

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Natalia Smorodinova

Morfologické a funkční změny kapilárního řečiště a endomysia v lidském atriálním myokardu při fibrilaci síní

Morphological and functional changes in microvasculature and endomysium in human atrial myocardium with atrial fibrillation

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Kučera, PhD.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovávala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně 1.LF UK v Praze a zda užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informační řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

V Praze dne 3.04.2023

Natalia Smorodinova

Podpis

Identifikační záznam

SMORODINOVA, Natalia. Morfologické a funkční změny kapilárního řečiště a endomysia v lidském atriálním myokardu při fibrilaci síní./Morphological and functional changes in microvasculature and endomysium in human atrial myocardium with atrial fibrillation/.Praha, 2023. 87 s., 3 přílohy disertační práce. Univerzita Karlova, 1.lékařská fakulta, Ústav histologie a embryologie. Školitel Kučera, Tomáš

Poděkování

Největší poděkování patří mému školiteli Doc. MUDr. Tomáši Kučerovi, PhD. za odborné vedení celé práce, upřímnou komunikaci, trpělivost, trvalou podporu, rady a připomínky. Děkuji školiteli-konzultantovi, již zesnulému panu Prof. MUDr. Jindřichu Martínkovi, DrSc. za vedení mé disertační práce v prvních letech studia. Všem pracovníkům Ústavu histologie a embryologie za přijetí do kolektivu a paní Marcelu Blažkové a Ing. Lucie Kosové, které mi byly oporou v prvních momentech mé histologické praxe. Dále hodlám poděkovat mnoha svým kolegům z Institutu klinické a experimentální medicíny IKEM za pomoc při odběru materiálu, kolegům z Anatomického ústavu 1.LF UK a kolegům z laboratoře biologie a patologie oka (LBPO) Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN za spolupráci na společných výzkumných projektech.

Na závěr bych ráda poděkovala především svému partnerovi a mé rodině, která mi byla a je po celou dobu nenahraditelnou oporou.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	7
Abstrakt	8
Abstract	9
1.ÚVOD	
1.1. Histologická stavba myokardu	10
1.2 Charakteristika pravé a levé síně	12
1.3 Převodní systém a šíření vzruchu	13
1.4 Cévní zásobení myokardu	16
1.5 Fibrilace síní	17
1.5.1 Definice	17
1.5.2 Klasifikace	18
1.5.3 Epidemiologie, prevalence, mortalita (příčiny a rizikové faktory)	19
1.5.4 Patogeneze, patofyziologie a mechanismus vzniku fibrilace síní	23
1.5.5 Další mechanismy vzniku fibrilace síní	27
1.6 Mechanismy srdeční fibrózy	28
1.7 Vztah atriální fibrilace a srdečního selhání	31
2.CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	32
3. MATERIÁL A METODY	35
3.1 Pacienti	36
3.2 Odběr vzorků tkáně	37
3.3 Histologické barvení	37

3.4 Imunohistochemické značení	37
3.5 Imunofluorescenční značení	39
3.6 Histomorfometrie	40
3.7 Statistická analýza	42
4. VÝSLEDKY	44
4.1 Kolagen I a kolagen III v síňovém myokardu	44
4.2 Elastin v síňovém myokardu	47
4.3 VEGF v síňovém myokardu	48
4.4 Mikrovaskulární hustota denzita v síňovém myokardu	50
4.5 Pericytové pokrytí síňových kapilár	51
4.6 Detekce a kvantifikace CD45+ buněk v síňovém myokardu	53
4.7 CD3-pozitivní T-lymfocyty v síňovém myokardu	55
4.8 CD68-KP1-pozitivní buňky v síňovém myokardu	55
4.9 DC -SIGN- pozitivní dendritické buňky, žírné buňky a B-lymfocyty v síňovém myokardu	57
4.10 Kolagenová histomorfometrie	59
4.11 Imunohistochemická analýza exprese TGF- β a CTGF	60
5. DISKUZE	63
6. ZAVĚR	74
7. LITERATURA	76
Seznam příloh	87

Seznam použitých zkratk

AF atriální fibrilace

AV atrioventrikulární uzel

DM diabetes mellitus

ECM extracelulární matrix

FS fibrilace síní

HE hematoxylin eosin

HIF-1 α hypoxií-indukovatelný faktor 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α)

ICHS ischemická choroba srdeční

IM infarkt myokardu

LK levá komora

LS levá síň

MPD hustota kapilár (microvessel density)

MPI pokrytí cév pericyty (microvessel pericyte coverage index)

NSS náhlá srdeční smrt

PBS fosfátový pufr (phosphate buffer solution)

PŽ plicní žíla

SA sinoatriální uzel

SR sinusový rytmus

TSH thyrotropní hormon

VEGF vaskulární růstový faktor endotelových buněk (vascular endothelial growth factor)

Abstrakt

Tato disertační práce byla zaměřena na morfologické a funkční změny kapilárního řečiště a endomysia v lidském atriálním myokardu při fibrilaci síní. Fibrilace síní (FS) je jednou z nejčastějších arytmií, se kterou se setkáváme v klinické praxi, je spojena se zvýšeným rizikem úmrtnosti a silně souvisí se stářím. Její patogenese stále není dostatečně prozkoumána. Jeden ze známých faktorů přispívajících k udržení FS je strukturální přestavba myokardu. Strukturální remodelace se projevuje jednak změnami samotných síňových kardiomyocytů, ale také změnami v endomysiu.

Studovali jsme síňové biopsie získané od pacientů kteří podstoupili aorto-koronární bypass nebo operaci mitrální chlopně. Pacienti měli pravidelný sinusový rytmus nebo fibrilaci síní. Imunohistochemie byla použita k vizualizaci kolagenu I, kolagenu III, elastinu, desminu, aktinu hladkého svalstva a VEGF ve vzorcích síní. Pro detekci kapilár byl použit UEA-lektin. Pro detekci různých typů imunitních buněk byly imunohistochemicky detekovány následující markery: CD45 jako marker panleukocytů, CD3 pro T-lymfocyty, CD68 pro monocyty/makrofágy, tryptáza z žírných buněk pro žírné buňky a DC-SIGN pro nezralé dendritické buňky.

Naše výsledky dokumentují, že u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci lze nalézt variabilní hladinu ECM proteinů, ale množství kolagenu I, kolagenu III a elastinu se neliší, když je skupina pacientů rozdělena na základě přítomnosti fibrilace síní nebo sinusového rytmu. Objemová frakce elastinu je vyšší v pravé síni ve srovnání s levou, což může odrážet odlišnou biomechaniku nebo embryonální původ. VEGF je přítomen v myokardu pacientů, ale jeho množství není závislé na srdečním rytmu. Většina síňových kapilár je spojena s pericyty, ale podobně jako u mikrovaskulární hustoty jsme nepozorovali změny během fibrilace síní nebo při porovnávání levé a pravé síně. CD45+ buňky jsou heterogenní buněčná populace v síňovém myokardu u pacientů podstupujících otevřenou operaci srdce a tyto buňky mohou být detekovány bez ohledu na srdeční rytmus. Vyšší frekvence CD45+ leukocytů s prodlouženými výběžky ve vzorcích AF naznačuje aktivaci zánětlivých buněk při této arytmií.

Klíčová slova: fibrilace síní, myokard, endomysium, kolagen, fibróza

Abstract

This doctoral thesis was focused on morphological and functional changes in microvasculature and endomysium in human atrial myocardium with atrial fibrillation. Atrial fibrillation (AF) is one of the most common arrhythmias in the clinical practice and it is associated with an increase in mortality risk that is strongly related with old age. Its pathogenesis is still not sufficiently explored. One of the generally recognized factors contributing to the initiation and maintenance of atrial fibrillation is structural remodeling of the myocardium. Structural remodeling is reflected by changes that affect both atrial cardiomyocytes as well as endomysium.

We analyzed atrial biopsies obtained from patients undergoing bypass or mitral valve surgery. The patients had a regular sinus rhythm or were suffering from AF. Immunohistochemistry was used to visualize collagen I, collagen III, elastin, desmin, smooth muscle actin and VEGF in the atrial samples. To detect capillaries UEA-lectin was used. For detection of different types of immune cells the following markers were detected immunohistochemically: CD45 as a pan-leukocyte marker, CD3 for T-lymphocytes, CD68 for monocyte/macrophages, mast cell tryptase for mast cells and DC-SIGN for immature dendritic cells.

Our results document that in patients undergoing open heart surgery variable level of ECM proteins can be found but the amount of collagen I, collagen III and elastin do not differ when the patient group is divided based on the presence of atrial fibrillation or sinus rhythm. Elastin volume fraction is higher in the right atrium compared to the left possibly reflecting different biomechanics or embryonic origin. VEGF is present in myocardia of patients but its amount is not dependent on the heart rhythm. Most of atrial capillaries are associated with pericytes but similar to microvascular density we did not observe changes during atrial fibrillation or when left and right atrium was compared. CD45⁺ cells are a heterogeneous cell population in atrial myocardium from patients undergoing open heart surgery and these cells can be detected regardless of the heart rhythm. The finding of higher frequency of CD45⁺ leukocytes with elongated processes in the AF samples suggests the activation of inflammatory cells in this arrhythmia.

Key words: atrial fibrillation, myocardium, endomysium, collagen, fibrosis

1.UVOD

1.1.Histologická stavba myokardu

Z morfologického hlediska se srdeční stěna skládá ze tří vrstev – endokardu, myokardu a epikardu. Myokard je hlavní a nejmohutnější vrstvou srdeční stěny. Je tvořený příčně pruhovanou svalovinou – kardiomyocyty a extracelulární matrix (ECM), ve které probíhají krevní a lymfatické cévy a nervy. Kardiomyocyty jsou buňky cylindrického tvaru. Na koncích jsou rozvětvené a měří okolo 100 μm na délku, přičemž v průměru mají 10-15 μm . Kardiomyocyty mají oválné, protáhle jádro, uložené uprostřed buňky. Kardiomyocyty obsahují příčně pruhované myofibrily, které se skládají z kontraktálních proteinů myofilament. Povrch buněk je ohraničen sarkolemou. V extrafibrilární sarkoplazmě buňky jsou obsaženy hojné mitochondrie, Golgiho aparát, kapénky lipidu, částice glykogenu a pigment lipofuscin. Buňky jsou navzájem spojeny pomocí interkalárních disků, které jsou tvořené komplexem specializovaných mezibuněčných kontaktů a skládají se z fascie adherentes, desmosomů a nexů (Mescher 2018; Šteiner 2010). Nexy zprostředkovávají elektrickou vazbu kardiomyocytů. Mezibuněčné kanály skládající se z connexinu umožňují iontovou výměnu mezi sousedními buňkami. V srdci je hlavním proteinem nexů je CX43 spojený s řízením mezibuněčné komunikace (Qiu, Zhou, and Liu 2016).

Kardiomyocyty síní jsou menší než komorové a obsahují sekreční granula. Myocyty převodního systému jsou menší než buňky myokardu kontraktálního (Šteiner 2010). Vrstva myokardu je výrazně tenčí ve stěnách a v septu předsíní než ve stěnách a v septu komor. Mezibuněčné hmoty je více mezi pruhy svaloviny předsíní než mezi pruhy svaloviny komor. Svalovina stěn levé komory je třikrát mohutnější než svalovina stěn pravé komory (Čichák 2016).

Kardiomyocyty jsou obklopeny intersticiální sítí ECM, tvořenou převážně fibrilárními kolageny (Bowers, Banerjee, and Baudino 2010). Srdeční ECM slouží nejen jako mechanické lešení, ale je také důležitá pro přenos kontraktilní síly. Mezi hlavní srdeční intersticiální kolageny patří kolageny I, III, IV a V (Jirmár and Pelouch 1993). Převládají typy I a III, které jsou nezbytné pro strukturální a funkční integritu myokardu. Jejich změny v poměru exprese jsou považovány za důležité pro pružnost a tuhost srdce a mohou zvýšit náchylnost k reentrantním arytmiím (Jugdutt 2003; Weber et al. 1992). Srdeční ECM obsahuje také elastiny, glykosoaminoglykany, multiadhezní molekuly (fibronektin, laminin, nidogen), antiadhezní proteiny (tenascin, trombospondin, osteopontin) a enzymy (metaloproteinázy), které mohou být po poranění rychle aktivovány a stimulují opravu (Jugdutt 2003).

Většina proteinů ECM se tvoří v srdečních fibroblastech. Srdeční fibroblasty, hlavní buňky produkující ECM, tvoří jednu z největších buněčných populací a hrají důležitou homeostatickou roli. Fibroblasty lze odlišit od jiných intersticiálních buněk myokardu na základě exprese receptoru 2 obsahujícího diskoidinovou doménu, PDGFR-a, a transkripčního faktoru Tcf21. Identifikace a charakterizace populací fibroblastů je dále komplikována jejich dynamickými fenotypovými změnami v poškozených tkáních (Tallquist 2020). V srdci po infarktu myokardu nebo srdečním stresu, podléhají fibroblasty přeměně na myofibroblasty, buňky, které vykazují výrazné endoplazmatické retikulum (indikující synteticky aktivní fenotyp) a expresi kontraktilních proteinů, jako je aktin hladkého svalstva (α -SMA) (Hinz 2007, 2010).

Fibroblasty a myofibroblasty jsou heterogenní populace, která se skládá z několika podskupin s odlišnými transkriptomickými profily (Farbehi et al. 2019). Rezidentní srdeční fibroblasty slouží k udržení strukturální integrity ECM sítě, (Eghbali et al. 1989) regulují obrát kolagenu, což je proces, který vyžaduje neustálou syntézu a degradaci proteinů ECM (Brown et al. 2005; Spinale 2007). Myokardiální kolageny zajišťují strukturální integritu a geometrii myokardu,

umožňují reagovat na zkracování myocytu a převádějí změny sarkomery na celkovou čerpací funkci levé komory. Jsou nezbytné pro udržení organizace celé osy: kolagen-integriny-cytoskelet-myofibrilární struktury (Li et al. 2020; Lindsey et al. 2005; Pauschinger et al. 2002). V intersticiální ECM je zapojeno a vzájemně komunikuje několik různých typů buněk. Cévní endotelové buňky odráží bohatou mikrovaskulární složku myokardu. V normálním srdečním intersticiu se také nacházejí menší populace imunitních buněk a cévních buněk (buňky hladkého svalstva a pericyty) (Bajpai et al. 2018; Epelman et al. 2014; Lee et al. 2018). Největší populaci imunitních buněk tvoří CD68-KP1+ buňky linie monocytů/makrofágů odpovídající převážně makrofágům a dendritickým buňkám, které byly imunoreaktivní vůči DC-SIGN (Afanasyeva, Georgakopoulos, and Rose 2004). Úloha těchto buněk je stále předmětem probíhajícího výzkumu a tyto buňky mohou mít jak příznivé, tak škodlivé účinky na srdce na základě různých patofyziologických okolností (Marty and Eriksson 2006; Pistulli et al. 2013).

1.2.Charakteristika pravé a levé síně

Srdce se skládá ze čtyř oddílů: levé síně, levé komory, pravé komory a pravé síně. Pravostranné oddíly pumpují krev do malého (plicního) oběhu, levostranné srdeční oddíly vypuzují krev do velkého (systémového) oběhu. Srdeční síně hrají významnou roli ve fyziologii srdce. Shromažďují krev během systoly a moduluji plnění komor během diastoly. Pravá síň leží nad a za pravou komorou a před levou síní. Stěna pravé síně obsahuje iniciální část převodního systému srdečního – sinoatriální (SA) a atrioventrikulární (AV) uzly, které tvoří vzruchy pro pravidelné stahy srdce. Z pravé síně krev protéká přes trikuspidální chlopeň, a pak přes komoru vtokovou částí proteče trabeculou carnae složenou z myokardu, dále pokračuje do výtokové části conus arteriosus. Pulmonální chlopní protéká do plicní tepny a

jejími větvemi do plic, kde dochází k výměně krevních plynů (Čihák, Haman, and Táborský 2016).

Levá síň má sférický tvar s objemem podle echokardiografických metod měření $22 \pm 6 \text{ ml/m}^2$. Stěna levé síně (3–5 mm) zajišťuje dobrou pružnost, slouží jako rezervoár během komorové systoly, a pak po otevření mitrální chlopně přesouvá krev do levé komory (Kittnar O. 2011; Škňouřil and Fiala 2013). Během první fáze diastoly levá síň převádí krev pasivně z plicních žil do levé komory. Naplnění levé komory je následně zajištěno systolou levé síně, která diastolickou fázi komor ukončuje. Během kontrakce levé síně se srdeční tepový objem zvyšuje o 10 až 30 % (Appleton, Hatle, and Popp 1988; Mitchell and Shapiro 1969). Levá síň je dobře vybavena několika vrstvami svalových vláken. Subepikardiální svalová vlákna jsou orientována především cirkulárně a obkružují levou síň laterálně od septa, v němž jsou zakotvena ve svalovém valu kolem fossa ovalis. Cirkulární vlákna jsou nejvýraznější nad mitrálním prstencem, a pak k této vrstvě vláken směrem k endokardu přidávají vlákna podélná a šikmá. Podélná vlákna směřují od stropu levé síně a končí v mitrálním prstenci, jehož vazivové struktury kompletně oddělují svalovinu síní a komor. Svalová vlákna mění směr a jednotlivé vrstvy se vzájemně proplétají, čímž vznikají podmínky pro velmi rozmanité vedení elektrických vzruchů. Svalová vlákna rovněž přecházejí na ústí plicní žíly, v nichž tvoří svalové rukávy zasahující hlouběji do vlastní žíly. Proximálně jsou tato svalová vlákna solidní a zcela obkružující ústí plicních žil, distálněji se nepravidelně rozvětvují a postupně vytrácejí (Ho, Anderson, and Sanchez-Quintana 2002).

1.3.Převodní systém a šíření vzruchu

Srdce je vybaveno speciálním systémem buněk, které mají minimální nebo žádné kontrakční schopnosti, ale které jsou schopny vytvářet v srdci elektrické vzruchy a rozvádět je přesně

naprogramovanou rychlostí po kontraktálním myokardu. Akční potenciál myokardu má výrazně delší trvání a liší se svým průběhem v různých částech srdce, především podle funkce (pracovní myokard nebo převodní systém srdeční), ale také podle lokalizace myokardiálních buněk (Kittnar O. 2011).

Převodní systém srdeční je soustava specializovaných svalových buněk v srdci, generující elektrické impulzy a umožňující koordinovaně a efektivně rozvádět elektrické vzruchy nutné ke kontrakci srdce (Sedmera and Vostarek 2017). Srdeční sval se elektricky aktivuje od hrotu směrem k bázi srdce, od endokardu přes myokard až k epikardu. Fyziologicky vzniká vzruch v sinoatriálním uzlu (SA) umístěném pod epikardem ve stěně pravé předsíně blízko ústí horní duté žíly. Odtud se pak šíří po celém pracovním myokardu předsíní. SA uzel je hlavním srdečním pacemakerem a udává frekvenci vzruchů, která u zdravého srdce představuje frekvenci srdečních stahů 60–100/min (Kittnar O. 2011). Přítomnost iontových kanálů – HCN (zejména HCN4) umožňuje tento proces. Tyto kanály jsou aktivovány během hyperpolarizace membrány. Kanály se otevírají a způsobují pomalou depolarizaci, jež překročením prahového potenciálu vyústí rychlou depolarizací v akční potenciál a celý cyklus se poté opakuje (DiFrancesco 1993; Sedmera and Vostarek 2017; Pauschinger et al. 2002). SA uzel tvoří tzv. pacemakerové buňky, které se vyznačují právě expresí HCN4, což je všeobecně uznávaný pacemakerový marker (DiFrancesco 2010; Mommersteeg, Brown, et al. 2007; Mommersteeg, Hoogaars, et al. 2007).

Pod endokardem na spodině pravé předsíně blízko ústí sinus coronarius se nachází atrioventrikulární uzel (AV) s pomalým vedením akčního potenciálu (0,02–0,05 m/s), což výrazně zdržuje postup vzruchu z předsíní na komory (Kittnar O. 2011). Na jeho dolní část je navázán Hisův svazek, který proniká membránovým septem mezi síněmi a komorami. Dále v mezikomorovém septu navazují pravé a levé Tawarovo raménko, která jsou elektricky odizolována od pracovního myokardu (Sedmera and Vostarek 2017; Suma 2001). Převodní

systém komor se větví na Purkyňova vlákna, která vytvářejí subendokardovou síť, uloženou na úrovni obou komor.

Srdce v sobě zahrnuje vlastnosti elektrické, při které vzniká a šíří se elektrické podráždění a mechanické ve formě kontrakce srdeční svaloviny. Různé typy buněk mají odlišné elektrické vlastnosti membrán ovlivněné rozlišením zastoupení iontových kanálů a načasováním jejich otevírání, zavírání, popřípadě jejich inaktivací v membráně těchto buněk (Nováková and CSc 2007).

Buňky síňového a komorového myokardu jsou propojeny do podoby syncytia pomocí speciálních bílkovinných struktur v jejich membránách. V klidu jsou membrány všech buněk polarizované díky přítomnosti sodíko-draslíkové pumpy (draslíkový potenciálem -90 mV a sodíkový potenciál $+60$ mV). Draslíkové kanály v klidu jsou více otevřeny a uvnitř buňky převládá potenciál -70 mV.

Při podráždění pracovního myokardu vzniká akční napětí buněk, sodíkové kanály se otevírají a do buňky vstupuje Na^+ . Napětí se bude blížit k hodnotě sodíkového koncentračního članku $+30$ mV. Dále při otevírání draslíkových kanálů dojde k návratu změny polarity membrány ke klidovým hodnotám – repolarizace, opět v několika fázích: fáze 1 – časná rychlá repolarizace ($+30$ až $+5$ mV), fáze 3 – závěrečná rychlá repolarizace (0 až -70 mV).

Vápníkový proud I_{Ca} zpomaluje průběh repolarizace, prodlužuje úsek a vytvářejí tzv. plató ve fázi 2, kolem 0 mV. Spontánní depolarizace membrán buněk převodního systému v SA a AV uzlu je zahájena prouděním Ca^{2+} pouze s malým příspěvkem Na^+ .

SA uzel má nejkratší spontánní depolarizaci. Jestli SA uzel bude vyloučen za nějakých okolností z činnosti, jeho roli přebírá AV uzel, Hisův svazek nebo Tawarova raménka a postupně se budou snižovat frekvence vygenerovaných vzruchů (Nováková and CSc 2007; Silbernagl et al. 2016).

1.4.Cévní zásobení myokardu

Srdce je zásobeno větvemi dvou koronárních (věncitých) tepen, které se dělení na pravou a levou koronární tepnu a srdeční sval je taktovyzívován okysličenou krví. Mezi lidmi existují poměrně velké individuální rozdíly v větvení koronárních tepen. Každá z věncitých tepen zásobuje určitou část myokardu. Tepny odstupují z kořene aorty a levá koronární tepna se krátce po odstupu dělí na ramus interventricularis anterior (RIA) a ramus cirkumflexus (RC). Levá koronární tepna pomocí RIA zásobuje převážnou část levé komory a přední část mezikomorového septa, RC zásobují levou síň a boční a horní část levé komory. Pravá koronární tepna směřuje dolů po pravé straně srdce v blízkosti ouška a zásobuje kyslíkem většinu pravé komory, horní zadní část komorového septa a pravou síň. Odkysličenou krev ze stěn myokardu odvádí venae cordis. Sinus coronarius uložený na zadní stěně pravé síně je hlavním sběrným kmenem žilního odtoku ze srdečních (Čichák 2016; Staněk 2020).

Mikrocirkulace myokardu je heterogenní cévní kompartment sestávající z cév o průměru <500 µm, tj. malých tepen, arteriol, kapilár a postkapilárních žilek, které jsou zodpovědné za distribuci krve a přenos vody a rozpuštěných látek k pracujícím kardiomyocytům (Hearse et al. 1993). Endotelové buňky produkují celou škálu mediátorů, které se dostanou do krevního oběhu a lokálně difundují do sousedních hladkých svalových buněk a kardiomyocytů. Oxid dusnatý indukuje vazorelaxaci a hraje další důležité role: zháší superoxidové radikály, zmírňuje adheenci a aktivaci krevních destiček, moduluje mikrovaskulární permeabilitu, inhibuje funkci leukocytů, a reguluje kontraktilní funkci myokardu (Kelly, Balligand, and Smith 1996; Kurose et al. 1993; Moncada 1999).

1.5.Fibrilace síní

1.5.1 Definice

Fibrilace síní (FS) je supraventrikulární arytmie, charakterizovaná rychlou, nekoordinovanou akcí síní. Na elektrokardiografickém záznamu nejsou patrné jasné vlny P, někdy lze rozpoznat rychlé fibrilační vlnky o frekvenci $> 300/\text{min}$ či vlnění izoelektrické linie. Vlnky se mohou místy do určité míry zpravidelnit a zvětšit. Frekvence práce komor zaleží na tonu sympatiku a vagu, převodních vlastnostech AV uzlu a také vlivu medikace. Někdy je akce komor relativně vyrovnaná a kolísá v malém rozmezí, jindy je zcela nevyrovnaná. Při vyšším převodu na komory mohou být některé nebo všechny komplexy QRS aberované. Pravidelná akce komor je typická pro atrioventrikulární blokádu a náhradní junkční či komorový rytmus, aktivní náhradní rytmus a přechod fibrilace síní v jinou arytmii. Fibrilaci síní může maskovat také pravidelný stimulovaný rytmus. Jako fibrilace síní se označují epizody trvající minimálně 30 sekund (Čihák et al. 2012; Šmíd and Rokyta 2017).

Fibrilace síní se může vyskytovat samostatně či být spojena s jinými supraventrikulárními arytmiemi. Poměrně častý je společný výskyt s flutterem síní, kdy se mohou obě arytmie u téhož nemocného střídat či přecházet jedna v druhou. FS může být spojena se síňovými tachykardiemi, s AV nodální a AV reentry tachykardií: tyto tachykardie ji dokonce mohou spouštět. Velmi často lze u pacientů s paroxysmální fibrilací síní při EKG monitoraci zachytit četné supraventrikulární extrasystoly nebo jejich salvy, které fibrilace síní spouštějí (Čihák et al. 2012).

