

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Autoreferát disertační práce

Vliv teploty na vznik arytmii během vývoje srdce
Effect of temperature on arrhythmogenesis during heart
development

Mgr. František Vostárek

Praha 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Program: Vývojová a buněčná biologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

Školící pracoviště: Oddělení vývojové kardiologie,
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. František Vostárek

Školitel: Prof. MUDr. David Sedmera, DSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah/Content

Abstrakt	6
Abstract	7
Česká část	8
1. Úvod	8
1.1 Funkce převodního systému	8
1.2 Vývoj převodního systému	9
1.3 Základní rozdělení srdečních arytmií	9
1.31 Poruchy tvorby vzruchu	9
1.32 Poruchy šíření vzruchu	10
1.4 Elektrofyzologie embryonálního srdce a klíčová role kalcia	10
1.5 Vliv teploty na funkci embryonálního srdce	11
2. Hypotéza a cíl práce	12
3. Materiál a nejdůležitější metody	12
4. Výsledky	15
4.1 Experimenty <i>in vitro</i>	15
4.11 Samovolně vznikající arytmie v prostředí <i>in vitro</i>	15
4.111 Samovolně vznikající poruchy tvorby vzruchu v prostředí <i>in vitro</i>	16
4.112 Samovolně vznikající poruchy šíření vzruchu v prostředí <i>in vitro</i>	16
4.12 Změny ve funkci embryonálního srdce indukované změnami teploty	16
4.121 Vliv teploty na sinusovou frekvenci a intracelulární dynamiku kalcia	16
4.122 Poruchy srdečního rytmu pozorované <i>in vitro</i>	17
4.1221 Poruchy tvorby vzruchu – přímý vliv teploty na funkci SA uzlu	17
4.1222 Poruchy šíření elektrického impulsu <i>in vitro</i>	17
4.12221 Lokalizace AV bloku třetího stupně	18
4.2 Experimenty <i>in ovo</i>	19

4.3 Elektrická stimulace embryonálních srdcí	19
5. Diskuze	20
5.1 Studium arytmií embryonálního srdce	20
5.2 Akutní vliv teploty na srdeční frekvenci a dynamiku Ca^{2+} transientů	21
5.3 Teplota a srdeční výdej	22
5.4 Mechanismy poruch šíření vzruchu indukované změnami teploty	22
5.5 Role hypoxie během vývoje embryonálního srdce	24
6. Závěr	25
English part	26
1. Introduction	26
1.1 Function of cardiac conduction system	26
1.2 Development of cardiac conduction system	27
1.3 Basic description of cardiac arrhythmias	27
1.31 Defects in impulse generation	27
1.32 Defects in impulse propagation	28
1.4 Electrophysiology of embryonic heart and key role of calcium	28
1.5 Effects of temperature on function of embryonic heart	28
2. Hypothesis and aim of the study	30
3. Materials and most important methods	30
4. Results	32
4.1 Experiments <i>in vitro</i>	32
4.11 Spontaneous arrhythmias	32
4.111 Spontaneous defects in impulse generation <i>in vitro</i>	33
4.112 Spontaneous defects in impulse propagation <i>in vitro</i>	33
4.12 Temperature-induced changes in function of embryonic heart	33
4.121 Changes in sinus frequency and calcium transients dynamics	33
4.122 Arrhythmias <i>in vitro</i>	33

4.1221 Defects in impulse generation – direct influence on the pacemaker	34
4.1222 Defects in impulse propagation	34
4.1222 Localization of third degree AV block	35
4.2 Experiments <i>in ovo</i>	35
4.3 Electrical stimulation of the atrium and ventricle	36
5. Discussion	37
5.1 Studying arrhythmias in the embryonic heart	37
5.2 Temperature effects on heart rate and calcium transients	37
5.3 Temperature and cardiac output	38
5.4 Mechanisms of temperature-induced conduction defects	38
5.5 Hypoxia in the developing heart	40
6. Conclusion	41
<i>Curriculum vitae</i>	42
Seznam publikací autora / List of publications	44
Použitá literatura / References	45

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 transiencí, 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 arytmii již při normotermii, proti prostředí *in ovo*, kde se při všech teplotách arytmie téměř nevyskytovaly. Hypotermie *in vitro* přinesla arytmii nejméně, zatímco hypertermie výrazně navýšila četnost vzniku arytmii. Nejčastější arytmii *in vitro* byl atrioventrikulární (AV) blok (II. a III. stupně), který tvořil 56% všech pozorovaných arytmii. 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, 37 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.

Česká část

1. Úvod

V současné době jsou v civilizovaném světě kardiovaskulární onemocnění nejčastější příčinou úmrtí. Se stárnutím populace přibývá srdečních arytmií a jejich výskyt bude tedy v blízké budoucnosti 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. Mnoho příčin arytmií zůstává stále velkou neznámou a jejich možný původ v odchylkách od normálního vývoje srdce je nedostatečně prozkoumán. Klíčovou roli hraje vývoj převodního systému srdečního, jehož funkce úzce souvisí se vznikem arytmií. Pro podrobné studium arytmií během vývoje srdce jsou úspěšně používány zvířecí experimentální modely jako např. kuřecí zárodek (Sarre et al., 2006).

1.1 Funkce převodního systému

Vznik arytmií je velmi často spojen s funkcí převodního systému srdečního. Převodní systém srdeční je složen ze sítě specializovaných kardiomyocytů, které jsou schopné velmi rychle vést elektrický vzruch. Rytmus je udáván prvním oddílem převodního systému; sinusovým uzlem. Jedná se o kapkovitý útvar specializovaných buněk velikosti cca 15×3 mm, který se nachází v oblasti ústí horní duté žíly do pravé síně asi 1 mm pod povrchem epikardu. Generovaný vzruch je dále veden skrze síň internodálními síňovými spoji do atrioventrikulárního uzlu. V atrioventrikulárním uzlu je vedení mezi síněmi a komorami zpomaleno, aby bylo zajištěno efektivní pumpování krve. Následuje Hisův svazek, který představuje jediný vodivý spoj ve vazivové elektrické izolaci mezi myokardem síní a komorami. Dále pokračuje levé a pravé Tawarovo raménko, Purkyňova vlákna a nakonec je aktivován pracovní myokard (Bonow et al., 2008).

