

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

**Studijní program: Postgraduální doktorské studium**

**Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka**



**MUDr. Radka Kočková**

**Vliv pozitivně inotropních a antiarytmických farmak na kardiovaskulární  
systém**

**The impact of positive inotropic and antiarrhythmic drugs on cardiovascular  
system**

**Dizertační práce**

**Školitelé:**

**Prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc.**

**Prof. MUDr. David Sedmera, D.Sc.**

**Praha 2014**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V Praze, 21.12.2014

MUDr. Radka Kočková



**MUDr. Radka Kočková**

Klinika kardiologie, Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM), Praha

**Školitelé:**

**Prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc.** – II. Interní klinika – Klinika kardiologie a angiologie  
Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty UK

**Prof. MUDr. David Sedmera, D.Sc.** – Fyziologický ústav, Akademie věd ČR Praha a  
Anatomický ústav 1. lékařské fakulty UK

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu v biomedicíně, oborové rady Fyziologie a patofyziologie člověka na 1. lékařské fakultě UK v Praze.

**Předseda oborové rady:** Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

**Období zpracování dizertační práce:** školní rok 2009/2010 – 2014/2015

**Školící pracoviště:**

II. Interní klinika – Klinika kardiologie a angiologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty UK

Fyziologický ústav, Akademie věd ČR Praha

**Autor:** MUDr. Radka Kočková

**Prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc.**

**Prof. MUDr. David Sedmera, D.Sc.**

## PODĚKOVÁNÍ

V úvodu své práce bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. Aleši Linhartovi, DrSc. Jsem mu zavázána za cenné rady a podporu v oblasti klinické práce v průběhu mého doktorského studia. Možnost pracovat na II. interní klinice Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK byla velkým přínosem pro mou klinickou praxi kardiologa a současně mi vědecký potenciál pracoviště vtiskl myšlenku doktorské práce, na které jsem zde začala pracovat.

Dále bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. Davidu Sedmerovi, D.Sc. S velkou dávkou trpělivosti mně pomohl proniknout do oblasti základního výzkumu, který je nyní hlavní součástí mé dizertační práce. Ve své laboratoři ve Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR mě naučil dovednostem experimentální práce a následnému zpracování získaných dat.

Ráda bych také poděkovala svému současnému vedoucímu lékaři Prof. Josefu Kautznerovi, který projevil pochopení pro mé odborné zájmy v oblasti základního výzkumu a umožnil mi mou doktorskou práci dokončit i v rámci nového zaměstnání v IKEM Praha.

Na tomto místě musím také s vděčností vzpomenout na trpělivost, povzbuzení a velkou podporu, které se mi při mé práci dostalo ze strany rodiny, manžela Viktora a obou synů Jana i Matěje.

Tato práce vznikla částečně za podpory výzkumných grantů MSM0021620817, MSM 0021620806, MSM 0021620858, AV0Z50110509, UK 610616, SVV260087/2014, P35/LF1/5, RVO 67985823, P302/11/1308

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| PODĚKOVÁNÍ .....   | 5  |
| OBSAH .....  | 6  |
| ABSTRAKT .....   | 8  |
| SEZNAM ZKRATEK .....   | 12 |
| 1. ÚVOD .....  | 14 |
| 1.1 Srdeční arytmie v průběhu fetálního vývoje kardiovaskulárního systému .....  | 14 |
| 1.1.1 Původ a význam arytmii ve fetálním období – zkušenosti z experimentálních pokusů na zvířecích modelech .....                     | 14 |
| 1.1.1.1 Význam srdečního převodního systému pro původ arytmii .....  | 14 |
| 1.1.1.2 Převodní systém myokardu a možnosti hodnocení jeho funkce v experimentu na kuřecích embryích .....                             | 15 |
| 1.1.1.3 Význam anoxie a reoxygenace na arytmogenezi u kuřecích embryí .....  | 15 |
| 1.1.1.4 Význam ochlazení a zahřátí kuřecího embrya na výskyt arytmii .....   | 20 |
| 1.1.1.5 Význam pH pro arytmogenezi u kuřecího embrya .....   | 20 |
| 1.1.1.6 Adenylát-cyklázová kaskáda a vývoj nervového systému kuřecího embrya .....   | 20 |
| 1.1.2 Poruchy srdečního rytmu v průběhu fetálního vývoje v klinické praxi .....  | 21 |
| 1.1.2.1 Výskyt arytmii ve fetálním věku a možnosti jejich diagnostiky .....  | 21 |
| 1.1.2.2 Souvislost mezi výskytem fetálních arytmii a strukturálním onemocněním srdce .....   | 22 |
| 1.1.2.3 Druhy arytmii, které se vyskytují ve fetálním období .....   | 23 |
| 1.1.2.4 Léčba maternálních arytmii v průběhu těhotenství a její nežádoucí účinky na vývoj plodu .....                                  | 29 |
| 1.1.2.5 Možnosti akutní léčby fibrilace síní s rychlou odpovědí komor v těhotenství pomocí nitrožilního podání ibutilid fumarátu ..... | 30 |
| 1.2 Digoxin a jeho role v současné kardiologii .....   | 31 |
| 1.2.1 Digoxin a jeho potenciál pro rozvoj digoxinové toxicity .....  | 33 |
| 2. PŮVODNÍ PRÁCE .....   | 35 |
| 2.1 Embryotoxický vliv změny tepové frekvence vyvolaný podáním léků s antiarytmickým účinkem u kuřecích embryí .....                   | 35 |
| 2.1.1 Cíl .....  | 35 |
| 2.1.2 Metodika .....   | 35 |
| 2.1.2.1 Inkubace embrya a aplikací léků .....  | 35 |
| 2.1.2.2 Testování embryotoxicity .....   | 36 |
| 2.1.2.3 Ex ovo videomikroskopie .....  | 36 |
| 2.1.2.4 Použití ultrazvuku pro ex ovo vyšetřování .....  | 37 |
| 2.1.2.5 Dávky antiarytmických léků .....   | 39 |
| 2.1.2.6 Analýza beta-adrenergických receptorů .....  | 39 |
| 2.1.2.7 Statistické metody .....   | 40 |
| 2.1.3 Výsledky .....   | 40 |
| 2.1.3.1 Funkční efekt v časném embryonálním stadiu ED4 .....   | 42 |
| 2.1.3.2 Funkční efekt v embryonálním stadiu ED8 .....  | 43 |
| 2.1.3.3 Beta-adrenergní receptory v průběhu vývoje .....   | 45 |
| 2.1.4 Diskuze .....  | 46 |
| 2.1.5 Závěr .....  | 49 |
| 2.2 Adenylát-cyklázová signální kaskáda kuřecího embrya v průběhu vývoje: vliv podání antiarytmických léků .....                       | 50 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.1 Cíl .....  | 50 |
| 2.2.2 Metodika.....  | 50 |
| 2.2.2.1 Použitý materiál.....  | 50 |
| 2.2.2.2 Kultivace kuřecího embrya a aplikace testovaných látek.....  | 51 |
| 2.2.2.3 Příprava buněčných membrán .....   | 51 |
| 2.2.2.4 Hodnocení aktivity adenylát-cyklázy .....  | 51 |
| 2.2.2.5 Elektroforéza a Western blot analýza .....   | 52 |
| 2.2.3 Výsledky .....   | 52 |
| 2.2.3.1 Aktivita adenylát-cyklázy .....  | 52 |
| 2.2.3.2 Expres adenylát-cyklázy a G proteinu v průběhu vývoje.....   | 56 |
| 2.2.4 Diskuze .....  | 58 |
| 2.2.5 Závěr .....  | 60 |
| 2.3 Pětiletá retrospektivní analýza souboru pacientů dvou center s toxickou sérovou koncentrací digoxinu ..... | 61 |
| 2.3.1 Cíl .....  | 61 |
| 2.3.2 Metodika.....  | 61 |
| 2.3.3 Výsledky a diskuze .....   | 62 |
| 2.3.4 Závěr .....  | 66 |
| 2.4 Ibutilidem navozená kardioverze fibrilace síní v těhotenství.....  | 66 |
| 2.4.1 Úvod.....  | 66 |
| 2.4.2 Kazuistika 1 .....   | 67 |
| 2.4.3 Kazuistika 2 .....   | 68 |
| 2.4.4 Diskuze.....   | 69 |
| 2.4.5 Závěr .....  | 72 |
| 3. ZÁVĚR .....   | 72 |
| 4. LITERATURA.....   | 74 |
| PŘÍLOHA 1 - Identifikační záznam.....  | 86 |
| PŘÍLOHA 2 - Souhrn prací autorky .....   | 87 |
| PŘÍLOHA 3 – Kopie publikovaných prací se vztahem k tématu.....   | 89 |