1.5.2 Klasifikace

Fibrilaci síní můžeme klasifikovat podle několika kritérií. V současnosti se nejčastěji doporučují klasifikace fibrilace síní, která je založena na délce trvání FS (Camm et al. 2010; Levy et al. 2003). Používají se dělení na fibrilaci síní jako první dokumentovanou ataku, paroxysmální, perzistující, dlouhodobě perzistující a permanentní fibrilaci síní.

Poprvé diagnostikovaná	FS nediodagnostikovaná dříve bez ohledu na trvání a přítomnost/závažnost příznaků
Paroxysmální	FS ukončená spontánně nebo pomocí intervence do 7 dnů od svého vzniku
Perzistující	FS trvající nepřetržitě >7 dnů, včetně epizod ukončených kardioverzí po 7 dnech
Perzistující dlouhodobě	FS trvající nepřetržitě >12 měsíců, jestliže je rozhodnuto o strategii kontroly rytmu
Permanentní	FS přijatá pacientem nebo lékařem a nejsou podnikány další pokusy o obnovu/udržování sinusového rytmu. Permanentní FS reprezentuje přístup pacienta a lékaře a nikoli patofyziologické vlastnosti FS. Při rozhodnutí o kontrole rytmu se arytmie překlasifikuje jako (dlouhodobá) perzistentní FS.

Tab.1 Typy fibrilace síní

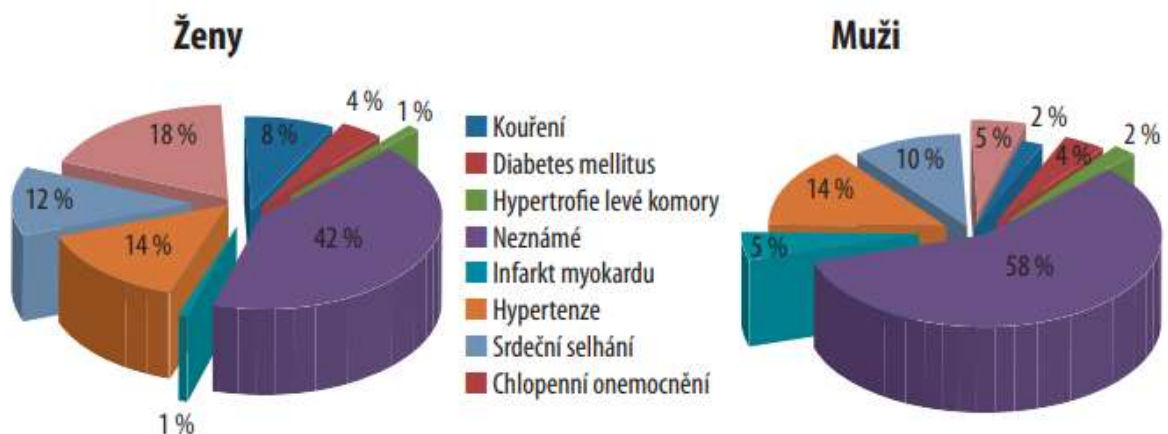
Poprvé diagnostikovaná fibrilace síní může být symptomatická i asymptomatická, spontánně končící i přetrvávající. Epizoda může být jedna nebo v budoucnu může dojít k opakování. Za recidivující fibrilaci síní jsou označovány případy dokumentované dvakrát. Paroxysmální fibrilace síní spočívá v recidivách FS, které končí spontánně a trvají alespoň 30 sekund, i když za určitých okolností mají význam i epizody kratší. Perzistující fibrilace síní přetrvává déle než sedm dní a epizody ve většině případů končí až po užívání léku nebo po provedené elektrokardioverzi. U jednoho pacienta se mohou současně vyskytovat kratší paroxysmy fibrilace síní i epizody perzistující formy. Dlouhodobě perzistující fibrilace síní trvá déle než

rok. Permanentní fibrilace síní většinou přetrvává nebo časně recidivuje i po kardioverzích a považuje se za trvalý srdeční rytmus pacienta.

Při posuzování FS u individuálního nemocného však musíme přihlídnout k řadě jiných faktorů, jako je symptomatologie, hemodynamický vliv, trvání FS či frekvence atak, věk pacienta, přítomnost a závažnost kardiálního onemocnění a dalších přidružených chorob (Táborský 2013).

1.5.3 Epidemiologie, prevalence a mortalita (příčiny a rizikové faktory)

Atriální fibrilace (AF) je jedna z nejčastějších arytmí, jejíž patogeneze je stále pouze nedostatečně prozkoumána. Mortalita pacientů s fibrilací síní je přibližně 2x vyšší než u pacientů se sinusovým rytmem. V evropské populační studii (Rotterdam study) byla celková incidence fibrilace síní 9,9 případu na 1000 obyvatel za rok. Faktory zvyšující riziko vzniku fibrilace síní je věk, pohlaví a přítomnost kardiovaskulárního onemocnění Obr.1.



Obr.1 Rizikové faktory fibrilace síní (Táborský 2013)

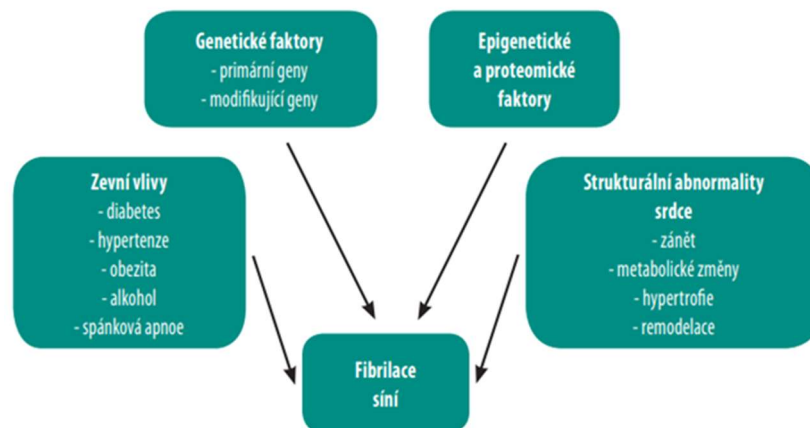
U většiny pacientů fibrilace síní vzniká jako důsledek souběžně působících mnohočetných faktorů. U další skupiny pacientů je možné zaznamenat genetickou predispozici,

kardiochirurgický výkon, obezitu, užívání alkoholu, spánkovou apnoe a diabetes mellitus (DM)

Obr.2.

Jednou z častých příčin FS je porucha funkce štítné žlázy. Tak například, subklinická hyperthyreozá s nízkou koncentrací thyrotropinu (TSH) výrazně (3-5x) zvyšuje riziko FS.

Existuje několik výzkumných prací hodnotících souvislost mezi DM a AF, které zjistily, že DM je významným nezávislým rizikovým faktorem pro fibrilaci síní (Feinberg et al. 1995; Ostgren et al. 2004; Psaty et al. 1997). Mechanismus, jakým onemocnění DM ovlivňuje vznik a progresi AF není dosud znám. Uvažuje se o poruchách koronárního mikrovaskulárního řečiště a metabolické dysfunkci síňového myokardu (Heather and Clarke 2011; Movahed, Hashemzadeh, and Jamal 2005). U diabetických potkanů byla pozorována fibróza síňového myokardu, kterou bylo možné omezit při potlačení tvorby advanced glycation end-products (Kato et al. 2008). Navíc je DM spojen s řadou systémových onemocnění jako je například infekce a selhání ledvin spojené s poruchami homeostázy elektrolytů, které by mohly ovlivnit atrium a stát se spouštěčem AF (Movahed, Hashemzadeh, and Jamal 2005) .



Obr. 2 Etiopatogeneze fibrilace síní (Táborský 2013).

Nové poznatky o genetické predispozici ke vzniku fibrilace síní přináší celogenomové asoiační studie (GWAS) (Burstein and Nattel 2008). Framingham Heart Study pozorovali u

pacientů s alespoň jedním z rodičů s diagnózou fibrilace síní 1,8× vyšší riziko rozvoje tohoto onemocnění než u těch, kteří měli negativní rodinnou anamnézu (Fox et al. 2004). Více než 30 % pacientů má prvostupňové příbuzné s fibrilací síní (Ellinor et al. 2005; Marcus et al. 2008). U nefamiliární fibrilace síní bylo popsáno několik genetických variant, které zvyšují riziko vzniku fibrilace síní. Tyto varianty jsou v populaci běžné, přispívají malým rizikem ke vzniku fibrilace síní. Molekulární defekty, které způsobují familiární FS, nejsou zatím příliš jasné. Gudbjartsson et al. popsal několik chromozomálních aberací, studie identifikovali lokus na chromozomu 4q25 asociovaný s fibrilací síní u subjektů všech věkových kategorií (Gudbjartsson et al. 2007). Byly nalezeny dvě rizikové alely pro fibrilaci síní, a to rs2200733 a rs10033464 v signifikantní asociaci s ischemickou cévní mozkovou příhodou a jako silné riziko kardioembolizační cévní mozkové příhody (Gretarsdottir et al. 2008; Táborský 2013).

Rostoucí věk je ze všech rizikových faktorů spojen nejsilněji s rostoucím výskytem fibrilace síní (Wakili et al. 2011). Její prevalence je okolo 1% u mladších osob a u osob starších 75 let dosahuje 9% (Heeringa et al. 2006). Podle věku se liší i manifestace AF: u mladších pacientů jsou spíše ojedinělé paroxysmy AF, s rostoucím věkem četnost atak stoupá či arytmie přechází v permanentní (Go et al. 2001; Kannel et al. 1982; Psaty et al. 1997). Existuje několik studií, které zaznamenaly vyšší výskyt atriální fibrózy se stoupajícím věkem (Annoni et al. 1998; Goette et al. 2002). Gramley et al. ukázal, že v biopsiích pravé síně získané u starších pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci je vyšší výskyt fibrózy a nižší exprese markerů hypoxie a angiogeneze (Gramley et al. 2009). Stoupající věk může být spojen s některými strukturálními změnami v myokardu, tyto změny budou udržovat elektricko-anatomický podklad nezbytný pro vznik a udržení FS. S přibývajícím věkem se zvyšuje izolace kardiomyocytů v důsledku snížené exprese connexinů a zvýšené tvorby fibrózní tkáně mezi kardiomyocyty síní (Spach et al. 2007). Ve Framinghamské studii, která sledovala 8725 pacientů po dobu 30 let, se fibrilace síní rozvinula u 10,7 % jedinců, celoživotní riziko rozvoje

FS pro osoby ve věku 40–95 let bylo 26 % pro muže a 23 % pro ženy (Lloyd-Jones et al. 2004). Za posledních 20 let prevalence atriální fibrilace u mužů vzrostla více než dvojnásobně (z původních 1,4% na 3,3%), u žen prevalence spíše klesá nebo přinejmenším stagnuje (Friberg et al. 2003).

Atriální fibrilace u dětí je neobvyklá, pokud je přítomná, může být spojena se závažnými strukturálními onemocněními srdce nebo vzniká po kardiochirurgických operacích.

Část pacientů s AF je současně postižena dalšími srdečními poruchami - nejčastější hypertenzí, ischemickou chorobou srdeční, kardiomyopatií, chlopenními vadami (zejména mitrální stenózou) a perikarditidami.

Arteriální hypertenze ve Framinghamské studii byla u 14% jedinců s FS a byla identifikována jako největší rizikový faktor pro vznik FS (Lloyd-Jones et al. 2004). Hypertenze také zvyšuje riziko rozvoje mozkové příhody nebo intrakraniálního krvácení. Ischemická choroba srdeční je pozorována u 20% pacientů s FS. Po infarktu myokardu může u 6-9% postižených nastat FS v důsledku ischemie a přepětí při srdečním selhání. Přítomnost AF nezávisle zvyšuje morbiditu a mortalitu pacientů, především v důsledku tromboembolických komplikací a srdečního selhání.

Chlopenní vady zvyšují riziko rozvoje atriální fibrilace. FS bývá často první manifestací mitrální stenózy nebo regurgitace a vyskytuje se také v pozdějších stádiích aortální stenózy.

Většina pacientů, kteří podstoupili operativní výměnu chlopní měli AF.

1.5.4 Patogeneze, patofyziologie a mechanismus vzniku fibrilace síní

Patogeneze FS nebyla dosud plně objasněna. U pacientu s fibrilací síní byly nalezeny strukturální změny v myokardu síní, které byly charakterizované ztrátou masy svalové tkáně spolu s fibrotickými změnami souvisejícími s dilatací síní. Tyto změny ve struktuře stěny síní pak udržují FS a FS přechází do permanentní formy (Lukl 2009).

Mechanismus vzniku FS je multifaktoriální a komplexní. Vyvolávajícím faktorem FS jsou ložiska ektopické aktivity vedoucí ke vzniku reentry okruhu. Vznik, vývoj i vlastnosti spouštěcího zdroje a substrátu ovlivňují četné faktory (Chen et al. 2006).

Ložisko může být jedno či několik, jejich aktivita se může střídat a nejčastěji se objevují v ústí plicních žil (Čihák et al. 2012; Eckstein et al. 2008), ale mohou být přítomna také kdekoli v srdečních síních (Ho et al. 1999). Vznik ektopických ložisek může být podmíněn pokračováním svaloviny ze síní do ústí plicních žil (Táborský 2013). Pod vlivem neustálých ektopických impulzů dochází k remodelaci síní, a to na elektrické, kontraktilní i strukturální úrovni (Allessie, Ausma, and Schotten 2002). Při elektrické remodelaci probíhají změny v intervalu minut a při strukturální remodelaci - dny a měsíce. Strukturální a elektrofyzilogické vlastností kardiomyocytů se navíc mění s rostoucím věkem a při různých kardiovaskulárních i jiných onemocněních.

Patologickou změnou, která nejčastěji provází vznik atriální fibrilace, je fibrotizace síní a ztráta kontraktilní svaloviny. Vazivo oddělující kardiomyocyty vede k nehomogennímu vedení vzruchu v síních. Změny postihují také sinusový a atrioventrikulární uzel a mohou vést k syndromu chorého sinu a AV blokádám. Změny sinového uzlu dále zhoršují FS a potlačují jeho aktivitu (Táborský 2013).

Napětí stěn síní (stretch) aktivuje systém renin-angiotenzin-aldosteron. Zvýšené množství angiotensinu II a růstového faktoru beta-1(TGF-beta1) vede k produkci růstového faktoru vazivové tkáně (connective tissue growth factor, CTGF).

Kromě fibrotizace myokardu dochází i ke změnám v důsledků poruch šíření impulzů mezi kardiomyocyty, a také k částečnému bloku mezibuněčného spojení umožňujícího vznik a udržení AF. Zvyšování množství vaziva při AF není primární, ale je aktivováno zvětšováním síní. Dále, rychlá frekvence síní vede k ischemii, která dále prohlubuje změny kardiomyocytů (Allessie, Ausma, and Schotten 2002). Remodelace srdeční tkáně může být důsledkem syntézy kvalitativně a kvantitativně odlišných kolagenních a nekolagenních proteinů (Jugdutt 2003).

Remodelace struktury síní a elektrická remodelace jsou dva důležité rysy AF, které mohou vést ke vzniku a perzistenci AF. AF zase může zhoršit strukturální přestavbu síní a elektrickou přestavbu (Reilly et al. 2016). Studie ukazují, že síňová fibróza hrála klíčovou roli při strukturální remodelaci a že gap junction proteiny (GJPs) hrály důležitou funkci při elektrické remodelaci síní (Igarashi et al. 2012).

Při trvající fibrilaci se v síních odehrávají adaptační změny, přičemž některé změny mohou být reverzibilní, nicméně reverzibilita strukturálních změn a fibrózy nemusí být úplná. Aktivace fibroblastů, zvýšená depozice složek pojivové tkáně a fibróza jsou hlavními rysy tohoto procesu. Strukturální remodelace má za následek elektrickou disociaci mezi svalovými snopci a lokální heterogenity vedení vzruchu podporují reentry mechanismy a udržování arytmií. Mechanismus fokální aktivity může zahrnovat jak spouštěnou aktivitu, tak lokalizované reentry. U pacientů s paroxysmální AF byla dokumentována hierarchická organizace AF s oblastmi rychlé aktivace, které řídí/udržují arytmií; u pacientů s perzistující AF je tento jev méně výrazný. Fibrilace síní může být udržována kontinuálním vedením několika nezávislých vln propagujících se síňovou svalovinou zdánlivě zcela chaoticky. Dokud počet vln neklesne pod kritickou mez, dokáží tyto vlny arytmií udržovat.

Dominantním srdečním oddílem pro vznik fibrilace je levá síň, účast pravé síně je méně významná. Strukturální změny síní vznikají v důsledku primárních kardiovaskulárních onemocnění a stavů a současně jsou navozovány a zhoršovány vlastní fibrilací. Tato tzv. arytmií indukovaná remodelace se děje časně na elektrické úrovni a později i na strukturální a mechanické úrovni (Ausma et al. 1997; Goette et al. 2000). Vývoj remodelace síní při vzniku arytmií umožňuje častější ataky FS, jejich delší trvání či přechod do chronicity: „FS tak vyvolává další FS“. Naopak potlačení remodelace zvyšuje pravděpodobnost udržení sinusového rytmu.

V počátečních stádiích paroxysmální FS převládá význam spouštěcí ektopie a fibrilace bude udržovaná setrvalou aktivací reentry okruhu, přičemž počet bude záviset na vodivých vlastnostech a velikosti síně. Pro udržení setrvalejších forem FS je předpokládána přítomnost určitých nepravidelností ve svalovině srdeční síní (Táborský 2013). Nové katetizační studie ukazují, že u pacientů se SR a makroskopicky normálními síněmi mohou být přítomny drobné histologické změny (Čihák, Haman, and Táborský 2016) .

Některé studie popisují řadu rizikových faktorů spojených s FS, mezi které lze například zařadit užívání alkoholu (Maki et al. 1998), obstrukční spánkovou apnoe (Gami et al. 2007), hyperfunkci štítné žlázy (Táborský 2013) a sportovní aktivity (Mont et al. 2002). Z kardiálních příčin je nejčastější hypertenze (Lloyd-Jones et al. 2004), ischemická choroba srdeční (Goldberg et al. 2002), kardiomyopatie (Robinson et al. 1990), chlopenní vady (zejména mitrální stenóza) (Diker et al. 1996) a perikarditidy. Výskyt FS ovlivňuje i zvýšený tonus vagu a u části pacientů FS byla spojena s vyšším tonem sympatiku (Táborský 2013).

Věkem podmíněná remodelace myokardu postihuje dvě základní komponenty myokardu: buněčnou složku (především srdeční myocyty) a extracelulární matrix. Podle současných znalostí se v průběhu věku uplatňuje řada procesů, které vedou k poruše funkce kardiomyocytů. Mezi nimi mají významnou roli: oxidativní stres (zvýšená produkce kyslíkových radikálů),

perzistence zánětu o nízké intenzitě a snížená funkce mitochondrií. Mezi ostatní procesy patří poruchy funkce sarkoplazmatického retikula, dále zkracování telomer, buněčná senescence, nestabilita genomu, epigenetické změny, snížená odolnost na působení zevních stresorů, porucha tvorby a reparace sarkolemálních proteinů a poruchy regulace energetických procesů myocytů. Řada abnormalit funkce srdečních myocytů zvyšuje jejich senzitivitu pro působení zevních patogenetických činitelů (hypoxie, kyslíkové radikály aj.), což vede k indukci apoptotických procesů v myokardu (Pudil 2020).

V průběhu věku dochází také k významným změnám extracelulární matrix, které zahrnují změnu struktury kolagenních vláken (pokles zastoupení kolagenu III a zvýšené zastoupení kolagenu I), zvýšenou tvorbu příčných spojení (cross-linking) mezi vlákny kolagenu. Ke zvýšené tvorbě příčných můstků přispívá také zvýšená koncentrace konečných produktů pokročilé glykace (advanced glycation end products, AGEs), které vedou ke zvýšené tvorbě vazeb mezi různými složkami extracelulární matrix (kolagenem, lamininem a elastinem) (Lindsey et al. 2005; Pudil 2020). Následkem je zvýšení tuhosti stěny myokardu.

S věkem dochází k poruše funkce řady metaloproteináz (např. MMP 9, 12, 28) a jejich tkáňových inhibitorů (TIMP-1, 2, 3) (Pudil 2020; Triposkiadis et al. 2022). Věk ovlivňuje také funkci srdečních fibroblastů, které produkují jednotlivé typy kolagenu, fibronektinu a dalších molekul včetně některých metaloproteináz a jejich tkáňových inhibitorů. V průběhu stárnutí dochází také ke změně funkce makrofágů, které jsou přítomny v myokardu a mají řadu regulačních funkcí (lokální produkce cytokinů, ovlivnění funkce matrixových metaloproteináz a podobně) (Li et al. 2020; Pudil 2020).

1.5.5 Další mechanismy vzniku fibrilace síní.

S věkem dochází také ke zvýšenému ukládání amyloidu do myokardu (tzv. „wild-type“ transthyretinová amyloidóza, ATTRwt, dříve označovaná jako senilní amyloidóza). Ke zvýšenému ukládání tohoto typu amyloidu dochází u některých pacientů po 60. roce, podle sekčních nálezů je možné nalézt tento typ amyloidózy až u 25 % pacientů ve věku nad 80 let (Gonzalez-Lopez et al. 2015; Pudil 2020).

V průběhu stárnutí může také docházet k řadě patogenetických procesů podílejících se na změně funkce myokardu v souvislosti s cévními změnami (Vaclavik 2020). Tento stav bude spojen se snadnějším ukládáním lipidových částic do cévní stěny, což se bude projevovat dysfunkcí endotelu a poruchami v mikrocirkulaci. Tyto změny přispívají k poklesu funkce myokardu.

Mezi komorbidity, které velmi významně ovlivňují funkci myokardu ve vyšším věku, patří především: arteriální hypertenze, ischemická choroba srdeční, hypercholesterolemie, diabetes mellitus, onemocnění ledvin, chronická anémie a řada dalších.

Ischemická choroba srdeční a hyperlipidemie může vést k řadě vaskulárních změn v myokardu (dysfunkce endotelu, progresse aterosklerotických změn s postižením většiny typů cév). Následkem je porucha mikrocirkulace v myokardu a snížení kontraktility. Jindy dochází přímo k vyřazení významné části myokardu (infarkt myokardu). V těchto situacích pak významně závisí na aktuálním funkčním stavu myokardu v době vzniku akutní léze (Pudil 2020; Triposkiadis, Xanthopoulos, and Butler 2019).

1.6 Mechanismy srdeční fibrózy

Aktivované fibroblasty a myofibroblasty jsou centrální buněčné efekторы v srdeční fibróze, které slouží jako hlavní zdroj matrixových proteinů. Imunitní buňky, cévní buňky a kardiomyocyty mohou také získat fibrogenní fenotyp za podmínek stresu, který aktivuje fibroblastové populace. Fibrogenní růstové faktory (jako jsou transformační růstový faktor- β a růstové faktory odvozené z krevních destiček), cytokiny [včetně tumor nekrotizujícího faktoru- α , interleukinu (IL)-1, IL-6, IL-10 a IL-4] a neurohumorální dráhy spouštějí fibrogenní signální kaskády vazbou na povrchové receptory a aktivují navazující signální kaskády. Srdeční fibroblasty mohou také vnímat mechanické namáhání prostřednictvím mechanosenzitivních receptorů, iontových kanálů a integrinů, které aktivují intracelulární fibrogenní kaskády, které přispívají k fibróze v reakci na tlakové přetížení (Frangogiannis 2021).

Aktivované fibroblasty jsou centrální buněčné efekторы fibrózy myokardu, které slouží jako hlavní buňky produkující ECM. Přeměna fibroblastů na sekreční, matrix produkující a kontraktilní buňky, nazývané myofibroblasty, je klíčovou buněčnou událostí u mnoha fibrotických stavů. Aktivované myofibroblasty jsou hlavním zdrojem strukturních ECM proteinů ve fibrotických srdcích, (Cleutjens, Verluyten, et al. 1995) produkují velké množství matricelulárních proteinů, (Ashizawa et al. 1996; Komatsubara et al. 2003) a mohou také přispívat k regulaci remodelace ECM produkcí proteáz, jako jsou matrixové metaloproteinázy (MMP) a jejich inhibitory (Cleutjens, Kandala, et al. 1995). Expanze a aktivace fibroblastů při remodelaci srdce může zahrnovat přímé účinky fibrogenních mediátorů, nebo stimulovat jiné typy buněk, včetně imunitních buněk, cévních buněk a kardiomyocytů. Imunitní buňky (makrofágy, lymfocyty, žírné buňky a eozinofily) mohou podporovat aktivaci fibroblastů vylučováním cytokinů, růstových faktorů a matricelulárních proteinů.

Cévní endotelové buňky a pericyty mohou také vylučovat mediátory aktivující fibroblasty a bylo zjištěno, že podporují jejich přeměnu na myofibroblasty. Poškozené kardiomyocyty jsou také schopny produkovat fibrogenní mediátory v reakci na stres, což přispívá k aktivaci fibroblastů. Navíc u IM vede smrt kardiomyocytů a dalších buněk myokardu k uvolnění molekulárních vzorců spojených s poškozením, které aktivují zánět, což nakonec vede k fibróze. Relativní role různých typů buněk ve fibrotické odpovědi závisí na typu poškození myokardu. Zánětlivé cytokiny, chemokiny a růstové faktory se podílejí na patogenezi srdeční fibrózy prostřednictvím přímých účinků na fibroblasty, stimulací náboru a aktivace fibrogenních makrofágů a lymfocytů a spuštěním fibrogenního programu v cévních buňkách a kardiomyocytech. Navíc, prodloužený chronický zánět může způsobit nekrózu kardiomyocytů, což vyvolává reparativní formu fibrózy (Frangogiannis 2021).

TGF- β je nejlépe charakterizovaný fibrogenní růstový faktor (Lodyga and Hinz 2020; Frangogiannis 2022, 2020). Různé typy buněk (včetně makrofágů, fibroblastů, kardiomyocytů a krevních destiček) mají schopnost produkovat de novo velké množství TGF- β v poškozeném srdci, přičemž signalizace TGF- β v poškozených tkáních je převážně regulována aktivací. Poškození bude mít za následek rychlou aktivaci TGF- β , což poskytuje mechanismus pro vhodnou prostorově omezenou stimulaci reparativní odpovědi TGF- β .