1.2 Vývoj převodního systému

Při vývoji převodního systému srdečního u kuřecího zárodku se jako první začíná mezi 25 a 33 h vývoje diferencovat oblast sinoatriálního uzlu na nejkaudálnější části srdeční trubice. Se zakřivením srdce se začíná pacemaker projevovat a srdeční kličkou probíhají pomalé peristaltoidní kontrakce kaudokraniálním směrem. Rychlost vedení je v této fázi vývoje pomalá a uniformní. Po zformování srdeční kličky se objevují rozdíly v rychlosti vedení jednotlivých srdečních segmentů. Rychlost vedení skrze budoucí síně a komory narůstá, kdežto v atrioventrikulárním (AV) kanálu a výtokové části přetrvává pomalé vedení vzruchu. V důsledku tak dochází ke zpomalování vedení mezi síněmi a komorami, čímž je zvýšena efektivita pumpování krve. Tento jev nastává okolo 60 h vývoje a je analogický se zpomalením vedení v AV uzlu u dospělého srdce. Poslední část převodního systému, která se vyvíjí, je rychle vodivý His-Purkinje systém diferencující se během septace komor. Počátek jeho funkce se projevuje změnou v aktivaci komor okolo 5. dne. Původní aktivace komor od báze k hrotu se mění na zralý typ aktivace od hrotu k bázi, která odpovídá aktivaci u dospělého srdce (Moorman a Lamers, 1992, Gourdie et al., 2003, Christoffels a Moorman, 2009, Christoffels et al., 2010).

1.3 Základní rozdělení srdečních arytmií

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

1.31 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 (u plodu > 180/min) jedná se o sinusovou tachykardii a frekvence pod 60/min (u plodu < 110/min) je označována jako sinusová bradykardie. V obou případech je rytmus pravidelný, pokud je frekvence kolísavá jedná se o sinusovou arytmií. U dospělého srdce je sinusový rytmus řízen vegetativními nervy (Silberagl 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. Pokud dojde k výpadku tvorby rytmu ze sinusového uzlu, projeví se jiná ohniska (atrioventrikulární 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 (Silberagl a Despopoulos, 2004, Sarre et al., 2006, Bonow et al., 2008).

1.32 Poruchy šíření vzruchu

Při poruše šíření vzruchu vznikají bloky v jeho vedení, 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 vyzorovat i u kuřecího zárodku od 3. dne vývoje (Sedmera et al., 2002). Dalším mechanismem vzniku arytmií poruchou vedení vzruchu je krouživý vzruch, tzv. reentry. Jedná se o častý arytmogenní mechanismus, který způsobuje řadu tachyarytmií (Silberagl a Despopoulos, 2004, Bonow et al., 2008).

1.4 Elektrofyziologie embryonálního srdce a klíčová role kalcia

Rytmus je u časného embryonálního srdce udáván pacemakerovými buňkami z budoucího se SA uzlu lokalizovaného ve vtokové části srdce (Kamino et al., 1981). V pacemakerových buňkách generujících vzruchy jsou exprimovány speciální HCN iontové kanály (hlavně HCN4), které jsou aktivovány hyperpolarizací. Tyto kanály jsou zodpovědné za udávání srdečního rytmu kvůli spontánní depolarizaci, kterou způsobují. Jsou důvodem srdeční automacie (DiFrancesco, 2010). Kalcium hraje během embryonální srdeční aktivity zásadní roli, kde kontrakci předchází excitace ve formě srdečního akčního potenciálu. Po excitaci právě úroveň hladiny kalcia v cytoplasmě určuje sílu následné kontrakce (Kho et al., 2012). Intracelulární dynamika kalcia je zajišťována kalciovými kanály, receptory, ATPázami a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníkem – NCX (Bers, 1991). Měřením intracelulární oscilace kalcia lze tedy pozorovat změny v elektrické aktivitě srdce a jeho adaptaci na vnější podmínky.

1.5 Vliv teploty na funkci embryonálního srdce

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 zkoumán již dlouhou dobu. Dlouhodobá hypotermie (32–36 °C) vedla u vyvíjejícího se embrya ke vzniku srdeční hypertrofie (Warbanow, 1970). Tato hypertrofie vedla ke zvýšení kontraktility srdce (Warbanow, 1971). Další studie byla zaměřená na vliv hypotermie během vývoje srdce u časných embryonálních stádií (HH18–24, Hamburger and Hamilton, 1951). 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 (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). Zásadní studie, kterou provedl Sarre a kolegové, se týkala vlivu ochlazení ze 37 °C na 0 °C s následovným 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).

2. 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.

3. Materiál a nejdůležitější metody

Experimentální model

Vejce od nosnic kmene 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 21 – 23 (Hamburger a Hamilton, 1951). Poté byla kuřecí embrya vyjmuta z vajec a přemístěna do Tyrodova roztoku (složení: NaCl 145 mmol/l, 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. Izolovaná srdce byla za laboratorní teploty 60 min barvena bez přístupu světla ve 2,5 ml 1,78 mM barviva Rhod-2 (Rhodamin 2, Invitrogen) v Tyrodově roztoku. Následovala další inkubace ve tmě ve 2,5 ml čistého Tyrodova roztoku bez barviva, 60 min při vyšší teplotě 37 °C, aby došlo k deesterifikaci barviva v cytoplasmě.

