaker cells are less responsive to NO (Terrand *et al.* 2003). An NO synthase inhibitor (L-NAME) prolongs the ventricular electromechanical delay during anoxia and delays its recovery during reoxygenation, while an NO donor (DETA-NONOate) has opposite effects (Maury *et al.* 2004). Thus, a NO-dependent pathway appears to contribute to regulation of ventricular excitation–contraction coupling in the anoxic–reoxygenated embryonic heart.

It should also be mentioned that a cycle of cooling (4 °C, 30 min)/rewarming (37 °C, 60 min) under normoxia is less arrhythmogenic than anoxia (30 min) followed by reoxygenation (60 min). However, between 15 and 20 min of rewarming, when temperature rises from 27 to 31 °C, the beating rate

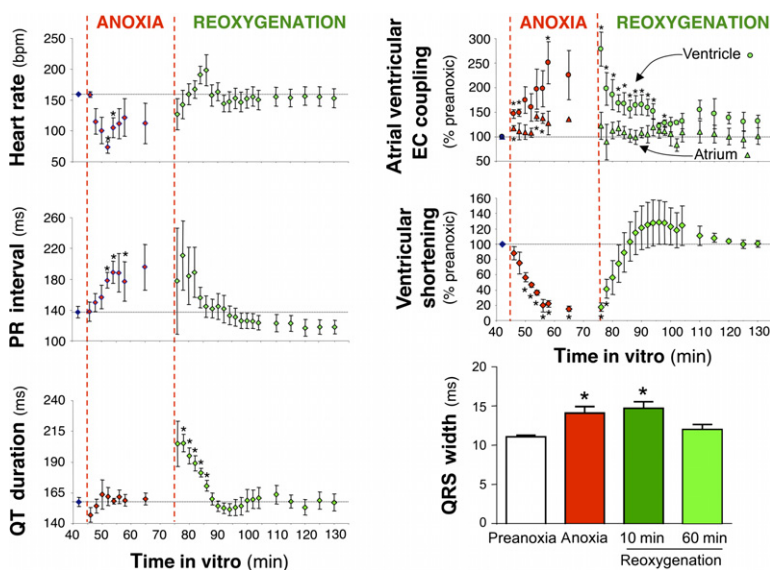


Figure 4 In a 4-day-old chick embryonic heart, heart rate, atrioventricular (AV) propagation (PR interval), QT duration, atrial and ventricular excitation-contraction (EC) coupling, contractility (apical ventricular shortening) and intraventricular conduction (QRS width) are markedly altered during anoxia and reoxygenation, but fully recover after 30–40 min. Mean \pm SEM; $n = 4$; $n = 20$ for QRS determination; bpm, beats per minute. * $P < 0.05$ vs. preanoxic values.

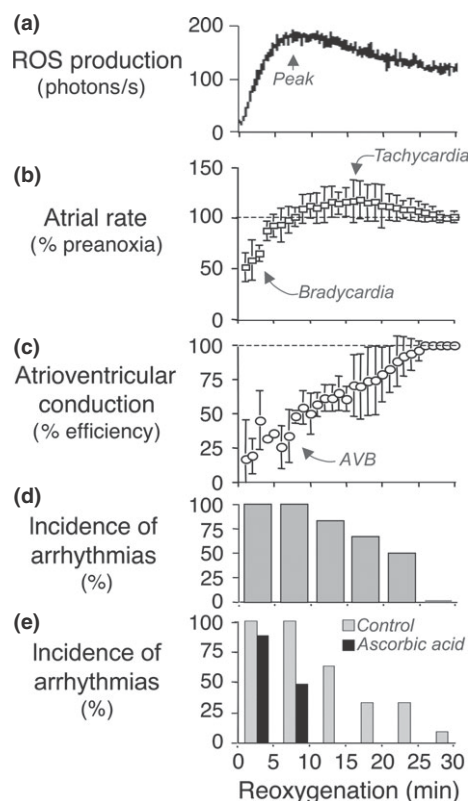


Figure 5 Functional recovery of the 4-day-old embryonic chick heart during the first 30 min of reoxygenation after preceding 30 min of anoxia. (a) typical reactive oxygen species (ROS) production determined by lucigenin-induced chemiluminescence peaking after about 8 min (arrow). (b) atrial rate reported as percentage of the pre-anoxic value. (c) efficiency of the atrioventricular (AV) propagation calculated as the ratio of the ventricular to the atrial electrical activity duration and expressed as a percentage, 100% representing one-to-one AV conduction. (d) highest incidence of arrhythmias is associated with the burst of ROS. (e) antioxidant ascorbic acid (Vit C, 10 mM) reduces incidence of arrhythmias. Mean \pm SD; horizontal dashed lines represent basal pre-anoxic levels; b and c: $n = 3$; d and e: $n = 6$.

transiently accelerates, the PR interval is prolonged, and the rate of recovery of QT decreased, clearly indicating that this range of temperature is critical for the return to normal rhythmicity (Sarre *et al.* 2006).

Acidosis (transition from pH 7.4 to 6.5), which can occur under prolonged anoxia, has negative chronotropic and inotropic effects, essentially characterized by intermittent atrial and ventricular activity (bursts). At pH 6.5, heart rate and AV conduction velocity remain significantly decreased, whereas ventricular shortening and contractility recover after 5 min. Under acidotic anoxia and during reoxygenation, inactivation of HCO_3^- -dependent mechanisms increases the incidence of arrhythmias. This indicates that in the anoxic–reoxygenated embryonic heart pH

regulation appears to depend predominantly on HCO_3^- availability and transport. The Na^+/H^+ exchange (NHE) appears to be protective only under anoxia (Meilzt *et al.* 1998).

Under normoxia, H_2O_2 differentially modulates ERK, p38 and JNK pathways in atria, ventricle and outflow tract (Gardier *et al.* 2010). Only exposure to a rather high concentration of H_2O_2 ($>500 \mu\text{M}$) leads to cardioplegia and markedly increased phosphorylation of ERK2 and p38 specifically in atria and outflow tract, without modifying the level of JNK phosphorylation. Moreover, during the post-anoxic reoxygenation, the phosphorylation level of ERK2 and p38 is altered specifically in the ventricle. During the early phase of post-anoxic reoxygenation, the Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway is activated by ROS, interacts with Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) proteins [(PI3K, Akt, Glycogen Synthase Kinase 3beta (GSK3beta)), Extracellular signal-Regulated Kinase 2 (ERK2)] and reduces arrhythmias (Pedretti & Raddatz 2011).

The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels are expressed very early during cardiogenesis and play an important role in the control of the rate of diastolic depolarization in pacemaker cells of atria, ventricle and outflow tract (Sarre *et al.* 2010). Inhibition of the HCN channels by ivabradine has a negative chronotropic effect in all these cardiac regions (characterized by a decreasing AV-conotruncal gradient of intrinsic beating rate) and stabilizes the PR interval under normoxia but does not alter the types and duration of arrhythmias during anoxia–reoxygenation.

Pharmacological opening of the mitochondrial KATP channel by diazoxide selectively improves recovery of the PR interval and ventricular E-C coupling during reoxygenation, via NO^- , ROS- and PKC-dependent pathways (Sarre *et al.* 2005) and reduces reoxygenation-induced JNK activity in the ventricle (Sarre *et al.* 2008). Furthermore, the open-state of the sarcolemmal L-Type Ca^{2+} channel, mitochondrial Ca^{2+} uniporter and mitochondrial KATP channel can be a major determinant of JNK activity and anoxia–reoxygenation-induced arrhythmias.

The TRPC1, 3, 4, 5, 6 and 7 isoforms of the voltage-insensitive transient receptor potential canonical (TRPC) channels are expressed in the heart of 4-day-old chick embryos and can form a macromolecular complex with the $\alpha_1\text{C}$ subunit of the L-type voltage-gated calcium channel (Cav1.2). Under normoxia, inhibition of TRPCs by SKF96365 leads to negative chronotropic, dromotropic and inotropic effects, prolongs QT interval and triggers Wenckebach phenomenon, clearly indicating that inactivation of these

channels is implicated in arrhythmias. Blockade of the TRPC3 isoform by Pyr3 affects AV conduction specifically, whereas inhibition of all TRPCs by SKF combined with that of Cav1.2 by nifedipine results in severe arrhythmias and finally in cardioplegia (Sabourin *et al.* 2011).

Proarrhythmic Ca²⁺ overload can result from Ca²⁺ entry through sarcolemmal voltage-dependent L-type and T-type Ca²⁺ channels (Cav1.2 and Cav3.1, respectively) and voltage-independent cation channels (TRPC), as well as Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum after anomalous activation of ryanodine receptor (RyR2) channels by ryanodine (Tentherey *et al.* 1998) and/or inhibition of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by thapsigargin (Sabourin *et al.* 2012). The L-type Ca²⁺ channel agonist Bay-K-8644 induces atrial tachycardia and tends to prolong arrhythmias during reoxygenation (Bruchez *et al.* 2008). ROS and reactive nitrogen species (RNS) are known to alter the redox state and increase activity of RyR2 leading to a potentially proarrhythmic Ca²⁺ release. Pharmacological opening of RyR channels with ryanodine (10 nM) triggers severe arrhythmias (mainly bursting activity) under normoxia and during anoxia and reoxygenation, whereas verapamil (10 nM), an antagonist of L-type Ca²⁺ channel at this concentration, affords protection against reoxygenation-induced arrhythmias (Tentherey *et al.* 1998). Furthermore, relative to the Cav3.1 channel (T-type), the Cav1.2 channel (L-type) plays a major role in spontaneous electrical activity of the embryonic chick heart. Indeed, inhibition of Cav1.2 with nifedipine induces a progressive and significant shortening of QT and prolongs the ventricular electromechanical delay, whereas specific inhibition of Cav3.1 with mibefradil has only a slight effect (Sabourin *et al.* 2011).