Pericelulární aktivace TGF- β v místech poranění zahrnuje několik různých molekulárních signálů, včetně proteáz, (Annes, Munger, and Rifkin 2003) matricelulárních proteinů, (Xia et al. 2011), a integrinů. (Asano et al. 2006) Nadměrná exprese TGF- β 1 v myokardu a konstitutivní exprese aktivovaného mutovaného proteinu TGF- β spouští komorovou fibrózu, spojenou s de novo depozicí strukturních proteinů ECM a aktivací programu zachovávajícího matrix (Accornero et al. 2015).

PDGF (PDGF-AA, -BB, AB, CC a DD) jsou homo- nebo heterodimerní růstové faktory, které signalizují prostřednictvím dvou různých receptorů: PDGFR-a a PDGFR-b. Četné důkazy

naznačují, že izoformy PDGF hrají roli při aktivaci fibrotické odpovědi po poškození myokardu. PDGF-A, PDGF-C a PDGF-D mají silné fibrogenní účinky na myokard, zprostředkované přímými účinky a alespoň částečně up-regulací TGF- β (Tuuminen et al. 2009). Studie poukazující na souvislost mezi zánětem a AF byly provedeny na zvířatech (Liao et al. 2010; Verheule et al. 2003) i u lidí (Frustaci et al. 1997; Chen et al. 2008; Nakamura et al. 2003; Yamashita et al. 2010). Jiné studie ukázaly korelaci mezi hladinou fibrózy a infiltrací síňového myokardu zánětlivými buňkami (Platonov et al. 2011). Není známo, jestli jsou zánětlivé buňky markerem lokální reakce na poškození tkáně způsobené faktory vedoucími k AF nebo zda se aktivně podílejí na udržování AF v důsledku přímých cytotoxických či profibrotických účinků (Rudolph et al. 2010) nebo nepřímo v důsledku uvolněných cytokinů, které mohou podporovat arytmogenezi (Liao et al. 2010).

1.7 Vztah atriální fibrilace a srdečního selhání

Fibrilace síní a srdeční selhání u mnoha pacientů spolu koexistují, ať již jako příčina, nebo následek základního strukturálního onemocnění myokardu. Přítomnost FS je spojena s horším klinickým průběhem srdečního selhání. U pacientů se srdečním selháním a zejména těch se sníženou ejekční frakcí levé komory existuje vyšší riziko výskytu NSS (Reinier et al. 2014) a maligních arytmií včetně fibrilační zástavy oběhu. Prevalence FS narůstá s klinickou závažností srdečního selhání, ve funkční třídě NYHA IV je fibrilace síní přítomna téměř u 50 % pacientů (Savelieva and John Camm 2004). Srdeční selhání a FS se mohou vzájemně vyvolávat a potencovat prostřednictvím mechanismů, mezi něž patří strukturální remodelace srdce, aktivace neurohormonálních mechanismů a narušení funkce levé komory (LK) související se srdeční frekvencí. Pacienti s FS a se souběžným výskytem srdečního selhání, ať už se zachovanou (\geq 50 %) ejekční frakcí levé komory (EFLK), nebo se sníženou ejekční frakcí (EFLK 40 %), mají

horší prognózu i vyšší mortalitu (Čihák, Haman, and Táborský 2016). Analýza velkých studií prokázala vyšší výskyt NSS u pacientů s FS za přítomnosti srdečního selhání. Analýza dat RELY ukázala že srdeční selhání u pacientu s FS bylo hlavním prediktorem NSS. Studie ROCKET-AF (17 171 účastníků) ukázala výskyt úmrtí u 1 214 (8,6 %) nemocných. Kardiovaskulární příčiny úmrtí mělo 72 %, z toho 32 % představovalo náhlé úmrtí či beze svědků, 15 % následováno úmrtím z důvodu srdečního selhání. Embolizace nebo ischemická CMP byla příčinou úmrtí u 6 % sledovaných. Ze všech příčin srdeční selhání souviselo s vyšším rizikem úmrtí a bylo hlavní příčinou NSS. (Marijon et al. 2013; Pokorney et al. 2016; Šmíd and Rokyta 2017). Studie poukazují na významně vyšší ohrožení akutním infarktem myokardu pacientů s FS oproti pacientům bez FS (Soliman et al. 2015; Soliman et al. 2014). U 6-7 % pacientu s IM fibrilace síní nastává v důsledku ischemie síní a síňového přepětí při srdečním selhání (Goldberg et al. 2002). Diastolická dysfunkce při asymptomatické a samotné subklinické ICHS se projevuje ischemií komor, přetěžuje srdeční síně a způsobuje atriální remodelaci a tím zvyšuje výskyt FS. Změny se projevují v převodním systému srdečním, sympato-adrenálním systému, a při vývoji možné dysfunkce LK i zvýšenou fibrózní aktivací. Rizikovými faktory mohou být endotelová dysfunkce a embolizace (Seccia et al. 2016; Soliman et al. 2015; Soliman et al. 2014; Vermond et al. 2015; Šmíd and Rokyta 2017).

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem práce bylo zjištění možných morfológických a funkčních změn endomysia (intersticia) lidského atriálního myokardu typických pro atriální fibrilaci. Zvláštní pozornost byla věnována množství a složení mezibuněčné hmoty síňového endomysia a výskytu různých typů imunitních buněk. Dále byl sledován stav kapilárního řečiště, novotvorba kapilár a zrání jejich stěny. Při porovnání různých faktorů jsme také brali v potaz věk pacientů, současné onemocnění diabetem II. typu a ischemickou chorobou srdeční.

Materiál byl shromážděn ve spolupráci s Institutem klinické a experimentální medicíny a histologické nálezy jsme v rámci této spolupráce vztahovali ke klinickým a biochemickým parametrům. Histologický materiál zahrnoval biopsie z pravých a levých pŕedsíní (pravé ouško, levé ouško a volná stěna levé síně) pacientů se sinusovým rytmem a atriální fibrilací, kteří představovali skupinu pacientů se spíše mírnějším stupněm srdečního onemocnění (Část II). K tomu jsme se dále zaměřili na pacienty s pokročilým srdečním selháním, kde jsme provedli analýzu explantovaného myokardu získaného při srdeční transplantaci (Část I). Cílem bylo zjistit, v jaké fázi srdečního onemocnění lze případné morfológické změny typické pro atriální fibrilaci detekovat. Kvantitativní parametry endomysia zahrnující buněčné struktury a mezibuněčnou hmotu jsme porovnávali s expresí různých růstových faktorů.

Rozhodli jsme se využít především histologické metody - s užitím obrazové analýzy jsme zjišťovali zastoupení vláknité složky mezibuněčné hmoty pomocí speciálního histologického barvení. Kvantifikovány byly také jednotlivé složky endomysia (kolagen I, kolagen III, elastin). Imunohistochemické metody jsme zvolili i pro analýzu imunitních buněk myokardu síní a hodnocení exprese růstových faktorů.

Část I

První část naší práce byla zaměřena na zjištění souvislostí mezi charakteristikami tkáně myokardu a přítomností fibrilace síní u pacientů s pokročilým srdečním selháním. Vzhledem ke známým souvislostem mezi těmito srdečními patologiemi nás zajímala především míra fibrózy myokardu vyjádřená objemovou frakcí kolagenu (CVF). Současně jsme se zaměřili na expresi profibrotických růstových faktorů - transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β) a růstového faktoru pojivové tkáně (CTGF) u pacientů se srdečním selháním s AF a bez ní. Vstupní hypotéza předpokládala vyšší fibrózu a vyšší expresi profibrotických růstových faktorů v myokardu pacientů s atriální fibrilací.

Část II

Cílem druhé části práce bylo hodnocení endomysia atriálního myokardu u pacientů s atriální fibrilací (AF) a sinusovým rytmem (SR), kteří podstoupili operaci na otevřeném srdci. Materiál pocházel z více lokalizací, protože jsme chtěli postihnout případné anatomické rozdíly v míře poškození. Peroperační bioptické vzorky levé a pravé síně byly vyšetřeny a hodnoceny pomocí imunohistochemie pro vizualizaci a kvantifikaci kolagenu I, kolagenu III, elastinu, desminu, hladkého svalového aktinu a vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF). Dále byly charakterizované a kvantifikované morfologické a funkční populace zánětlivých buněk pozitivní na CD45-, CD3-, CD68-KP1 v síňovém myokardu pacientů s AF ve srovnání se sinusem rytmem (SR). Vstupní hypotéza předpokládala vyšší fibrózu, nižší mikrovaskulární denzitu a vyšší expresi VEGF v myokardech pacientů s atriální fibrilací. Dále jsme očekávali vyšší zastoupení imunitních buněk – zejména T-lymfocytů a makrofágů - v myokardech

pacientů s atriální fibrilací. Rozdíly mezi pacienty s atriální fibrilací a se sinusovým rytmem jsme očekávali především v levé síni.

(Pozn.: Dělení práce na Část I a Část II je chronologické. Ve výsledcích však nejprve prezentují výsledky Části II, protože se opírá o stěžejní prvoautorské publikace.)

MATERIALY A METODY

3.1 Pacienti

V prvním projektu studovaná skupina se skládala z pacientů s trvalou fibrilací síní (n = 10), kteří byli věkově podobní s kontrolní skupinou se sinusovým rytmem (n = 11). Vzorky myokardu přední volné stěny pravé síně a levé komory byly získány při transplantaci srdce ze všech explantovaných srdcí těchto 21 pacientů (ve věku $51,6 \pm 8,9$ let) s pokročilým HF, kteří podstoupili operaci v Institutu klinické a experimentální medicíny IKEM. Základní etiologie HF byla ischemická choroba srdeční (10 pacientů), dilatační kardiomyopatie (9 pacientů), těžká chlopenní dysfunkce (1 pacient) a restriktivní kardiomyopatie (1 pacient) (Tabulka 2). Echokardiografie byla provedena u všech pacientů před transplantací. Rozměry pravé komory (RV) a levé komory (LV), velikost LA, tloušťka stěny mezikomorové přepážky a ejekční frakce LV byly měřeny standardními technikami. Hemodynamické měření bylo získáno před transplantací srdce. Napětí stěny levé síně (WS) bylo vypočteno podle vzorce: $WS = 0,334 * P(LAD)/WT(1+WT/LAD)$, kde P = tlak levé síně, který byl získán při srdeční katetrizaci, LAD = rozměr levé síně a WT = tloušťka stěny. Na základě předchozích anatomických a zobrazovacích studií byla tloušťka stěny použita u těchto vzorků všech pacientů odhadnuta na 2 mm.

	SR	AF	P hodnota
Věk, y	51.3 ± 9.3	51.9 ± 8.8	0.8
BMI, kg/m²	26.9 ± 5.9	26.8 ± 3.9	1.0
Základní etiologie srdečního selhání:			
ICHS, n	6	4	
DKM, n	5	4	
Onemocnění chlopní, n	0	1	
RKM, n	0	1	
Trvání srdečního selhání, y	2.0 ± 1.6	5.0 ± 2.9	0.008
Median (IQR)	1(2)	5 (5)	
Komorbidity:			
Diabetes, n	2	4	
Hypertenze, n	1	2	
Léky:			
Furosemid, n	11	10	
Spirolakton, n	10	9	
ACE inhibitor, n	10	8	
Beta blokátory, n	7	8	
BNP, pg/ml	2119.3 ± 1624.6	1969.5 ± 971.8	0.8

Tabulka 2 Charakteristika transplantovaných pacientů se SR a AF

ICHS – ischemická choroba srdeční; DKM – dilatační kardiomyopatie, RKM – restriktivní kardiomyopatie, BNP – brain natriuretic peptide

Ve druhém projektu se studované skupiny skládaly ze 46 pacientů (19 s dlouhodobě perzistující AF a 27 v SR). Pacienti podstoupili kardiologické zákroky v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Ve skupinách AF i SR byli pacienti, kteří podstoupili operaci bypassu koronární arterie nebo operaci chlopně (Tabulka 3).

Characteristic	Total	AF	SR	P value
	(n=46)	(n=19)	(n=27)	
Age (years)	65±9	69±7	62±9	.01
Sex (m/f)	25/21	13/6	12/15	n.s.
Height (cm)	169±10	170±10	169±10	n.s.
Weight (kg)	84±19	84±21	83±15	n.s.
Atrial fibrillation duration (years)	---	8.3±11.1	---	---
Obesity	19(41.3%)	7(36.8%)	12(44.4%)	n.s.
Diabetes mellitus	10(21.7%)	4(21.1%)	6(22.2%)	n.s.
Arterial hypertension	37(80.4%)	16(84.2%)	21(77.8%)	n.s.
	2.32±0.59	2.31±0.54	2.33±0.64	n.s.
CHADS2 score	1.57±1.37	1.41±0.93	1.79±1.08	n.s.
CHA2DS2-VASc score	3.35±1.86	3.30±1.30	3.42±1.50	n.s.
Coronary artery disease	32(69.6%)	8(42.1%)	24(88.9%)	.001
Mitral regurgitation grade (0-4)	2.18±1.03	2.91±1.02	1.72±0.74	.0001
Tricuspid valve regurgitation grade (0-4)	1.74±0.82	2.40±0.87	1.34±0.45	<.0001
Aortic valve stenosis grade (0-4)	1.21±1.61	1.06±1.42	1.32±1.74	n.s.
LV diameter (mm)	54.0±7.0	55.4±8.0	53.0±6.1	n.s.
LV EF (%)	51.6±10.4	49.5±11.7	53.1±9.3	n.s.
LA volume (ml)	93.4±51.4	121.3±62.5	73.0±28.5	.001
RA volume (ml)	71.0±33.0	84.2±39.5	61.3±23.8	.05

Tabulka 3 Charakteristika pacientů s AS a SR

LV, levá komora; EF, ejekční frakce; LA, levá síň; RA, pravá síň; CABG, bypass koronární arterie; CHADS2 (srdeční selhání, Hypertenze, Věk >75, Diabetes mellitus, Cévní mozková příhoda), CHA2DS2-VASc (srdeční selhání, Hypertenze, Věk >75, Diabetes mellitus, Cévní mozková příhoda, Cévní onemocnění, Věk 65-74 let, pohlaví) Hodnocení rizika cévní mozkové příhody u fibrilace síní; Pozn.: n.s.=Není významné. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ±SD.

Protokoly studií byly schváleny etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze a studie odpovídala zásadám uvedeným v Helsinské deklaraci. Všichni pacienti zařazení do studie podepsali písemný informovaný souhlas s transplantačním postupem a použitím explantovaného srdce, resp. biopsií pro výzkumné účely.

3.2 Odběr vzorků tkáně

Vzorky tkáně byly získány během operace na otevřeném srdci nebo při transplantaci. Kousek síňové či komorové tkáně byl vyříznut jako příčný řez z pravého ouška, levé volné síňové stěny, levého ouška a levé komory. V důsledku odběru vzorků tkáně se nevyskytly žádné komplikace. Odebrané vzorky myokardu byly fixovány paraformaldehydem, zality do parafínu a nakrájeny na tkáňové řezy o tloušťce 7 μm . Řezy byly následně odparafinovány a rehydratovány.

3.3 Histologické barvení

Deparafinizované tkáňové řezy byly histologicky vyšetřeny pomocí rutinního barvení hematoxylinem a eosinem. Pro kvantifikaci objemové frakce kolagenu (CVF) v myokardu explantovaných srdcí byly řezy obarveny barvením picosirius.

3.4 Imunohistochemické metody

Expresí CTGF a TGF-beta byla hodnocena imunohistochemicky v prvním projektu. Na parafínových řezech byla provedena třístupňová detekce imunoperoxidázy. Po revitalizaci antigenu citrátovým pufrům (pH = 6,0) byla blokována aktivita endogenní peroxidázy a vazebná místa nespecifických protilátek. Dále byly řezy inkubovány s primární myší monoklonální protilátkou anti-human CTGF/CCN2 C (MAB660; R&D system) 1:50 nebo myší

monoklonální protilátkou anti-TGF-beta (MAB1032; Chemicon Int.) 1:500 po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Vizualizace vazby protilátek byla provedena pomocí soupravy LSAB+ peroxidáza (Dako). Vynechání primární protilátky, stejně jako aplikace izotypově odpovídající kontrolní protilátky ve stejné koncentraci jako specifické protilátky, vedly k negativnímu značení.

Imunohistochemie byla také použita ve druhém projektu k vizualizaci kolagenu I, kolagenu III, elastinu, desminu, aktinu hladkého svalstva a VEGF v těchto vzorcích (Tabulka 4).

Antibody	Abbreviation	Catalog ID/Lot ID	Dilution	Retrieval	Clone/Isotype	Produced by
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin	SMA	M0851	1:100	Tris buffer +EDTA	1A4 IgG2a	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Monoclonal Mouse Anti-Human Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF	M7273	1:100	Citrate buffer	VG1 IgG1	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Monoclonal Mouse Anti-Human Elastin	ELAST	E4013/019K4828	1:250	TRYP SIN	BA-4 IgG1	Sigma-Aldrich, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin	DESM	IR606	1:100	Tris buffer +EDTA	D33 IgG1	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Collagen I (Rabbit Anti-Human polyclonal)	Col I	ab34710/GR3358 5-3	1:1000	Citrate buffer		Abcam, CambridgeScience, Cambridge UK
Collagen III (Rabbit Anti-Human polyclonal)	Col III	LS-B693/36517	1:1000	Citrate buffer		LifeSpan BioSciences, USA

Tabulka 4 Charakterizace protilátek použitých ve studii

Třístupňová imunoperoxidázová detekce byla provedena také na parafinových řezech. Po revitalizaci antigenu citrátovým pufrém (pH = 6,0) nebo TRIS + EDTA pufrém (pH = 9,0) byla blokována aktivita endogenní peroxidázy a nespecifická vazebná místa protilátek byla blokována 5% prasečím nebo kozím sérem v PBS. Poté byly řezy inkubovány s primární protilátkou přes noc při teplotě 4°C nebo po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Vizualizace vazby protilátek byla provedena pomocí detekčního kitu LSAB+ peroxidázy (Dako, Glostrup, Dánsko).

K detekci kapilár v síňové tkáni jsme použili biotinylovaný Ulex europaeus agglutinin I (Vector Laboratories, USA), který byl aplikován (1:200) přes noc při teplotě 4 °C. Vizualizace

lektinové vazby byla provedena pomocí Standard Vectastain Elite ABC kit - peroxidase (Vector Laboratories, USA).

Imunohistochemie byla dále použita k vizualizaci CD45, CD3, CD68-KP1, DC-SIGN (dc-specifický ICAM-3 grabbing nonintegrin), tryptázy žírných buněk a CD20 v těchto vzorcích (Tabulka 5). Vizualizace vazby protilátek byla provedena pomocí detekčního kitu LSAB+ peroxidáza (Dako, Glostrup, Dánsko). Pro všechny imunohistochemické detekce byly použity negativní kontroly s vynecháním primární protilátky.

Antibody	Abbreviation	Catalog ID/Lot ID	Dilution	Retrieval	Clone/Isotype	Produced by
Monoclonal Mouse Anti-Human CD45 Leucocyte Common Antigen	CD45	M0701	1:100	Tris buffer + EDTA	1A4 IgG2a	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Polyclonal Rabbit Anti – Human CD3	CD3	A0452	1:8000	Tris buffer + EDTA		DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68	CD68	M0814	1:200	Tris buffer + EDTA	KP1 IgG1	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Monoclonal Mouse Anti-Human Mast cell Tryptase	MCT	M7052	1:6000	Tris buffer + EDTA	D33 IgG1	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
DC-SIGN (Rabbit Anti-Human polyclonal)	DC-SIGN	LS-B479	1:6000	Tris buffer + EDTA		LifeSpan BioSciences, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD20	CD20	M0755	1:400	Tris buffer + EDTA	L26 IgG2a, kappa	DakoCytomation, Glostrup, Denmark

Tabulka 5 Charakterizace protilátek použitých ve studii

3.5 Imunofluorescenční značení

Pro posouzení exprese desminu v pericytech a dalších buňkách jsme použili imunofluorescenční značení s použitím primární monoklonální myší protilátky proti lidskému desminu 1:100 (viz tabulka 2) v 1% kozím séru v PBS a sekundárního anti-myšího Alexa Fluor 532 (Invitrogen, Life Technologies) 1:500 v 5% kozím séru v PBS protilátkách.

K detekci pericytů pro hodnocení indexu pokrytí pericytů kapilár jsme použili monoklonální myší anti-lidské aktinové protilátky proti hladkému svalstvu (viz Tabulka 3) a biotinylovaný Ulex europaeus agglutinin I (Vector Laboratories, USA) zředěný 1:200 v 1% kozím séru v PBS. Streptavidin Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Life Technologies) 1:100 a anti-mouse Alexa Fluor

532 (Invitrogen, Life Technologies) 1:500 v 5% kozí sérum v PBS byly použity v dalším kroku. Jádra byla obarvena DAPI 1:1000.

3.6 Histomorfometrie

Pro kvantifikaci kolagenu I, kolagenu III a objemové frakce elastinu jsme použili program Image J 1.44p (National Institutes of Health, USA). Snímky pro kvantifikaci byly získány systematickým náhodným výběrem pomocí 40x suchého objektivu mikroskopu Leica DMLB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo). Z každého vzorku síňového myokardu bylo zaznamenáno 10 snímků z jednoho řezu. Jednotlivé snímky byly od sebe odděleny jedním vynechaným zorným polem o velikosti obrazového rámečku. Obrázky byly převedeny do 8bitového formátu stupnice šedi a práh byl nastaven nad intenzitu barvení pozadí. Imunoreaktivní oblasti byly automaticky detekovány a frakce značené plochy byla vypočtena pro kolagen I, kolagen III a elastin. V této analýze byla kvantifikována pouze endomysální kolagenová a elastinová vlákna. Perimysální vazivová tkáň oddělující listy kardiomyocytů byla vyloučena z kvantifikace, stejně jako epikardiální a endokardiální vazivová tkáň.

Pro kvantifikaci mikrovaskulární denzity bylo použito barvení Ulex europaeus agglutininin I. Měření bylo provedeno pomocí programu Image J 1.44p (National Institutes of Health, USA). Snímky pro kvantifikaci byly sbírány, jak je popsáno výše, a mikrovaskulární hustota byla vypočtena jako počet kapilár na jednotku plochy (mm^2).

Expres VEGF byla analyzována semikvantitativně. Mikrofotografie a vzorkování obrazu byly provedeny tak, jak je popsáno výše. Hodnotili jsme intenzitu pozitivních kardiomyocytů, adipocytů, mezotelových buněk a kapilár. Skóre intenzity se skládalo ze čtyř stupňů (0–3), přičemž 0 představuje žádné značení a 3 označuje maximální intenzitu značení.

Pro kvantifikaci indexu pericytového pokrytí kapilár jsme použili imunofluorescenční značení síňového myokardu. Pericyty byly identifikovány jako buňky imunoreaktivní pro aktin

hladkého svalstva a charakterizovány jako protáhle buňky obklopující kapiláry. Kapiláry byly imunoreaktivní na Ulex europaeus agglutinin I. Náhodné oblasti byly vyfotografovány pomocí konfokálního laserového skenovacího biologického mikroskopu Fluoview FV1000 Spectral Type (Olympus) vybaveného 40× olejovým imerzním objektivem a analyzovány softwarem Olympus Fluoview 10-ASW 3.1. Bylo spočítáno procento kapilár s pericytovým pokrytím.

Pro kvantifikaci CD45+ buněk, CD3+ buněk, CD68-KP1+ buněk a žírných buněk jsme použili program Image J 1.44p (National Institutes of Health, USA). Imunoreaktivní buňky v myokardu byly počítány ručně a označeny v programu pro analýzu obrazu, aby se zajistilo, že žádná buňka není počítána dvakrát. Frekvence buněk byla vyjádřena jako počet buněk na milimetr čtvereční. Snímky pro kvantifikaci byly získány systematickým jednotným náhodným výběrem vzorků tkáňových řezů pomocí 40x suchého objektivu mikroskopu Leica DMLB (Leica Microsystems). Všechny morfometrické parametry pro první část projektu byly získány pomocí interaktivního softwaru pro analýzu obrazu (LeicaQWin, Leica Microsystems). CVF bylo kvantifikováno jako plošná frakce tkáně myokardu obsahující kolagenová vlákna značená barvením Sirius Red. Kvantifikována byla pouze endomysiální kolagenová vlákna, zatímco perimysiální vazivová tkáň byla vynechána. Imunohistochemické barvení (DAB-hnědá barva) pro CTGF a TGF-beta bylo kvantifikováno následovně. Obrázky byly převedeny do 8bitového formátu ve stupních šedi a nad intenzitou barvení pozadí byla nastavena prahová hodnota. Průměrná optická intenzita nad touto prahovou úrovní byla měřena na stupnici 0-255 (0=bílá barva, 255=černá barva) (A.U.- zvolená jednotka optické hustoty).