Optické mapování

Systém použitý pro optické mapování intracelulárních změn koncentrace kalcia u kuřecích embryonálních srdcí vycházel ze zavedeného přístupu (Valderrabano et al., 2006). Použili jsme modifikovaný systém s kalcium senzitivním barvivem Rhod-2 (Vostarek et al., 2014).

Izolovaná a obarvená srdce byla přemístěna do speciální optické Petriho misky (Wilco Wells, Holandsko) se skleněným průhledem, která obsahovala 2 ml Tyrodova roztoku

s přidaným blebbistatinem (0,15 μM , disociátor excitace kontrakce, Sigma-Aldrich, Německo) kvůli redukci pohybu srdcí při kontrakcích (Fedorov et al., 2007). Teplota roztoku byla regulována termoregulační podložkou s digitálním ovladačem a teploměrem (Linkam DC-60). Použili jsme invertovaný epifluorescenční mikroskop (Nikon Eclipse TE 2000-S, Japonsko) ve spojení s vysokorychlostní digitální kamerou s EM-CCD čipem (Andorr iXon3, Andor, Velká Británie). Elektrická aktivita srdcí byla snímána jako změna intenzity fluorescence indikátoru v čase, což odpovídalo oscilacím koncentrace kalcia. Měření probíhala při třech různých teplotách. Teplota 37 °C byla kontrolní teplota – normotermie. 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.

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 předehřátými hliníkovými pecičkami (Bath Armor, Nickel-Electro Ltd., Velká Británie), která byla umístěna na termoregulačním podstavci (Echotherm chilling/heating plate, Torrey Pines Scientific, USA). Měření probíhalo pomocí digitálního fotoaparátu (Nikon D7000, rozlišení 640 × 480 pixelů, rychlost snímání 30 snímků/sek) připojeného na diskční mikroskop (Leica 125, Leica Microsystems, 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. Zvolili jsme vždy dvě oblasti zájmu (síň a komoru), u kterých byla srdeční frekvence stanovena ze záznamu změn úrovně šedi, která odpovídala změnám proudění krve v čase (Sedmera et al., 1999, Kockova et al., 2013).

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 měřením 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 měřením při různých teplotách (34 °C, 37 °C a 40 °C). Hodnoty, které uvádíme ve výsledcích, prezentujeme jako hodnotu aritmetického průměru \pm směrodatná odchylka. Statistickou hladinu významnosti našich pozorování jsme testovali pomocí Studentova t-testu a jako signifikantní jsme označili hodnoty s $P < 0,05$.

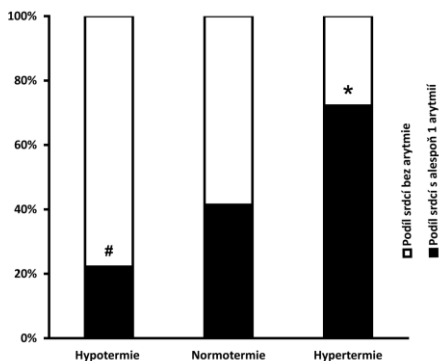
4. Výsledky

4.1 Experimenty *in vitro*

Pozorované jevy jsme rozdělili do tří 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.

4.11 Samovolně vznikající arytmie v prostředí *in vitro*

V prostředí *in vitro* jsme pozorovali arytmie vznikající samovolně již při kontrolní teplotě (normotermii) pouze díky stresu prostředí. Při normotermii jsme pozorovali 47 spontánních arytmií (n = 99 srdcí) proti zvýšené teplotě hypertermii (48 arytmií, n = 54 srdcí) a hypotermii (12 arytmií, n = 45 srdcí). Alespoň jednou arytmií bylo při normotermii postiženo 41% srdcí v porovnání se 72% srdcí při hypertermii a pouze 22% při hypotermii. Celková četnost výskytu srdcí s alespoň jednou arytmií je uvedena na Obr. 1. Celkem jsme pozorovali při všech teplotách 107 jednotlivých arytmií, které se vyskytly u 99 srdcí (Tab. 1). Arytmie pozorované při normotermii jsme rozdělili do dvou skupin – poruchy tvorby vzruchu a poruchy šíření vzruchu.



Obrázek 1

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

Alespoň jednou arytmií bylo při normotermii postiženo 41% srdcí, při hypertermii 72% srdcí (n = 54, Pearsonův test – Chi kvadrát *P < 0,001) a během hypotermie pouze 22% (n = 45, Pearsonův test – Chi kvadrát #P < 0,05).

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

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

4.112 Samovolně vznikající poruchy šíření vzruchu v prostředí *in vitro*

Poruchy šíření vzruchu vznikající samovolně v prostředí *in vitro* tvořily 76% arytmií pozorovaných při normotermii (n = 47) a představovaly tak naprostou většinu arytmií vzniklých samovolně. Nejfrekventovanějším typem arytmiie za těchto podmínek byl AV blok třetího stupně, který tvořil 32% arytmií 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 jeden 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. Při normotermii jsme v jednom případě pozorovali AV reentry.

4.12 Změny ve funkci embryonálního srdce indukované změnami teploty

4.121 Vliv teploty na sinusovou frekvenci a intracelulární dynamiku kalcia

Pomocí optického mapování jsme zjistili, že akutní změny teploty mají na elektrickou aktivitu embryonálního srdce zásadní vliv. Nejvýrazněji byla ovlivněna srdeční frekvence, kterou udává sinoatriální uzel. Testovali jsme tři zvolené teploty – 34 °C jako hypotermii, 37 °C jako normotermii (kontrolní teplotu) a 40 °C jako hypertermii. Za těchto teplotních podmínek jsme pozorovali téměř lineární závislost frekvence udávané sinoatriálním uzlem na teplotě. Sinusová frekvence se v porovnání s normotermií změnila přibližně o 20% v podmínkách hypotermie ($P < 0,001$) a stejnou změnu v sinusové frekvenci jsme pozorovali také u hypertermie ($P < 0,001$). Dále jsme se zaměřili na změny amplitudy kalciových transiencí. Nárůst srdeční frekvence během hypertermie měl za následek významný pokles amplitudy kalciových transiencí u síní (35%) i komor (38%). Proti tomu během hypotermie při zpomalení frekvence k významným změnám amplitudy nedošlo.