## ABSTRAKT

### **Embryotoxický vliv změny tepové frekvence vyvolaný podáním léků s antiarytmickým účinkem u kuřecích embryí**

V současné době pozorujeme rychle narůstající trend potřeby kardiovaskulární farmakologické léčby u těhotných žen, avšak chybí nám však dostatečná evidence o možném nežádoucím vlivu této léčby na vyvíjející se plod. Předpokládáme, že antiarytmickými léky navozená bradykardie je hlavním mechanismem rozvoje embryotoxicity. Na modelu kuřecího embrya jsme testovali embryotoxicitu metoprololu, carvedilolu a ivabradinu a dále akutní účinky těchto léků na embryo. Používali jsme k tomu videomikroskopii a ultrazvukového vyšetření. Signifikantní embryotoxicita byla dokumentována u carvedilolu a ivabradinu. U ED4 embryí způsobil metoprolol, carvedilol a ivabradin pokles tepové frekvence o 33%, 27% a 55% ve srovnání s kontrolní skupinou (6%). U ED8 embryí byl tento efekt vyjádřen více, došlo k poklesu o 71%, 54% a 53% ve srovnání s kontrolní skupinou (36%). Srdeční výdej poklesl ve všech testovaných skupinách, ale statistické významnosti dosáhl pouze ve skupině ED8 s metoprololem. Ačkoliv počet beta-adrenergických receptorů v průběhu embryonálního vývoje klesá, negativní chronotropní odpověď na podaná farmaka s pokročilostí vývoje stoupá a vede k výraznějšímu poklesu srdečního výdeje, který je pravděpodobně hlavním mechanismem předčasného úmrtí embrya. Metoprolol je pro plod v běžných dávkách pravděpodobně bezpečný, zatímco carvedilol a ivabradin mají na plod potenciálně negativní vliv.

### **Adenylát-cyklázová signalizační kaskáda kuřecího embrya v průběhu vývoje: vliv podání antiarytmických léků**

Adenylát-cyklázová kaskáda hraje hlavní roli v regulaci srdeční kontraktility. Na modelu kuřecího embrya jsme analyzovali množství jejích komponent (adenylát-cykláza 5,  $G_{\alpha}$  a  $G_{i\alpha}$  protein), v různých stádiích embryonálního vývoje u kontrolní skupiny a po podání metoprololu a carvedilolu v ED4, ED8 nebo ED4+ED8. Aplikace farmak ve stádiu ED8 vedla k signifikantní down-regulaci adenylát-cyklázy 5 (o 40%) a také k poklesu  $G_{\alpha}$  proteinu a k poklesu aktivity adenylát-cyklázy stimulované forskolinem. Zajímavé je, že aplikace farmak mladším embryím ve stádiu ED4 neměla tak výrazný efekt na expresi adenylát-cyklázy a její aktivitu a vedla jen



k signifikantnímu nárůstu exprese  $G_{i\alpha}$  proteinu. Výsledky naší práce ukazují na silný vliv metoprololu a carvedilolu na adenylát-cyklázový systém u kuřecích embryí.