3.7 Statistická analýza

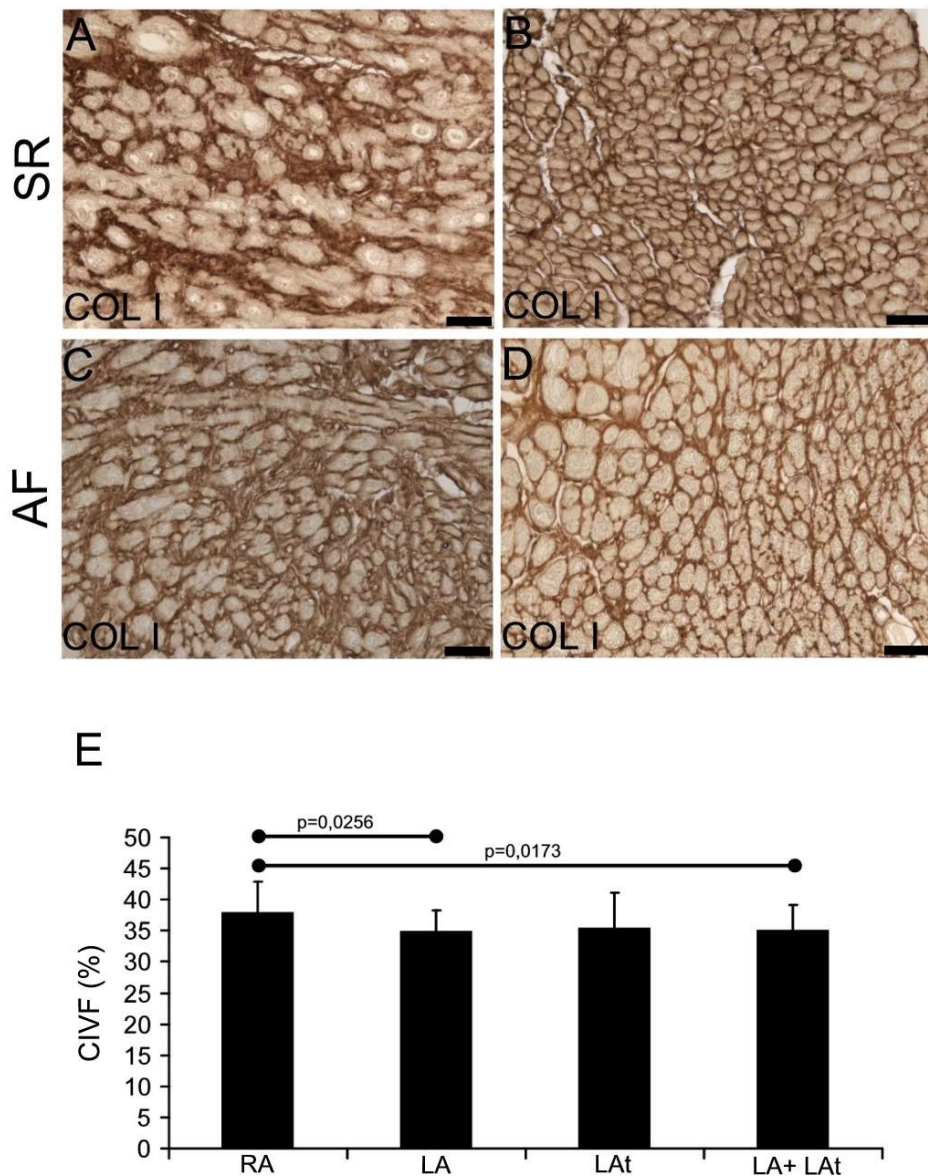
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr±SD (směrodatná odchylka). Uváděn je také rozsah hodnot. Statistické testování morfometrické analýzy porovnávající hodnoty ze skupin AF a SR v různých anatomických lokalitách bylo provedeno pomocí neparametrického testu - Mann-

Whitney U testu. Statistická významnost rozdílů mezi skupinami pacientů v různých charakteristikách pacientů byla testována pomocí Studentova t-testu, Fisherova exaktního testu nebo chí-kvadrát testu, jak bylo pro konkrétní data vhodné. Pro tyto analýzy byly použity statistické programy Microsoft Office Excel, InStat a Statistica. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za významnou.

4. VÝSLEDKY

4.1 Kolagen I a kolagen III v síňovém myokardu

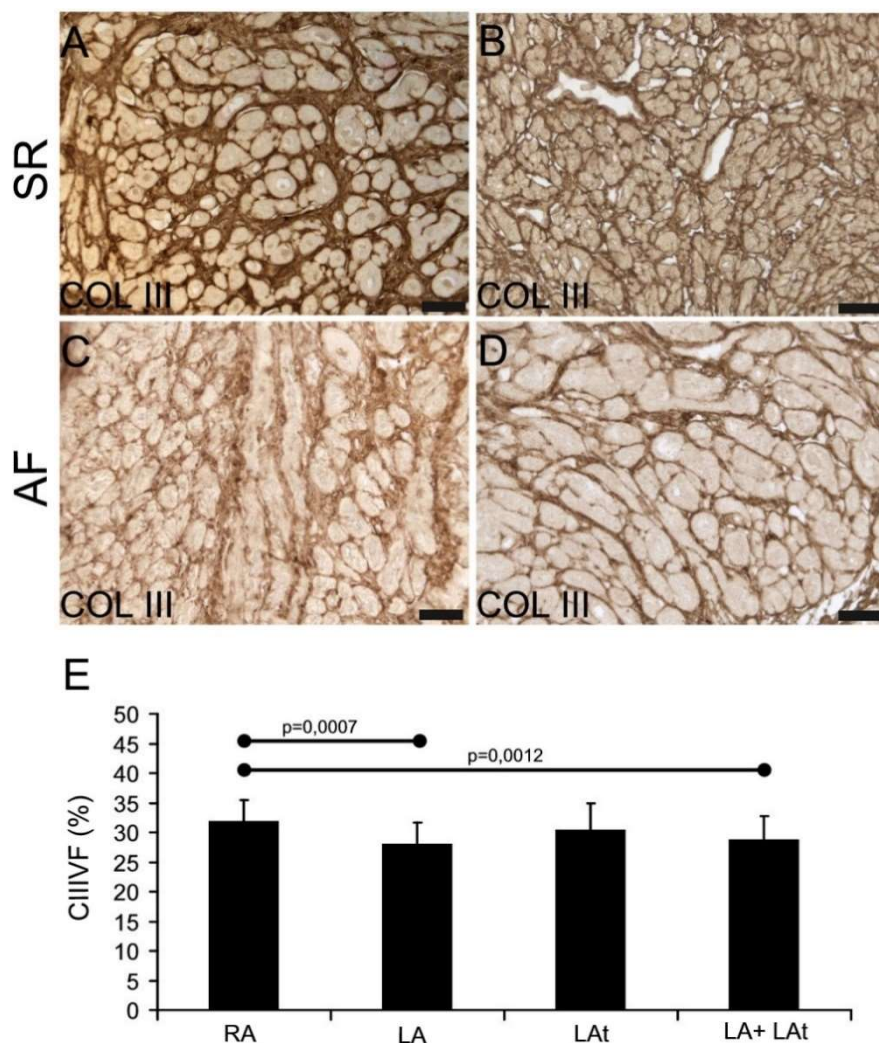
Pro porovnání úrovně fibrózy ve vzorcích srdečních síní pacientů se SR a AF jsme se nejprve zaměřili na kolagen I v síňovém endomyziu pomocí imunohistochemické detekce. Variabilní množství kolagenu I bylo nalezeno ve vzorcích z obou skupin pacientů (obr. 3A - 3D). Ve vzorcích s nízkým množstvím kolagenu I byla imunoreaktivita rovnoměrně rozložena v tenké endomysiální vrstvě, obklopující jednotlivé kardiomyocyty (obr. 3 B, D). V jiných vzorcích byly identifikovány silnější vrstvy kolagenu I, obklopující jednotlivé kardiomyocyty nebo skupiny kardiomyocytů izolovaných silnou vrstvou kolagen-I pozitivní ECM (obr. 3 A, C). Objemový podíl kolagenu I byl podobný při porovnávání vzorků ze skupiny AF a SR. Dále jsme porovnali objemovou frakci kolagenu I ve vzorcích z různých anatomických oddílů srdce a zjistili jsme, že v pravém oušku byla významně vyšší objemová frakce kolagenu I ve srovnání s levým ouškem, stejně jako ve srovnání se směsnými vzorky z levé volné stěny síní a levého ouška (obr. 3E). Distribuce imunoreaktivity kolagenu III byla podobná jako u kolagenu I (obr. 4A - 4D). Objemová frakce kolagenu III byla také podobná při porovnávání vzorků ve skupinách pacientu s AF a SR. V pravé oušku byla významně vyšší objemová frakce kolagenu III ve srovnání s levým a také ve srovnání se smíšenými vzorky z levé síňové stěny a levého ouška (obr. 4E).



Obr. 3. Kolagen I v síňovém myokardu.

A-D: Imunohistochemická detekce ukazuje kolagen I v endomyziální extracelulární matrix. V síňích obou skupin pacientů (SR v A, B a AF v C, D) bylo detekováno vyšší (A, C) i nižší (B, D) množství kolagen I-pozitivní ECM. Imunoperoxidázová reakce s DAB jako substrátem (hnědá sraženina). Jádra buněk nebyla dobarvena. Pro všechny obrázky platí měřítko = 50 μ m.

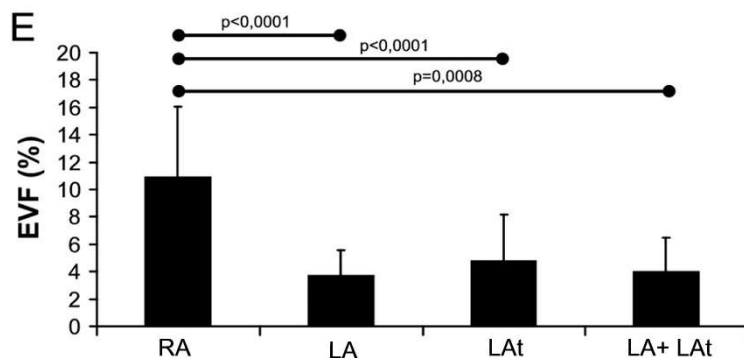
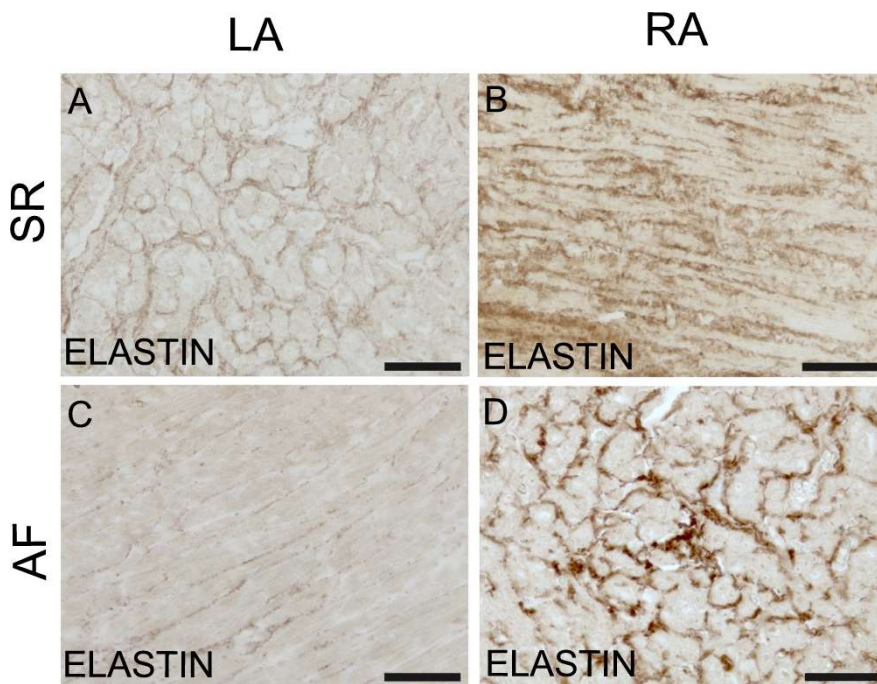
(E) Graf znázorňující výsledek kvantifikace objemové frakce kolagenu I (CIVF) ve vzorcích síňového myokardu. Porovnání různých anatomických oddílů: pravé ouško–RA (n = 37), levé ouško –LA (n = 18), levá síň–LAt (n = 8), LA+LAt (n = 26).



Obr. 4. Kolagen III v síňovém myokardu. A-D: Imunohistochemická reakce ukazuje kolagen III v endomyziální a částečně také perimysiální extracelulární matrix. V síních obou skupin pacientů (SR v A, B a AF v C, D) je možné detekovat vyšší (A, C) i nižší (B, D) množství kolagenu III. Imunoperoxidázová reakce s DAB jako substrátem (hnědá sraženina). Pro všechny obrázky platí měřítko = 50 μ m. (E) Graf znázorňující výsledek kvantifikace objemové frakce kolagenu III (CIIIF) ve vzorcích síňového myokardu. Porovnání různých anatomických oddílů: pravé ouško–RA (n = 37), levé ouško–LA (n = 19), levá síň–LAT (n = 9), LA+LAT (n = 28).

4.2 Elastin v síňovém myokardu

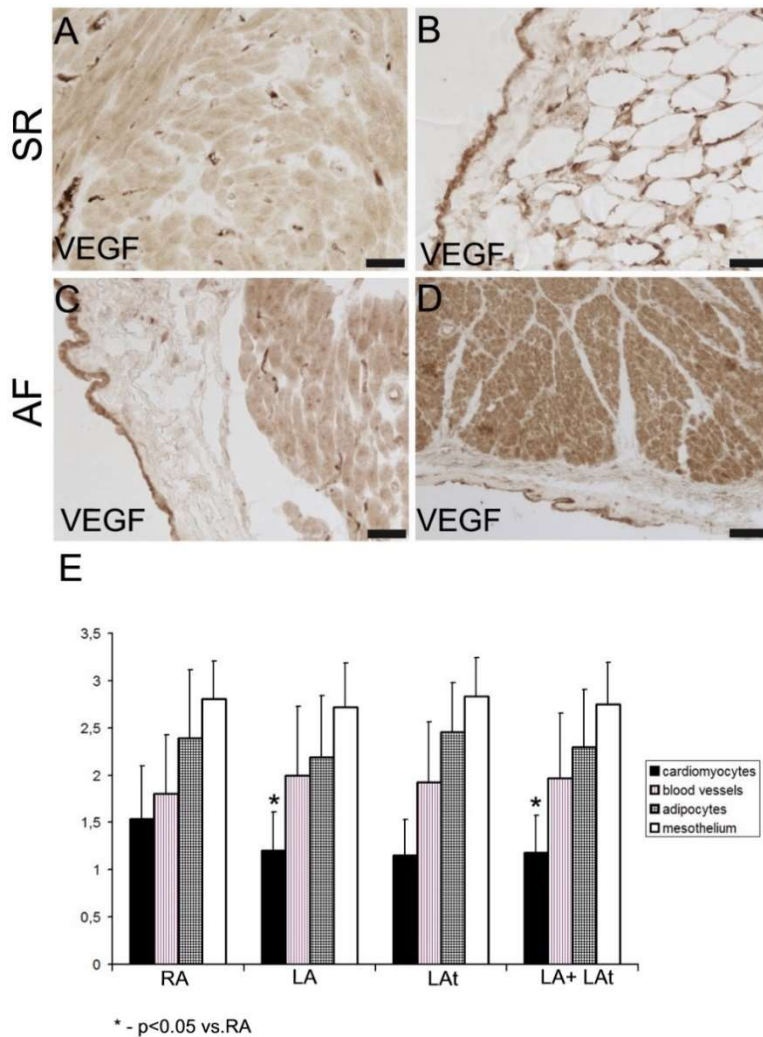
Elastin byl detekován ve vzorcích lidských síní ve variabilním množství (obr. 5). Některé vzorky obsahovaly nízké množství elastinu (obr. 5A, 5C), zatímco jiné byly bohaté na elastin (obr. 5B, 5D). Kvantitativní morfometrická analýza objemové frakce elastinu neodhalila žádné významné rozdíly mezi vzorky od pacientů s AF a SR. Objemová frakce elastinu však byla obecně nižší než objemová frakce kolagenu I a objemová frakce kolagenu III. Ve srovnání s obsahem kolagenu (objemová frakce kolagenu I a III) byly zjištěny podobné, ale výraznější rozdíly v objemové frakci elastinu mezi třemi anatomickými lokalizacemi (srovnejte obr. 3E a obr. 4E s obr. 5E). Výrazně vyšší obsah elastinu byl zjištěn v pravém oušku ve srovnání s levým, levou síňovou stěnou nebo směsnými vzorky z levé síňové stěny a levého oušku (obr. 5E).



Obr. 5. Elastin v síňovém myokardu. Imunohistochemická detekce elastinu ve vzorcích síňového myokardu pacientů se sinusovým rytmem (A, B) a ve vzorcích síňového myokardu pacientů s fibrilací síní (C, D). EVF (objemová frakce elastinu) je procento elastických vláken v morfometricky hodnocené oblasti myokardu. Reprezentativní snímky myokardu levého ouška s nízkým EVF (A, C) a snímky z pravého ouška ukazují vysokou EVF (B, D) imunoperoxidázovou reakcí s DAB substrátem (hnědá sraženina). Jádra buněk nebyla dobarvena. Měřítko v A-D = 100 μ m. E: Graf znázorňující síňové EVF všech pacientů se sinusovým rytmem a fibrilací síní v závislosti na lokalizaci. RA–pravé ouško (n = 26), LA–levé ouško (n = 12), LAt–levá síň (n = 4), LA + LAt (n = 16).

4.3 VEGF v síňovém myokardu

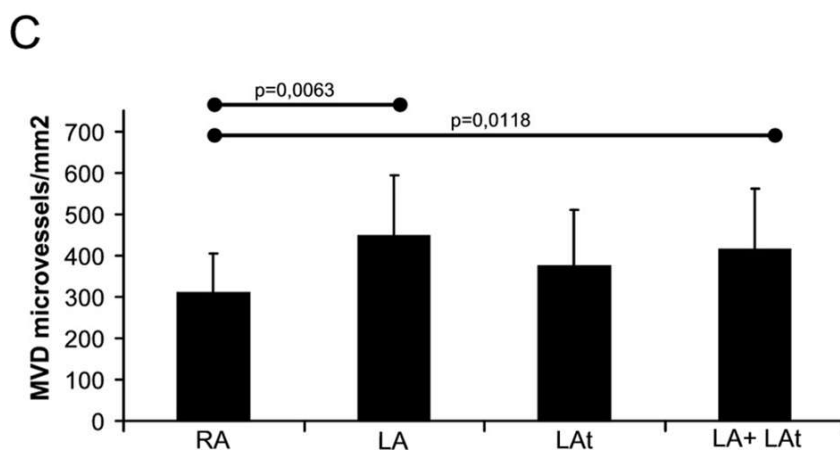
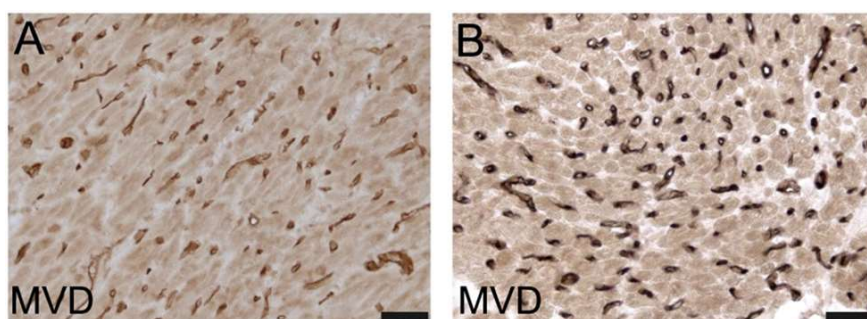
Imunoreaktivita VEGF byla detekována ve všech vzorcích síňové tkáně, které byly zkoumány. Zaměřili jsme se nejen na myokard, ale také na endokardovou a epikardovou vrstvu. V epikardu byla imunoreaktivita VEGF zjištěna v mezotelových buňkách a adipocytech, jakož i v kardiomyocytech a cévách, zejména kapilárách (obr. 6A-6D). Exprese VEGF byla variabilní. Semikvantitativní analýza exprese VEGF odhalila nejvyšší expresi v epikardiálním mezotelu. Úroveň imunoreaktivity VEGF byla podobná u pacientů s AF a SR. Srovnání exprese VEGF kardiomyocytů na základě anatomického původu vzorků od všech pacientů odhalilo vyšší expresi VEGF v pravém oušku ve srovnání s levým (obr. 6E). Rozdíl oproti pravému síňovému oušku byl zjištěn také u vzorků z levého ouška a levé síňové stěny (obr.6E).



Obr. 6. Expresse VEGF v síňovém myokardu u pacientů se sinusovým rytmem (SR) a fibrilací síní (AF). A, B: Síňové vzorky od pacientů se SR. (A) Silná imunoreaktivita VEGF je patrná v kapilárách, kardiomyocyty vykazují poměrně nízkou úroveň exprese VEGF. (B) Vysoká úroveň imunoreaktivity VEGF v mezotelových buňkách a v adipocytech epikardu. C, D: Vzorky síní od pacientů s AF. (C) Silná imunoreaktivita VEGF je lokalizována v mezotelu. V síňovém myokardu jsou VEGF-pozitivní kapiláry a středně pozitivní kardiomyocyty. (D) Silná imunoreaktivita VEGF v myokardu (zejména kardiomyocytech) a v mezotelových buňkách. Měřítka v A-D = 50 μ m. (E) Graf znázorňující výsledek semikvantitativní analýzy imunoreaktivity VEGF ve vzorcích síní od všech pacientů, jak je popsáno v metodách (skóre 0–3). Je ukázáno srovnání různých struktur z různých anatomických oddílů srdce: RA–pravé ouško, LA–levé ouško, LAT–levá síň.

4.4 Mikrovaskulární denzita v síňovém myokardu

Mikrovaskulární denzita byla analyzována ve vzorcích tkáně ve stejných skupinách pacientů. Pomocí UEA-lektinu byl vizualizován endotel cév v síňovém myokardu (obr. 7A, 7B); mikrovaskulární hustota byla kvantifikována ve vzorcích síní ve skupinách pacientů s AF i SR. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v úrovni mikrovaskulární denzity u pacientů s AF a s SR. Mikrovaskulární denzita v pravém oušku byla významně nižší ve srovnání s levým ouškem a volnou stěnou levé síně (obr. 7C).

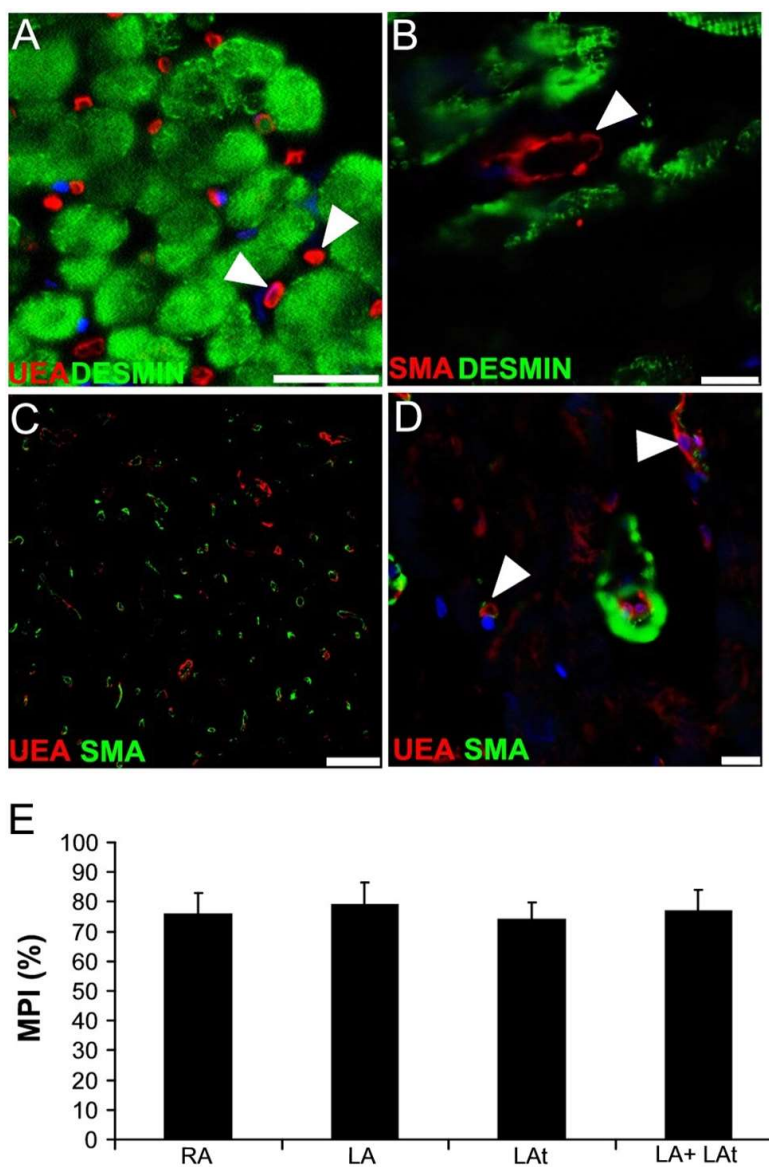


Obr.7 Kvantifikace mikrovaskulární denzity Histochemická vizualizace mikrovaskulární denzity pomocí vazby UEA-lektinu v síňovém myokardu u pacientů se sinusovým rytmem (SR) (A) a fibrilací síní (AF) (B). Peroxidázová reakce s DAB substrátem (hnědá sraženina). Jádra buněk nebyla dobarvena. Měřítka v A-B = 50 μ m. (C) Graf znázorňující výsledky kvantifikace

mikrovaskulární denzity (MVD) ve vzorcích síní všech pacientů, jak je popsáno v metodách. RA–pravé ouško (n = 24), LA–levé ouško (n = 12), LAt–levá síň (n = 10), LA + LAt (n = 22).

4.5 Pericytové pokrytí síňových kapilár.

Pro vyhodnocení možných rozdílů v aktivitě angiogenního procesu v síňovém myokardu pacientů s AF a SR bylo analyzováno pokrytí kapilár pericyty ve vzorcích síňové tkáně. Byla hodnocena exprese dvou nejčastěji používaných markerů: desminu a hladkosvalového aktinu. Zatímco desmin byl především detekován v kardiomyocytech, kapiláry postrádaly desminový signál (obr. 8A, 8B). Na druhé straně jsme mohli detekovat aktin-pozitivní pericyty hladkého svalstva obklopující kapiláry i imunoreaktivní buňky hladkého svalstva ve stěně arterioli, malých tepen a žil v síňovém myokardu (obr. 8C, 8D). Kvantitativní analýza indexu pokrytí kapilár pericyty ukázala, že mezi skupinami pacientů s AF a SR nebyl žádný významný rozdíl. Srovnání indexu pokrytí kapilár pericyty ve vzorcích z různých anatomických míst ukázalo, že podobné pokrytí pericyty je v levém a pravém síňovém myokardu (obr. 8E).