4.122 Poruchy srdečního rytmu pozorované *in vitro*

V prostředí *in vitro* jsme pozorovali široké spektrum arytmií (Tab. 1), které jsme rozdělili do dvou skupin – poruchy tvorby vzruchu a poruchy šíření vzruchu.

4.1221 Poruchy tvorby vzruchu – přímý vliv teploty na funkci SA uzlu

Nepravidelnosti při tvorbě elektrických impulzů v SA uzlu 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. Ve dvou případech jsme při hypertermii pozorovali také junkční rytmus, který vycházel z AV kanálu a dosahoval značně vysokých frekvencí (160 a 180/min).

4.1222 Poruchy šíření elektrického impulzu *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* a během hypotermie jsme pozorovali pouze několik blokád vedení vzruchu. Celkově představovaly poruchy šíření elektrického impulzu 72% všech pozorovaných arytmií (n = 107). Ve třech případech došlo k poruše vedení vzruchu již v síních (síňový blok), pouze ve dvou případech 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 zaměřena zejména na šíření vzruchu v oblasti AV kanálu. Blokády vedení vzruchu v této oblasti (AV blok II. a III. stupně) představovaly 56% ze všech pozorovaných arytmií. Nejčastější pozorovanou arytmií byl AV blok III. stupně, 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 III. stupně v 15% případů (n = 99 srdcí) a při hypertermii se vyvinul AV blok III. stupně ve 39% případů (n = 54 srdcí, Pearsonův test – Chí kvadrát $P < 0,001$). AV blok III. stupně v celkovém počtu arytmií (n = 107) představoval úctyhodných 35%. Druhou nejčastější arytmií byl AV blok II. stupně, který vzniknul v 21% případů (n = 107). Během hypotermie jsme pozorovali AV blok II. 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 II: stupně, který tvořil 65% všech pozorovaných AV bloků II. stupně, Wenckebachův typ představoval 30% AV bloků druhého stupně a blok typu

Mobitz II jsme pozorovali pouze v jednom případě. Ojedinele jsme pozorovali také méně běžný druh arytmie jako AV reentry, který se vyskytnul ve dvou případech při hypotermii.

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

4.12221 Lokalizace AV bloku třetího stupně

Optické mapování kalcia nám díky svým možnostem dovolilo detailně pozorovat místa lokalizace blokády vedení vzruchu. 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. 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 III. 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 III. stupně. Zajímavé pozorování bylo, že během snížení teploty ze 37 °C na 34 °C došlo v 6 případech k úplné obnově vedení po předchozí AV blokádě.

4.2 Experimenty *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 shodně s naším postupem při pokusech *in vitro*. 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*. 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 přechodný AV blok druhého stupně a ke vzniku AV bloku třetího stupně nedošlo vůbec.

4.3 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 (37 °C, $n = 10$ srdcí) při pravidelném spontánním rytmu bez bradykardie ani tachykardie ukázala, že nejdelší dobu trvání akčního potenciálu (APD₉₀) měl ze všech srdečních segmentů AV kanál. 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 APD₉₀ u komor (282 ms, $P < 0,001$) byla vyšší než u síní (223 ms, $P < 0,001$).

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. Během stimulace síní dosáhla maximální frekvence komor dosažitelná stimulací 360/min. Tzn. 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. 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. U stejného srdce dosáhla maximální frekvence dosažitelná stimulací pro síně 353/min, ale při takto vysoké frekvenci již byl vyvinut AV blok druhého stupně. 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.

5. Diskuze

5.1 Studium arytmii embryonálního srdce

Pokroky ve vysokorychlostním mapování intracelulární dynamiky kalcia, které provedl na myších embryonálních srdcích Valderrabano a kolektiv (Valderrabano et al., 2006), s sebou 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. 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 během experimentů na ED11,5 – ED12,5 myších srdcí kultivovaných po dobu 24 h *in vitro* (Benes et al., 2014, Vostarek et al., 2014). Imunohistochemické barvení ukázalo, 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 expresi HCN4 opodstatňuje (Moorman et al., 1998, Liang et al., 2013). 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 frekvencích 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).

5.2 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).

5.3 Teplota a srdeční výdej

Experimenty provedené v prostředí *in ovo*, kde srdce zůstalo napojeno na vaskulární systém a oběh krve, vykázaly 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).

5.4 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. 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 a celkové zvýšení četnosti vzniku arytmií (Obr. 1) 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. Díky tomu lze i v přirozeném prostředí *in ovo* korelovat zvýšení četnosti vzniku arytmií a náchylnost AV kanálu na vznik blokad vedení vzruchu se zvýšením teploty. Na druhou stranu snížení teploty v několika případech obnovilo vedení vzruchu AV kanálem po předchozím AV bloku, což pravděpodobně souvisí se snížením metabolických nároků včetně spotřeby O₂.

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 přispívá také nový koncept vedení vzruchu mezi kardiomyocyty tzv. „ephaptické“ vedení (z angl. ephaptic conduction), které se odehrává mimo vodivé spoje myocytů. (Rhett a Gourdie, 2012, Veerarahavan 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 blokad a kde se mohou nacházet heterotypické vodivé spoje 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 exprimující 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. 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).

5.5 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 O₂ pozměněn, silně náchylná ke vzniku AV blokad.

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 (síní 360/min, komora 600/min) než v prostředí *in vitro* (síní 353/min, komora 476/min). Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben výrazně lepší oxygenací srdcí krví 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.