### **Pětiletá retrospektivní analýza souboru pacientů dvou center s toxickou sérovou koncentrací digoxinu**

Digoxin patří k nejstarším lékům užívaným v kardiologii především pro léčbu pokročilého srdečního selhání. Cílem práce bylo popsat charakteristiku pacientů s toxickou sérovou koncentrací digoxinu a zaměřit se na možné lékové interakce v souvislosti s mortalitou. V databázi dvou fakultních nemocnic jsme v letech 2001 až 2005 identifikovali 222 (0,2% ze všech hospitalizovaných) pacientů s toxickou sérovou hladinou digoxinu  $\geq 3,0$  nmol/l. Průměrný věk byl 78 let, 41% bylo mužů, 14% mělo kreatinin clearance  $\geq 60$  ml/min a 64% užívalo současně alespoň jeden lék se známou interakcí s digoxinem. Nemocniční mortalita byla 8%. Statisticky signifikantními prediktory mortality byly nízké hodnoty kreatinin clearance ( $P=0,01$ ) a nitrožilní aplikace digoxinu ( $P=0,02$ ). Hraniční statistická významnost byla zjištěna pro sníženou ejekční frakci levé komory ( $P=0,05$ ) a pro malou tělesnou hmotnost ( $P=0,08$ ). Současná léčba ACEI/ARB měla protektivní účinek ( $P=0,01$ ). Toxická sérová koncentrace digoxinu je v současné době relativně vzácná, ale je spojena s vysokým rizikem mortality. Typicky se vyskytuje u jedinců pokročilého věku, s malou tělesnou hmotností, s renální insuficiencí a polypragmazií. Současná léčba ACE/ARB a BB má pravděpodobně ochranných efekt.

### **Ibutilidem navozená kardioverze fibrilace síní v těhotenství**

Přestavujeme dva případy úspěšné medikamentózní kardioverze fibrilace síní u těhotných žen navozené nitrožilní infúzí ibutilid-fumarátu. U první pacientky byl později prokázán Wolff-Parkinson-White syndrom, který se v průběhu těhotenství na rozvoji fibrilace síní podílel. U druhé pacientky byla známá anamnéza hypertrofické kardiomyopatie bez obstrukce již v období před koncepcí. Ani v jednom případě nebyly zaznamenány nežádoucí účinky podané léčby na matku či plod v průběhu těhotenství a ani po porodu.

## **ABSTRACT**

### **Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo**

A significant increase in cardiovascular medication use during pregnancy has occurred in recent years but only limited evidence on its safety profile is available. We hypothesized that drug-induced bradycardia is the leading mechanism of developmental toxicity. We tested metoprolol, carvedilol, or ivabradine for embryotoxicity and their acute effect on chick embryonic model. We used video microscopy and ultrasound biomicroscopy. Significant dose-dependent mortality was achieved in embryos injected with carvedilol and ivabradine. In ED4 embryos, metoprolol, carvedilol and ivabradine reduced the heart rate by 33%, 27%, and 55%, respectively, compared to controls (6%). In ED8 embryos this effect was more pronounced with a heart rate reduction by 71%, 54%, 53%, respectively (controls 36%). Cardiac output decreased in all tested groups but only proved significant in the metoprolol group in ED8 embryos. The number of  $\beta$ -adrenergic receptors showed a downward tendency during embryonic development but a negative chronotropic effect of tested drugs was increasingly pronounced with embryonic maturity. This effect was associated with reduced cardiac output in chick embryos, probably leading to premature death. Metoprolol in usual doses appears to be relatively safe in pregnancy whereas carvedilol and ivabradine have a potentially adverse effect on the foetus.

### **Adenylyl cyclase signalling in the developing chick heart: The deranging effect of antiarrhythmic drugs**

We analysed the number of key components of myocardial adenylyl cyclase in the developing chick embryo and assessed the impact of metoprolol and carvedilol on this system. Application of these drugs at embryonic day (ED) 8 significantly downregulated (40 %) expression of adenylyl cyclase 5 level, the amount of Gs $\alpha$  protein and the activity of adenylyl cyclase stimulated by forskolin. Interestingly, when administered at ED4, these drugs did not produce such as profound changes except for markedly increased expression of Gi $\alpha$  protein. These data indicate that  $\beta$ -blocking

agents can strongly derange adenylyl cyclase signalling during the early chick embryonic heart development.

### **Five years two center retrospective analysis of patients with toxic digoxin serum concentration**

Digoxin is an old cardiovascular drug used for treatment of advanced chronic heart failure. We aimed to determine main characteristics of patients with toxic digoxin serum concentration with respect to drug interactions and mortality. Databases of two teaching hospitals were retrospectively reviewed from 2001 till 2005 and 222 (0.2% of all admissions) patients with serum digoxin level  $\geq 3.0$  nmol/ml were identified. The average age was 78 years, 41% males, 14% had creatinine clearance  $\geq 60$  ml/min, and 64% of patients were prescribed at least one medication with known digoxin interaction. Hospital mortality was 8%. Statistically significant predictors of mortality were low creatinine clearance ( $p=0.01$ ) and intravenous administration of digoxin ( $p=0.02$ ). Borderline association was between mortality and low ejection fraction of the left ventricle ( $p=0.05$ ) and with low body weight ( $p=0.08$ ). Concomitant use of ACEI/ARB was protective ( $p=0.01$ ). Toxic serum digoxin concentration is uncommon finding in modern medicine with relatively high mortality. Typical patient is an elderly with low body weight, renal insufficiency and polypragmasia. Concomitant therapy with ACEI/ARBs and beta-blocker appears to have a protective effect.

### **Ibutilide-Induced Cardioversion of Atrial Fibrillation During Pregnancy**

We present two cases of successful cardioversion of atrial fibrillation using intravenous ibutilide during pregnancy. One patient had atrial fibrillation, complicating the Wolff-Parkinson-White syndrome and the other had a history of nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy. No adverse maternal or fetal effects were observed during or after pregnancy in either case.