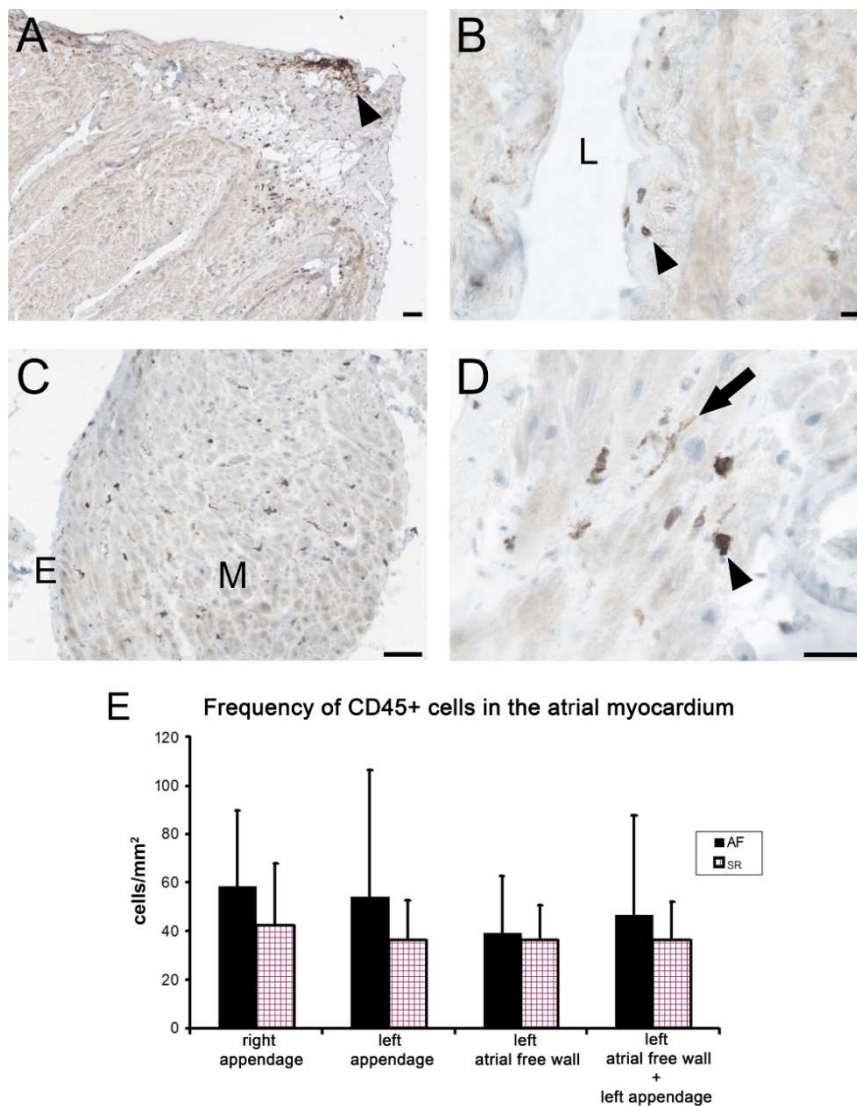
Obr. 8 Pericytové pokrytí kapilár v síních pacientů se sinusovým rytmem (SR) a fibrilací síní (AF). (A) Imunodetekce desminu (zelená) ukazuje jeho expresi v kardiomyocytech. Kapiláry označené UEA-lektinem (červená) postrádají imunoreaktivitu desminu (šipky). Měřítko = 50 μ m. (B) Desmin je přítomen v kardiomyocytech, zatímco SMA-pozitivní pericyt (šipka) nevykazuje desminový signál. Měřítko = 10 μ m. (C) Reprezentativní část myokardu používaná pro kvantitativní analýzu indexu pokrytí kapilár pericyty. Endotel krevních cév je označen lektinem UEA (červený) a pericyty jsou vizualizovány pomocí anti-SMA protilátky (zelené). Měřítko = 100 μ m. (D) Snímek s vysokým zvětšením ukazuje SMA-pozitivní buňky hladkého svalstva obklopující malou arterioli a také SMA-pozitivní pericyty ve spojení s

kapilárami (šipky). Měřítka = 25 μ m. (A, B, D) Jádra jsou obarvena DAPI (modrá). (E) Graf znázorňující výsledky kvantifikace indexu pokrytí kapilár pericyty (MPI) ve vzorcích síní všech pacientů, jak je popsáno v metodách. RA–pravé ouško (n = 8), LA–levé ouško (n = 9), LA+ levá síň (n = 7), LA + LA+ (n = 16).

4.6 Detekce a kvantifikace CD45+ buněk v síňovém myokardu

Pro vizualizaci zánětlivých buněk jsme použili protilátku proti panleukocytárnímu markeru CD45. Tento marker je běžný pro buňky hematopoetického původu. Imunoperoxidázová reakce odhalila CD45+ buňky ve všech vzorcích analyzovaných ze SR a AF skupiny. Imunoreaktivní buňky byly nalezeny v celé tloušťce síňové stěny bez ohledu na anatomické umístění (obr. 9 A-D). V epikardu CD45+ buňky často tvořily větší shluky (obr. 9 A). V endokardu byly tyto buňky rozptýleny v celé tloušťce této vrstvy (obr. 9 B), občas také přilnuly k endotelu z lumenální strany (není zobrazeno). Buňky imunoreaktivní pro CD45+ byly nalezeny v intersticiálním kompartmentu myokardu jak v perimysiu, tak v endomysiu. Morfologicky se buněčná populace CD45+ jevila jako heterogenní s buňkami, které měly obecně buď zaoblená nebo protáhlá buněčná těla (obr. 9 D). CD45+ buňky umístěné v myokardu byly kvantifikovány v tkáňových řezech levého a pravého ouška a volné stěny levé síně. Při porovnávání vzorků ze skupiny SR a skupiny AF byla tendence k vyšší frekvenci CD45+ buněk ve skupině AF, aniž by však bylo dosaženo statistické významnosti (obr. 9 E). V pravém oušku byl průměrný počet CD45+ buněk na 1 mm² 42,4 \pm 25,5 (rozmezí 12,2-103,8) ve skupině SR a 58,4 \pm 31,3 (rozmezí 12,6-118,5) ve skupině AF. V levém oušku byl průměrný počet CD45+ buněk na 1 mm² 36,1 \pm 16,7 (rozmezí 14,4-61,7) ve skupině SR a 54,2 \pm 52,2 (rozmezí 17,8-186,2) ve skupině AF. Ve volné stěně levé síně byl průměrný počet CD45+ buněk na 1 mm² 36,2 \pm 14,2 (rozmezí 20,6-59,3) ve skupině SR a 39,0 \pm 23,7 (rozmezí 11,9-95,5) ve skupině AF. Ve sdružených vzorcích z celé levé síně byl průměrný počet CD45+ buněk na

1 mm² 36,1±15,9 (rozmezí 14,3-61,7) ve skupině SR a 46,6±41,2 (rozmezí 11,9-186,2) ve skupině AF.



Obr. 9. CD45-pozitivní buňky v síňovém myokardu. Části stěny síní pacientů se sinusovým rytmem (A, B, D) a fibrilací síní (C) po provedení imunoperoxidázové reakce na CD45. A) Epikardová a myokardová vrstva síňové stěny obsahuje rozptýlené i nahloučené (šipka) CD45-pozitivní buňky. Měřítko = 100µm. B) Endokardová vrstva s CD45-pozitivními buňkami (šipka) vedle síňového lumen (L). Měřítko = 20µm. C) Řez trabekulární částí síňové stěny s CD45 pozitivními buňkami v myokardu (M) a endokardu (E). Měřítko = 50 µm. D) Detailní pohled na síňový myokard s CD45-pozitivními buňkami, které mají spíše zaoblený (šipka) nebo protáhlý (šipka) tvar buňky. Měřítko 50 = µm. E) Frekvence CD45+ buněk v síňovém

myokardu pacientů s fibrilací síní (AF) a sinusovým rytmem (SR). Průměrný počet CD45+ buněk na čtvereční mm průřezu síňového myokardu je dán spolu se směrodatnou odchylkou. Pravé ouško – SR (n=22), AF (n=15); Levé ouško - SR (n = 8), AF (n = 8); Levá síňová volná stěna - SR (n = 4), AF (n = 8); Levá síňová volná stěna + levé ouško - SR (n = 12), AF (n = 16).

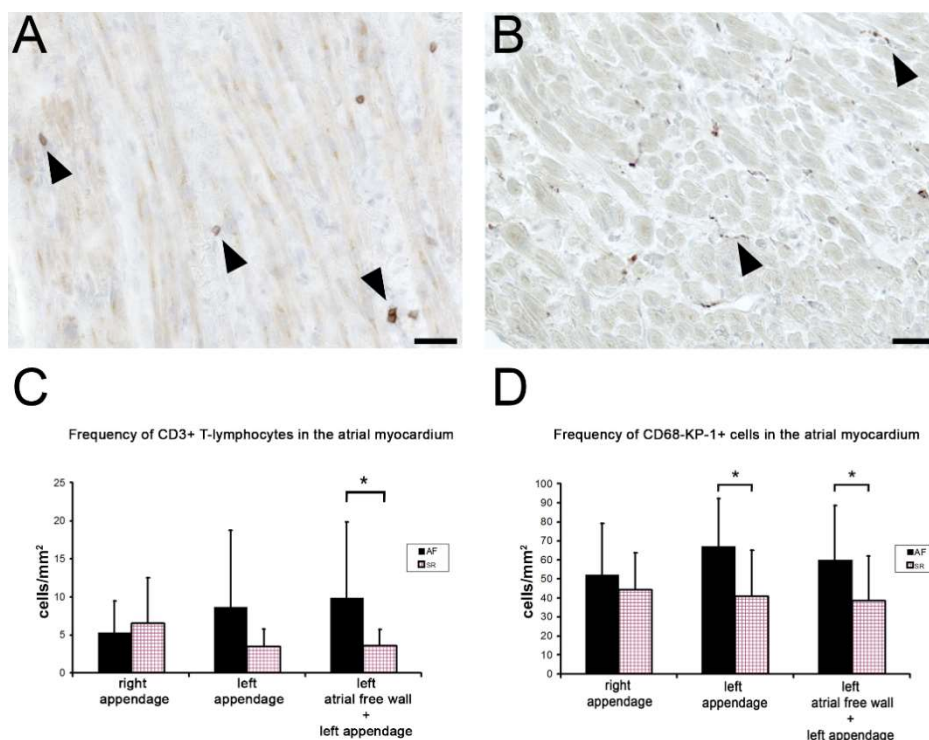
4.7 CD3-pozitivní T-lymfocyty v síňovém myokardu

Dalším cílem bylo charakterizovat populaci zánětlivých buněk a provést analýzu různých subpopulací CD45+ buněk. Jako další krok byly tedy T-lymfocyty imunohistochemicky detekovány ve vzorcích síní pomocí protilátky proti markeru CD3. Stejně jako CD45+ buňky, T-lymfocyty byly nalezeny ve všech vzorcích ze skupin pacientů s SR i AF a byly lokalizovány v celé síňové stěně včetně myokardu (obr. 10), nicméně byly mnohem méně početné než CD45+ buňky. Zaoblená morfolgie CD3+ buněk, které byly nalezeny rozptýlené v endomyziálním a perimysiálním intersticiálním prostoru, odpovídala morfolologii lymfocytů (obr. 10 A). Kvantifikace CD3+ T-lymfocytů odhalila jejich signifikantně vyšší frekvenci v levé síni pacientů s AF. Když byly seskupeny vzorky levého ouška a levé síňové volné stěny, rozdíl mezi AF a SR skupinou byl statisticky významný (obr. 10 C). V pravém oušku byl průměrný počet CD3+ buněk na 1 mm² 6,5±6,0 (rozmezí 1,08-26,8) ve skupině SR a 5,3±4,2 (rozmezí 1,2-15,3) ve skupině AF. V levém oušku byl průměrný počet CD3+ buněk na 1 mm² 3,5±2,3 (rozmezí 1,1-8,4) ve skupině SR a 8,6±10,1 (rozmezí 1,7-36,2) ve skupině AF. V sdružených vzorcích z celé levé síně byl průměrný počet CD3+ buněk na 1 mm² 3,5±2,2 (rozmezí 1,1-8,4) ve skupině SR a 9,8±10,0 (rozmezí 1,7-36,2) ve skupině AF.

4.8 CD68-KP1-pozitivní buňky v síňovém myokardu

Zánětlivé buňky včetně monocytů/makrofágů a dendritických buněk lze detekovat pomocí markeru CD68-KP1. Imunoreaktivní buňky pro CD68-KP1 byly velmi časté ve všech vzorcích

síňové tkáně ze skupiny AF i SR. Byly pravidelně detekovány v myokardu a měly převážně protáhlý tvar buněk (obr. 10 B). Kvantitativní analýza ukázala, že buněčná populace CD68-KP1+ byla nejhojnější populací zánětlivých buněk a byla častější ve vzorcích od pacientů s AF (obr. 10 D). U pacientů s AF byl významně vyšší počet CD68-KP1+ buněk v levém oušku a v poolovaných vzorcích levého ouška a levé síňové stěny ve srovnání s pacienty se SR (obr. 10 D). V pravém síňovém oušku byl průměrný počet buněk CD68-KP1+ na 1 mm² 44,3±19,3 (rozmezí 7,7-76,7) ve skupině SR a 52,0±27,0 (rozmezí 14,0-109,0) ve skupině AF. V levém oušku byl průměrný počet CD68-KP1+ buněk na 1 mm² 40,8±24,4 (rozmezí 9,9-96,3) ve skupině SR a 67,2±25,0 (rozmezí 41,6-122,4) ve skupině AF. Ve sdružených vzorcích z celé levé síně byl průměrný počet buněk CD68-KP1+ na 1 mm² 38,5±23,7 (rozmezí 9,9-96,3) ve skupině SR a 60,2±28,4 (rozmezí 18,0-122,4) ve skupině AF.



Obr. 10. CD3-pozitivní T-lymfocyty a CD68-KP1-pozitivní buňky v síňovém myokardu.

Sekce síňového myokardu u pacientů s fibrilací síní vykazující výsledek imunoperoxidázové reakce pro CD3 a CD68-KP1. A) CD3-pozitivní T-lymfocyty lokalizované mezi síňovými kardiomyocyty a v intersticiálních prostorech (šipky). Měřítko = 50 μm. B) CD68-KP1-

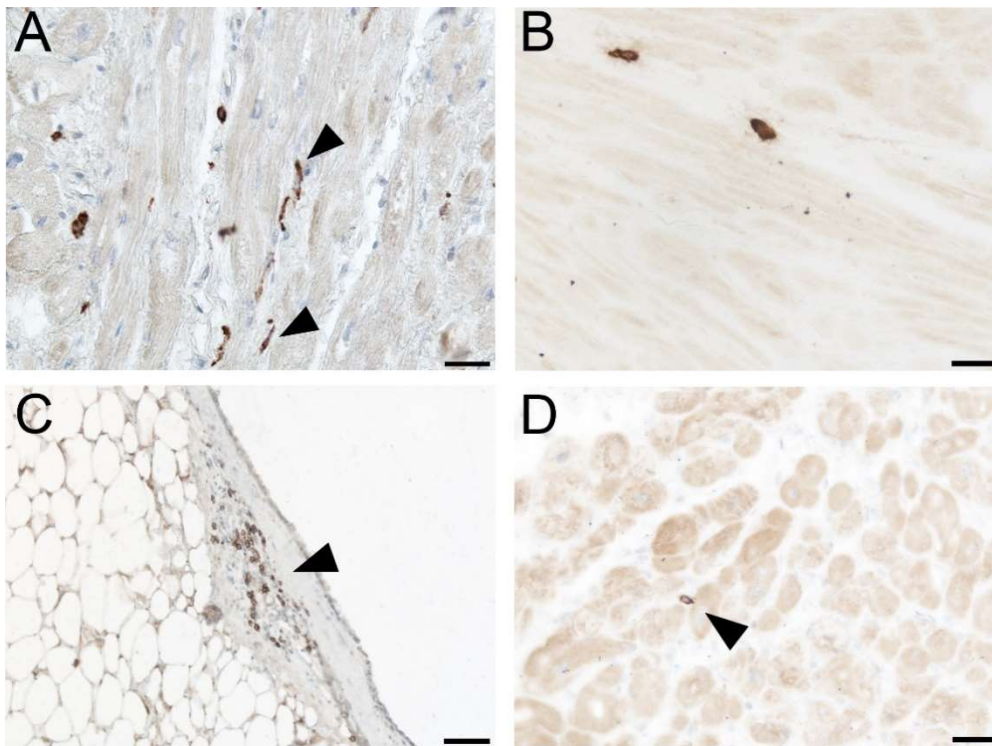
pozitivní buňky se nacházejí v intersticiu a mají hlavně protáhlou morfologii (šipky). Měřítka = 50 μ m. C) Frekvence CD3-pozitivních T-lymfocytů v síňovém myokardu pacientů s fibrilací síní (AF) a sinusovým rytmem (SR). Průměrný počet CD3-pozitivních buněk T-lymfocytů na čtvereční mm průřezu síňového myokardu je dán spolu se směrodatnou odchylkou. Pravé ouško – SR (n=17), AF (n=11); Levé ouško - SR (n = 8), AF (n = 10); Volná stěna levé síně + levé ouško- SR (n = 9), AF (n = 16). * $p < 0,05$ D) Frekvence CD68-KP1-pozitivních buněk v síňovém myokardu pacientů s fibrilací síní (AF) a sinusovým rytmem (SR). Průměrný počet CD68-KP1-pozitivních buněk na čtvereční mm průřezu síňového myokardu je dán spolu se směrodatnou odchylkou. Pravé ouško – SR (n=22), AF (n=9); Levé ouško - SR (n = 11), AF (n = 9); Volná stěna levé síně + levé ouško - SR (n = 13), AF (n = 19). * $p < 0,05$

4.9 DC-SIGN- pozitivní dendritické buňky, žírné buňky a B-lymfocyty v síňovém myokardu

Dendritické buňky patří mezi buňky imunoreaktivní pro CD68-KP1+. Pro potvrzení jejich přítomnosti v síňovém myokardu pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdce jsme provedli imunohistochemickou detekci markeru DC-SIGN, označujícího nezralé dendritické buňky. DC-SIGN+ buňky byly často nalezeny ve vzorcích síňového myokardu ze skupin AF i SR. Měly stejnou morfologii jako buňky dříve imunoreaktivní pro antigen CD68-KP1 (obr. 11 A). Žírné buňky byly detekovány pomocí protilátky proti tryptáze žírných buněk.

Žírné buňky byly v síňovém myokardu poměrně vzácné a byly nalezeny rozptýlené jako jednotlivé buňky v endomyziálním kompartmentu nebo v malých skupinách v perimysialních prostorech obklopujících větší cévy (obr. 11 B). V síňovém myokardu byla podobná frekvence žírných buněk u pacientů ze skupin AF a SR. B-lymfocyty byly detekovány pomocí protilátky proti markeru CD20 v síňovém myokardu pacientů ve skupině AF a SR. CD20+ buňky byly

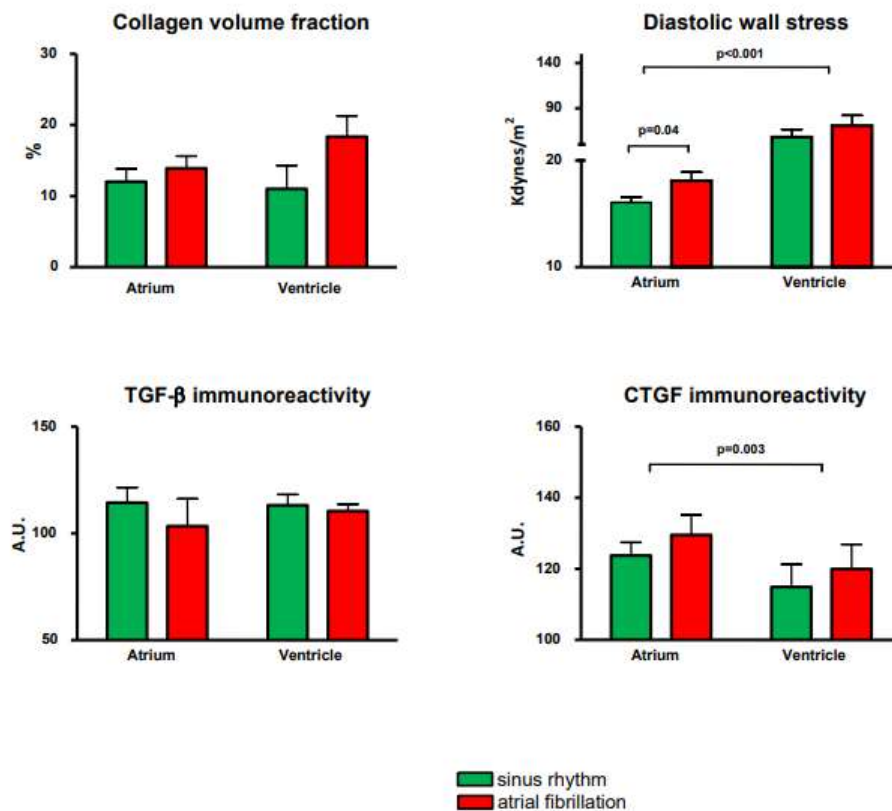
příležitostně nalezeny jako malé shluky v epikardové vrstvě (obr. 11 C). V myokardu byly tyto buňky velmi vzácné (obr. 11 D).



Obr. 11. DC-SIGN- pozitivní dendritické buňky, žírné buňky a B-lymfocyty v síňovém myokardu. A) Část síňového myokardu pacienta s fibrilací síní vykazující výsledek imunoperoxidázové reakce na DC-SIGN. DC-SIGN - pozitivní buňky mají hlavně protáhlou morfolonii (šipky). Měřítko = 50 μ m. B) Část síňového myokardu pacienta se sinusovým rytmem. Žírné buňky detekované pomocí protilátek proti tryptáze proti žírným buňkám jsou rozptýleny v síňovém myokardu. Měřítko = 50 μ m. (C-D) Části síňové stěny pacienta se sinusovým rytmem. C) Shluk CD20-pozitivních B-lymfocytů v epikardiální vrstvě (šipka). Měřítko = 100 μ m. D) Detail síňového myokardu s izolovaným CD20-pozitivním B-lymfocytem. Měřítko = 50 μ m.

4.10 Kvantifikace fibrózy v atriálním myokardu pacientů s AF a SR

Určité množství síňové fibrózy vyjádřené jako objemová frakce kolagenu - collagen volume fraction (CVF) bylo zjištěno ve všech vzorcích myokardu nezávisle na srdečním rytmu. Reprezentativní snímky síňového myokardu obarveného pomocí Sirius Red pro znázornění kolagenu v pravé síni jsou uvedeny na obrázku 13A a 13B. V CVF nebyl žádný významný rozdíl mezi skupinami AF a SR (obr. 12). CVF v pravé síni skupiny pacientů s AF však korelovala ($r=0,8$, $p=0,006$) s trváním AF (obr. 14). V myokardu levé komory nebyl významný rozdíl v expresi CVF mezi skupinami SR a AF ($11,0 \pm 9,9$ vs. $18,3 \pm 8,3$; $p=0,1$) (obr. 12).

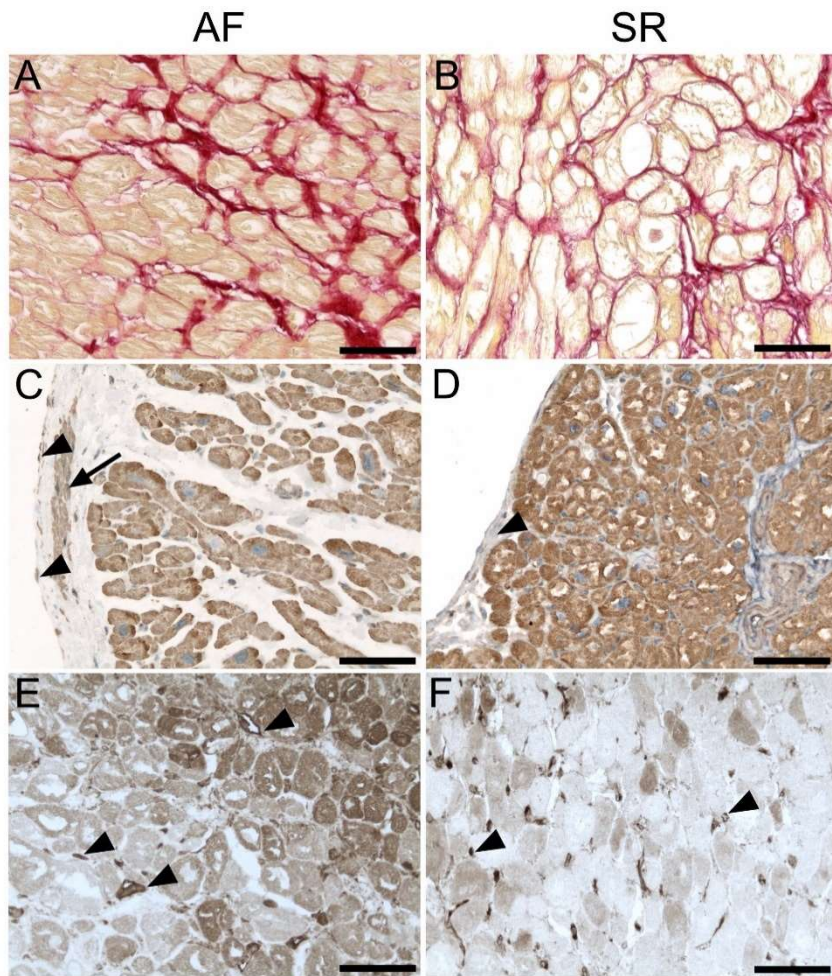


Obrázek 12. Frakce kolagenu (CVF), transformující růstový faktor-beta (TGF-beta) a růstový faktor pojivové tkáně (CTGF) v pravé síni a levé komoře explantovaných srdcí pacientů s AF a SR (A, C, D). Při namáhání diastolickým stresem pravé síně a levé komory pacientů s pokročilým srdečním selháním s a bez AF (B). Imunoreaktivita CTGF a TGF-β je

vyjádřena průměrnými libovolnými jednotkami optické hustoty (A.U.). Diastolické napětí stěny je vyjádřeno kdynes/m²

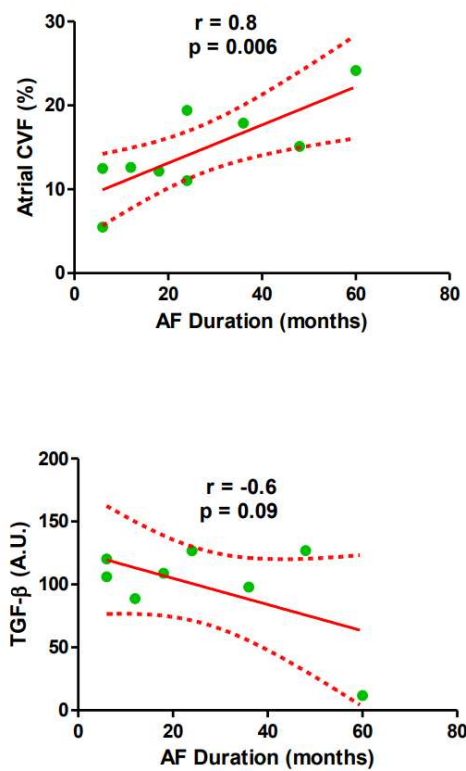
4.11 Imunohistochemická analýza exprese TGF- β a CTGF

Imunohistochemická detekce neodhalila žádné významné rozdíly v expresi CTGF mezi vzorky myokardu síní/komor u pacientů s AF a SR (obr. 12). Nicméně exprese CTGF ve ventrikulárním myokardu byla významně nižší ($117,3 \pm 17,9$ vs. $126 \pm 15,0$, $p=0,003$) ve skupině SR i AF ve srovnání s odpovídajícími síněmi (obr. 12). Reprezentativní snímky exprese CTGF v pravé síni jsou na obrázku 13. CTGF byl exprimován v kardiomyocytech síňového myokardu obou skupin (obr. 13C, 13D). Úroveň CTGF imunoreaktivity u jednotlivých kardiomyocytů v rámci jednoho vzorku byla velmi podobná. V endokardu však byla variabilní exprese CTGF (včetně endotelu endokardu). V některých vzorcích bylo možné detekovat CTGF ve vaskulárním endotelu a buňkách hladkého svalstva cévní stěny. To však bylo běžné pro tkáň myokardu bez ohledu na srdeční rytmus. TGF- β byl detekován na velmi nízké úrovni v obou skupinách a nebyl mezi nimi žádný rozdíl (obr. 12, obr. 13E, 13F). Ve většině případů byl TGF- β exprimován pouze vaskulárním endotelem. V subendokardových oblastech síňové stěny byly také imunoreaktivní kardiomyocyty spolu s endotelovými buňkami. Na rozdíl od exprese CTGF se úroveň imunoreaktivity TGF- β u jednotlivých kardiomyocytů lišila (obr. 13E, 13F). Exprese TGF- β nepřímo korelovala s trváním AF (obr. 13).