6. 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 blíže 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 nejčastější 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.

English part

1. Introduction

Cardiovascular diseases are nowadays the most common cause of death in the developed world. The prevalence of cardiac arrhythmias is increasing with ageing of population and their occurrence is thus becoming more and more frequent. Arrhythmias significantly decrease the quality of life and their therapy is expensive. Disturbances in cardiac output during foetal development could have fatal impact. Prevention, precise diagnostics and treatment of malignant arrhythmias during foetal stage could highly influence life quality of adult person. Thus, studying of arrhythmogenesis during heart development leading to improvement in prevention and diagnosis, higher efficiency of treatment and new pieces of information plays an important role. Many causes of cardiac arrhythmias remain unknown. Their potential origin in deviations from normal heart development is insufficiently explored. The key role is attributed to the development of cardiac conduction system (CCS) and defects in its function during development lead to problems responsible for high amount of arrhythmias. Animal experimental models (such as chick embryo) are successfully used for detail studying of arrhythmogenesis during heart development (Sarre et al., 2006).

1.1 Function of cardiac conduction system

The arrhythmogenesis is often linked to function of CCS. CCS is composed of the network of specialized cardiomyocytes, which are able to propagate electrical impulse very fast. The heart rhythm is generated by the first part of CCS – sinoatrial (SA) node. It is a drop shaped structure composed of specialized pacemaker cells about 15×3 mm in diameter, localized at inflow of superior caval vein to the right atrium about 1 mm under the surface of epicardium. Impulse generated by the SA node is then propagated through atria by internodal tracts to the AV node. Conduction is slowed there to ensure the efficiency of blood pumping. The bundle of His is the next part of CCS and it is the only electrical connection in fibrous insulation between atria and ventricles. Then follow left and right bundle branches, Purkinje fibres and ventricular working myocardium is activated at the end (Bonow et al., 2008).

1.2 Development of cardiac conduction system

The first part of CCS, which starts to differentiate in the chick embryo between 22 and 33 hours of development, is area of the pacemaker (future sinoatrial node) placed at the most caudal part of the cardiac tube. Pacemaker starts to manifest during the looping of cardiac tube and slow peristaltoid contractions spread caudocranially through the cardiac loop. The conduction velocity is slow and uniform in this phase. Conduction velocity starts to differ between particular heart segments after the formation of cardiac loop. The conduction velocity in future atria and ventricles increases in comparison with the atrioventricular (AV) canal and outflow tract, where slow conduction velocity persists. This difference causes slowing of impulse propagation between atria and ventricles, leading to more effective pumping of blood. This phenomenon appears at about 60 hours of development. It is similar to AV delay caused by the AV node in the mature heart. The last part of CCS to develop is the fast conducting His-Purkinje system differentiating during ventricular septation. The beginning of its function manifests by change of ventricular activation pattern at about day 5 of development. The premature activation pattern from base to apex changes to the mature activation from apex to base (Moorman and Lamers, 1992, Gourdie et al., 2003, Christoffels and Moorman, 2009, Christoffels et al., 2010).

1.3 Basic description of cardiac arrhythmias

Cardiac arrhythmia is generally described as a disturbance in heart rhythm. It could be caused by defect in impulse generation or its propagation and arrhythmias could be generally divided according to these mechanisms into two groups.

1.31 Defects in impulse generation

Defects in impulse generation are characterized by changes in the sinus rhythm. Standard sinus frequency of adult human heart is about 60 to 100 beats per minute (bpm). Sinus tachycardia is defined as sinus frequency >100 bpm (in foetus >180 bpm) and sinus bradycardia as frequency <60 bpm (in foetus <110 bpm). This sinus rhythm is in both cases regular and if it is irregular, it is characterized as sinus arrhythmia. Sinus rhythm is influenced by autonomic nervous system in the adult heart (Silbernagl and Despopoulos, 2004). Sympathetic overstimulation induces tachyarrhythmias and could cause even complete cardiac arrest. An important factor influencing the sinus rhythm is temperature. It has much bigger impact especially in the embryonic heart that lacks regulation through autonomic innervation. Dysfunction in impulse generation by the SA node leads to unmasking of function of ectopic pacemakers (AV node, ventricular pacemaker) with slower firing rate (25 – 55 bpm). These ectopic pacemakers are normally active but their function is masked by the

faster firing rate of the dominant pacemaker. These and other ectopic pacemakers play a role in arrhythmogenesis, if they manifest during normal rhythm and thus perturb it (Silbernagl and Despopoulos, 2004, Sarre et al., 2006, Bonow et al., 2008).

1.32 Defects in impulse propagation

Defects in impulse propagation are mostly caused by blocks of conduction, which often lead to bradyarrhythmias. The most important conduction block is the AV block, which is classified into three degrees. The first degree AV block is characterized only by the slowing of conduction through AV node. The second degree AV block is defined by occasional non-conducted impulse from atria to ventricles. The third degree AV block or complete AV block is defined as a complete block of conduction from atria to ventricles. The presence of a complete AV block can unmask the activity of ectopic pacemakers (AV node, ventricular pacemaker). These well known clinical situations were described also in the chick from embryonic day 3 (Sedmera et al., 2002). Next type of propagation defect is the reentry mechanism. It is caused by circular activation of myocardium. This common mechanism induces number of tachyarrhythmias (Silbernagl and Despopoulos, 2004, Bonow et al., 2008).

1.4 Electrophysiology of embryonic heart and key role of calcium

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 HCN (mainly HCN4) channels, which are activated by hyperpolarization. Thus cardiac automaticity is maintained (DiFrancesco, 2010). Early cardiac rhythmicity is critically dependent on intracellular dynamics of calcium ions. Intracellular level of calcium regulates the strength of contraction during excitation – coupling (Kho et al., 2012). Calcium handling is regulated by calcium ion channels, receptors, ATPases and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) (Bers, 1991). Measuring of intracellular dynamics of calcium is thus able to bring information about changes in early cardiac electric activity and its adaptation to outside conditions.