Adenosine is a crucial regulator of the developing cardiovascular system, derives from intra- and extracellular ATP degradation and accumulates in the myocardial interstitial fluid under hypoxia or ischaemia. In the embryonic heart, developing normally in an environment poor in oxygen, the physiological concentration of ADO is much higher than in the adult normoxic heart and ADO metabolism relies on ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (CD39), ecto-5'-nucleotidase (CD73), adenosine kinase (AdK) and ADO deaminase (ADA). CD39 and CD73 sequentially convert ATP to ADO and ADA convert ADO into inosine (INO). ADO is transported by equilibrative (ENT1,3,4) or concentrative (CNT3) transporters and interacts with the four subtypes of ADO receptors (AR), A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR and A₃AR (Robin *et al.* 2011, 2013). ADO or A₁AR activation transiently provokes bradycardia, second-degree AVB and Mobitz type I second-degree AVB

(Wenckebach phenomenon). These transient pacemaking and AV conduction disturbances are induced by A₁AR activation through concomitant stimulation of NADPH oxidase and phospholipase C (PLC), followed by downstream ROS-dependent activation of ERK2 and ROS-independent activation of PKC with Cav1.2 channel as a possible target (Robin *et al.* 2011). Furthermore, A₁AR activation mediates also a proarrhythmic Ca²⁺ entry through the TRPC3 channel functioning as a receptor-operated channel, via the stimulation of the PLC/DAG/PKC cascade in atrial and ventricular cardiomyocytes (Sabourin *et al.* 2012). Inactivation of ENTs (i) increases myocardial ADO level, (ii) provokes atrial ectopy and AVB, (iii) prolongs P wave and QT interval and (iv) increases ERK2 phosphorylation. Inhibition of CD73, MEK/ERK pathway or A₁AR prevents these arrhythmias. Exposure to INO also causes arrhythmias associated with AVB and ERK2 phosphorylation, which are prevented by A₁AR or A_{2A}AR antagonists exclusively or by MEK/ERK inhibitor. Thus, disturbances of nucleoside metabolism and transport can lead to interstitial accumulation of ADO and INO and provoke arrhythmias in an autocrine/paracrine manner through A₁AR and A_{2A}AR stimulation and ERK2 activation (Robin *et al.* 2013).

Pathogenesis of autoimmunity-caused congenital heart block

It is well recognized that maternal antibodies causing lupus pass the placenta and can induce prenatal or congenital heart block (CHB, reviewed in (Buyon & Clancy 2003)). Current understanding of its pathogenesis was obtained from animal models that were instrumental in revealing its mechanisms. It is believed that the foetal cardiomyocytes undergoing apoptosis such as those in the AV canal (Cheng *et al.* 2002) expose the originally intracellular Ro and La antigens to their surface, where they can be bound by circulating maternal autoantibodies (anti-SSA/Ro-SSB/La). The macrophages then phagocytose these 'opsonized' cells, leading to the secretion of pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines, leading to fibrosis (which does not normally occur during prenatal tissue healing), differentiation of myofibroblasts and scarring. This overshoots the normal process of reduction of the originally broad myocardial connection between the atria and ventricles to His bundle and leads in extreme cases to a complete ventricular block. More recent studies (Kamel *et al.* 2007) linked the AV bundle and sinoatrial node dysplasia in autoimmune lupus to antiserotonin (5-HT₄) receptor antibodies in mice.

One of the problems with analysing this human disease is its incomplete penetrance and far from 100%

recurrence rate in the same mother. Some of these features also complicate the murine models of lupus erythematosus, where the frequency of CHB is low as well (Suzuki *et al.* 2005). The authors' assessment of heart block incidence in murine maternal lupus models by measuring AV conduction in neonatal offspring is potentially confounded by loss by death *in utero* of the most severely affected fetuses. However, prenatal embryonic Doppler echocardiography employed in mice immunized with 60 kDa Ro, 48 kDa La or recombinant calreticulin autoantigens revealed a significant decrease in foetal heart rate and 18% incidence of lower degrees of AV block in all groups relative to controls from ED13. However, the number of pups born with an overt block was lower. This shows that a lot of potentially significant events that may even lead to foetal demise, such as foetal bradycardia and temporary conduction deficits, could be missed if one concentrates only on postnatal stages.

Qu *et al.* (2001) identified L-type calcium channel as a potential target for maternal antibodies inducing CHB in the foetus. *In vitro* studies showed the binding of these antibodies to the sarcolemma and *in vivo* demonstrated lower channel density in myocytes isolated from neonatal mice born to immunized dams. Deletion of the neuroendocrine α_1D Ca channel in mice resulted in significant sinus bradycardia and AV block, a phenotype reminiscent to that seen in CHB. Another study by this group (Qu *et al.* 2005) confirmed expression of the α_1D Ca channel in human foetal heart, showed the inhibitory effect of anti-Ro/La antibodies on this channel and direct cross-reactivity with this protein. This inhibition was rescued by a Ca channel activator, Bay K8644, opening a potential therapeutic avenue in this disease.

Conclusions

Despite recent advances in developmental cardiology, foetal medicine and genomics, little is known regarding the dysfunction of the developing human heart. This review shows the importance of the correct detection, characterization and diagnosis of cardiac rhythm disturbances as early as possible during *in utero* life. Experimental and transgenic animal models (e.g. sheep, mouse, chick and zebrafish) can help to decipher the cellular and molecular mechanisms underlying embryonic and foetal arrhythmias and assist in the identification of novel therapeutic targets. Such approaches also allow the investigation of the potentially deleterious short- and long-term effects of early intra-uterine stress-, drug- and mutation-induced cardiac dysrhythmias. Research in this field provides complementary scientific data to make possible the treatment of the « foetal patient » before their birth,

limiting possible detrimental consequences in adulthood.

Conflict of interests

None.

We would like to thank the reviewers for their helpful comments on this manuscript and Prof. Robert G. Gourdie for final language editing. This work was supported by Ministry of Education PRVOUK P35/LF1/5, institutional RVO: 67985823 (DS), Grant Agency of the Czech Republic P302/11/1308 and 13-12412S to DS, and Swiss National Science Foundation Grants 3100A0-105901 and 310030-127633 to ER.