**Klíčová slova:** arytmie, embryonální srdce, ivabradine, signalizační kaskáda, digoxin, toxicita, embryotoxicita, teratogenicita, lékové interakce, těhotenství, beta-blokátory, bradykardie, adenylát-cykláza, G protein, ibutilid fumarate, fibrilace síní

**Key words:** arrhythmia, embryonic heart, ivabradine, signalling cascade, digoxin, toxicity, embryotoxicity, teratogenicity, drug interaction, pregnancy, beta-blocking agents, bradycardia, adenylate cyclase, G protein, ibutilide fumarate, atrial fibrillation

## SEZNAM ZKRATEK

|                      |   |
|----------------------|---|
| ACC/AHA              | American College of Cardiology a American Heart Association |
| ATP                  | Adenosintrifosfát   |
| cAMP                 | cyklický adenosinmonofosfát                                 |
| CCS                  | cardiac conduction system                                   |
| EC                   | excitation-contraction coupling                             |
| ED                   | embryonální den   |
| EF                   | ejekční frakce  |
| EKG                  | elektrokardiogram   |
| FDA                  | U.S. Food and Drug Administration                           |
| Gi                   | inhibiční podjednotka G proteinu                            |
| Gs                   | stimulační podjednotka G proteinu                           |
| HCl                  | Kyselina chlorovodíková                                     |
| HR                   | tepová frekvence  |
| I <sub>f</sub> kanál | Funny kanál   |
| NHE                  | Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> pumpa                       |
| ROS                  | reactive oxygen species (kyslíkové radikály)                |
| SMOD                 | směrodatná odchylka   |
| SV                   | tepový objem  |
| SVT                  | Supraventrikulární arytmie                                  |
| TBS                  | Tris-buffered saline  |
| TDI                  | tissue doppler imaging                                      |
| WPW                  | Wolff-Parkinson-White syndrom                               |

|                      |   |
|----------------------|---|
| ACC/AHA              | American College of Cardiology a American Heart Association |
| ATP                  | Adenosintrifosfát   |
| cAMP                 | cyklický adenosinmonofosfát                                 |
| CCS                  | cardiac conduction system                                   |
| EC                   | excitation-contraction coupling                             |
| ED                   | embryonální den   |
| EF                   | ejekční frakce  |
| EKG                  | elektrokardiogram   |
| FDA                  | U.S. Food and Drug Administration                           |
| Gi                   | inhibiční podjednotka G proteinu                            |
| Gs                   | stimulační podjednotka G proteinu                           |
| HCl                  | Kyselina chlorovodíková                                     |
| HR                   | tepová frekvence  |
| I <sub>f</sub> kanál | Funny kanál   |
| NHE                  | Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> pumpa                       |
| ROS                  | reactive oxygen species (kyslíkové radikály)                |
| SMOD                 | směrodatná odchylka   |
| SV                   | tepový objem  |
| SVT                  | Supraventrikulární arytmie                                  |
| TBS                  | Tris-buffered saline  |
| TDI                  | tissue doppler imaging                                      |
| WPW                  | Wolff-Parkinson-White syndrom                               |

## 1. ÚVOD

### 1.1 Srdeční arytmie v průběhu fetálního vývoje kardiovaskulárního systému

Srdeční arytmie se objevují v průběhu celého života jedince, ale s přibývajícím věkem roste i jejich prevalence. Jejich výskyt v období prenatálního vývoje není vysoký, avšak o to závažnější jsou důsledky, které z nich pro vývoj jedince vyplývají. V současné době stále chybí dostatek vědecky podložených informací o zdroji arytmií v období časného vývoje srdce a především informace o vlivu lékové terapie, která je užívána pro jejich léčbu v klinické praxi převážně na základě empirických zkušeností.

#### 1.1.1 Původ a význam arytmií ve fetálním období – zkušenosti z experimentálních pokusů na zvířecích modelech

##### 1.1.1.1 Význam srdečního převodního systému pro původ arytmií

V současnosti je všeobecně uznávanou skutečností, že převodní systém srdce může představovat zdroj arytmogeneze (Braunwald et al., 2001). Tato oblast byla z hlediska vývoje široce prozkoumána autory Jongbloed a kol. (Jongbloed et al., 2004) na modelu (CCS - cardiac conduction system) CCS-LacZ transgenní myši. U těchto myší lze díky genetické expresi lacZ spolehlivě identifikovat buňky CCS již ve velmi časném stádiu vývoje buněk převodního systému. To umožnilo detailní analýzu vývoje převodního systému srdce již v 9,5 – 15,5 dni embryonálního vývoje. LacZ byl detekován v oblasti sinoatriálního uzlu, v levé a pravé žilní chlopni, septum spurium, v pravém a levém atrioventrikulárním prstenci, v Hisově svazku a jeho větvení, v crista septomarginalis, v Bachmanově svazku, na zadní stěně levé síně v oblasti ústí plicních žil a v pozdějším vývoji také ve stěně plicních žil. Bylo tak jasně prokázáno, že vývoj převodního systému je vysoce komplexním dějem podléhajícím komplexní regulaci a vyžadujícím postupnou integraci buněk do funkčního systému. Alterace tohoto procesu pak může být potenciálním zdrojem arytmogeneze. Tuto hypotézu podporuje studie, která zkoumala výskyt síňové tachykardie vycházející s aorto-mitrální junkce u lidí. Její autoři prokázali přítomnost specializované vodivé tkáně ve stejné oblasti u myších embryí ve velmi časně vývojové fázi 11,5 embryonálního dne (Gonzalez et al., 2004). Zvláštní pozornost byla věnována vývoji myokardu, který je součástí plicních žil (Mommersteeg et al., 2007a) jehož původ je

v druhém srdečním poli. Oblast ústí plicních žil do levé síně je totiž velmi častým zdrojem arytmí u lidí, konkrétně se jedná o fibrilaci síní. Dosažením elektrické izolace této oblasti pomocí radiofrekvenční ablace umožňuje odstranění tohoto typu arytmií s vysokou úspěšností (Camm et al., 2012) a počet těchto výkonů v klinické praxi rychle roste.

Pro lepší porozumění podílu převodního systému srdce na arytmogenezi je nutné vzít také v úvahu mechanismy, které řídí jeho vývojovou diferenciaci (Gourdie et al., 2003). Skupině nizozemských autorů (Mommersteeg et al., 2007b) se nedávno podařilo odhalit genetickou kaskádu řídící vývoj převodního systému. Například omezení exprese homeodomain transcription faktoru *Shox2* v myokardu sinus venosus a v oblastech atrioventrikulárního uzlu a žilních chlopní vede k abnormálnímu vývoji buněk vybavených schopností buněčného pacemakeru.