1.5 Effects of temperature on function of embryonic heart

The function of the embryonic heart is strongly affected by temperature. Changes in the kinetics of ion channels, pumps and exchangers are crucial for generation and propagation of electrical activation through the embryonic heart (Sperelakis and Lehmkuhl, 1967, Chen and DeHaan, 1993). Despite homeothermy, 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. Long-lasting hypothermia (32 – 36 °C) causes cardiac hypertrophy (Warbanow, 1970). These changes are accompanied by increased contractility of embryonic hearts (Warbanow, 1971). Another study focused on hypothermia tests and hemodynamic effects of environmental hypothermia in the stage 18 – 24 (Hamburger and Hamilton, 1951) embryo. Cooling from 34.7 °C 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 innervations, which develop later (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 °C to 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 24 (Nakazawa et al., 1986). An *in vitro* hypothermia-rewarming study by Sarre and colleagues shows dramatic changes in heart rate during cooling from 37 °C 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 °C and 37 °C (Sarre et al., 2006).

2. Hypothesis and aim of the study

Activation of mechanisms causing induction and differentiation of conduction system cells during development is responsible for arrhythmogenesis under different pathological conditions in the adult. We tested the working hypothesis stating that epigenetic factors (temperature, *in vitro* environment stress) influence function of cardiac conduction system during development and lead to arrhythmogenesis by affecting both impulse generation and propagation.

The main goal of this study was to characterize acute temperature effects on function of isolated chick embryonic heart *in vitro* and compare it with the effects on the whole embryo, in which the working heart is coupled to the vascular system.

3. Materials and most important 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 °C in a humidified incubator until day 4 – ED 4 (HH stage 21 – 23, (Hamburger and Hamilton, 1951). Chick embryos were removed from the eggs and placed into Tyrode's solution (composition: NaCl 145 mM, KCl 5.9 mM, CaCl₂ 1.1 mM, MgCl₂ 1.2 mM, glucose 11 mM, HEPES 5 mM; pH = 7.4). Hearts were isolated from the embryos and stained in 2.5 ml Rhod-2 (1.78 mM, Invitrogen) in Tyrode's solution for 1 hour in the dark at room temperature. The hearts were then incubated in 2.5 ml Tyrode's solution for 1 hour in the dark at 38 °C to de-esterify the dye loaded to the myocytes.

Optical mapping

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). Isolated 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, The Netherlands) was maintained by a temperature-controlled stage (Linkam DC-60). An inverted epifluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S) fitted with a high-speed EM-CCD camera (Andor iXon3) 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 °C and 34 °C – cooling, 34 °C and 37 °C – warming, 37 °C and 40 °C – warming).

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 preheated Bath Armor pellets placed (Nickel-Electro Ltd., UK) 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 (Leica Microsystems, Germany) dissecting microscope 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. Two regions of interest were selected on atrium and ventricle, respectively, and heart rate values were obtained by measurement of changes in greyscale levels in time during blood flow (Sedmera et al., 1999, Kockova et al., 2013).

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 analyzed *in ovo* was 19, and each heart was tested at all three temperatures. In all cases, values are presented as mean ± S.D., and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

4. Results

4.1 Experiments *in vitro*

Our observations were divided into three main groups. The first group is represented by spontaneous arrhythmias induced by instability *in vitro*. The second group represents changes in function induced by temperature and the third group covers the experiments with electrical stimulation of embryonic hearts.

4.1.1 Spontaneous arrhythmias

Spontaneous arrhythmias were generated during normothermia independently of temperature changes only due to stress of the *in vitro* environment. Normothermia conditions led spontaneously to 47 arrhythmias (n = 99 hearts) in comparison with hyperthermia (48 arrhythmias, n = 54 hearts) and hypothermia (12 arrhythmias, n = 45 hearts). At least one arrhythmia per heart occurred in 41% of cases during normothermia, 72% of cases during hyperthermia but only 22% of cases during hypothermia (Fig. 1). In total, we observed 107 arrhythmias in 99 hearts under all temperature conditions (Tab. 1). We divided spontaneous arrhythmias into two groups – defects in impulse generation and defects in impulse propagation.

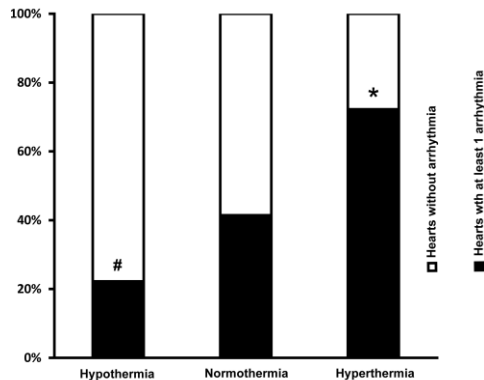


Figure 1

Occurrence of ED4 chick embryonic hearts with at least one arrhythmia *in vitro*.

At least one arrhythmia per heart occurred in 41% of cases during normothermia, 72% of cases during hyperthermia (n = 54 hearts, Pearson's Chi square test $P < 0.001$) and only 22% of cases during hypothermia (n = 45 hearts, Pearson's Chi square test $P < 0.05$).

4.111 Spontaneous defects in impulse generation *in vitro*

Spontaneous defects in impulse generation *in vitro* represented 24% of spontaneous arrhythmias (n = 47). The most common were sinus pauses (15%, n = 47) and other 9% represented atrial extrasystoles.