Obrázek 13 Morfologická analýza síňové tkáně u pacientů s fibrilací síní (A, C, E) a sinusovým rytmem (B, D, F). (A, B) Barvení síňového myokardu pomocí Sirius Red znázorňuje kolagenní vlákna v endomysiu (červená barva). (C, D) Imunohistochemická detekce CTGF imunoperoxidázovou metodou (DAB-hnědá sraženina). (C) Vzorek od pacienta s AF zachycující myokard a endokard. Imunoreaktivita CTGF je viditelná v kardiomyocytech, buňkách hladkého svalstva endokardu (šipka) a endokardovém endotelu. Jádra jsou obarvena hematoxylinem. (D) Vzorek od pacienta s SR zachycující myokard a endokard. Imunoreaktivita CTGF je viditelná u kardiomyocytů, zatímco endokard jen jen slabě imunoreaktivní. (E, F) Imunohistochemická detekce TGF- β imunoperoxidázovou metodou (DAB-hnědá sraženina). (E) Vzorek od pacienta s AF zachycující tkáň myokardu blízko endokardu. Imunoreaktivita TGF- β je lokalizována ve vaskulárním endotelu a proměnlivé množství reakčního produktu se nachází také v kardiomyocytech. (F) Vzorek od pacienta se SR

zachycující tkáň myokardu blízkou endokardu. Kapilární endotel vykazuje nejvyšší úroveň imunoreaktivity TGF- β v této oblasti ve srovnání s poměrně mírnou nebo nízkou expresí v kardiomyocytech. Měřítka v A-F, 100 μ m



Obrázek 14 Levý graf: korelace mezi trváním AF a fibrózou síní vyjádřenou jako CVF.

Pravý graf: korelace mezi dobou trvání AF a expresí TGF- β .

Diskuse

Část I

Naše práce ukázala, že pacienti s HF a SR mají pokročilou atriální fibrózu, jak ukázala kvantifikace CVF. Ve srovnání s jinými pracemi jsme pozorovali 2x-3x více fibrózy u těchto pacientů se SR než v pravých síních pacientů bez HF, kteří podstoupili operaci na otevřeném srdci (Goette et al. 2002; Gramley et al. 2010). V jiné studii bylo ukázáno, že pacienti s HF, ale bez atriální tachyarytmie mají v atriálním myokardu významné elektrofyzilogické abnormality (Sanders et al. 2003). V atriích těchto pacientů byly nalezeny oblasti s prodlouženým vedením vzruchu, snížením napětím a prodlouženou refrakterní fází. Naše nálezy potvrzují přítomnost rozsáhlé fibrózy u takovýchto pacientů. Domníváme se, že tato rozsáhlá fibróza může být důsledkem neurohumorální aktivace, což dokazuje skutečnost, že několik pro-fibrotických faktorů je ve zvýšené míře exprimováno při HF, jak dokládají některé práce (Everett and Olgin 2007; Koitabashi et al. 2007; Li et al. 2001).

V podobné studii na pacientech s terminálním srdečním selháním byla zjištěna zvýšená objemová frakce kolagenu I v levé síni pacientů s AF ve srovnání s pacienty s SR (Xu et al. 2004). Tento nesoulad s našimi výsledky může být způsoben dvěma hlavními příčinami. Zaprvé, zde mohou být rozdíly v charakteristikách pacientů mezi sledovanými skupinami, jako je zastoupení různé etiologie HF, jeho závažnost a trvání. Toto vysvětlení má svou oporu v práci zaměřené na pacienty s HF a zachovalou ejekční frakcí, kde samotná AF nebyla asociovaná s atriální fibrózou, ale místo toho byla zjištěna souvislost s přítomným strukturálním postižením srdce (Anne et al. 2005). Zadruhé, tyto rozdíly mohou být ovlivněny místem odběru vzorků, neboť je známo, že atriální fibróza není v myokardu rozšířena rovnoměrně. Proměnlivé prostorové rozložení a celkový charakter fibrózy mohou vést k pozorovaným rozdílům. Zároveň je třeba zmínit, že v práci Xu et al. nebyly získány vzorky pravých síní od kontrolní skupiny se SR (Xu et al. 2004).

V naší práci jsme pozorovali korelaci mezi trváním AF a mírou fibrózy vyjádřenou pomocí CVF, což naznačuje, že persistentní AF podporuje vznik fibrózy v AF. Podobná souvislost byla publikována v práci analyzující levé síně získané post mortem od osob bez HF (Platonov et al. 2011). Dále byla tato skutečnost zaznamenána v pravých síních u pacientů bez HF, kteří podstoupili by-pass (Gramley et al. 2009).

Profibrotický cytokin TGF-beta je zapojen do fibrotických procesů v mnoha tkáních a orgánech (Frangogiannis 2020). V kardiovaskulárním systému hraje TGF-beta důležitou úlohu při vzniku jizvy po infarktu myokardu, při stabilizaci aterosklerotického plátu a při jizvení síní při HF (Cipollone et al. 2004; Frangogiannis 2020; Hanna et al. 2004). Jedna dřívější studie se věnovala expresi TGF-beta u větší skupiny pacientů (n=163), kteří podstoupili kardiochirurgický výkon (Gramley et al. 2010). Bylo zjištěno, že obsah kolagenu a exprese TGF-beta byla vyšší u pacientů s chronickou AF ve srovnání s pacienty s paroxysmální AF nebo SR. Autoři práce dále ukázali, že exprese TGF-beta přímo úměrně rostla s dobou trvání AF. Na druhou stranu, exprese dalších složek signální dráhy TGF-beta, jako jsou TGFBR a SMAD2 byla snížena spolu se zvětšující se zátěží síní, což naznačuje, že efekt TGF-beta je s narůstající dobou trvání AF omezenější.

Zvýšená tkáňová exprese TGF-beta byla dána do souvislosti s rozvojem atriální fibrózy u experimentálního modelu HF navozeného u psů pomocí zrychlení srdeční frekvence (Hanna et al. 2004). V naší studii jsme zaznamenali, že exprese TGF-beta v síních a komorách je u pacientů s AF a se SR podobná. Dále naše výsledky ukázaly sice hraničně signifikantní, ale patrnou negativní korelaci mezi expresí TGF-beta a trváním AF. Zdá se tedy, že exprese TGF-beta zřejmě hraje roli při časné odpovědi síní na hemodynamické přetížení a v časné fázi atriální remodelace. Nicméně, úloha tohoto faktoru při pokročilé atriální fibróze je pravděpodobně méně významná. To je v souladu se závěry práce Gramley et al., kteří popsali bifázickou povahu exprese TGF-beta v průběhu AF (Gramley et al. 2010).

CTGF je protein, který je zapojen do řízení hojení ran a tkáňové reparační (Chen et al. 2020). Zvýšená a protražovaná exprese CTGF je dáována do souvislosti s tkáňovou fibrózou (Sonnylal et al. 2010). Do doby zahájení našeho projektu nebyla k dispozici relevantní data ohledně role CTGF při AF asociované s HF. U pacientů bez HF, kteří podstoupili operaci srdce, měla skupina s AF signifikantně zvýšenou expresi CTGF v pravém atriálním oušku ve srovnání se skupinou se SR (Ko et al. 2011). U pacientů v našem projektu jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly v expresi CTGF při srovnání skupin s AF a SR. V jiné studii zaměřené na pacienty bez HF, kteří podstoupili operaci chlopně, byla zaznamenána zvýšená exprese CTGF a TGF-beta v síních pacientů s AF oproti skupině se SR (Li et al. 2013). Zdá se tedy, že se tyto faktory aktivují již na počátku remodelace síní a v pozdějších fázích srdečního onemocnění se rozdíly podmíněné srdečním rytmem vytrácí, což byla zřejmě situace u naší skupiny s pokročilým srdečním selháním. Jelikož jsme pracovali pouze s pravou síní, není možné vztah mezi expresí CTGF v srdečních síních a AF při HF zcela vyloučit.

Část II

V této části dizertace jsme přinesli výsledky, které dokládají dilataci obou atrií u pacientů s AF, přičemž nebyly zaznamenány rozdíly u parametrů levé komory, což je také známo ze studií provedených s podobnými skupinami pacientů (de Oliveira et al. 2013; Ogi et al. 2010). Pacienti s HF mají zvýšené riziko AF (Hindricks et al. 2021; Darby and Dimarco 2012). Nicméně, pacienti ze skupiny s AF a SR zařazení do naší studie neměli signifikantní rozdíly ve funkci levé komory a ve třídě NYHA. Naše práce naznačuje, že intersticiální fibróza a další morfologické změny souvisí spíše se strukturálním srdečním onemocněním než s AF jako takovou. Tento pohled je v protikladu k obecně přijímané představě o strukturální remodelaci atriálního myokardu se vztahem k AF. Vysvětlením může být možná úloha jiných faktorů, které

mají úlohu v etiopatogenezi AF, jako je přítomnost spouštěčů nebo ovlivnění autonomním nervovým systémem, zánětem apod.

Dále je třeba zmínit, že dřívější práce, které ukázaly významné rozdíly v morfologických parametrech síní u pacientů s AF, využívaly odlišnou metodiku pro detekci a kvantifikaci kolagenu (Boldt et al. 2004; Kostin et al. 2002; Polyakova et al. 2008). V této části projektu jsme zabývali komplexní charakteristikou atriálního intersticia a především jeho endomysální složky. Jednotlivé typy vláken tvořené kolagenem I, kolagenem III a elastinem jsme kvantifikovaly zvlášť. Překvapivě a oproti předchozím údajům, jsme našli srovnatelné zastoupení těchto vláken vyjádřené jako objemová frakce atriální tkáně u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci nezávisle na tom, jestli tito pacienti měli SR nebo AF. Naše výsledky jsou podporovány nedávno publikovanou podrobnou morfologickou analýzou vzorků lidského atriálního myokardu, které byly získány při autopsii, přičemž tato práce zahrnovala histomorfometrii rutinně obarvených řezů (de Oliveira et al. 2013). Když tito autoři porovnávali pacienty s AF a se SR, bylo zjištěno, že tyto dvě skupiny mají podobný rozsah fibrózy. Autoptický materiál byl v této studii sbírán z levé i pravé síně. Význam anatomické lokalizace odebíraných vzorků může být patrný i z výsledků podobné studie, která porovnávala morfologii pravých a levých atriálních oušek v biopsiích pacientů s patologickou mitrální chlopní (Anne et al. 2005). Zde byla vyšší míra fibrózy zaznamenána u pacientů s AF pouze v pravém oušku a poněkud překvapivě nebyl zjištěn rozdíl mezi mírou fibrózy v levém oušku při porovnání pacientů s AF a SR. V této souvislosti je třeba zmínit, že významné morfologické změny byly dříve popisovány zejména na volné stěně levé síně (Corradi et al. 2005; Corradi et al. 2004; Corradi et al. 2008; Corradi et al. 2012). Tato část síňového myokardu však ve zmíněné práci studována nebyla. Na druhou stranu vzorky v našem projektu zahrnovaly i materiál z této anatomické lokalizace. V naší práci jsme přinesli výsledky, které dále rozšiřují data publikovaná dříve jinými výzkumnými skupinami, zejména s ohledem na naši analýzu

zastoupení elastinu v síňovém myokardu pacientů s AF a SR. S ohledem na zmíněné anatomické rozdíly se v této souvislosti jeví jako významný náš nález několikanásobně vyššího zastoupení elastinu v pravém síňovém myokardu ve srovnání s levým síňovým myokardem, přičemž vzorky z levé síně zahrnovaly ouško i volnou stěnu. Podobné, nikoliv však stejně velké rozdíly jsme našli v případě objemové frakce kolagenu I a kolagenu III. Tyto regionální rozdíly v zastoupení hlavních složek vláknité komponenty atriálního endomysia považujeme za nález vyžadující další vysvětlení, které mohou přinést navazující práce. Rozdíl může být například dána rozdílnou biomechanickou stimulací fibroblastů nebo může spočívat v odlišném původu buněk endomysia vzhledem ke složitému vývoji srdce (Porter and Turner 2009). Je třeba poznamenat, že úloha elastinu není v myokardu ještě uspokojivě vysvětlena (Fomovsky, Thomopoulos, and Holmes 2010) .

Naše data dále ukazují, že VEGF může být běžně detekován ve vzorcích atrií pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci nezávisle na jejich srdečním rytmu. Při porovnání exprese VEGF, kterou jsme detekovali imunohistochemickou metodou, jsme nezaznamenali významné rozdíly při porovnání pacientů se SR a AF. V této souvislosti považujeme přítomnost VEGF za možnou známku aktivní angiogeneze nebo za nutnou podmínku pro udržení funkčního mikrovaskulárního řečiště v myokardu pacientů s různými srdečními chorobami, kteří také tvořili námi sledovanou skupinu. Jedna studie provedená na biopsiích z pravého atriálního ouška přinesla výsledky ukazující vyšší expresi VEGF u pacientů s AF (Gramley et al. 2010). Ačkoliv autoři ve své práci také zvolili imunohistochemickou detekci, nezmiňují buňky, které byly v jejich vzorcích imunoreaktivní na VEGF. V jiné práci, rovněž postavené na bioptickém materiálu z pravých síňových oušek, autoři zjistili zvýšenou expresi VEGF na úrovni mRNA a proteinu detekovaného pomocí Western blottingu v celém rozsahu atriální stěny (Ogi et al. 2010). V této práci autoři také provedli imunofluorescenční detekci VEGF a detekovali ho ve struktuře, kterou sami popsali jako stěnu arterií zásobujících síně, nicméně na

přiložených snímcích se zřejmě jedná o vrstvu endokardu a přilehlé buňky myokardu. Tyto nálezy jsou v kontrastu s námi pozorovanou expresí VEGF v kapilárách, kardiomyocytech a v epikardu.

V souladu s podobnou expresí VEGF ve skupinách pacientů se SR a s AF, jsme zjistili srovnatelnou mikrovaskulární denzitu v atriálním myokardu obou skupin pacientů. Podobná data přinesla i jedna již zmíněná studie. V této práci autoři nepozorovali rozdíl v mikrovaskulární denzitě v biopsiích pravého atriálního ouška u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci se SR a s AF (Gramley et al. 2010). Analýza kapilární hustoty byla také provedena v studii pracující s autoptickým materiálem z levé síně a atriálního septa, přičemž autoři rovněž nepozorovali rozdíl mezi skupinou pacientů se SR a s AF (Platonov et al. 2011).

V naší práci jsme v případě exprese VEGF opět pozorovali rozdíly mezi anatomickými lokalizacemi odebíraných vzorků stěny srdečních síní. Vyšší exprese VEGF v kardiomyocytech ve stěně pravé síně může znamenat zvýšenou potřebu angiogenní stimulace kardiomyocytů, které jsou obklopeny v pravé síni větším množstvím endomysialní mezibuněčné hmoty bohaté na vláknitou složku, přičemž takto remodelované endomysium bylo zároveň chudší na kapiláry. V naší práci jsme nedetekovali hypoxické faktory, nicméně jejich exprese by v tomto kontextu byla také zajímavá (Babapoor-Farrokhran et al. 2021). Další možností jak charakterizovat mikrocirkulaci v atriálním myokardu je stanovení indexu pericytového pokrytí kapilár. Pericyty, jakožto typické perivaskulární buňky, jsou totiž asociovány s kapilárami v různé míře a případné rozdíly mohou ukazovat na přestavbu mikrovaskulárního řečiště (Armulik, Genové, and Betsholtz 2011; Kučera et al. 2010; Longden et al. 2023; Sims 2000). V případě námi analyzovaných vzorků atriálního myokardu jsme zjistili podobné hodnoty indexu pericytového pokrytí kapilár nezávislé na srdečním rytmu. Nezaznamenali jsme ani žádné rozdíly v tomto parametru mezi levou a pravou síní. Index pericytového pokrytí kapilár síňového myokardu

pocházejícího z naší sledované skupiny pacientů odpovídá hodnotám nalezeným v atriálním myokardu zdravých potkanů, kde činil přibližně 84% (Tilton, Kilo, and Williamson 1979).

Výsledky části dizertace věnované strukturální remodelaci síňového myokardu u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci s AF a SR mohou být do určité míry ovlivněny velikostí naší skupiny pacientů. Vzorky mohly být získány jen z určitých anatomických lokalizací, což bylo ovlivněno chirurgickým přístupem. Na základě některých studií je zřejmé, že architektura svalové tkáně síní je značně variabilní (Zhao et al. 2012). Systematičtější přístup při sběru vzorků by byl možný z autoptického materiálu, nicméně v těchto případech lze očekávat pokročilé stadium srdečního onemocnění a změny způsobené komplikovanou historií kardiovaskulárního onemocnění a dalších komorbidit, podobně jako jsme viděli v části dizertace, kde proběhla analýza síní z explantovaných srdcí pacientů s terminálním HF. V naší skupině pacientů s AF byl významně vyšší podíl osob podstupujících operaci na chlopních. Vyšší míra fibrózy detekovaná u těchto pacientů by byla možná vysvětlitelná touto diagnózou. Nicméně i u některých těchto pacientů byl při vyšší míře fibrózy stále zachován SR.

Část III

Několik dříve publikovaných prací ukázalo zvýšený počet zánětlivých buněk v srdečních síních pacientů trpících AF (Frustaci et al. 1997; Nguyen et al. 2009; Nakamura et al. 2003; Platonov et al. 2011; Yamashita et al. 2010; Chen et al. 2008; Yamashita et al. 2015; Begieneman et al. 2015). Ve srovnání s naší studií se v jiných projektech autoři zaměřili na vzorky pouze z levé či pravé síně (Nakamura et al. 2003; Yamashita et al. 2010; Yamashita et al. 2015; Begieneman et al. 2015), případně byla analýza provedena na nekroptickém materiálu (Platonov et al. 2011). Výsledky naší práce v zásadě odpovídají nálezům učiněným ve výše zmíněných studiích, které byly provedeny na různě charakterizovaných skupinách pacientů. Hlavním poznatkem, ke kterému jsme dospěli, je skutečnost, že významně vyšší infiltrace imunitními buňkami u

pacientů s AF byla pouze v levé síni. Jedním z možných vysvětlení pro tento nálezn může být vyšší hustota mikrovaskulárního řečiště, které je vstupní branou pro zánětlivé buňky do myokardu síní. Ta byla zjištěna v levé síni a tento anatomický rozdíl mezi levou a pravou síní jsme v naší práci zaznamenali na téměř identických vzorcích. Jak bylo opakovaně zjištěno, nejvýraznější strukturální morfologické změny, které jsou připisovány AF, se našly na zadní volné stěně levé síně (Corradi et al. 2004). Jelikož většina vzorků levé síně, které jsme analyzovali v naší práci, pocházela z levého ouška a pouze menší množství z volné stěny levé síně, nebylo možné tyto oddíly síně charakterizovat zvlášť. Nicméně, rozdíl v počtu CD3+ a CD68+ buněk mezi levou a pravou síní dosáhl statistické významnosti vždy, když byla data z obou oblastí levé síně spojena dohromady.

Kromě CD3+ (T-lymfocytů) a CD 68+ buněk (makrofágů/dendritických buněk) jsme v atriálním myokardu také stanovili zastoupení buněk žírných a B-lymfocytů. Jedna dřívější experimentální studie poukázala na důležitou roli žírných buněk při vzniku AF (Liao et al. 2010). Žírné buňky jsou zapojeny do mnoha patologických procesů v lidském organismu (Krystel-Whittemore, Dileepan, and Wood 2015). Srdeční žírné buňky byly po biochemické stránce charakterizovány již před několika desetiletími (Sperr et al. 1994). V rámci kardiovaskulárního systému je známo jejich rozmanité působení především v procesu aterosklerózy (Kovanen and Bot 2017; Varricchi and Marone 2020). Nedávno publikované výsledky z naší skupiny ukázaly vyšší zastoupení žírných buněk v epikardiální tukové tkáni pacientů s ischemickou chorobou srdeční (Rozsivalova et al. 2020). V atriálním myokardu pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci, kteří byli analyzováni v rámci této části dizertační práce, jsme v myokardu síní pozorovali jen malé množství žírných buněk, převážně lokalizovaných perivaskulárně a perimysialně, a žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinou pacientů se SR a AF jsme nezjistili.

Naše data ukazují spíše mírnější zvýšení počtu imunitních buněk v myokardu levé síně u pacientů podstupujících operaci na otevřeném srdci, kteří měli AF ve srovnání s pacienty se SR. V případě CD3⁺ T-lymfocytů jsme pozorovali spíše difúzní infiltraci tvořenou izolovanými buňkami. Je pozoruhodné, že oproti dříve publikované studii (Frustaci et al. 1997), nebyly v nedávno publikované práci analyzující síňový myokard pacientů s tzv. idiopatickou AF pozorovány žádné zánětlivé infiltráty (Corradi et al. 2014). Z pohledu současné definice myokarditidy, námi zjištěné zastoupení imunitních buněk nesplňuje definici této patologické jednotky (Caforio et al. 2013; Maisch et al. 2005). Je pravděpodobné, že námi pozorovaný zvýšený počet imunitních buněk zastoupených především populací CD3⁺ a CD68⁺ odráží zvýšenou úroveň zánětlivé odpovědi myokardu jako reakci na mechanický stres působený atriální dilatací (De Jong et al. 2011). V nedávno publikované práci autoři porovnávali zastoupení imunitních buněk reprezentovaných populací CD45⁺ a CD3⁺ buněk v levé síni v závislosti na typu AF, nicméně nenalezli žádnou korelaci (Wu et al. 2020). Avšak v rámci skupiny pacientů s dlouhodobou perzistentní nebo permanentní AF, počet CD45⁺ buněk v myokardu pozitivně koreloval s věkem pacientů. Tato skupina CD45⁺ nebyla dále charakterizována, ale je možné se domnívat, že se jednalo o makrofágy, které i v našem materiálu byly nejpočetnější skupinou CD45⁺ buněk.

Expresí zánětlivých cytokinů je jeden z dalších parametrů lokálního zánětlivého procesu (Boos, Anderson, and Lip 2006; Guo, Lip, and Apostolakis 2012; Matloch et al. 2018; Mazurek et al. 2003; Ihara et al. 2020). Jedna studie provedená na pacientech s onemocněním chlopní zjistila zvýšenou expresi TNF-alfa a IL-6 v pravých síních pacientů s AF (Qu et al. 2009). Novější práce ukázala vyšší expresi zánětlivé adhesivní molekuly VCAM1 v kapilárách myokardu v levého ouška u pacientů s AF ve srovnání s nekroptickým materiálem získaným z osob se SR (Begieneman et al. 2015). Je zajímavé, že obě studie se lišily v rozsahu fibrózy pozorované v materiálu od pacientů s AF vs. SR. Starší studie ukázala větší množství fibrózy

(Qu et al. 2009), naopak v novější práci nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinou s AF a kontrolní skupinou se SR (Begieneman et al. 2015), což je v shodě s našimi výsledky (Smorodinova et al. 2015). Jak již bylo zmíněno v této části dizertace zaměřené na imunitní buňky v myokardu jsme jako nejpočetnější buněčnou populaci identifikovali CD68+ buňky, které měli většinou tvar těla tvořený tělem s jádrem a delšími cytoplazmatickými výběžky, které byly nataženy v prostoru endomyxia, mezi kapilárami a těly kardiomyocytů. Velké množství buněk s touto morfologií bylo také imunoreaktivních na marker DC-SIGN, který bývá někdy označován, jako marker buněk dendritických (van Kooyk 2008). Otázka, jaká frakce CD68+ buněk je tvořena právě dendritickými buňkami, a jestli jsou tyto DC-SIGN+ buňky rozdílně zastoupeny v síňovém myokardu pacientů s AF oproti osobám se SR by mohla být vyřešena další charakterizací této buněčné populace. Úloha dendritických buněk v patologii srdečních onemocnění je popsána stále jen nedostatečně (Afanasyeva, Georgakopoulos, and Rose 2004). V rámci dizertace jsme také nepřistoupili k další charakterizaci populace makrofágů, přičemž v poslední době je stále více patrné, že se jedná o rozmanitou populaci imunitních buněk, která se může z hlediska svého charakteru měnit v závislosti na vývoji i jako reakce na různé patologické stavy (Frodermann and Nahrendorf 2018; Pierzynova et al. 2019; Nicolas-Avila, Hidalgo, and Ballesteros 2018; Hou et al. 2019). K této přesnější charakteristice chronického zánětlivého infiltrátu by jistě mohly přispět kromě imunohistochemie také nové molekulárně biologické přístupy (Litvinukova et al. 2020; Xue et al. 2014). Jedna práce z nedávné doby přinesla výsledky, ukazující na korelaci mezi chronickou zánětlivou infiltrací síní a myokarditidou v srdečních komorách (Begieneman et al. 2016). V naší studii, která je podkladem této dizertace, jsme provedli detekci imunitních buněk pouze v síních, protože jsme neměli možnost sbírat bioptický materiál z jiných oddílů srdce a tudíž jsme vztah mezi zánětem síní a komor nemohli ověřit. Ačkoliv jsme imunitní buňky detekovali také v endokardu a epikardu, nebyly tyto vrstvy atriální stěny zahrnuty do kvantifikace a z tohoto důvodu se také

nemůžeme vyjádřit ke vztahu mezi chronickým zánětem epikardiální tukové tkáně a remodelací atriálního myokardu při AF. Zánětlivá infiltrace epikardiálního tuku byla pozorována u pacientů s AF opakovaně (Begieneman et al. 2016; Wu et al. 2020). Postupně přibývá i dalších dokladů o těsném vztahu mezi chronickým zánětem epikardiálního tuku a dalšími srdečními patologiemi (Rozsivalova et al. 2020; Pierzynova et al. 2019; Mraz et al. 2019; Iacobellis 2022; Malavazos et al. 2022).