#### **1.1.1.2 Převodní systém myokardu a možnosti hodnocení jeho funkce v experimentu na kuřecích embryích**

Způsob převodu elektrického vzruchu v myokardu byl velmi dobře prozkoumán na modelu kuřecího embrya *in ovo* (Van Mierop, 1967; Rajala et al., 1984; Tazawa et al., 1989; Sugiyama et al., 1996), in intaktním embryu (Paff et al., 1964), izolovaném srdci (Paff et al., 1968; Paff and Boucek, 1975; Hirota et al., 1987), na izolovaných srdečních komorách (Boucek et al., 1959; Arguello et al., 1986) a nakonec také na kulturách srdečních kardiomyocytů (Shrier and Clay, 1982). EKG kuřecích embryí umožňuje detekovat vlnu P, QRS komplex a vlnu T, což umožňuje měření PP a RR intervalu. Dále lze měřit délku atrioventrikulárního vedení na základě PR intervalu a dobu aktivace komor z intervalu QT, dále ještě délku intraventrikulárního vedení zjištěnou z QRS komplexu. Výhodou je také to, že aktivace komor probíhá typicky od srdeční báze k srdečnímu hrotu a v rané vývojové fázi není ještě vyvinut převodní systém (Gourdie et al., 2003).

#### **1.1.1.3 Význam anoxie a reoxygenace na arytmogenezi u kuřecích embryí**

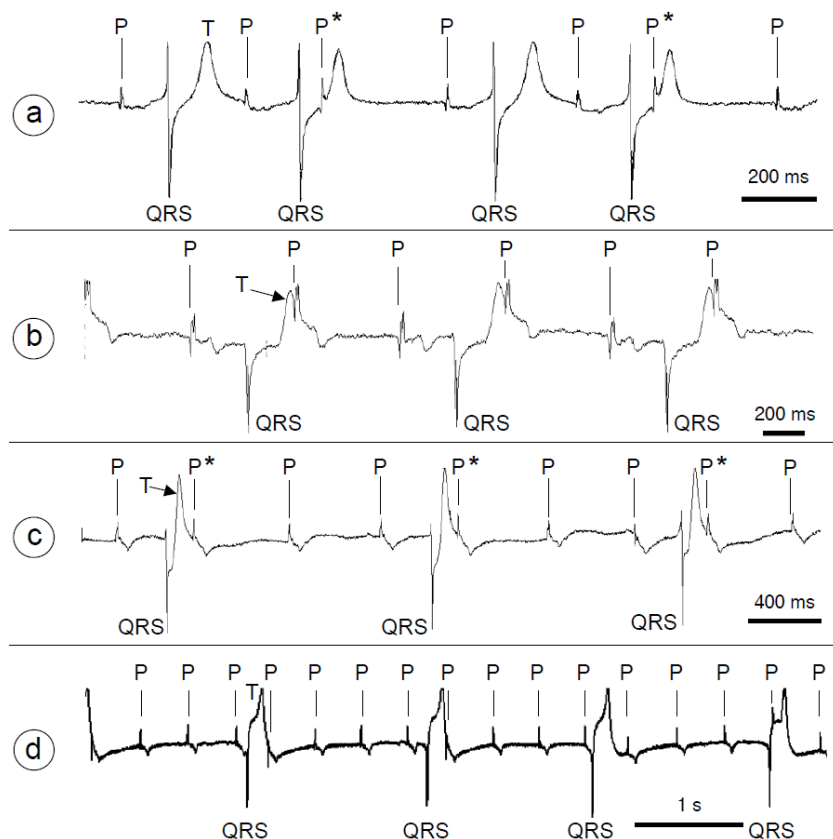
Hlavní typy arytmí pozorovaných u 4-denního kuřecího embrya vyvolané nejrůznějšími podněty (anoxie-reoxygenace, farmaka) byly nesetřvalá síňová tachykardie (tepová frekvence v rozmezí 180-300/min) a bradykardie (tepová frekvence v rozmezí 110-140/min), síňová ektopie, atrioventrikulární blokáda

1. stupně a 2. stupně (v poměru 2:1 až 8:1). Pozorován byl též Wenckebachův fenomén (Mobitz I), kompletní atrioventrikulární blokáda s náhradním komorovým rytmem a paroxysmy nepravdělné tepové frekvence následované přechodným výpadkem síňového elektrického impulzu. Tyto arytmie byly dokumentovány Sarrem a kol. (Sarre et al., 2006) a jsou zobrazeny na (Obrázek 1). Některé z těchto arytmí připomínají ty, které byly pozorovány také u lidských fétů (Strasburger and Wakai, 2010).