4.112 Spontaneous defects in impulse propagation *in vitro*

Spontaneous defects in impulse propagation *in vitro* represented 76% of spontaneous arrhythmias (n = 47). The most common was complete AV block (32%, n = 47). Second degree AV block represented 21% of spontaneous arrhythmias. Ventriculo-conotruncal block represented 13% (n = 47) and then two cases of mid-ventricular block and one case of atrial block. We observed also ectopic activity originating from transition of ventricle and outflow tract. This activity was unmasked due to the presence of complete AV block. We observed also one case of AV reentry during normothermia.

4.12 Temperature-induced changes in function of embryonic heart

4.121 Changes in sinus frequency and 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 approximately 20% in hypothermia ($P < 0.001$) and hyperthermia ($P < 0.001$), in comparison with normothermia. 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 (35%) and ventricle (38%), while no significant changes were observed during hypothermia.

4.122 Arrhythmias *in vitro*

We observed a wide spectrum of rhythm disturbances *in vitro* (Tab. 1). These arrhythmias were divided into two groups – defects in impulse generation and defects in impulse propagation.

4.1221 Defects in impulse generation – direct influence on the pacemaker

Defects in generation of electrical impulse represented 28% of all arrhythmias observed *in vitro* (n = 107). Most common were atrial extrasystoles and sinus pauses (missed beats), which together represented 23% of all arrhythmias *in vitro* (Tab. 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 3 out of the 99 hearts analyzed. We also uncovered junction rhythm activity in the AV canal in two cases during hyperthermia, at considerably high firing rates (160 and 180 bpm).

4.1222 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 represented 72% of all observed arrhythmias (n = 107, Tab. 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 56% 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 $P < 0.05$), 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 = 107). The second most common defect was second degree AV block (21% 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. We noted rare arrhythmias such as AV reentry in two cases during hypothermia.

Table 1 – Overview of arrhythmias observed *in vitro*.

Arrhythmias observed in ED4 chick embryonic hearts in vitro. Complete spectrum of observed arrhythmias in hypothermia, normothermia and hyperthermia (total number of observed arrhythmias = 107).

Type of arrhythmia	Occurrence (%)
Complete cardiac arrest	3
Atrial extrasystoles	10
Sinus pauses	13
Junction rhythm and ectopy	3
Atrial block	3
Second-degree AV block	21
Third-degree AV block	35
Mid-ventricular block	2
Ventriculo-conotruncal block	7
AV re-entry	3
Total	100

Modified from Vostarek et al. 2016

4.1222 Localization of third degree AV block

Optical calcium imaging enabled us to precisely localize the sites of conduction blocks. We described and classified various types of the third degree AV block according to localization of conduction block within the AV canal. The most critical part for conduction was the distal part of AV canal, where is the transition between the AV canal and ventricle and we observed there 53% of third degree AV blocks. The second most common site was the proximal part of AV canal (37% of third degree AV blocks) and only 10% of third degree AV blocks occurred in the middle part of AV canal. We observed interesting phenomenon during decrease of temperature from 37 °C to 34 °C, when conduction was completely recovered after previous AV block.

4.2 Experiments *in ovo*

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 bpm in hypothermia, 160 ± 21 bpm

in normothermia and 197 ± 27 bpm in hyperthermia. This dependence of heart rate on temperature was almost linear ($R^2 = 0.999$) and corresponded well with the *in vitro* findings. We observed only a few arrhythmias, which developed in some embryos only during hyperthermia. The most frequent were sinus pauses. Intermittent second degree AV block developed in one case. Third degree AV block was not observed.

4.3 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, hearts with regular rhythm without tachycardia and bradycardia, $n = 10$) 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 (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 bpm. AV canal conduction limit reached 360 bpm during atrial stimulation in one case. During stimulation of atrium, an atrial conduction limit of 360 bpm was found. This being said, second degree AV block regularly occurred when pacing rates exceeded 300 bpm. 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 bpm. These results support our hypothesis that hypoxia could be one of several parameters that would explain our findings, since we never observed such high rates in sinus rhythm, even during the highest tachycardias in hyperthermia *in vitro* 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 bpm. In the same heart a maximum frequency of 353 bpm was reached in the atrium, but second degree AV block developed. The next two highest heart rates successfully propagated through the AV canal in other hearts were 232 bpm and 200 bpm. The remaining hearts didn't even reach 200 bpm with normal AV conduction. A capture limit for the ventricle was reached at 476 bpm.

5. Discussion

5.1 Studying 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 low signal detection in the AV canal, enabling detection of various arrhythmias. Our experimental setup (Vostarek et al., 2014) for imaging normal and stressed embryonic hearts represents a significant technological improvement. Among other advances it enables precise localization and description of defects in impulse propagation and the uncovering of ectopic pacemakers (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) in the isolated embryonic heart model.

We localized ectopic pacemaker at the transition of ventricle and outflow tract. Similar phenomenon was observed by our colleague Dr. Šaňková using voltage imaging during experiments with ED11.5 – 12.5 mouse embryonic hearts cultivated for 24 hours *in vitro* (Benes et al., 2014, Vostarek et al., 2014). Immunohistochemical staining showed in the area of ectopic pacemaker increased expression of HCN4 channels, which are responsible for pacemaker activity. Outflow tract is during this developmental stage composed of primary characterized by slow conduction and high automaticity. This clarifies the increased expression of HCN4 (Moorman et al., 1998, Liang et al., 2013) in that area.

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 and co-workers (Sarre et al., 2006). However, a modest trend towards 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 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 fetuses. It is notable that these more mature fetal hearts were measured under *in vivo* conditions and with full autonomic innervation (Tomek et al., 2011).

5.2 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 °C 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 °C to 34 °C and warming from 34 °C to 37 °C. We didn't 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).

5.3 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 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, like 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, 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).