References

- 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**, 1267–1274.
- Ammirabile, G., Tessari, A., Pignataro, V., Szumska, D., Sardo, F.S., 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.
- Azarbayjani, F. & Danielsson, B.R. 2002. Embryonic arrhythmia by inhibition of HERG channels: a common hypoxia-related teratogenic mechanism for antiepileptic drugs? *Epilepsia* **43**, 457–468.
- Baker, C., Taylor, D.G., Osuala, K., Natarajan, A., Molnar, P.J., Hickman, J., Alam, S., Moscato, B., Weinschenker, 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**, 536–541.
- 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**, 1465–1469.
- Blaschke, R.J., Hahurij, N.D., Kuijper, S., Just, S., Wisse, L.J., Deissler, K., Maxelon, T., Anastasiadis, K., Spitzer, J., Hardt, S.E. *et al.* 2007. Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor *Shox2* in sinoatrial and pacemaker development. *Circulation* **115**, 1830–1838.
- Boucek, R.J., Murphy, W.P. Jr & Paff, G.H. 1959. Electrical and mechanical properties of chick embryo heart chambers. *Circ Res* **7**, 787–793.
- Braunwald, E., Zipes, D.P. & Libbt, 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**, 744–748.
- Brucato, A., Frassi, M., Franceschini, F., Cimaz, R., Faden, D., Pisoni, M.P., Muscara, M., Vignati, G., Stramba-Badiale, M., Catelli, L. *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**, 1832–1835.
- Bruchez, P., Sarre, A., Kappenberger, L. & Raddatz, E. 2008. The L-Type Ca⁺ and KATP channels may contribute to pacing-induced protection against anoxia-reoxygenation in the embryonic heart model. *J Cardiovasc Electrophysiol* **19**, 1196–1202.
- Buyon, J.P. & Clancy, R.M. 2003. Neonatal lupus: review of proposed pathogenesis and clinical data from the US-based Research Registry for Neonatal Lupus. *Autoimmunity* **36**, 41–50.
- Chen, F., De Diego, C., Xie, L.H., Yang, J.H., Klitzner, T.S. & Weiss, J.N. 2007. Effects of metabolic inhibition on conduction, Ca transients, and arrhythmia vulnerability in embryonic mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H2472–H2478.
- 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**, 1941–1949.
- Cheng, G., Wessels, A., Gourdie, R.G. & Thompson, R.P. 2002. Spatiotemporal distribution of apoptosis in embryonic chicken heart. *Dev Dyn* **223**, 119–133.
- 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**, 470–476.
- Clark, E.B., Hu, N. & Dooley, J.B. 1985. The effect of isoproterenol on cardiovascular function in the stage 24 chick embryo. *Teratology* **31**, 41–47.
- 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–H171.
- 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**, 813–817; discussion 17–9.
- 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**, 271–281.
- 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.
- 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. *et al.* 2014. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **129**, 2183–2242.
- 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**, 835–837.
- Eronen, M. 1997. Outcome of fetuses with heart disease diagnosed *in utero*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **77**, F41–F46.
- 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 USA* **109**, E154–E163.
- 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**, 1102–1106.
- Gardier, S., Pedretti, S., Sarre, A. & Raddatz, E. 2010. Transient anoxia and oxyradicals induce a region-specific activation of MAPKs in the embryonic heart. *Mol Cell Biochem* **340**, 239–247.
- 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**, 3187–3192.
- 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 USA* **95**, 6815–6818.
- 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* **69C**, 46–57.
- 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–H1300.
- 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**, 581–592.
- 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. & Yada, T. 1985. Early events in development of electrical activity and contraction in embryonic rat heart assessed by optical recording. *J Physiol* **369**, 209–227.
- 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**, 711–728.
- 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**, 1098–1112.
- Huhta, J.C. 2005. Fetal congestive heart failure. *Semin Fetal Neonatal Med* **10**, 542–552.
- 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 USA* **93**, 12974–12979.
- Jaeggi, E.T. & Nii, M. 2005. Fetal brady- and tachyarrhythmias: new and accepted diagnostic and treatment methods. *Semin Fetal Neonatal Med* **10**, 504–514.
- 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**, 1487–1492.
- Jay, P.Y., Harris, B.S., Maguire, C.T., Buerger, A., Wakimoto, H., Tanaka, M., Kupersmidt, S., Roden, D.M., Schultheiss, T.M., O'Brien, T.X., Gourdie, R.G., Berul, C.I. & Izumo, S. 2004. Nk2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *J Clin Invest* **113**, 1130–1137.
- Jerome, L.A. & Papaioannou, V.E. 2001. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet* **27**, 286–291.
- 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**, 349–355.
- Kamel, R., Garcia, S., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R., Muller, S., Hoebek, J. & Eftekhari, P. 2007. Immunomodulation by maternal autoantibodies of the fetal serotonergic 5-HT₄ receptor and its consequences in early BALB/c mouse embryonic development. *BMC Dev Biol* **7**, 34.
- Karppinen, S., Rapila, R., Makikallio, K., Hanninen, S.L., Rysa, J., Vuolteenaho, O. & Tavi, P. 2013. Endothelin-1 signalling controls early embryonic heart rate *in vitro* and *in vivo*. *Acta Physiol (Oxf)* **210**, 369–380.
- 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**, 124–133.
- 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–H902.
- 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.
- 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 fibrosis and persistence of accessory pathways. *Circulation* **117**, 1508–1517.
- 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**, 1001–1008.
- 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**, 1025–1030.
- 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**, 3867–3875.
- 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.
- 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**, 661–668.
- Maurer, M. Jr 1979. Developmental factors contributing to the susceptibility to bradycardia in isolated, cultured fetal mouse hearts. *Pediatr Res* **13**, 1052–1057.
- Maury, P., Sarre, A., Terrand, J., Rosa, A., Kucera, P., Kappenberger, L. & Raddatz, E. 2004. Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide. *Mol Cell Biochem* **265**, 141–149.
- 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, 327–335.
- 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, 2688–2695.
- 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 Nk2-5 Are Required for the Formation and Identity of the Pulmonary Myocardium. *Circ Res* 101, 902–909.
- 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, 354–362.
- 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.
- 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, 4107–4116.
- 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, 1187–1199.
- 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, 5730–5733.
- 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, 1831–1837.
- Nomura-Kitabayashi, A., Phoon, C.K.L., 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–H1628.
- Paff, G.H. & Boucek, R.J. 1975. Conal contribution to the electrocardiogram of chick embryo hearts. *Anat Rec* 182, 169–173.
- Paff, G.H., Boucek, R.J. & Klopfenstein, H.S. 1964. Experimental heart block in the chick embryo. *Anat Rec* 149, 217–224.
- Paff, G.H., Boucek, R.J. & Harrell, T.C. 1968. Observations on the development of the electrocardiogram. *Anat Rec* 160, 575–582.
- Pedra, S.R., Smallhorn, J.F., Ryan, G., Chitayat, D., Taylor, G.P., Khan, R., Abdoell, M. & Hornberger, L.K. 2002. Fetal cardiomyopathies: pathogenic mechanisms, hemodynamic findings, and clinical outcome. *Circulation* 106, 585–591.
- Pedretti, S. & Raddatz, E. 2011. STAT3alpha interacts with nuclear GSK3beta and cytoplasmic RISK pathway and stabilizes rhythm in the anoxic-reoxygenated embryonic heart. *Basic Res Cardiol* 106, 355–369.
- 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–H916.
- 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, 92–99.
- Qu, Y., Xiao, G.Q., Chen, L. & Boutjdir, M. 2001. Autoantibodies from mothers of children with congenital heart block downregulate cardiac L-type Ca channels. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1153–1163.
- Qu, Y., Baroudi, G., Yue, Y. & Boutjdir, M. 2005. Novel molecular mechanism involving alpha1D (Cav1.3) L-type calcium channel in autoimmune-associated sinus bradycardia. *Circulation* 111, 3034–3041.
- 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–H835.
- 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, 385–392.
- 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.
- Reed, K.L., Appleton, C.P., Anderson, C.F., Shenker, L. & Sahn, D.J. 1990. Doppler studies of vena cava flows in human fetuses. Insights into normal and abnormal cardiac physiology. *Circulation* 81, 498–505.
- 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, 436–438.
- 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 USA* 99, 10464–10469.
- 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 atrioventricu-

- lar conduction and the formation of accessory pathways. *J Clin Invest* 121, 525–533.
- 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, 945–954.
- Robin, E., Sabourin, J., Marcillac, F. & Raddatz, E. 2013. Involvement of CD73, equilibrative nucleoside transporters and inosine in rhythm and conduction disturbances mediated by adenosine A1 and A2A receptors in the developing heart. *J Mol Cell Cardiol* 63, 14–25.
- 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, 226–236.
- Sabourin, J., Antigny, F., Robin, E., Frieden, M. & Raddatz, E. 2012. Activation of transient receptor potential canonical 3 (TRPC3)-mediated Ca²⁺ entry by A1 adenosine receptor in cardiomyocytes disturbs atrioventricular conduction. *J Biol Chem* 287, 26688–26701.
- 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–H1576.
- 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, 469–479.
- 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–H1619.
- 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, 1350–1359.
- Sarre, A., Gardier, S., Maurer, F., Bonny, C. & Raddatz, E. 2008. Modulation of the c-Jun N-terminal kinase activity in the embryonic heart in response to anoxia-reoxygenation: involvement of the Ca²⁺ and mitoKATP channels. *Mol Cell Biochem* 313, 133–138.
- 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.
- 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, 1360–1366.
- 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, 105–119.
- Sedmera, D., Kucera, P. & Raddatz, E. 2002. Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R379–R388.
- 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–H1652.
- 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, 1746–1753.
- 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.
- Simpson, J.M. & Sharland, G.K. 1998. Fetal tachycardias: management and outcome of 127 consecutive cases. *Heart* 79, 576–581.
- 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, 520–525.
- Srinivasan, S. & Strasburger, J. 2008. Overview of fetal arrhythmias. *Curr Opin Pediatr* 20, 522–531.
- Stewart, P.A., Tonge, H.M. & Wladimiroff, J.W. 1983. Arrhythmia and structural abnormalities of the fetal heart. *Br Heart J* 50, 550–554.
- Strasburger, J.F. & Wakai, R.T. 2010. Fetal cardiac arrhythmia detection and *in utero* therapy. *Nat Rev Cardiol* 7, 277–290.
- Strasburger, J.F., Cheulkar, B. & Wakai, R.T. 2008. Magnetocardiography for fetal arrhythmias. *Heart Rhythm* 5, 1073–1076.
- 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 vivo* on the 16th day of incubation. *Toxicol Appl Pharmacol* 138, 262–267.
- Suzuki, H., Silverman, E.D., Wu, X., Borges, C., Zhao, S., Isacovics, B. & Hamilton, R.M. 2005. Effect of maternal autoantibodies on fetal cardiac conduction: an experimental murine model. *Pediatr Res* 57, 557–562.
- 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, 3523–3532.
- 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, 478–483.
- 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.
- Terrand, J., Felley-Bosco, E., Courjault-Gautier, F., Rochat, A.C., Kucera, P. & Raddatz, E. 2003. Postanoxic func-

- tional recovery of the developing heart is slightly altered by endogenous or exogenous nitric oxide. *Mol Cell Biochem* **252**, 53–63.
- 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**, 766–773.
- 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**, 543–549.
- Van Mierop, L.H. 1967. Location of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heartbeat. *Am J Physiol* **212**, 407–415.
- 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**, 261–269.
- Wakimoto, K., Kobayashi, K., Kuro, O.M., Yao, A., Iwamoto, T., Yanaka, N., Kita, S., Nishida, A., Azuma, S., Toyoda, Y. *et al.* 2000. Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat. *J Biol Chem* **275**, 36991–36998.
- Zhang, S.S., Kim, K.H., Rosen, A., Smyth, J.W., Sakuma, R., Delgado-Olguin, P., Davis, M., Chi, N.C., Puviondran, V., Gaborit, N. *et al.* 2011. Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 13576–13581.
- Zhao, H., Strasburger, J.F., Cuneo, B.F. & Wakai, R.T. 2006. Fetal cardiac repolarization abnormalities. *Am J Cardiol* **98**, 491–496.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Movie S1. Example of atrioventricular re-entry in ED4 isolated chick embryonic heart visualized by optical mapping of calcium transients.