ZAVĚR

Komplexní analýza bioptických vzorků síňové tkáně u pacientu podstupujících operaci na otevřeném srdce ukázala, že interstitium má variabilní morfologii, zejména pokud jde o množství a složení ECM. Nemohli jsme však potvrdit vyšší úroveň fibrózy specifické pro AF. Toto zjištění naznačuje, že intersticiální fibróza a další morfologické změny v síňové tkáni jsou spíše spojeny se strukturálním srdečním onemocněním než s AF jako takovým. Zda se u takového pacienta rozvine AF, závisí s největší pravděpodobností na další přítomnosti spouštěčů a modulačních faktorů. Výrazné rozdíly v množství kolagenu I, III a elastinu u pacientů s SR a AF nebyly nalezeny. Obě skupiny pacientů neměly žádné rozdíly v exprese VEGF a mikrovaskulární denzitě. Množství kolagenu I,III a elastinu v pravé síni myokardu bylo výrazně vyšší, než ve vzorcích získaných z levé síni. VEGF exprese kardiomyocytů byla výrazně vyšší oproti levé síni. Mikrovaskulární denzita byla vyšší v levé síni myokardu ve srovnání s pravou síni.

Dále jsme ukázali, že rozdíly ve stupni strukturální remodelace mezi levou a pravou síni mohou být důležitější pro etiopatogenezi AF. Regionální rozdíly v obsahu ECM, mikrovaskulární hustotě a expresi VEGF zaslouží další zkoumání.

Imunohistochemická analýza vzorků tkáně u pacientů prokázala mírný a místně specifický nárůst zánětlivých buněk v síňovém myokardu pacientů s FS ve srovnání s pacienty se SR. Nejvíce zastoupenou populací imunitních buněk byly CD3+ T-lymfocyty a CD68-KP1+ subpopulace monocytů/makrofágů, což odpovídalo převážně dendritickým buňkám. Žírné buňky a B-lymfocyty byly méně časté. Pouze CD3+ a CD68-KP1+ buňky byly zvýšeny v levé síni pacientů s FS, zatímco v síňovém myokardu nebyla zjištěna žádná zánětlivá ložiska. Toto lokální zvýšení některých populací CD45+ buněk může odrážet progresi AF.

LITERATURA

1. Accornero, F., J. H. van Berlo, R. N. Correll, J. W. Elrod, M. A. Sargent, A. York, J. E. Rabinowitz, A. Leask, and J. D. Molkentin. 2015. 'Genetic Analysis of Connective Tissue Growth Factor as an Effector of Transforming Growth Factor beta Signaling and Cardiac Remodeling', *Mol Cell Biol*, 35: 2154-64.
2. Afanasyeva, M., D. Georgakopoulos, and N. R. Rose. 2004. 'Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction', *Autoimmun Rev*, 3: 476-86.
3. Allesie, M., J. Ausma, and U. Schotten. 2002. 'Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation', *Cardiovasc Res*, 54: 230-46.
4. Anne, W., R. Willems, T. Roskams, P. Sergeant, P. Herijgers, P. Holemans, H. Ector, and H. Heidbuchel. 2005. 'Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation', *Cardiovascular Research*, 67: 655-66.
5. Annes, J. P., J. S. Munger, and D. B. Rifkin. 2003. 'Making sense of latent TGFbeta activation', *J Cell Sci*, 116: 217-24.
6. Annoni, G., G. Luvara, B. Arosio, N. Gagliano, F. Fiordaliso, D. Santambrogio, G. Jeremic, L. Mircoli, R. Latini, C. Vergani, and S. Masson. 1998. 'Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in the rat myocardium', *Mech Ageing Dev*, 101: 57-72.
7. Appleton, C. P., L. K. Hatle, and R. L. Popp. 1988. 'Relation of transmitral flow velocity patterns to left ventricular diastolic function: new insights from a combined hemodynamic and Doppler echocardiographic study', *J Am Coll Cardiol*, 12: 426-40.
8. Armulik, A., G. Genové, and C. Betsholtz. 2011. 'Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises', *Dev Cell*, 21: 193-215.
9. Asano, Y., H. Ihn, K. Yamane, M. Jinnin, and K. Tamaki. 2006. 'Increased expression of integrin alphavbeta5 induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts', *Am J Pathol*, 168: 499-510.
10. Ashizawa, N., K. Graf, Y. S. Do, T. Nunohiro, C. M. Giachelli, W. P. Meehan, T. L. Tuan, and W. A. Hsueh. 1996. 'Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction', *J Clin Invest*, 98: 2218-27.
11. Ausma, J., M. Wijffels, F. Thone, L. Wouters, M. Allesie, and M. Borgers. 1997. 'Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat', *Circulation*, 96: 3157-63.
12. Babapoor-Farrokhran, S., D. Gill, J. Alzubi, and S. K. Mainigi. 2021. 'Atrial fibrillation: the role of hypoxia-inducible factor-1-regulated cytokines', *Mol Cell Biochem*, 476: 2283-93.
13. Bajpai, G., C. Schneider, N. Wong, A. Bredemeyer, M. Hulsmans, M. Nahrendorf, S. Epelman, D. Kreisel, Y. Liu, A. Itoh, T. S. Shankar, C. H. Selzman, S. G. Drakos, and K. J. Lavine. 2018. 'The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions', *Nat Med*, 24: 1234-45.
14. Begieneman, M. P., R. W. Emmens, L. Rijvers, B. Kubat, W. J. Paulus, A. B. Vonk, L. Rozendaal, P. S. Biesbroek, D. Wouters, S. Zeerleder, M. van Ham, S. Heymans, A. C. van Rossum, H. W. Niessen, and P. A. Krijnen. 2016. 'Ventricular myocarditis coincides with atrial myocarditis in patients', *Cardiovasc Pathol*, 25: 141-8.
15. Begieneman, M. P., L. Rijvers, B. Kubat, W. J. Paulus, A. B. Vonk, A. C. van Rossum, C. G. Schalkwijk, W. Stooker, H. W. Niessen, and P. A. Krijnen. 2015. 'Atrial fibrillation coincides with the advanced glycation end product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the atrium', *Am J Pathol*, 185: 2096-104.

16. Boldt, A., U. Wetzel, J. Lauschke, J. Weigl, J. Gummert, G. Hindricks, H. Kottkamp, and S. Dhein. 2004. 'Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease', *Heart*, 90: 400-5.
17. Boos, C. J., R. A. Anderson, and G. Y. Lip. 2006. 'Is atrial fibrillation an inflammatory disorder?', *Eur Heart J*, 27: 136-49.
18. Bowers, S. L., I. Banerjee, and T. A. Baudino. 2010. 'The extracellular matrix: at the center of it all', *J Mol Cell Cardiol*, 48: 474-82.
19. Brown, R. D., S. K. Ambler, M. D. Mitchell, and C. S. Long. 2005. 'The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45: 657-87.
20. Burstein, B., and S. Nattel. 2008. 'Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation', *J Am Coll Cardiol*, 51: 802-9.
21. Caforio, A. L., S. Pankuweit, E. Arbustini, C. Basso, J. Gimeno-Blanes, S. B. Felix, M. Fu, T. Helio, S. Heymans, R. Jahns, K. Klingel, A. Linhart, B. Maisch, W. McKenna, J. Mogensen, Y. M. Pinto, A. Ristic, H. P. Schultheiss, H. Seggewiss, L. Tavazzi, G. Thiene, A. Yilmaz, P. Charron, P. M. Elliott, Myocardial European Society of Cardiology Working Group on, and Diseases Pericardial. 2013. 'Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases', *Eur Heart J*, 34: 2636-48, 48a-48d.
22. Camm, A. J., P. Kirchhof, G. Y. Lip, U. Schotten, I. Savelieva, S. Ernst, I. C. Van Gelder, N. Al-Attar, G. Hindricks, B. Prendergast, H. Heidbuchel, O. Alfieri, A. Angelini, D. Atar, P. Colonna, R. De Caterina, J. De Sutter, A. Goette, B. Gorenek, M. Haldal, S. H. Hohloser, P. Kolh, J. Y. Le Heuzey, P. Ponikowski, F. H. Rutten, and E. S. C. Committee for Practice Guidelines. 2010. 'Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)', *Europace*, 12: 1360-420.
23. Cipollone, F., M. Fazio, G. Mincione, A. Iezzi, B. Pini, C. Cuccurullo, S. Uchino, F. Spigonardo, M. Di Nisio, F. Cuccurullo, A. Mezzetti, and E. Porreca. 2004. 'Increased expression of transforming growth factor-beta 1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques', *Stroke*, 35: 2253-57.
24. Cleutjens, J. P., J. C. Kandala, E. Guarda, R. V. Guntaka, and K. T. Weber. 1995. 'Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction', *J Mol Cell Cardiol*, 27: 1281-92.
25. Cleutjens, J. P., M. J. Verluyten, J. F. Smiths, and M. J. Daemen. 1995. 'Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart', *Am J Pathol*, 147: 325-38.
26. Corradi, D., S. Callegari, S. Benussi, R. Maestri, P. Pastori, S. Nascimbene, S. Bosio, E. Dorigo, C. Grassani, R. Rusconi, M. V. Vettori, R. Alinovi, E. Astorri, C. Pappone, and O. Alfieri. 2005. 'Myocyte changes and their left atrial distribution in patients with chronic atrial fibrillation related to mitral valve disease', *Hum Pathol*, 36: 1080-9.
27. Corradi, D., S. Callegari, S. Benussi, S. Nascimbene, P. Pastori, S. Calvi, R. Maestri, E. Astorri, C. Pappone, and O. Alfieri. 2004. 'Regional left atrial interstitial remodeling in patients with chronic atrial fibrillation undergoing mitral-valve surgery', *Virchows Archiv*, 445: 498-505.
28. Corradi, D., S. Callegari, R. Maestri, S. Benussi, and O. Alfieri. 2008. 'Structural remodeling in atrial fibrillation', *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5: 782-96.
29. Corradi, D., S. Callegari, R. Maestri, D. Ferrara, D. Mangieri, R. Alinovi, P. Mozzoni, S. Pinelli, M. Goldoni, Y. A. Privitera, V. Bartoli, E. Astorri, E. Macchi, A. Vaglio, S. Benussi, and O. Alfieri. 2012. 'Differential Structural Remodeling of the Left-Atrial

- Posterior Wall in Patients Affected by Mitral Regurgitation with or Without Persistent Atrial Fibrillation: A Morphological and Molecular Study', *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 23: 271-79.
30. Corradi, D., S. Callegari, L. Manotti, D. Ferrara, M. Goldoni, R. Alinovi, S. Pinelli, P. Mozzoni, R. Andreoli, A. Asimaki, A. Pozzoli, G. Becchi, A. Mutti, S. Benussi, J. E. Saffitz, and O. Alfieri. 2014. 'Persistent lone atrial fibrillation: Clinicopathologic study of 19 cases', *Heart Rhythm*, 11: 1250-58.
 31. Čihák, R., P. Heinc, L. Haman, M. Fiala, P. Neužil, and O. Toman. 2012. 'Fibrilace síní. Doporučený diagnostický a léčebný postup České kardiologické společnosti vypracovaný Pracovní skupinou arytmie a trvalé kardiostimulace', *Vnitřní lékařství*, 58: 41-69.
 32. Čihák, Robert, Luděk Haman, and Miloš Táborský. 2016. '2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS: Summary of the document prepared by the Czech Society of Cardiology', *Cor et Vasa*, 58: e636-e83.
 33. Čihák. 2016. *Anatomie 3: Třetí, upravené a doplněné vydání* (Grada Publishing, a.s.).
 34. Darby, A. E., and J. P. Dimarco. 2012. 'Management of atrial fibrillation in patients with structural heart disease', *Circulation*, 125: 945-57.
 35. De Jong, A. M., A. H. Maass, S. U. Oberdorf-Maass, D. J. Van Veldhuisen, W. H. Van Gilst, and I. C. Van Gelder. 2011. 'Mechanisms of atrial structural changes caused by stretch occurring before and during early atrial fibrillation', *Cardiovasc Res*, 89: 754-65.
 36. de Oliveira, I. M., B. D. Oliveira, M. I. Scanavacca, and P. S. Gutierrez. 2013. 'Fibrosis, myocardial crossings, disconnections, abrupt turns, and epicardial reflections: do they play an actual role in human permanent atrial fibrillation? A controlled necropsy study', *Cardiovasc Pathol*, 22: 65-9.
 37. DiFrancesco, D. 1993. 'Pacemaker mechanisms in cardiac tissue', *Annu Rev Physiol*, 55: 455-72.
 38. DiFrancesco, D. 2010. 'The role of the funny current in pacemaker activity', *Circ Res*, 106: 434-46.
 39. Diker, E., S. Aydogdu, M. Ozdemir, T. Kural, K. Polat, S. Cehreli, A. Erdogan, and S. Goksel. 1996. 'Prevalence and predictors of atrial fibrillation in rheumatic valvular heart disease', *Am J Cardiol*, 77: 96-8.
 40. Eckstein, J., S. Verheule, N. M. de Groot, M. Allessie, and U. Schotten. 2008. 'Mechanisms of perpetuation of atrial fibrillation in chronically dilated atria', *Prog Biophys Mol Biol*, 97: 435-51.
 41. Eghbali, M., O. O. Blumenfeld, S. Seiffter, P. M. Buttrick, L. A. Leinwand, T. F. Robinson, M. A. Zern, and M. A. Giambone. 1989. 'Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization', *J Mol Cell Cardiol*, 21: 103-13.
 42. Ellinor, P. T., D. M. Yoerger, J. N. Ruskin, and C. A. MacRae. 2005. 'Familial aggregation in lone atrial fibrillation', *Hum Genet*, 118: 179-84.
 43. Epelman, S., K. J. Lavine, A. E. Beaudin, D. K. Sojka, J. A. Carrero, B. Calderon, T. Brija, E. L. Gautier, S. Ivanov, A. T. Satpathy, J. D. Schilling, R. Schwendener, I. Sergin, B. Razani, E. C. Forsberg, W. M. Yokoyama, E. R. Unanue, M. Colonna, G. J. Randolph, and D. L. Mann. 2014. 'Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation', *Immunity*, 40: 91-104.
 44. Everett, T. H., and J. E. Olgin. 2007. 'Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation', *Heart Rhythm*, 4: S24-S27.

45. Farbehi, N., R. Patrick, A. Dorison, M. Xaymardan, V. Janbandhu, K. Wystub-Lis, J. W. Ho, R. E. Nordon, and R. P. Harvey. 2019. 'Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury', *Elife*, 8.
46. Feinberg, W. M., J. L. Blackshear, A. Laupacis, R. Kronmal, and R. G. Hart. 1995. 'Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications', *Arch Intern Med*, 155: 469-73.
47. Fomovsky, G. M., S. Thomopoulos, and J. W. Holmes. 2010. 'Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart', *J Mol Cell Cardiol*, 48: 490-6.
48. Fox, C. S., H. Parise, R. B. D'Agostino, Sr., D. M. Lloyd-Jones, R. S. Vasan, T. J. Wang, D. Levy, P. A. Wolf, and E. J. Benjamin. 2004. 'Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring', *JAMA*, 291: 2851-5.
49. Frangogiannis, N. G. 2020. 'Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis', *Journal of Experimental Medicine*, 217.
50. Frangogiannis, N. G. 2021. 'Cardiac fibrosis', *Cardiovasc Res*, 117: 1450-88.
51. Frangogiannis, N. G. 2022. 'Transforming growth factor-beta in myocardial disease', *Nature Reviews Cardiology*, 19: 435-55.
52. Friberg, J., P. Buch, H. Scharling, N. Gadsbphioll, and G. B. Jensen. 2003. 'Rising rates of hospital admissions for atrial fibrillation', *Epidemiology*, 14: 666-72.
53. Frodermann, V., and M. Nahrendorf. 2018. 'Macrophages and Cardiovascular Health', *Physiological Reviews*, 98: 2523-69.
54. Frustaci, A., C. Chimenti, F. Bellocci, E. Morgante, M. A. Russo, and A. Maseri. 1997. 'Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation', *Circulation*, 96: 1180-84.
55. Gami, A. S., D. O. Hodge, R. M. Herges, E. J. Olson, J. Nykodym, T. Kara, and V. K. Somers. 2007. 'Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation', *J Am Coll Cardiol*, 49: 565-71.
56. Go, A. S., E. M. Hylek, K. A. Phillips, Y. Chang, L. E. Henault, J. V. Selby, and D. E. Singer. 2001. 'Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study', *JAMA*, 285: 2370-5.
57. Goette, A., G. Juenemann, B. Peters, H. U. Klein, A. Roessner, C. Huth, and C. Rocken. 2002. 'Determinants and consequences of atrial fibrosis in patients undergoing open heart surgery', *Cardiovascular Research*, 54: 390-96.
58. Goette, A., T. Staack, C. Rocken, M. Arndt, J. C. Geller, C. Huth, S. Ansorge, H. U. Klein, and U. Lendeckel. 2000. 'Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation', *J Am Coll Cardiol*, 35: 1669-77.
59. Goldberg, R. J., J. Yarzebski, D. Lessard, J. Wu, and J. M. Gore. 2002. 'Recent trends in the incidence rates of and death rates from atrial fibrillation complicating initial acute myocardial infarction: a community-wide perspective', *Am Heart J*, 143: 519-27.
60. Gonzalez-Lopez, E., M. Gallego-Delgado, G. Guzzo-Merello, F. J. de Haro-Del Moral, M. Cobo-Marcos, C. Robles, B. Bornstein, C. Salas, E. Lara-Pezzi, L. Alonso-Pulpon, and P. Garcia-Pavia. 2015. 'Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction', *Eur Heart J*, 36: 2585-94.
61. Gramley, F., J. Lorenzen, C. Knackstedt, O. R. Rana, E. Saygili, D. Frechen, S. Stanzel, F. Pezzella, E. Koellensperger, C. Weiss, T. Munzel, and P. Schauerte. 2009. 'Age-related atrial fibrosis', *Age (Dordr)*, 31: 27-38.

62. Gramley, F., J. Lorenzen, E. Koellensperger, K. Kettering, C. Weiss, and T. Munzel. 2010. 'Atrial fibrosis and atrial fibrillation: The role of the TGF-beta(1) signaling pathway', *International Journal of Cardiology*, 143: 405-13.
63. Gretarsdottir, S., G. Thorleifsson, A. Manolescu, U. Styrkarsdottir, A. Helgadóttir, A. Gschwendtner, K. Kostulas, G. Kuhlenbaumer, S. Bevan, T. Jonsdottir, H. Bjarnason, J. Saemundsdottir, S. Palsson, D. O. Arnar, H. Holm, G. Thorgeirsson, E. M. Valdimarsson, S. Sveinbjornsdottir, C. Gieger, K. Berger, H. E. Wichmann, J. Hillert, H. Markus, J. R. Gulcher, E. B. Ringelstein, A. Kong, M. Dichgans, D. F. Gudbjartsson, U. Thorsteinsdottir, and K. Stefansson. 2008. 'Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke', *Ann Neurol*, 64: 402-9.
64. Gudbjartsson, D. F., D. O. Arnar, A. Helgadóttir, S. Gretarsdottir, H. Holm, A. Sigurdsson, A. Jonasdottir, A. Baker, G. Thorleifsson, K. Kristjansson, A. Palsson, T. Blondal, P. Sulem, V. M. Backman, G. A. Hardarson, E. Palsdottir, A. Helgason, R. Sigurjonsdottir, J. T. Sverrisson, K. Kostulas, M. C. Ng, L. Baum, W. Y. So, K. S. Wong, J. C. Chan, K. L. Furie, S. M. Greenberg, M. Sale, P. Kelly, C. A. MacRae, E. E. Smith, J. Rosand, J. Hillert, R. C. Ma, P. T. Ellinor, G. Thorgeirsson, J. R. Gulcher, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, and K. Stefansson. 2007. 'Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25', *Nature*, 448: 353-7.
65. Guo, Y., G. Y. Lip, and S. Apostolakis. 2012. 'Inflammation in atrial fibrillation', *J Am Coll Cardiol*, 60: 2263-70.
66. Hanna, N., S. Cardin, T. K. Leung, and S. Nattel. 2004. 'Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure', *Cardiovascular Research*, 63: 236-44.
67. Hearse, D. J., L. Maxwell, C. Saldanha, and J. B. Gavin. 1993. 'The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection', *J Mol Cell Cardiol*, 25: 759-800.
68. Heather, L. C., and K. Clarke. 2011. 'Metabolism, hypoxia and the diabetic heart', *J Mol Cell Cardiol*, 50: 598-605.
69. Heeringa, J., D. S. Conway, D. A. van der Kuip, A. Hofman, M. M. Breteler, G. Y. Lip, and J. C. Witteman. 2006. 'A longitudinal population-based study of prothrombotic factors in elderly subjects with atrial fibrillation: the Rotterdam Study 1990-1999', *J Thromb Haemost*, 4: 1944-9.
70. Hindricks, G., T. Potpara, N. Dagres, E. Arbelo, J. J. Bax, C. Blomstrom-Lundqvist, G. Boriani, M. Castella, G. A. Dan, P. E. Dilaveris, L. Fauchier, G. Filippatos, J. M. Kalman, M. La Meir, D. A. Lane, J. P. Lebeau, M. Lettino, G. Y. H. Lip, F. J. Pinto, G. N. Thomas, M. Valgimigli, I. C. Van Gelder, B. P. Van Putte, C. L. Watkins, and E. S. C. Scientific Document Group. 2021. '2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC', *Eur Heart J*, 42: 373-498.
71. Hinz, B. 2007. 'Formation and function of the myofibroblast during tissue repair', *J Invest Dermatol*, 127: 526-37.
72. Hinz, B. 2010. 'The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell', *J Biomech*, 43: 146-55.
73. Ho, S. Y., R. H. Anderson, and D. Sanchez-Quintana. 2002. 'Atrial structure and fibres: morphologic bases of atrial conduction', *Cardiovasc Res*, 54: 325-36.