### Obrázek 1

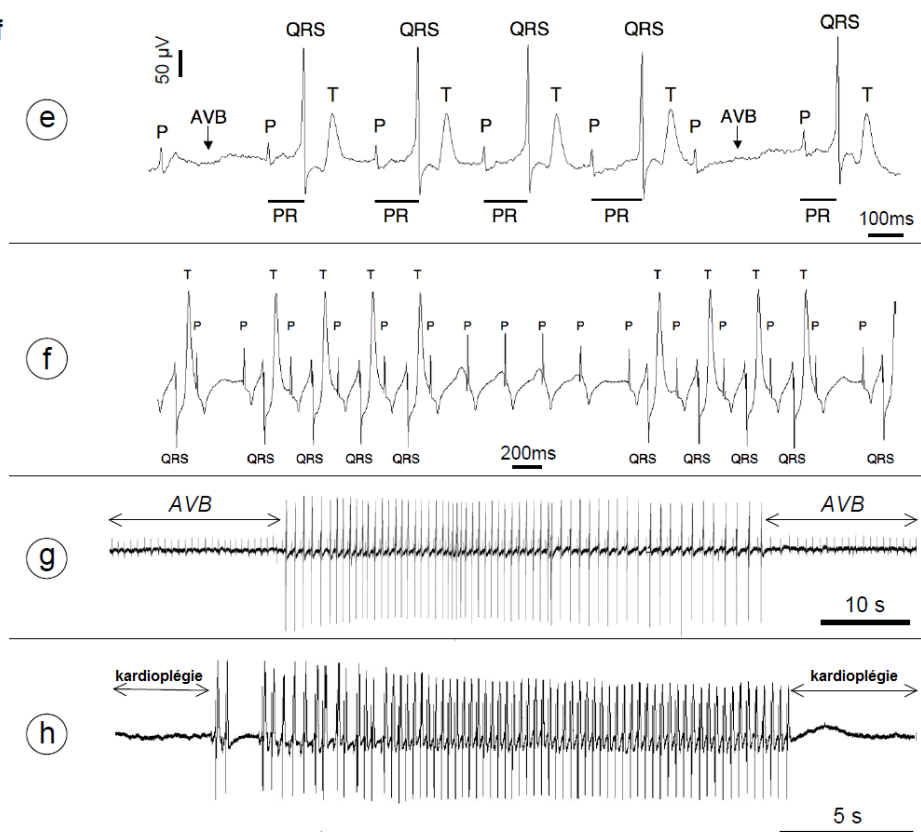
*Příklady hlavních typů arytmí pozorovaných u čtyřdenního kuřecího embrya. EKG na izolovaném srdci umožňuje zobrazit vlny P, T a QRS komplex. (a) Síňová ektopie, (b) 2:1 atrioventrikulární blokáda, (c) síňová ektopie 3:1 atrioventrikulární blokáda, (d) komorový náhradní rytmus (atrioventrikulární blokáda 3.stupně), (e) Wenckebachův fenomén (Mobitz I), (f) epizoda srdeční blokády + Wenckebach, (g) 3.stupeň atrioventrikulární blokády + paroxysmus el. aktivity a (h) intermitentní sinoatriální blokáda + paroxysmus el. aktivity. Hvězdička ukazuje na předčasnou aktivaci síní. Upraveno podle (Sedmera et al., 2014).*

Obrázek 1 a - d





Obrázek 1 e - f

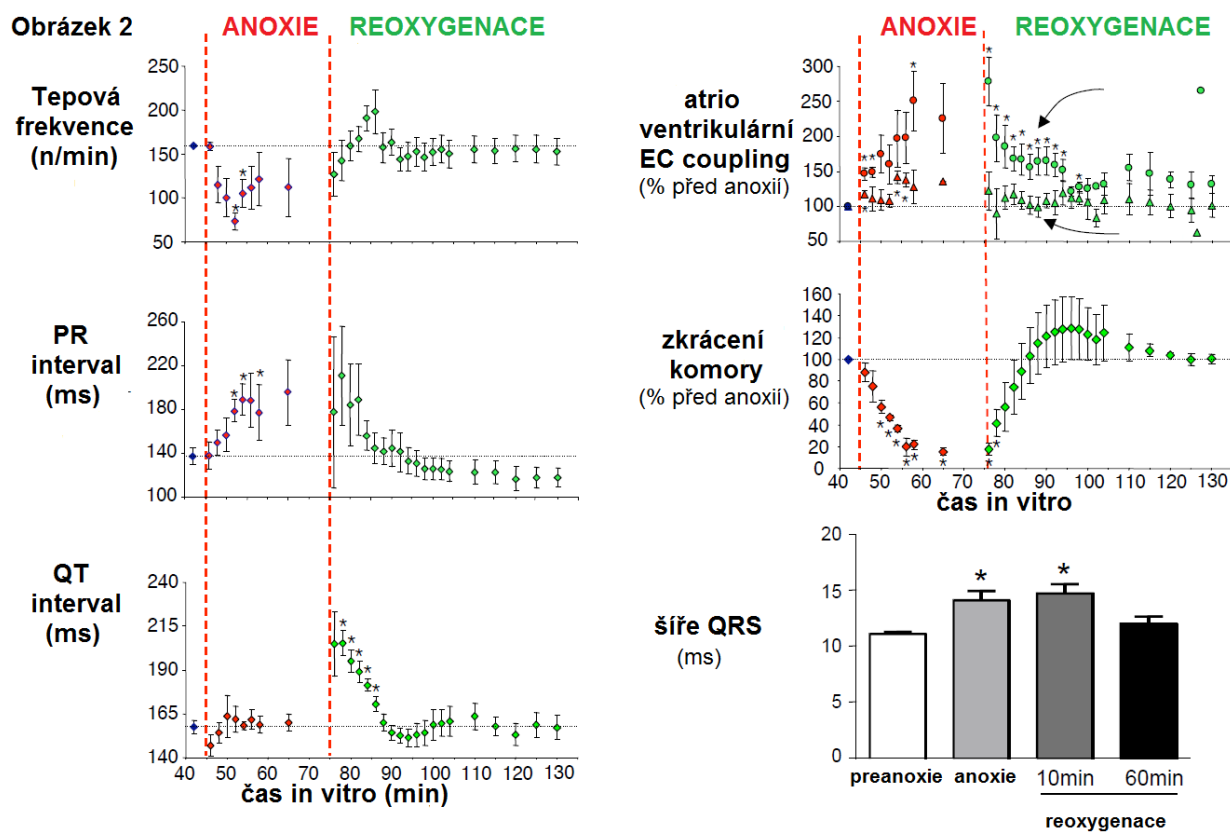


Chronotropní, dromotropní a inotropní změny vyvolané v experimentu na 4-denním kuřecím embryu (Raddatz et al., 1997; Sarre et al., 2006) a také změny v ultrastruktuře například mitochondrií a edému jádra indukovaném 30 minut trvající anoxií následované 60 minutovou reoxygenací jsou reverzibilní. Následně bylo prokázáno, že míra této reverzibility je závislá nepřímo úměrně na stáří embrya, starší embrya se projevují nižší reverzibilitou (Sedmera et al., 2002). Anoxie způsobuje bradykardii, síňovou ektopickou aktivitu, všechny stupně atrioventrikulární blokády a přechodnou sinoatriální blokádu. Reoxygenace vede k Wenckebachovu fenoménu a komorovému náhradnímu rytmu. Hned na začátku procesu reoxygenace dochází k prodloužení PR a QT intervalu a prodloužení elektro-mechanické závislosti v oblasti komor, zatímco sinoatriální vedení a elektro-mechanická závislost (excitation-contraction coupling) zůstávají neovlivněny. Snížena je také kontraktilita komor v oblasti hrotu a intra-ventrikulární vedení vzruchu je vlivem působení anoxie-reoxygenace prodlouženo (Obrázek 2). Nedochozí však ani k fibrilaci komor ani k re-entry a ani ke komorovým extrasystolám, neboť velikost embryonálního srdce neumožňuje vnik typických re-entry okruhů. V průběhu reoxygenace jsou arytmie a poruchy vedení vzruchu provázeny náhlým uvolněním kyslíkových radikálů ROS

(Sarre et al., 2005; Raddatz et al., 2011), které mohou být sníženy vlivem kyseliny askorbové jakožto známé látky s antioxidačními vlastnostmi (Obrázek 3).