Acute temperature effects on function of the chick embryonic heart

F. Vostarek,^{1,2} J. Svatunkova¹ and D. Sedmera^{1,3}

¹ Czech Academy of Sciences, Institute of Physiology, Prague, Czech Republic

² Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

³ First Faculty of Medicine, Institute of Anatomy, Charles University, Prague, Czech Republic

Received 22 December 2015,
revision requested 22 January
2016,
revision received 11 April 2016,
accepted 12 April 2016
Correspondence: D. Sedmera,
Czech Academy of Sciences,
Institute of Physiology, Videnska
1083, 14220 Prague 4, Czech
Republic.
E-mail: dsedmera@biomed.cas.cz

Abstract

Aim: We analysed the effects of acute temperature change on the beating rate, conduction properties and calcium transients in the chick embryonic heart *in vitro* and *in ovo*.

Methods: The effects of temperature change (34, 37 and 40 °C) on calcium dynamics in isolated ED4 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 stimulation experiments were performed *in vitro* and *in ovo* to uncover conduction limits of heart segments.

Results: Decrease in temperature from 37 to 34 °C *in vitro* led to a 22% drop in heart rate and unchanged amplitude of Ca²⁺ transients, compared to a 25% heart rate decrease *in ovo*. Increase in temperature from 37 to 40 °C *in vitro* and *in ovo* led to 20 and 23% increases in heart rate, respectively, and a significant decrease in amplitude of Ca²⁺ transients (atrium –35%, ventricle –38%). We observed a wide spectrum of arrhythmias *in vitro*, of which the most common was atrioventricular (AV) block (57%). There was variability of AV block locations. 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.

Conclusion: The pacemaker and AV canal are the most temperature-sensitive segments of the embryonic heart. We suggest that the critical point for conduction is the connection of the ventricular trabecular network to the AV canal.

Keywords arrhythmias, calcium imaging, chick embryo, conduction block, heart development, optical mapping.

The function of the embryonic heart is strongly affected by temperature. The temperature changes affect the kinetics of ion channels, pumps and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. Changes in the kinetics of these channels are crucial for the generation and propagation of electrical activation through the embryonic heart (Sperelakis & Lehmkuhl 1967, Chen & DeHaan 1993).

Despite homoeothermy, the avian embryo retains some flexibility from its poikilothermic ancestors and

tolerates (within limits) variations in incubation temperature. The effects of temperature on developing chick embryonic heart have been extensively studied. One of the most striking findings is the effect of long-lasting hypothermia (32–36 °C), which causes cardiac hypertrophy (Warbanow 1970). These changes are accompanied by increased contractility of embryonic hearts (Warbanow 1971). Another study focused on hypothermia tests haemodynamic effects of environmental hypothermia in the stage 21

(Hamburger & Hamilton 1951) embryo. Cooling from 34.7 to 31.1 °C causes a significant decrease in heart rate by about 25%, increased vascular resistance and decrease in blood pressure and blood flow. This bradycardic response is independent of functional autonomic innervation (Nakazawa *et al.* 1985). A recent study at stage 17 shows that hypothermia is associated with bradycardia and a decrease in the peak velocity of blood during systole (Lee *et al.* 2011). The effects of environmental hyperthermia (37–40 °C) cause an increase in the heart rate by about 22% at stage 21, without changes in stroke volume (flow/rate). This study also shows a significant increase in the basal heart rate during development from stage 18 to stage 24 (Nakazawa *et al.* 1986). The long-term consequences of periods of hypothermia (31–36 °C) and hyperthermia (38–42 °C) show teratogenic and lethal effects on the chick embryo (Peterka *et al.* 1996).

An *in vitro* hypothermia-rewarming study by Sarre and colleagues shows dramatic changes in heart rate during cooling from 37 to 0 °C and subsequent rewarming to 37 °C in isolated chick embryonic hearts at stage 24. The hearts stopped beating in deep hypothermia at the critical temperature of 18 °C, and they resumed beating at the same temperature during rewarming. Changes in heart rate remained linear in the range between 34 and 37 °C (Sarre *et al.* 2006). The most recent study shows acute temperature effects on *ex vivo* zebrafish hearts studied by optical mapping, in the range from 18 to 28 °C. Cooling to 18 °C decreases heart rate by about 40% and increases atrial and ventricular APD₅₀ by factors 3 and 2 respectively. It shows that the atrial APD is the most severely affected AP parameter by an acute temperature change (Lin *et al.* 2014) and that this property is conserved among vertebrates. The action potentials of atrium, atrioventricular (AV) canal, ventricle and outflow tract differ in duration – APD₉₀. The longest APD₉₀ occurs in the AV canal. Arguello *et al.* (1986) suggested that prolonged APD₉₀ in AV canal region was caused by longer predominance of Ca²⁺ and slow Na⁺ current dependence during development, as compared to atrial or ventricular cells.

Early cardiac rhythmicity is critically dependent on intracellular dynamics of calcium ions. Calcium handling is regulated by calcium ion channels, receptors, ATPases and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX; Bers 1991), and its kinetics is strongly influenced by temperature. Embryonic cardiac rhythmicity is maintained by pacemaker cells from the developing sinoatrial node located at the inflow portion of the heart (Kamino *et al.* 1981). The pacemaker potential is generated by a specific set of ion channels. Spontaneous depolarization is initiated mainly by the funny current

(I_f) or ‘pacemaker’ current, via the HCN channels (Na⁺, K⁺ currents) (DiFrancesco 1993, Moroni *et al.* 2001). A significant role during early depolarization is played also by influx of positive charges, known as the I_{NCX} during forward mode (3Na⁺ in, 1Ca²⁺ out) of sodium–calcium exchanger – NCX (Haddock *et al.* 1997).

We analysed the acute effects of temperature change on electrical activity of the chick embryonic heart using *in vitro* high-speed calcium imaging. We hypothesized that temperature-dependent arrhythmias, in particular AV blocks, are due to a particular sensitivity of the AV canal to relative hypoxia. The main goal of this study was to observe changes in calcium transient dynamics as a basis for contractility and also to analyse defects in conduction through activation maps with high spatio-temporal resolution. We also performed videomicroscopy *in ovo* to compare *in vitro* temperature effects on the pacemaker *per se* with the effects on the whole embryo, in which the working heart is coupled to the vascular system.

Materials and methods

Experimental model

White Leghorn chicken eggs (Institute of Molecular Genetics, Kolec, Czech Republic) were stored at 16 °C prior to incubation. The eggs were incubated at 37.5 ± 0.5 °C in a humidified incubator until ED4 (HH stage 21–23, Hamburger & Hamilton 1951). Chick embryos were removed from the eggs and placed into Tyrode’s solution (composition: NaCl 145 mmol L⁻¹, KCl 5.9 mmol L⁻¹, CaCl₂ 1.1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 1.2 mmol L⁻¹, glucose 11 mmol L⁻¹, HEPES 5 mmol L⁻¹; pH = 7.4). Hearts were isolated from the embryos and stained in 2.5 mL Rhod-2 (1.78 mM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in Tyrode’s solution for 1 h in the dark at room temperature. The hearts were then incubated in 2.5 mL Tyrode’s solution for 1 h in the dark at 38 °C to de-esterify the dye loaded to the myocytes, according to manufacturer’s instructions.

Optical mapping

The two-dimensional optical mapping system for embryonic hearts has been described in detail previously (Tamaddon *et al.* 2000, Rentschler *et al.* 2001). Optical calcium imaging of chick embryonic hearts was based on an established set-up (Valderrabano *et al.* 2006). We used the calcium-sensitive dye Rhod-2 with a modified set-up (Vostarek *et al.* 2014). Stained hearts were placed into a tissue bath containing 2 mL of Tyrode’s solution with 0.15 μM

blebbistatin to reduce movement (Fedorov *et al.* 2007). Temperature in the glass-bottomed Petri dish (Wilco Wells, Amsterdam, the Netherlands) was maintained by a temperature-controlled stage (Linkam DC-60, Tadworth, UK). An inverted epifluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S, Tokyo, Japan) fitted with a high-speed EM-CCD camera (Andor iXon3; Andor, Belfast, UK) was used to monitor changes in intracellular calcium concentration – visualized as changes of fluorescence over time under hypothermia (34 °C), normothermia (controls, 37 °C) and hyperthermia (40 °C). Two measurements were performed on each heart after 5 min of stabilization at different temperatures (37 and 34 °C – cooling, 34 and 37 °C – warming, 37 and 40 °C – warming). This temperature range represents the physiological range, compatible with long-term embryonic survival.

Data analysis

The obtained data were analysed by NIS ELEMENTS software (Nikon, Tokyo, Japan) and BV_ANA Analysis software (SciMedia Ltd, Costa Mesa, CA, USA). Heart rate was established from counts of calcium transients in the atrium during the 6-s interval (NIS ELEMENTS). Amplitudes of calcium transients in atrium and ventricle were analysed using NIS ELEMENTS tools. The start of the calcium transient was established as a point of beginning of the upstroke from baseline. Amplitudes were measured as the height from baseline to the peak. APD₉₀ values were obtained from calcium transient recordings from atrium, AV canal and ventricle of normothermic hearts ($n = 10$), with recordings free from motion artefacts or arrhythmias. Spatiotemporal activation maps were constructed from raw data from NIS ELEMENTS using BV_ANA Analysis software. Data were filtered by high pass/low pass and median filters. The first derivative was calculated as described previously (Nanka *et al.* 2008, Sankova *et al.* 2010). Its peak was used to mark the time of activation of each pixel.