74. Ho, S. Y., D. Sanchez-Quintana, J. A. Cabrera, and R. H. Anderson. 1999. 'Anatomy of the left atrium: implications for radiofrequency ablation of atrial fibrillation', *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10: 1525-33.
75. Hou, X. Z., G. B. Chen, W. Bracamonte-Baran, H. S. Choi, N. L. Diny, J. Sung, D. Hughes, T. Won, M. K. Wood, M. V. Talor, D. J. Hackam, K. Klingel, G. Davogusto, H. Taegtmeier, I. Coppens, J. G. Barin, and D. Cihakova. 2019. 'The Cardiac Microenvironment Instructs Divergent Monocyte Fates and Functions in Myocarditis', *Cell Reports*, 28: 172-+.
76. Chen, M. C., J. P. Chang, W. H. Liu, C. H. Yang, Y. L. Chen, T. H. Tsai, Y. H. Wang, and K. L. Pan. 2008. 'Increased inflammatory cell infiltration in the atrial myocardium of patients with atrial fibrillation', *Am J Cardiol*, 102: 861-5.
77. Chen, P. S., C. C. Chou, A. Y. Tan, S. Zhou, M. C. Fishbein, C. Hwang, H. S. Karagueuzian, and S. F. Lin. 2006. 'The mechanisms of atrial fibrillation', *J Cardiovasc Electrophysiol*, 17 Suppl 3: S2-7.
78. Chen, Z. H., N. Zhang, H. Y. Chu, Y. Y. Yu, Z. K. Zhang, G. Zhang, and B. T. Zhang. 2020. 'Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
79. Iacobellis, G. 2022. 'Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology', *Nature Reviews Cardiology*, 19: 593-606.
80. Igarashi, T., J. E. Finet, A. Takeuchi, Y. Fujino, M. Strom, I. D. Greener, D. S. Rosenbaum, and J. K. Donahue. 2012. 'Connexin gene transfer preserves conduction velocity and prevents atrial fibrillation', *Circulation*, 125: 216-25.
81. Ihara, K., T. Sasano, Y. Hiraoka, M. Togo-Ohno, Y. Soejima, M. Sawabe, M. Tsuchiya, H. Ogawa, T. Furukawa, and H. Kuroyanagi. 2020. 'A missense mutation in the RSRSP stretch of Rbm20 causes dilated cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice', *Scientific Reports*, 10.
82. Jirmár, R., and V. Pelouch. 1993. '[The role of the myocardial interstitium in left ventricular remodeling after acute myocardial infarction]', *Cor Vasa*, 35: 206-9.
83. Jugdutt, B. I. 2003. 'Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways', *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 3: 1-30.
84. Kannel, W. B., R. D. Abbott, D. D. Savage, and P. M. McNamara. 1982. 'Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study', *N Engl J Med*, 306: 1018-22.
85. Kato, T., Y. Umeda, K. Azuma, and S. Murakawa. 2008. 'Hybrid myocardial revascularization complicated by delayed anastomotic bleeding', *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 56: 456-8.
86. Kelly, R. A., J. L. Balligand, and T. W. Smith. 1996. 'Nitric oxide and cardiac function', *Circ Res*, 79: 363-80.
87. Kittnar O., and kolektiv 2011. *Lékařská fyziologie* (Grada Publishing a.s.).
88. Ko, W. C., C. Y. Hong, S. M. Hou, C. H. Lin, E. T. Ong, C. F. Lee, C. T. Tsai, and L. P. Lai. 2011. 'Elevated Expression of Connective Tissue Growth Factor in Human Atrial Fibrillation and Angiotensin II-Treated Cardiomyocytes', *Circulation Journal*, 75: 1592-600.
89. Koitabashi, N., M. Arai, S. Kogure, K. Niwano, A. Watanabe, Y. Aoki, T. Maeno, T. Nishida, S. Kubota, M. Takigawa, and M. Kurabayashi. 2007. 'Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis', *Hypertension*, 49: 1120-27.
90. Komatsubara, I., T. Murakami, S. Kusachi, K. Nakamura, S. Hirohata, J. Hayashi, S. Takemoto, C. Suezawa, Y. Ninomiya, and Y. Shiratori. 2003. 'Spatially and temporally

- different expression of osteonectin and osteopontin in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats', *Cardiovasc Pathol*, 12: 186-94.
91. Kostin, S., G. Klein, Z. Szalay, S. Hein, E. P. Bauer, and J. Schaper. 2002. 'Structural correlate of atrial fibrillation in human patients', *Cardiovasc Res*, 54: 361-79.
 92. Kovanen, P. T., and I. Bot. 2017. 'Mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease - Activators and actions', *Eur J Pharmacol*, 816: 37-46.
 93. Krystel-Whittemore, M., K. N. Dileepan, and J. G. Wood. 2015. 'Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell', *Front Immunol*, 6: 620.
 94. Kučera, T., I. Vyletěl, M. Moravcová, V. Krejčí, Z. Zizka, and M. Jirkovská. 2010. 'Pericyte coverage of fetoplacental vessels in pregnancies complicated by Type 1 diabetes mellitus', *Placenta*, 31: 1120-2.
 95. Kurose, I., P. Kubes, R. Wolf, D. C. Anderson, J. Paulson, M. Miyasaka, and D. N. Granger. 1993. 'Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage', *Circ Res*, 73: 164-71.
 96. Lee, J. S., S. J. Jeong, S. Kim, L. Chalifour, T. J. Yun, M. A. Miah, B. Li, A. Majdoubi, A. Sabourin, T. Keler, J. V. Guimond, E. Haddad, E. Y. Choi, S. Epelman, J. H. Choi, J. Thibodeau, G. T. Oh, and C. Cheong. 2018. 'Conventional Dendritic Cells Impair Recovery after Myocardial Infarction', *J Immunol*, 201: 1784-98.
 97. Levy, S., A. J. Camm, S. Saksena, E. Aliot, G. Breithardt, H. J. Crijns, D. W. Davies, G. N. Kay, E. N. Prystowsky, R. Sutton, A. L. Waldo, D. G. Wyse, Cardiology Working Group on Arrhythmias of European Society of, Cardiology Working Group of Cardiac Pacing of European Society of, Pacing North American Society of, and Electrophysiology. 2003. 'International consensus on nomenclature and classification of atrial fibrillation: A collaborative project of the Working Group on Arrhythmias and the Working Group of Cardiac Pacing of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology', *J Cardiovasc Electrophysiol*, 14: 443-5.
 98. Li, D. S., K. Shinagawa, L. Pang, T. K. Leung, S. Cardin, Z. G. Wang, and S. Nattel. 2001. 'Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure', *Circulation*, 104: 2608-14.
 99. Li, H., M. H. Hastings, J. Rhee, L. E. Trager, J. D. Roh, and A. Rosenzweig. 2020. 'Targeting Age-Related Pathways in Heart Failure', *Circ Res*, 126: 533-51.
 100. Li, Y., Z. Jian, Z. Y. Yang, L. Chen, X. F. Wang, R. Y. Ma, and Y. B. Xiao. 2013. 'Increased Expression of Connective Tissue Growth Factor and Transforming Growth Factor-Beta-1 in Atrial Myocardium of Patients with Chronic Atrial Fibrillation', *Cardiology*, 124: 233-40.
 101. Liao, C. H., H. Akazawa, M. Tamagawa, K. Ito, N. Yasuda, Y. Kudo, R. Yamamoto, Y. Ozasa, M. Fujimoto, P. Wang, H. Nakauchi, H. Nakaya, and I. Komuro. 2010. 'Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts', *J Clin Invest*, 120: 242-53.
 102. Lindsey, M. L., D. K. Goshorn, C. E. Squires, G. P. Escobar, J. W. Hendrick, J. T. Mingoia, S. E. Sweterlitsch, and F. G. Spinale. 2005. 'Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function', *Cardiovasc Res*, 66: 410-9.
 103. Litvinukova, M., C. Talavera-Lopez, H. Maatz, D. Reichart, C. L. Worth, E. L. Lindberg, M. Kanda, K. Polanski, M. Heinig, M. Lee, E. R. Nadelmann, K. Roberts, L. Tuck, E. S. Fasouli, D. M. DeLaughter, B. McDonough, H. Wakimoto, J. M. Gorham, S. Samari, K. T. Mahbubani, K. Saeb-Parsy, G. Patone, J. J. Boyle, H. B. Zhang, H. Zhang, A. Viveiros, G. Y. Oudit, O. A. Bayraktar, J. G. Seidman, C. E. Seidman, M.

- Nosedá, N. Hubner, and S. A. Teichmann. 2020. 'Cells of the adult human heart', *Nature*, 588: 466-+.
104. Lloyd-Jones, D. M., T. J. Wang, E. P. Leip, M. G. Larson, D. Levy, R. S. Vasan, R. B. D'Agostino, J. M. Massaro, A. Beiser, P. A. Wolf, and E. J. Benjamin. 2004. 'Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study', *Circulation*, 110: 1042-6.
105. Lodyga, M., and B. Hinz. 2020. 'TGF-beta1 - A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity', *Semin Cell Dev Biol*, 101: 123-39.
106. Longden, T. A., G. Zhao, A. Hariharan, and W. J. Lederer. 2023. 'Pericytes and the Control of Blood Flow in Brain and Heart', *Annu Rev Physiol*, 85: 137-64.
107. Lukl, J. 2009. '[How to improve response to cardiac resynchronization therapy?]', *Vnitr Lek*, 55: 808-11.
108. Maisch, B., A. Richter, A. Sandmoller, I. Portig, S. Pankuweit, and B. MBF-Heart Failure Network. 2005. 'Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI)', *Herz*, 30: 535-44.
109. Maki, T., L. Toivonen, P. Koskinen, H. Naveri, M. Harkonen, and H. Leinonen. 1998. 'Effect of ethanol drinking, hangover, and exercise on adrenergic activity and heart rate variability in patients with a history of alcohol-induced atrial fibrillation', *Am J Cardiol*, 82: 317-22.
110. Malavazos, A. E., A. Di Vincenzo, G. Iacobellis, S. Basilico, C. Dubini, L. Morricone, L. Menicanti, T. Luca, A. Giordano, S. Castorina, M. Carruba, E. Nisoli, S. Del Prato, and S. Cinti. 2022. 'The density of crown-like structures in epicardial adipose tissue could play a role in cardiovascular diseases', *Eating and Weight Disorders-Studies on Anorexia Bulimia and Obesity*, 27: 2905-10.
111. Marcus, G. M., L. M. Smith, E. Vittinghoff, Z. H. Tseng, N. Badhwar, B. K. Lee, R. J. Lee, M. M. Scheinman, and J. E. Olgin. 2008. 'A first-degree family history in lone atrial fibrillation patients', *Heart Rhythm*, 5: 826-30.
112. Marijon, E., J. Y. Le Heuzey, S. Connolly, S. Yang, J. Pogue, M. Brueckmann, J. Eikelboom, E. Themeles, M. Ezekowitz, L. Wallentin, S. Yusuf, and Re-Ly Investigators. 2013. 'Causes of death and influencing factors in patients with atrial fibrillation: a competing-risk analysis from the randomized evaluation of long-term anticoagulant therapy study', *Circulation*, 128: 2192-201.
113. Marty, R. R., and U. Eriksson. 2006. 'Dendritic cells and autoimmune heart failure', *Int J Cardiol*, 112: 34-9.
114. Matloch, Z., A. Cinkajzlova, M. Mraz, and M. Haluzik. 2018. 'The Role of Inflammation in Epicardial Adipose Tissue in Heart Diseases', *Curr Pharm Des*, 24: 297-309.
115. Mazurek, T., L. Zhang, A. Zalewski, J. D. Mannion, J. T. Diehl, H. Arafat, L. Sarov-Blat, S. O'Brien, E. A. Keiper, A. G. Johnson, J. Martin, B. J. Goldstein, and Y. Shi. 2003. 'Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators', *Circulation*, 108: 2460-6.
116. Mescher, A.L. 2018. *Junqueirovy základy histologie* (Galén).
117. Mitchell, J. H., and W. Shapiro. 1969. 'Atrial function and the hemodynamic consequences of atrial fibrillation in man', *Am J Cardiol*, 23: 556-67.
118. Mommersteeg, M. T., N. A. Brown, O. W. Prall, C. de Gier-de Vries, R. P. Harvey, A. F. Moorman, and V. M. Christoffels. 2007. 'Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium', *Circ Res*, 101: 902-9.
119. Mommersteeg, M. T., W. M. Hoogaars, O. W. Prall, C. de Gier-de Vries, C. Wiese, D. E. Clout, V. E. Papaioannou, N. A. Brown, R. P. Harvey, A. F. Moorman,

- and V. M. Christoffels. 2007. 'Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node', *Circ Res*, 100: 354-62.
120. Moncada, Salvador. 1999. 'Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine', *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92: 164-69.
 121. Mont, L., A. Sambola, J. Brugada, M. Vacca, J. Marrugat, R. Elosua, C. Pare, M. Azqueta, and G. Sanz. 2002. 'Long-lasting sport practice and lone atrial fibrillation', *Eur Heart J*, 23: 477-82.
 122. Movahed, M. R., M. Hashemzadeh, and M. M. Jamal. 2005. 'Diabetes mellitus is a strong, independent risk for atrial fibrillation and flutter in addition to other cardiovascular disease', *Int J Cardiol*, 105: 315-8.
 123. Mraz, M., A. Cinkajzlova, J. Klouckova, Z. Lacinova, H. Kratochvilova, M. Lips, M. Porizka, P. Kopecky, A. Pierzynova, T. Kucera, V. Melenovsky, I. Striz, J. Lindner, and M. Haluzik. 2019. 'Coronary Artery Disease Is Associated with an Increased Amount of T Lymphocytes in Human Epicardial Adipose Tissue', *Mediators of Inflammation*, 2019.
 124. Nakamura, Y., K. Nakamura, K. Fukushima-Kusano, K. Ohta, H. Matsubara, T. Hamuro, C. Yutani, and T. Ohe. 2003. 'Tissue factor expression in atrial endothelia associated with nonvalvular atrial fibrillation: possible involvement in intracardiac thrombogenesis', *Thromb Res*, 111: 137-42.
 125. Nguyen, B. L., M. C. Fishbein, L. S. Chen, P. S. Chen, and S. Masroor. 2009. 'Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans', *Heart Rhythm*, 6: 454-60.
 126. Nicolas-Avila, J. A., A. Hidalgo, and I. Ballesteros. 2018. 'Specialized functions of resident macrophages in brain and heart', *Journal of Leukocyte Biology*, 104: 743-56.
 127. Nováková, Zuzana, and Miroslav Novák CSc. 2007. "Fyziologie převodního systému srdečního, mechanismy vzniku arytmií." In.
 128. Ogi, H., Y. Nakano, S. Niida, K. Dote, Y. Hirai, K. Suenari, Y. Tonouchi, N. Oda, Y. Makita, S. Ueda, K. Kajihara, K. Imai, T. Sueda, K. Chayama, and Y. Kihara. 2010. 'Is structural remodeling of fibrillated atria the consequence of tissue hypoxia?', *Circ J*, 74: 1815-21.
 129. Ostgren, C. J., J. Merlo, L. Rastam, and U. Lindblad. 2004. 'Atrial fibrillation and its association with type 2 diabetes and hypertension in a Swedish community', *Diabetes Obes Metab*, 6: 367-74.
 130. Pauschinger, M., K. Chandrasekharan, J. Li, P. L. Schwimmbeck, M. Noutsias, and H. P. Schultheiss. 2002. '[Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]', *Herz*, 27: 677-82.
 131. Pierzynova, A., J. Sramek, A. Cinkajzlova, H. Kratochvilova, J. Lindner, M. Haluzik, and T. Kucera. 2019. 'The number and phenotype of myocardial and adipose tissue CD68+cells is associated with cardiovascular and metabolic disease in heart surgery patients', *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 29: 946-55.
 132. Pistulli, R., S. Konig, S. Drobnik, D. Kretzschmar, I. Rohm, M. Lichtenauer, M. Fritzenwanger, G. Mall, G. Mall, H. R. Figulla, and A. Yilmaz. 2013. 'Decrease in dendritic cells in endomyocardial biopsies of human dilated cardiomyopathy', *Eur J Heart Fail*, 15: 974-85.
 133. Platonov, P. G., L. B. Mitrofanova, V. Orshanskaya, and S. Y. Ho. 2011. 'Structural abnormalities in atrial walls are associated with presence and persistency of atrial fibrillation but not with age', *J Am Coll Cardiol*, 58: 2225-32.
 134. Pokorney, S. D., J. P. Piccini, S. R. Stevens, M. R. Patel, K. S. Pieper, J. L. Halperin, G. Breithardt, D. E. Singer, G. J. Hankey, W. Hacke, R. C. Becker, S. D. Berkowitz, C. C. Nessel, K. W. Mahaffey, K. A. Fox, R. M. Califf, Rocket Af Steering

- Committee, Investigators, and Rocket Af Steering Committee Investigators. 2016. 'Cause of Death and Predictors of All-Cause Mortality in Anticoagulated Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation: Data From ROCKET AF', *J Am Heart Assoc*, 5: e002197.
135. Polyakova, V., S. Miyagawa, Z. Szalay, J. Risteli, and S. Kostin. 2008. 'Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation', *J Cell Mol Med*, 12: 189-208.
136. Porter, K. E., and N. A. Turner. 2009. 'Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling', *Pharmacol Ther*, 123: 255-78.
137. Psaty, B. M., T. A. Manolio, L. H. Kuller, R. A. Kronmal, M. Cushman, L. P. Fried, R. White, C. D. Furberg, and P. M. Rautaharju. 1997. 'Incidence of and risk factors for atrial fibrillation in older adults', *Circulation*, 96: 2455-61.
138. Pudil, R. 2020. 'Age-related myocardial remodeling: myth or reality?', *Vnitř Lek*, 66: 507-11.
139. Qiu, J., S. Zhou, and Q. Liu. 2016. 'Phosphorylated AMP-activated protein kinase slows down the atrial fibrillation progression by activating Connexin43', *Int J Cardiol*, 208: 56-7.
140. Qu, Y. C., Y. M. Du, S. L. Wu, Q. X. Chen, H. L. Wu, and S. F. Zhou. 2009. 'Activated nuclear factor-kappaB and increased tumor necrosis factor-alpha in atrial tissue of atrial fibrillation', *Scand Cardiovasc J*, 43: 292-7.
141. Reilly, S. N., X. Liu, R. Carnicer, A. Recalde, A. Muszkiewicz, R. Jayaram, M. C. Carena, R. Wijesurendra, M. Stefanini, N. C. Surdo, O. Lomas, C. Ratnatunga, R. Sayeed, G. Krasopoulos, T. Rajakumar, A. Bueno-Orovio, S. Verheule, T. A. Fulga, B. Rodriguez, U. Schotten, and B. Casadei. 2016. 'Up-regulation of miR-31 in human atrial fibrillation begets the arrhythmia by depleting dystrophin and neuronal nitric oxide synthase', *Sci Transl Med*, 8: 340ra74.
142. Reinier, K., E. Marijon, A. Uy-Evanado, C. Teodorescu, K. Narayanan, H. Chugh, K. Gunson, J. Jui, and S. S. Chugh. 2014. 'The association between atrial fibrillation and sudden cardiac death: the relevance of heart failure', *JACC Heart Fail*, 2: 221-7.
143. Robinson, K., M. P. Frenneaux, B. Stockins, G. Karatasakis, J. D. Poloniecki, and W. J. McKenna. 1990. 'Atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: a longitudinal study', *J Am Coll Cardiol*, 15: 1279-85.
144. Rozsivalova, K., A. Pierzynova, H. Kratochvilova, J. Lindner, M. Lips, T. Kotulak, P. Ivak, I. Netuka, M. Haluzik, and T. Kucera. 2020. 'Increased Number of Mast Cells in Epicardial Adipose Tissue of Cardiac Surgery Patients With Coronary Artery Disease', *Physiological Research*, 69: 621-31.
145. Rudolph, V., R. P. Andrie, T. K. Rudolph, K. Friedrichs, A. Klinke, B. Hirsch-Hoffmann, A. P. Schwoerer, D. Lau, X. Fu, K. Klingel, K. Sydow, M. Didie, A. Seniuk, E. C. von Leitner, K. Szoecs, J. W. Schrickel, H. Treede, U. Wenzel, T. Lewalter, G. Nickenig, W. H. Zimmermann, T. Meinertz, R. H. Boger, H. Reichenspurner, B. A. Freeman, T. Eschenhagen, H. Ehmke, S. L. Hazen, S. Willems, and S. Baldus. 2010. 'Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation', *Nat Med*, 16: 470-4.
146. Sanders, P., J. B. Morton, N. C. Davidson, S. J. Spence, J. K. Vohra, P. B. Sparks, and J. M. Kalman. 2003. 'Electrical remodeling of the atria in congestive heart failure - Electrophysiological and electroanatomic mapping in humans', *Circulation*, 108: 1461-68.
147. Savelieva, I., and A. John Camm. 2004. 'Atrial fibrillation and heart failure: natural history and pharmacological treatment', *Europace*, 5 Suppl 1: S5-19.

148. Seccia, T. M., B. Carocchia, M. L. Muiesan, and G. P. Rossi. 2016. 'Atrial fibrillation and arterial hypertension: A common duet with dangerous consequences where the renin angiotensin-aldosterone system plays an important role', *Int J Cardiol*, 206: 71-6.
149. Sedmera, D., and F. Vostarek. 2017. '[The contemporary view of the cardiac conduction system]', *Cas Lek Cesk*, 156: 417-21.
150. Silbernagl, Stefan, Agamemnon Despopoulos, Kateřina Jandová, Miloš Langmeier, Otomar Kittnar, Eduard Kuriščák, Pavla Mlčková, Martina Nedbalová, Vladimír Riljak, and Michal Wittner. 2016. *Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání* (Grada Publishing: Praha).
151. Sims, D. E. 2000. 'Diversity within pericytes', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27: 842-6.
152. Smorodinova, N., L. Lantova, M. Blaha, V. Melenovsky, J. Hanzelka, J. Pirk, J. Kautzner, and T. Kucera. 2015. 'Biopic Study of Left and Right Atrial Interstitium in Cardiac Patients with and without Atrial Fibrillation: Interatrial but Not Rhythm-Based Differences', *Plos One*, 10.
153. Soliman, E. Z., F. Lopez, W. T. O'Neal, L. Y. Chen, L. Bengtson, Z. M. Zhang, L. Loehr, M. Cushman, and A. Alonso. 2015. 'Atrial Fibrillation and Risk of ST-Segment-Elevation Versus Non-ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study', *Circulation*, 131: 1843-50.
154. Soliman, E. Z., M. M. Safford, P. Muntner, Y. Khodneva, F. Z. Dawood, N. A. Zakai, E. L. Thacker, S. Judd, V. J. Howard, G. Howard, D. M. Herrington, and M. Cushman. 2014. 'Atrial fibrillation and the risk of myocardial infarction', *JAMA Intern Med*, 174: 107-14.
155. Sonnylal, S., S. W. Xu, P. Leoni, K. Naff, C. S. Van Pelt, H. Nakamura, A. Leask, D. Abraham, G. Bou-Gharios, and B. de Crombrughe. 2010. 'Selective Expression of Connective Tissue Growth Factor in Fibroblasts In Vivo Promotes Systemic Tissue Fibrosis', *Arthritis and Rheumatism*, 62: 1523-32.
156. Spach, M. S., J. F. Heidlage, P. C. Dolber, and R. C. Barr. 2007. 'Mechanism of origin of conduction disturbances in aging human atrial bundles: experimental and model study', *Heart Rhythm*, 4: 175-85.
157. Sperr, W. R., H. C. Bankl, G. Mundigler, G. Klappacher, K. Grossschmidt, H. Agis, P. Simon, P. Laufer, M. Imhof, T. Radaszkiewicz, D. Glogar, K. Lechner, and P. Valent. 1994. 'The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization', *Blood*, 84: 3876-84.
158. Spinale, F. G. 2007. 'Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function', *Physiological Reviews*, 87: 1285-342.
159. Staněk, V. 2020. *Kardiologie v praxi* (Axonite s.r.o., nakladatelství lékařské literatury).
160. Suma, K. 2001. 'Sunao Tawara: a father of modern cardiology', *Pacing Clin Electrophysiol*, 24: 88-96.
161. Škňouřil, Libor, and Martin Fiala. 2013. "Význam anatomie a funkce levé síně pro prognózu a intervenční léčbu." In.
162. Šmíd, Jiří, and Richard Rokyta. 2017. 'Atrial fibrillation and its relation to cardiac diseases and sudden cardiac death', *Cor et Vasa*, 59: e325-e31.
163. Šteiner, Ivo, -. 2010. *Kardiopatologie : pro patology i kardiology* (Galén: Praha).
164. Táborský, M. 2013. *Fibrilace síní: novinky v léčbě 2013* (Axonite CZ).
165. Tallquist, M. D. 2020. 'Cardiac Fibroblast Diversity', *Annu Rev Physiol*, 82: 63-78.

166. Tilton, R. G., C. Kilo, and J. R. Williamson. 1979. 'Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries', *Microvasc Res*, 18: 325-35.
167. Triposkiadis, F., A. Xanthopoulos, and J. Butler. 2019. 'Cardiovascular Aging and Heart Failure: JACC Review Topic of the Week', *J Am Coll Cardiol*, 74: 804-13.
168. Triposkiadis, F., A. Xanthopoulos, J. Parissis, J. Butler, and D. Farmakis. 2022. 'Pathogenesis of chronic heart failure: cardiovascular aging, risk factors, comorbidities, and disease modifiers', *Heart Fail Rev*, 27: 337-44.
169. Tuuminen, R., A. I. Nykanen, R. Krebs, J. Soronen, K. Pajusola, M. A. Keranen, P. K. Koskinen, K. Alitalo, and K. B. Lemstrom. 2009. 'PDGF-A, -C, and -D but not PDGF-B increase TGF-beta1 and chronic rejection in rat cardiac allografts', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 691-8.
170. Vaclavik, J. 2020. 'Blood vessel ageing and vascular memory', *Vnitr Lek*, 66: 104-10.
171. van Kooyk, Y. 2008. 'C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses', *Biochemical Society Transactions*, 36: 1478-81.
172. Varricchi, G., and G. Marone. 2020. 'Mast Cells: Fascinating but Still Elusive after 140 Years from Their Discovery', *Int J Mol Sci*, 21.
173. Verheule, S., E. Wilson, T. th Everett, S. Shanbhag, C. Golden, and J. Olgin. 2003. 'Alterations in atrial electrophysiology and tissue structure in a canine model of chronic atrial dilatation due to mitral regurgitation', *Circulation*, 107: 2615-22.
174. Vermond, R. A., I. C. Van Gelder, H. J. Crijns, and M. Rienstra. 2015. 'Does myocardial infarction beget atrial fibrillation and atrial fibrillation beget myocardial infarction?', *Circulation*, 131: 1824-6.
175. Wakili, R., N. Voigt, S. Kaab, D. Dobrev, and S. Nattel. 2011. 'Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation', *J Clin Invest*, 121: 2955-68.
176. Weber, K. T., P. Anversa, P. W. Armstrong, C. G. Brilla, J. C. Burnett, Jr., J. M. Cruickshank, R. B. Devereux, T. D. Giles, N. Korsgaard, C. V. Leier, and et al. 1992. 'Remodeling and reparation of the cardiovascular system', *J Am Coll Cardiol*, 20: 3-16.
177. Wu, L. H., R. W. Emmens, J. van Wezenbeek, W. Stooker, C. P. Allaart, A. B. A. Vonk, A. C. van Rossum, H. W. M. Niessen, and P. A. J. Krijnen. 2020. 'Atrial inflammation in different atrial fibrillation subtypes and its relation with clinical risk factors', *Clinical Research in Cardiology*, 109: 1271-81.
178. Xia, Y., M. Dobaczewski, C. Gonzalez-Quesada, W. Chen, A. Biernacka, N. Li, D. W. Lee, and N. G. Frangogiannis. 2011. 'Endogenous thrombospondin 1 protects the pressure-overloaded myocardium by modulating fibroblast phenotype and matrix metabolism', *Hypertension*, 58: 902-11.
179. Xu, J., G. G. Cui, F. Esmailian, M. Plunkett, D. Marelli, A. Ardehali, J. Odim, H. Laks, and L. Sen. 2004. 'Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation', *Circulation*, 109: 363-68.
180. Xue, J., S. V. Schmidt, J. Sander, A. Draffehn, W. Krebs, I. Quester, D. De Nardo, T. D. Gohel, M. Emde, L. Schmidleithner, H. Ganesan, A. Nino-Castro, M. R. Mallmann, L. Labzin, H. Theis, M. Kraut, M. Beyer, E. Latz, T. C. Freeman, T. Ulas, and J. L. Schultze. 2014. 'Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation', *Immunity*, 40: 274-88.
181. Yamashita, T., A. Sekiguchi, Y. K. Iwasaki, T. Date, K. Sagara, H. Tanabe, H. Suma, H. Sawada, and T. Aizawa. 2010. 'Recruitment of immune cells across atrial endocardium in human atrial fibrillation', *Circ J*, 74: 262-70.
182. Yamashita, T., A. Sekiguchi, S. Suzuki, T. Ohtsuka, K. Sagara, H. Tanabe, T. Kunihara, H. Sawada, and T. Aizawa. 2015. 'Enlargement of the left atrium is associated

- with increased infiltration of immune cells in patients with atrial fibrillation who had undergone surgery', *J Arrhythm*, 31: 78-82.
183. Zhao, J., T. D. Butters, H. Zhang, A. J. Pullan, I. J. LeGrice, G. B. Sands, and B. H. Smaill. 2012. 'An image-based model of atrial muscular architecture: effects of structural anisotropy on electrical activation', *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 5: 361-70.