### Obrázek 2

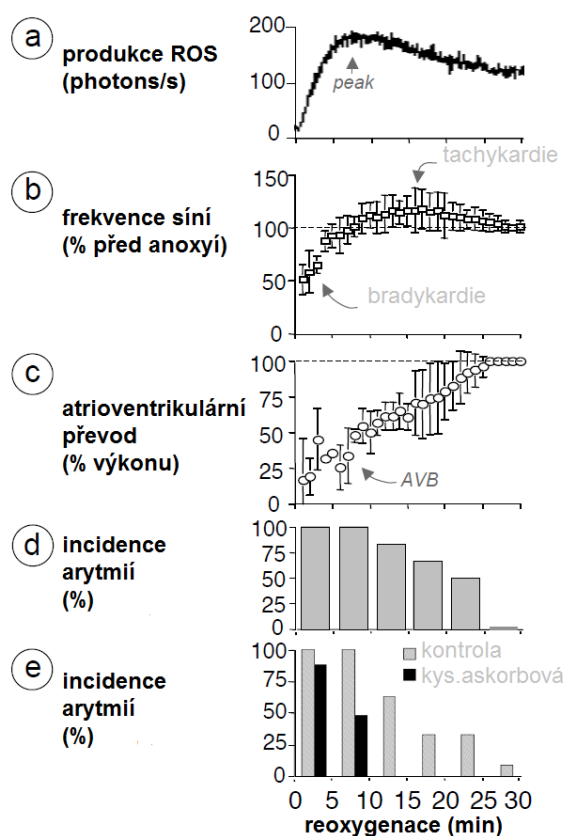
Tepová frekvence, atrioventrikulární vedení (PR interval), QT interval, síňová a komorová elektro-mechanická asociace (excitation-contraction coupling – EC), kontraktilita (apikální komorové zkrácení) a nitrokomorové vedení – QRS komplex jsou znatelně alterovány v průběhu hypoxie a reoxygenace, ale úplně se upraví za 30-40 minut. Průměr  $\pm$  SMOD;  $n=4$ ,  $n=20$  pro QRS. Upraveno podle (Sedmera et al., 2014).



## Obrázek 3

Funkční úprava 4-denního kuřecího embrya v průběhu 30 minut reoxygenace po 30 minutové anoxii. (a) typická ROS produkce prokázaná lucigenin indukovanou chemiluminiscencí vrcholící v asi 8 minutách (šipka), (b) frekvence síní vyjádřená jako procento její hodnoty před anoxií, (c) efekt atrioventrikulárního šíření vzruchu vyjádřená jako poměr délky trvání aktivity komor a síní a vyjádřeno v procentech, 100% představuje 1:1 atrioventrikulární převod, (d) nejvyšší incidence arytmií je spojena s náhlým uvolněním ROS, (e) kys. askorbová jakožto antioxidant (vitamin C, 10 mMol) snižuje incidenci arytmií. Průměr  $\pm$  SMOD; vodorovná přerušovaná čára ukazuje preanoxickou hodnotu; b a c:  $n=3$ ; d a e:  $n=6$ . Upraveno podle (Sedmera et al., 2014).

Obrázek 3



#### **1.1.1.4 Význam ochlazení a zahřátí kuřecího embrya na výskyt arytmií**

Postupné ochlazení kuřecího embrya až k hodnotám 4° Celsia na 30 minut a opětovné zahřátí k normálním hodnotám 37° Celsia za současné normoxémie je výrazně méně arytmogenní než výše zmiňovaná kombinace anoxie a reoxygenace (Sarre et al., 2006). Přeci jen však v průběhu 15. – 20. minuty procesu zahřívání, když teplota dosahuje 27 - 31° Celsia srdeční frekvence přechodně vzroste, interval PR se lehce prodlouží a délka QT intervalu se mírně zkrátí. Dá se říci, že tato teplota je zřejmě kritická pro úpravu srdečních rytmů zpět do normálních poměrů v průběhu zahřívání (Sarre et al., 2006).

#### **1.1.1.5 Význam pH pro arytmogenezi u kuřecího embrya**

Acidóza, tedy hodnoty pH v rozmezí 7,4-6,5, se může objevit v průběhu protrahované anoxie a působí negativně chronotropně, dromotropně a inotropně. Při hodnotě pH 6.5 je srdeční frekvence a rychlost převodu atrioventrikulárním uzlem výrazně snížena. Během acidózy při anoxii a následné reoxygenaci hraje zásadní roli mechanismus přesunu HCO<sub>3</sub>, který především koriguje pH. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pumpa (NHE) představuje proto ochranný mechanismus, který se uplatňuje výrazně v průběhu anoxie (Meiltz et al., 1998).