Videomicroscopy

ED4 chick embryos incubated *in ovo* were studied by videomicroscopy to measure changes in heart rate under different temperature conditions. The first measurement was performed at 34 °C, the second at 37 °C and the third at 40 °C. The embryos *in ovo* were maintained at set temperature using a custom-made styrofoam-insulated metal container filled with pre-heated Bath Armor pellets placed on a Torrey Pines Scientific chilling/heating plate. Ten-second movies were recorded for each temperature with a Nikon D7000 camera (640 × 480 px, 30 fps) mounted on a

Leica 125 dissecting microscope; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany with a 150 W halogen light source fitted with a green interference filter to enhance contrast of blood. Data analysis was performed using IMAGEJ software; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Two regions of interest were selected on atrium and ventricle, respectively, and heart rate values were obtained by the measurement of changes in grey-scale levels in time during blood flow (Sedmera *et al.* 1999, Kockova *et al.* 2013).

Electrical stimulation in ovo

Atrial and ventricular pacing was performed in ED4 chick embryonic hearts after spontaneous rhythm recordings were obtained. A platinum bipolar electrode was positioned over the atrium using a Narishige micromanipulator; Narishige International USA, Inc., Amityville, NY, USA. The heart was stimulated in overdrive mode at a gradually increasing/decreasing rate (from 120 to 600 beats min⁻¹), with 2-ms pulses twice the diastolic threshold, which was between 1.5 and 2.5 mA (Sedmera *et al.* 2003). The pacing frequency at which conduction disturbances appeared was considered the limit of sustainable conduction rate. Video recordings were obtained and analysed as described above.

Electrical stimulation in vitro (voltage recordings)

Chick ED4 embryonic hearts were isolated with a piece of adjacent body wall to allow for fixation to the dish bottom. Hearts were stained in 500 µL of voltage-sensitive dye di-4-ANEPPS (2.5 mM; Invitrogen) for 5 min. They were then briefly rinsed and pinned face-up in a custom-made oxygenated tissue bath containing 20 mL of Tyrode's solution with added 0.1 µM blebbistatin to reduce movement. Atrial and ventricular pacing was performed by a platinum bipolar electrode, which was positioned over the atrium or ventricle using a Narishige micromanipulator. The hearts were stimulated in overdrive mode at varying rates (atrium from 200 up to 400 beats min⁻¹ and ventricle from 300 up to 600 beats min⁻¹) to uncover capture and conduction limits. Data acquisition and analysis were performed using the Ultima L high-speed camera; SciMedia Ltd, Costa Mesa, CA, USA and bundled software as described recently (Sankova *et al.* 2010).

Statistical analysis

The data from optical mapping were divided into two groups according to the temperature: hypothermia group (37 and 34 °C) and hyperthermia group (37 and 40 °C). Each group included at least 45 hearts,

and significance of difference was tested by two-tailed Student's paired *t*-test. The occurrence of third-degree AV block in the three groups, hypothermia, normothermia and hyperthermia hearts, was tested by Pearson's chi-square test. The number of hearts analysed *in ovo* was 19, and each heart was tested at all three temperatures. In all cases, values are presented as mean \pm SD, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Experiments *in vitro*

Changes in calcium transients dynamics. Electrical activity of the chick embryonic hearts (monitored by calcium optical imaging) was strongly affected by acute temperature changes. The most striking was modulation of sinus rhythm frequency. We tested the acute effects in three temperatures. We set 37 °C as a default (baseline *in vitro*) temperature – normothermia, hypothermia at 34 °C and hyperthermia at 40 °C. We observed a nearly linear dependence of the sinus rhythm on temperature under these conditions. The rhythm changed by approx. 20% in hypothermia ($P < 0.001$) and hyperthermia ($P < 0.001$), in comparison with normothermia (Fig. 1).

We then focused on changes in amplitude of the calcium transients. The acceleration of heart rate

during hyperthermia caused a significant decrease in calcium transient amplitude in both the atrium and ventricle (Fig. 1d), while no significant changes were observed during hypothermia (Fig. 1b).

We also observed a wide spectrum of rhythm disturbances (for examples, see Supplemental Video S1). These arrhythmias were divided into two main groups.

Defects in rhythm generation – direct influence on the pacemaker. Defects in generation of electrical impulse represented 28% of all arrhythmias. Most common were atrial extrasystoles and sinus pauses (missed beats), which together represented 22% of all observed arrhythmias (Table 1). Atrial extrasystoles and sinus pauses were two times more frequent during hyperthermia than in the normothermia group, while almost none were found in hypothermia. Complete cardiac arrest developed only in three of the 99 hearts analysed. We also uncovered junction rhythm activity in the AV canal in two cases during hyperthermia, at considerably high firing rates (160 and 180 beats min^{-1}).

Defects in impulse propagation. This phenomenon was observed most frequently during hyperthermia, less commonly during normothermia, and was observed only as a few conduction blocks during hypothermia. Defects in impulse propagation

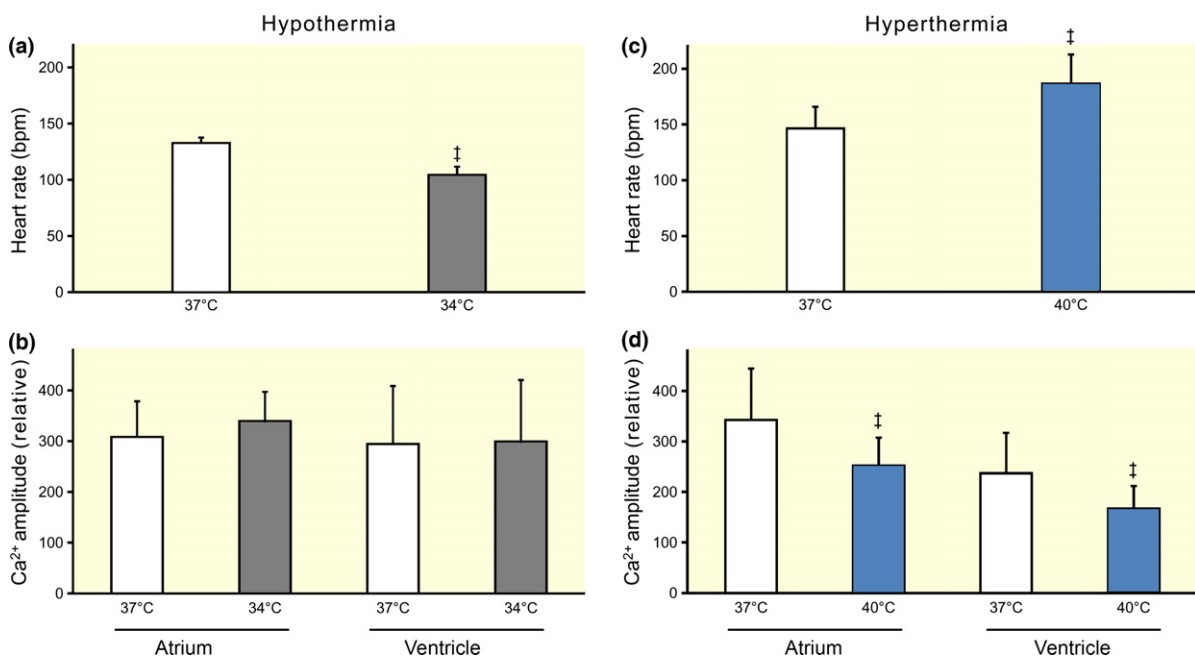


Figure 1 Effects of acute temperature changes on heart rate and amplitudes of Ca²⁺ transients in ED4 chick embryonic heart *in vitro*. (a) Decrease in temperature from 37 to 34 °C led *in vitro* to a 22% drop of intrinsic heart rate ($n = 45$). (b) Hypothermia caused no significant changes in amplitude of Ca²⁺ transients ($n = 45$). (c) Increase in temperature from 37 to 40 °C led *in vitro* to a 20% acceleration of intrinsic heart rate ($n = 54$). (d) Hyperthermia caused a significant decrease in the amplitude of Ca²⁺ transients ($n = 54$, atrium -35% , ventricle -38% , mean \pm SD, † $P < 0.001$).

Table 1 Arrhythmias observed in ED4 chick embryonic hearts *in vitro*. Complete spectrum of observed arrhythmias in hypothermia, normothermia and hyperthermia (total number of observed arrhythmias = 106)

Type of arrhythmia	Occurrence (%)
Complete cardiac arrest	3
Atrial extrasystoles	10
Sinus pauses	12
Junction rhythm	2
Atrial block	3
Second-degree AV block	22
Third-degree AV block	35
Mid-ventricular block	2
Ventriculo-conotruncal block	8
AV re-entry	3
Total	100

AV, atrioventricular.

represented 72% of all observed arrhythmias ($n = 106$, Table 1). In three cases, conduction blocks were observed in conduction through the atrium (atrial block), in two cases in the middle of the ventricle (mid-ventricular block) and in 8% of cases ($n = 106$ observed arrhythmias) at the boundary between the ventricle and outflow tract (ventriculo-conotruncal block). Our attention was especially focused on conduction in the AV canal. Development of conduction blocks in the AV canal (second- or third-degree AV block) presented 57% of all observed arrhythmias. The most common defect was a complete AV block, which developed in one case during hypothermia ($n = 45$ hearts, Pearson's chi-square test $P < 0.03$), in 15% of cases in normothermia (stabilization, $n = 99$ hearts) and 39% in hyperthermia ($n = 54$ hearts, Pearson's chi-square test $P < 0.001$). Third-degree AV block represented 35% of all observed arrhythmias ($n = 106$). The second most common defect was second-degree AV block (22% of all arrhythmias), which developed in 11% of cases during hypothermia ($n = 45$), in 10% of cases in normothermia (stabilization, $n = 99$) and 14% in hyperthermia ($n = 54$). The most common was an intermittent second-degree AV block in 65% of second-degree AV blocks, Wenckebach phenomenon represented 30% of second-degree AV blocks, and Mobitz II was observed only in one case. Occasionally, we noted rare arrhythmias such as AV re-entry, but only in three cases of the 106 arrhythmias observed (Table 1).