5.4 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 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 = 107) were caused by

conduction block in the AV canal – first and second degree AV block (Tab. 1). We analyzed in detail various types of AV block. 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 and also general occurrence of arrhythmias (Fig. 1) are influenced by increased temperature or by another factor connected to hyperthermia. It probably corresponds with the increase of metabolic needs of hearts and concomitant decrease in oxygen concentration in the tissue bath with increasing temperature, because we observed only a very few arrhythmias *in ovo* and only during hyperthermia. Thus, it is possible to correlate increasing temperature with increased arrhythmogenesis. On the other hand, we observed few cases of conduction recovery after previous AV block due to decrease in temperature. It could correspond with decrease of metabolic demands allowing resumption of the excitability and conductivity of the myocytes.

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 (Rhett and Gourdie, 2012, Veeraraghavan 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. and later by Sedmera et al., who noted that AV block could not be induced pharmacologically or by anoxia/reoxygenation prior to ED3 (Paff et al., 1964, Sedmera et al., 2002). Ongoing development (ED4) of 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 is crucial for conduction and might include heterotypic Cx45/Cx40 gap junctional coupling, which could have decreased conductance in comparison with homotypic gap junctions (Despantez, 2017). The most common location of AV block was at this 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).

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, de Jong et al., 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).

5.5 Hypoxia in the developing heart

During cardiac development, hypoxic regions are found in several locations of the myocardium (Wikenheiser et al., 2006, Nanka et al., 2006, Nanka et al., 2008). 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). Since 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, 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 bpm) than *in vitro* (261 bpm). Also the conduction limits of the atrium and ventricle respectively were higher *in ovo* (atrium 360 bpm, ventricle 600 bpm) than *in vitro* (atrium 353 bpm, ventricle 476 bpm). 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.

6. Conclusion

This study provides a detailed description of acute temperature effects on function of the chick embryonic heart with focus on arrhythmogenesis. The pacemaker and AV canal were the most temperature-sensitive segments of the embryonic heart. We observed quite high occurrence of spontaneous arrhythmias during normothermia *in vitro* only due to stress of environment in comparison with only few arrhythmias observed *in ovo* and only in hyperthermia. Hyperthermia increased stress and metabolic demands *in vitro* and thus led to increased occurrence of arrhythmias. We observed intermittent second degree AV block even *in ovo* during hyperthermia. Hypothermia was tolerated better than hyperthermia, according to the natural adaptation of chick embryos to intermittent hypothermia. Decrease in temperature caused in few cases recovery after previous AV block, what could correspond with decrease of metabolic demands. The most common arrhythmia was AV block, which occurrence significantly increased with increase in temperature. It was observed typically at the transition between the AV canal and ventricle – the connection of two molecularly and morphologically distinct tissues. Thus, morphological and molecular distinctions between different compartments of the developing heart have physiological consequences manifesting under increased metabolic demands. Acute increase in temperature correlates with increased arrhythmogenesis both *in vitro* and *in ovo*.

Curriculum vitae

Osobní údaje:

Mgr. František Vostárek

Narozen: 8. 12. 1985 v Praze

Vzdělání:

- 2012 – nyní:** Doktorské studium oboru Vývojová biologie, PřF UK v Praze,
Oddělení vývojové kardiologie, FGÚ AV ČR
Disertační práce: Vliv teploty na vznik arytmií během vývoje srdce
- 2010 – 2012:** Navazující magisterské studium oboru Biochemie, PřF UK v Praze
Diplomová práce: Rekombinantní exprese extracelulárních domén
lidských leukocytárních receptorů NKR-P1A a LLT1
- 2005 – 2009:** Bakalářské studium oboru Biochemie, PřF UK v Praze

Výzkumná činnost:

- 2012 – nyní:** Působení na Oddělení vývojové kardiologie, FGÚ AV ČR
- 2007 – 2012:** Působení v Laboratoři přirozené buněčné imunity, MBÚ AV ČR

Granty:

- 2013 – 2016:** Grantová agentura Univerzity Karlovy
Název grantu: Mechanismy vzniku arytmií během vývoje srdce

Curriculum vitae

Personal data:

Name: Mgr. František Vostárek

Place and date of birth: 8. 12. 1985 in Prague

Education:

2012 – present: Ph.D. study, Developmental and Cellular Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague

Department of Developmental Cardiology, Institute of Physiology CAS

Effect of temperature on arrhythmogenesis during heart development

2010 – 2012: Master study, Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague

Expression of the recombinant extracellular parts of human leukocyte receptors LLT1 and NKR-PIA

2005 – 2009: Bachelor study, Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague

Research experience:

2012 – present: Department of Developmental Cardiology, Institute of Physiology CAS

2007 – 2012: Department of Innate Immunity, Institute of Microbiology CAS

Grants:

2013 – 2016: Grant Agency of Charles University

Mechanisms of arrhythmogenesis during heart development

Seznam publikací autora / List of publications

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)

Použitá literatura / 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, 1465-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., Ophhof, 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.
- 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. 2010. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res*, 106, 434-46.

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.

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, 1098-112.

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

Christoffels, V. M. & Moorman, A. F. 2009. Development of the cardiac conduction system: why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others? *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2, 195-207.

Christoffels, V. M., Smits, G. J., Kispert, A. & Moorman, A. F. 2010. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ Res*, 106, 240-54.

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

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

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.

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.

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 Geneeskd*, 136, 2503-8.
- 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.
- Paff, G. H., Boucek, R. J. & Klopfenstein, H. S. 1964. Experimental Heart-Block in the Chick Embryo. *Anat Rec*, 149, 217-23.
- 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.
- Rhett, J. M. & Gourdie, R. G. 2012. The perinexus: a new feature of Cx43 gap junction organization. *Heart Rhythm*, 9, 619-23.
- 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.
- 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., 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., 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.
- Silbernagl, S. & Despopoulos, A. 2004. Atlas fyziologie člověka. Grada Publishing, Praha.
- Sperelakis, N. & Lehmkühl, D. 1967. Effects of temperature and metabolic poisons on membrane potentials of cultured heart cells. *Am J Physiol*, 213, 719-24.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.