Locations of AV blocks – optical activation maps. Optical mapping allowed us to focus specifically on the localization of third-degree AV blocks.

Activation maps were created from calcium data in BV_ANA Analysis software. Comparison of standard conduction in normothermia and various types of the third-degree AV block is shown in Figure 2. The locations of block were variable within the AV canal. In 59% of cases, the conduction stopped uniformly across the AV canal. In the remaining 41% of cases, we observed a different AV block pattern, wherein conduction stopped either at the inner curvature or at the AV canal–ventricular boundary, along the outer curvature (Fig. 2f). The most critical part of the AV canal was the distal region at the boundary of the ventricle. The distal region of AV canal developed 53% of AV blocks. By contrast, the proximal AV region developed 37% of blocks and conduction stopped in the middle part of the AV canal in the remaining 10% of blocks.

In ovo experiments

We decided to compare the *in vitro* findings with an *in ovo* experiment that included vascular coupling. We studied acute temperature effects *in ovo* by videomicroscopy ($n = 19$ hearts). The experimental temperatures were chosen in the same range as the *in vitro* studies. We obtained heart rates 120 ± 11 beats min^{-1} in hypothermia, 160 ± 21 beats min^{-1} in normothermia and 197 ± 27 beats min^{-1} in hyperthermia. Increase in temperature from 34 to 37 °C leads to a 25% change of baseline heart rate and increase from 37 to 40 °C lead to 23% acceleration *in ovo* ($P < 0.001$). This dependence of heart rate on temperature was almost linear ($R^2 = 0.999$) and corresponded well with the *in vitro* findings.

We also observed rhythm disturbances, which developed in some embryos during hyperthermia. The most frequent were sinus pauses. On occasion, second-degree AV block developed (see Fig. 3). Third-degree AV block was not observed.

Electrical stimulation of the atrium and ventricle. We hypothesized that third-degree AV blocks found *in vitro* were caused by relative tissue hypoxia, which most profoundly affects conduction through the AV canal (Tran *et al.* 1996, Sedmera *et al.* 2002). To test this hypothesis, we measured the ability of the AV canal to propagate high frequencies induced by electrical stimulation from the atrium to the ventricle. The measurements of calcium transients *in vitro* (37 °C) showed that the APD₉₀ under spontaneous rhythm was longest in the AV canal of whole ED4 hearts. The longer APD₉₀ in the AV canal (330 ms) predisposes this cardiac segment to be a limiting factor in conduction of higher beat frequencies between the atrium and the ventricle. The APD₉₀ in the ventricle

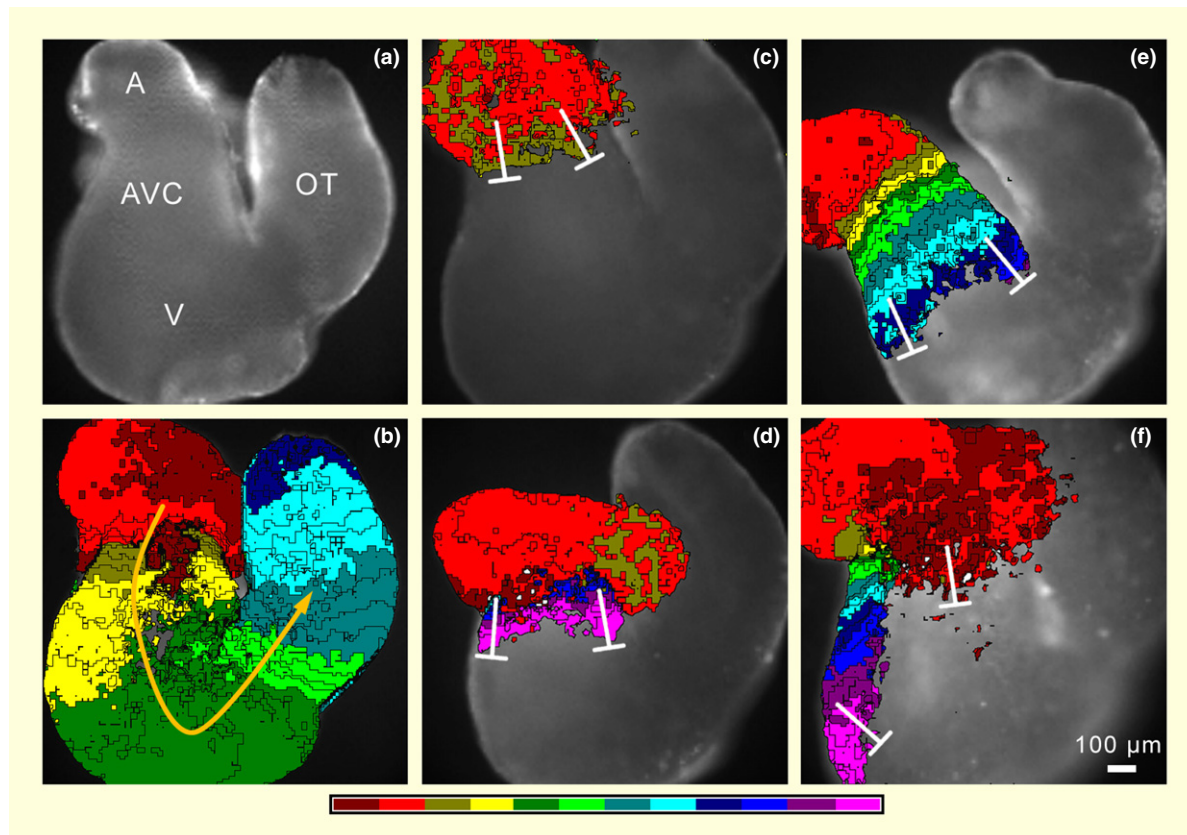


Figure 2 Comparison of third-degree atrioventricular (AV) block locations – different localization of conduction disturbances in the AV canal. (a) ED4 chick heart. (b) Standard conduction. (c) Proximal AV block. (d) Mid-AV block. (e) Distal AV block. (f) Distal AV block with preferential conduction along the outer curvature of the AV canal. Colour bands are in 32 ms (b) and 16 ms intervals (c–f), isochrones are in 8 ms intervals. A, atrium; AVC, AV canal; V, ventricle; OT, outflow tract.

(282 ms) was longer than in the atrium (223 ms, $P < 0.001$).

Electrical stimulation experiments *in ovo* showed that the AV canal of all experimental hearts ($n = 7$) was capable of propagating frequencies of up to 300 beats min^{-1} . AV canal conduction limit reached 360 beats min^{-1} during atrial stimulation in one case (Fig. 4a,b). During stimulation of atrium, an atrial conduction limit of 360 beats min^{-1} was found. This being said, second-degree AV block regularly occurred when pacing rates exceeded 300 beats min^{-1} . Hearts were capable of beating at high frequencies for only a few seconds without developing conduction block. Stimulation of the ventricle uncovered a maximal capture threshold at 600 beats min^{-1} (Fig. 4c). These results support our hypothesis that hypoxia could be one of several parameters that would explain our findings, as we never observed such high rates in sinus rhythm, even during the highest tachycardias in hyperthermia *in vitro* (270 beats min^{-1}) without AV block.

We performed electrical stimulation experiments on isolated ED4 hearts *in vitro* to uncover the conduction limits of isolated hearts without blood flow and

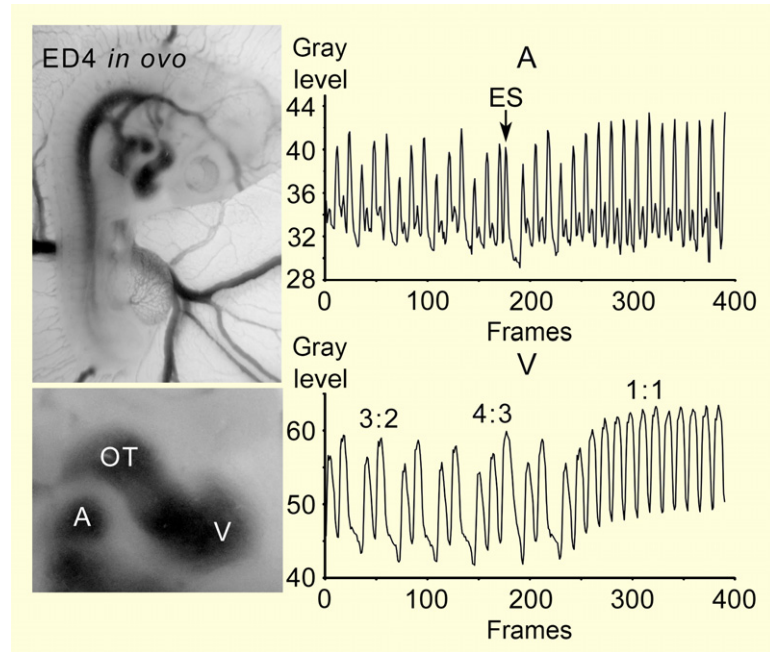
vascular coupling ($n = 23$). The AV conduction limit (1 : 1 AV capture) was breached at 261 beats min^{-1} (see Fig. 4d). In the same heart, a maximum frequency of 353 beats min^{-1} was reached in the atrium, but second-degree AV block developed (see Fig. 4e). The next two highest heart rates successfully propagated through the AV canal in other hearts were 232 beats min^{-1} and 200 beats min^{-1} . The remaining hearts did not even reach 200 beats min^{-1} with normal AV conduction. A capture limit for the ventricle was reached at 476 beats min^{-1} (see Fig. 4f).

Discussion

Arrhythmias in the embryonic heart

High-speed imaging of calcium in the embryonic mouse heart (Valderrabano *et al.* 2006) results in increased sensitivity compared to imaging of voltage-sensitive dye. This modality also allows for signal detection in the AV canal, enabling the detection of various arrhythmias. Our experimental set-up (Vostarek *et al.* 2014) for imaging normal and stressed

Figure 3 Second-degree atrioventricular (AV) block during hyperthermia *in ovo*. *In ovo* videomicroscopy recording of a transient second-degree AV block (Wenckebach phenomenon) during hyperthermia. Traces represent changes in grey level in time due to edge motion. Each peak represents one contraction. The x-axis is presented in frames (acquisition speed 30 fps). A, atrium; V, ventricle; OT, outflow tract; ES, atrial extrasystole.



embryonic hearts represents a significant technological improvement. Among other advances, it enables precise localization of sites of conduction block and the uncovering of ectopic pacemakers (Hoogaars *et al.* 2007, Leaf *et al.* 2008, Ammirabile *et al.* 2012, Benes *et al.* 2014) in the isolated embryonic heart model.

We measured correlation of PQ intervals in hypothermia, normothermia and hyperthermia, but no significant dependences were observed. PR interval was not significantly influenced by temperature or heart rate, similar to the results of Sarre *et al.* (2006). However, a modest trend towards the prolongation of PR interval was noted in their follow-up study, which included analysis of the bradycardic effects of ivabradine (Sarre *et al.* 2010). This probably reflects the limitation of ion pumps responsible for the restoration of membrane potential at higher heart rates during the pre-innervation stages of cardiogenesis. On the other hand, the mechanical PQ interval was described as negatively correlated with heart rate in human foetuses. It is notable that these more mature foetal hearts were measured under *in vivo* conditions and with full autonomic innervation (Tomek *et al.* 2011).

Temperature effects on heart rate and calcium transients

Results from calcium transient dynamics measurements *in vitro* showed that heart rate is linearly dependent on the temperature in the range from 34 to 40 °C. This corresponds well with a previous study using a ramp protocol (Sarre *et al.* 2006). Changes in

heart rate were caused by direct influence on the pacemaker changing its kinetics. In the hypothermia group, we tried to change the temperature in both directions – cooling from 37 to 34 °C and warming from 34 to 37 °C. We did not observe any significant difference in heart rate change or arrhythmogenesis related to the direction of temperature change.

We expected changes in temperature to influence calcium transient amplitudes. During hyperthermia, we observed a significant decrease in amplitudes of calcium transients. We hypothesize that this is caused by higher heart rate with less time for calcium channels and pumps to establish calcium transients. We suggest that lowering of calcium transients could result in weaker contractility, which may lead over time to negative effects on pumping efficiency. These negative effects on cardiac output are equalized by higher heart rate, but limitations of energetic metabolism are crucial. On the other hand, we observed no significant changes during hypothermia. This is probably due to adaptation of chick embryos to hypothermia in natural conditions. Decreased activity of calcium transporters is balanced by a longer period available for establishing the equilibrium concentration. Cardiac output is maintained through Frank-Starling compensation by increased stroke volume (Benson *et al.* 1989).

Temperature and cardiac output

Experiments *in ovo*, including vascular coupling and blood flow, showed the same linear dependence of heart rate on temperature as *in vitro*. Chick ED4 hearts are not innervated, but β -adrenergic receptors are expressed at

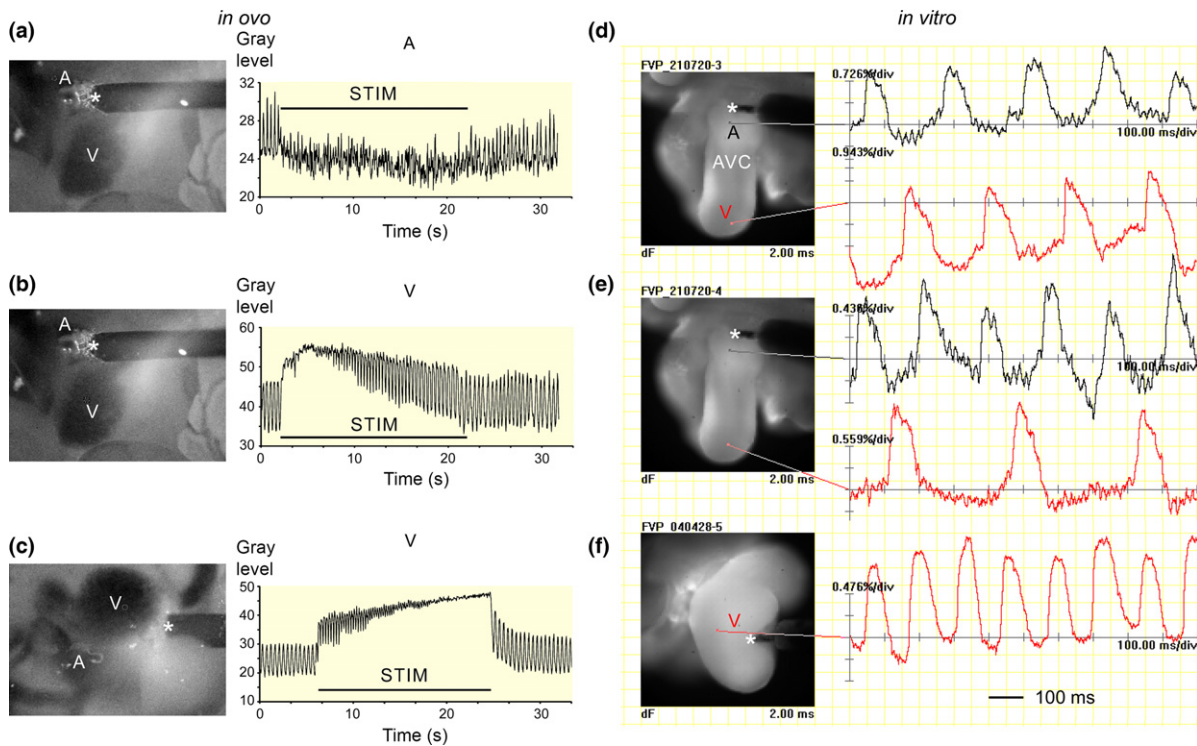


Figure 4 Artificial stimulation uncovers conduction limits. Left side shows recordings during electrical stimulation *in ovo* ($n = 7$). Atrioventricular (AV) canal conduction limit of chick ED4 heart *in ovo* reached 360 beats min^{-1} during electrical stimulation of the atrium. Atrium was stimulated gradually from 400 to 120 beats min^{-1} . (a) Motion signal from the atrium. (b) Edge movement signal from the ventricle. (c) Maximal measured conduction limit of ventricle *in ovo* reached 600 beats min^{-1} . Ventricle stimulated from 200 to 600 beats min^{-1} . Right side shows voltage imaging of electrical stimulation of ED4 chick hearts *in vitro* ($n = 23$). (d) Maximal measured AV canal conduction frequency of 261 beats min^{-1} . Atrium stimulated up to 300 beats min^{-1} . (e) Maximal measured conduction limit of atrium was 353 beats min^{-1} . Second-degree AV block (2 : 1) developed. Atrium stimulated up to 400 beats min^{-1} . (f) Maximal measured conduction limit of ventricle *in vitro* reached 476 beats min^{-1} . Ventricle stimulated up to 600 beats min^{-1} . A, atrium; AVC, AV canal; V, ventricle.

this stage. It was shown that ED4 chick heart responded to adrenaline stimulation by a significant increase in heart rate (up to 60%). Treatment by different β -blockers leads to a significant decrease of heart rate in ED4 chick hearts (Kockova *et al.* 2013). Heart function in ectothermic animals, such as fish or reptiles, is strongly affected and limited by hyperthermia, even when autonomic innervation is fully developed. The main regulating mechanisms are the same as in the embryonic heart of the chick, which physiologically develops at constant temperature maintained by the hen incubating the egg. The embryo is unable to generate its body heat by itself and therefore is well adapted to brief periods of hypothermia. A crucial limiting factor is oxidative phosphorylation in mitochondria and especially sufficient temperature-dependent ATP synthesis (Power *et al.* 2014).

Mechanisms of temperature-induced conduction defects

Increased temperature increases metabolic demands, and the availability of oxygen can become a limiting

factor. This is especially the case *in vitro* where the thick AV region is probably not optimally oxygenated, as it physiologically receives nutrients and oxygen from the heart lumen. We thus focused on defects in impulse propagation in this cardiac segment, as almost 60% of all observed arrhythmias ($n = 106$) were caused by conduction block in the AV canal (Table 1). We analysed in detail various types of AV block (Fig. 2). Third-degree AV block developed in one case during hypothermia ($n = 45$ hearts), in 15% of cases in normothermia (stabilization, $n = 99$ hearts) and 39% of cases in hyperthermia ($n = 54$ hearts). This suggests that development of complete AV block is influenced by increased temperature or by another condition connected to hyperthermia. It probably corresponds with the increase of metabolic needs of hearts and concomitant decreases in oxygen concentration in the tissue bath with increasing temperature.

The slowing of conduction velocity in the AV canal is highly influenced by the presence of cardiac jelly and the endocardial cushions (Bressan *et al.* 2014). The

morphology of the AV canal is determined by large extracellular spaces, scarce membrane contacts and anionic extracellular matrix resulting in a low margin of conduction safety (Arguello *et al.* 1986). This principle is supported by new findings regarding ephaptic conduction of action potential between myocytes without recourse to gap junctions. This might happen via electric field mechanism or ion transients within the extracellular space between two tightly, <15 nm apposed myocytes, occurring, for example, in the perinexus – the cleft formed at the edge of gap junctions (Rhett & Gourdie 2012, Veer-araghavan *et al.* 2014).

The primitive cardiac tube is characterized by uniformly slow conduction velocity and expresses only one gap junction protein, Connexin45. The conduction in the AV canal is slow but robust, as noted already by Paff *et al.* (1964) and later by Sedmera *et al.* (2002), who noted that AV block could not be induced pharmacologically or by anoxia/reoxygenation prior to ED3. Chamber myocardium is characterized by Connexin40 expression, among other specific gene products, a gap junction protein essential for fast conduction. Transition between the slowly conducting AV canal and the ventricle might include heterotypic Cx45/Cx40 gap junctional coupling, which could represent a tissue sector with increased probability of functional block, similar to the substrate for sinoatrial blockade. In isolated cardiomyocytes, it was observed that cooling decreases the frequency of gap junction channel opening at all conductance levels (Chen & DeHaan 1993).

Action potentials with a low rate of rise and longer duration are typical for the AV canal (Sanders *et al.* 1984, de Jong *et al.* 1987, 1992). We measured APDs in the atrium, AV canal and ventricle in normothermia, to test the hypothesis that longer APDs predispose the AV canal to be the limiting segment of the heart. We obtained higher values than standard APDs measured by microelectrodes (Arguello *et al.* 1986), likely because of the prolongation of APD by blebbistatin – similar to the effects of cytochalasin D (Sedmera *et al.* 2006).

Our experiments showed that the pacemaker and AV canal were the most temperature-sensitive segments of the embryonic heart. The most common location of AV block was at the transition between the slowly conducting tissue of the AV canal and the fast conducting tissues of the ventricle. We suggest that the most critical region for the propagation of impulse is the connection site of trabecular network to the AV canal. It corresponds with similar finding of Coppen *et al.* in the embryonic and mature rodent heart. This observation uncovered the analogous sharp transitional interface between the Cx45-expressing

component of the mouse AV node and Cx40-expressing His bundle (Coppen *et al.* 1999).

Hypoxia in the developing heart

During cardiac development, hypoxic regions are found in several locations of the myocardium (Nanka *et al.* 2006, 2008, Wikenheiser *et al.* 2006). These hypoxic regions correlate with areas of conduction system formation (Wikenheiser *et al.* 2006). Coincidentally, hypoxia is also detected in the thickest regions of the myocardium (AV canal, interventricular septum, outflow tract myocardium), and it is believed that hypoxia is a powerful stimulus for coronary vasculogenesis (Nanka *et al.* 2008). As the AV canal is one of the thickest areas of the embryonic myocardium, it lacks trabeculae and is separated from the oxygen-carrying blood in the lumen by the cardiac cushions, and it thus comes as no surprise that it is very sensitive to hypoxia. Because the normal routes of oxygenation in the chick embryonic heart prior to ED9 (establishment of coronary perfusion) is through the lumen, it is not surprising that hearts were more prone to develop AV block *in vitro*, where the direction of oxygen diffusion, as well as its concentration gradient, is perturbed.

We tested the ability of the AV canal to propagate high beat frequencies by electrical stimulation. The main point was to prove that AV blocks induced during comparatively mild tachycardia in hyperthermia were not due to the intrinsic absolute conduction limit of the AV conduction. Electrical stimulation experiments showed that the conduction limit of the AV canal was much higher *in ovo* (360 beats min⁻¹) than *in vitro* (261 beats min⁻¹). Also the conduction limits of the atrium and ventricle, respectively, were higher *in ovo* (atrium 360 beats min⁻¹, ventricle 600 beats min⁻¹) than *in vitro* (atrium 353 beats min⁻¹, ventricle 476 beats min⁻¹). This is probably caused by better oxygenation of the hearts from blood flow through the lumen. These results suggest that the observed AV blocks could be caused by relative tissue hypoxia and not by a low ability of the AV canal to propagate high frequencies.

In conclusion, this study provides a quantitative evaluation of temperature effects on conduction in the chick embryonic heart. Hypothermia is tolerated better than hyperthermia, the former of which embryos seem to be well adapted to. The most common arrhythmia observed under hyperthermia was AV block, which was observed typically at the transition between the AV canal and ventricle. Thus, morphological and molecular distinctions between different compartments of the developing heart have physiological consequences manifesting under increased metabolic demands.

Conflict of interest

None.

We would like to thank Dr. Zuzana Halasova for her assistance with the *in ovo* experiments, and Prof. Eric Raddatz and Prof. Robert Gourdie for critical reading of the manuscript. This work was supported by Ministry of Education PRVOUK P35/LF1/5, institutional RVO: 67985823 (DS), Grant Agency of the Czech Republic P302/11/1308, 13-12412S and 16-02972S to DS, and Grant Agency of the Charles University 716214 to FV.

References

- Ammirabile, G., Tessari, A., Pignataro, V., Szumska, D., Sutura 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.
- 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**, 1465–1469.
- 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**, 438–441.
- Bers, D.M. 1991. Ca regulation in cardiac muscle. *Med Sci Sports Exerc* **23**, 1157–1162.
- Bressan, M., Yang, P.B., Louie, J.D., Navetta, A.M., Gariocck, R.J. & Mikawa, T. 2014. Reciprocal myocardial-endocardial interactions pattern the delay in atrioventricular junction conduction. *Development* **141**, 4149–4157.
- Chen, Y.H. & DeHaan, R.L. 1993. Temperature dependence of embryonic cardiac gap junction conductance and channel kinetics. *J Membr Biol* **136**, 125–134.
- 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.
- DiFrancesco, D. 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* **55**, 455–472.
- 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**, 619–626.
- 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–H846.
- Hamburger, V. & Hamilton, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **88**, 49–92.
- 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**, 1098–1112.
- 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**, 240–250.
- Kamino, K., Hirota, A. & Fujii, S. 1981. Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature* **290**, 595–597.
- 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–H902.
- 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**, 1001–1008.
- 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.
- 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–R836.
- Moroni, A., Gorza, L., Beltrame, M., Gravante, B., Vaccari, T., Bianchi, M.E., Altomare, C., Longhi, R., Heurteaux, C., Vitadello, M., Malgaroli, A. & DiFrancesco, D. 2001. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f). *J Biol Chem* **276**, 29233–29241.
- 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**, 651–654.
- 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**, 1213–1215.
- Nanka, O., Valasek, P., Dvorakova, M. & Grim, M. 2006. Experimental hypoxia and embryonic angiogenesis. *Dev Dyn* **235**, 723–733.
- 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**, 1187–1199.
- Paff, G.H., Boucek, R.J. & Klopfenstein, H.S. 1964. Experimental heart-block in the chick embryo. *Anat Rec* **149**, 217–223.

- Peterka, M., Peterkova, R. & Likovsky, Z. 1996. Teratogenic and lethal effects of long-term hyperthermia and hypothermia in the chick embryo. *Reprod Toxicol* **10**, 327–332.
- 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**, e12138.
- Rentschler, S., Vaidya, D.M., Tamaddon, H., Degenhardt, K., Sassoon, D., Morley, G.E., Jalife, J. & Fishman, G.I. 2001. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development* **128**, 1785–1792.
- Rhett, J.M. & Gourdie, R.G. 2012. The perinexus: a new feature of Cx43 gap junction organization. *Heart Rhythm* **9**, 619–623.
- 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**, 185–191.
- 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–H1576.
- 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**, 1350–1359.
- 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**, 845–852.
- Sedmera, D., Kucera, P. & Raddatz, E. 2002. Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R379–R388.
- 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–H1160.
- 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–H1652.
- Sperelakis, N. & Lehmkuhl, D. 1967. Effects of temperature and metabolic poisons on membrane potentials of cultured heart cells. *Am J Physiol* **213**, 719–724.
- 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**, 929–936.
- 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**, 611–616.
- Tran, L., Kucera, P., de Ribapierre, Y., Rochat, A.C. & Raddatz, E. 1996. Glucose is arrhythmogenic in the anoxic-reoxygenated embryonic chick heart. *Pediatr Res* **39**, 766–773.
- 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**, 543–549.
- Veeraraghavan, R., Gourdie, R.G. & Poelzing, S. 2014. Mechanisms of cardiac conduction: a history of revisions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **306**, H619–H627.
- Vostarek, F., Sankova, B. & Sedmera, D. 2014. Studying dynamic events in the developing myocardium. *Prog Biophys Mol Biol* **115**, 261–269.
- Warbanow, W. 1970. [Morphologic and functional studies of the hypothermia-induced hypertrophy of the embryonic chick heart]. *Acta Biol Med Ger* **25**, 281–293.
- Warbanow, W. 1971. Contractility of the embryonic chick heart in hypothermia-induced cardiac hyperplasia and hypertrophy. *Acta Biol Med Ger* **26**, 859–861.
- Wikenheiser, J., Doughman, Y.Q., Fisher, S.A. & Watanabe, M. 2006. Differential levels of tissue hypoxia in the developing chicken heart. *Dev Dyn* **235**, 115–123.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Video S1. Examples of arrhythmias observed in the embryonic chick heart using calcium imaging.