#### **1.1.1.6 Adenylát-cyklázová kaskáda a vývoj nervového systému kuřecího embrya**

Adenylát-cyklázová kaskáda hraje klíčovou roli v regulaci kontraktility myokardu. U kuřecího embrya, které představuje výborný model pro studium této kaskády, začíná vývoj sympatického nervového systému teprve asi 9. den embryonálního vývoje a plně funkční začíná být tento nervový systém asi až 16. den (Kirby, 2007). V průběhu dalšího vývoje roste počet beta-adrenergických receptorů a dospělých hodnot dosahuje až 7. den postnatálně (Higgins and Pappano, 1979). Přitom autonomními receptory řízený efektorový mechanismus je přítomen v srdci ještě před začátkem této funkční inervace. Například byla prokázána schopnost akcelerace srdeční frekvence pomocí podaného exogenního noradrenalinu již v časných stádiích kuřecího embrya (Culver and Fischman, 1977). Je zajímavé, že kuřecí embryo je již v období před vývojem inervace ovlivňováno významným množstvím katecholaminů, které jsou produkovány ve velké míře dřením nadledvin nebo sympatickými ganglii (Stewart and Kirby, 1985;

Mulder et al., 2000). Některé dříve publikované práce přinesly poznatek, že kuřecí embrya jsou v časných vývojových stádiích méně citlivá na vliv katecholaminů či naopak beta-blokátorů (Zamenhof, 1989). Přítomnost beta-adrenergních receptorů a jejich počet lze zkoumat měřením aktivity adenylát-cyklázy. Aktivované beta-adrenergní receptory následně aktivují celou adenylát-cyklázovou kaskádu cestou aktivace G proteinu. Tento kaskádový aktivační systém je zcela zásadní pro řízení kontraktility myokardu (Vatner et al., 1999; Wachter and Gilbert, 2012)

### **1.1.2 Poruchy srdečního rytmu v průběhu fetálního vývoje v klinické praxi**

#### **1.1.2.1 Výskyt arytmii ve fetálním věku a možnosti jejich diagnostiky**

Poruchy srdečního rytmu u lidského fetu jsou relativně málo časté. Z celkového počtu rutinních gynekologických kontrol těhotných žen se objevují asi v 2% (Copel et al., 2000; Jaeggi and Nii, 2005). Tvoří asi 10-20% ze všech vyžádaných specializovaných kardiologických vyšetření v prenatálním období (Srinivasan and Strasburger, 2008). Fetální elektrokardiogram (kardiotokogram) představuje velmi limitovaný způsob hodnocení arytmii vzhledem k jeho četným limitacím. Relativně novější metodou, která však zatím nedoznala velkého rozšíření, je magnetokardiografie, kterou lze již od 20. týdne těhotenství velmi spolehlivě zaznamenat srdeční akci plodu. V časnějších fázích těhotenství však bohužel není ani tato metoda dostatečně spolehlivá.

Nejrozšířenější a velmi spolehlivou metodou pro posouzení srdeční akce fetu je ultrazvuková metoda - echokardiografie. Kromě detekce vlastní arytmie umožňuje také posouzení jednotlivých příznaků srdečního selhání, které provází některé typy perzistujících arytmii ve fetálním období. Jedná se například o hydrops (pleurální a perikardiální výpotek, ascites), který lze detekovat již ve velmi časných stádiích onemocnění. Huhta a kolektiv (Huhta, 2005) vytvořili skórovací systém - "heart failure score", který je velmi užitečný k posouzení stupně srdečního selhávání v klinické praxi. Principy využití echokardiografie (B-mode, M-mode, Doppler) spočívají v možnosti detekce systolické kontrakce obou srdečních komor a jejich vzájemné časové provázanosti. Ekvivalentem vlny P na EKG (aktivace síní) je vlna A hodnocená v pulzním dopplerovském zobrazení toku přes mitrální chlopeč nebo to může být retrogradní vlna v horní duté žíle zobrazené pomocí pulzního

dopplerovského způsobu. Také pomocí metody M-modu lze velmi kvalitně posoudit kontrakci obou síní a to ve výborném časovém rozlišení. Echokardiograficky lze také hodnotit ekvivalenty QRS komplexu, kterými jsou dopplerovská proudění aortální či pulmonální chlopní. Echokardiograficky lze tedy změřit tepovou frekvenci, PQ interval a diagnostikovat celou řadu arytmií pomocí hodnocení jejich mechanické odezvy na srdečních oddílech. Nicméně zcela precizní diferenciace arytmií není s pomocí echokardiografie vždy možná. Velmi dobře lze například rozlišit supraventrikulární tachykardii s převážně 1:1 atrioventrikulárním převodem od flutteru síní, kde převažuje atrioventrikulární blokáda 2:1 a to především na základě možnosti rozpoznat frekvenci síňové kontrakce, která v případě flutteru dosahuje až hodnot 440-480/min a výsledná tepová frekvence je pak při 2:1 atrioventrikulární blokádě asi 220-240/min. Již méně snadno lze odlišit atrioventrikulární re-entry tachykardii od síňové arytmie vycházející z ektopického ložiska v síních, a to na základě zkráceného intervalu mezi kontrakcí síní a komor v případě re-entry tachykardie a spíše delšího intervalu u fokální síňové tachykardie. Pro tachykardii původem komorovou je typická naprostá disociace mezi kontrakcí síní a komor. Výjimku z tohoto pravidla představuje poměr kontrakce síní a komor 1:1 způsobený retrográdním převodem elektrického impulzu na myokard síní. Komorové arytmie jsou ve fetálním období extrémně vzácné pravděpodobně proto, že malé rozměry srdce nedovolí vznik typických re-entry okruhů, a lze tedy říci, že naprostá většina arytmií má původ v srdečních síních. Celkově lze říci, že diagnostika arytmií je v období fetálního vývoje velmi obtížná a vyžaduje velké množství zkušeností, které lze získat výlučně na vysoce specializovaných pracovištích.

#### **1.1.2.2. Souvislost mezi výskytem fetálních arytmií a strukturálním onemocněním srdce**

Vztah mezi výskytem fetálních arytmií a strukturálním onemocněním srdce stále není zcela objasněn. Například Steward a kol. ve své observační studii našel pouze 2 případy fetů z celkem 17, u kterých byla dokumentována ektopická aktivita a současně u nich bylo dokumentováno také strukturální postižení srdce. U 5 plodů s dokumentovanou tachykardií (tepová frekvence > 180/min) nebylo nalezeno žádné strukturální postižení srdce. Naopak 4 plody z celkem 8 s dokumentovanou bradykardií měly diagnostikováno těžké strukturální postižení srdce. Copel a kol. v

observační studii zahrnující celkem 614 plodů s nepravidelnostmi srdečního rytmu dokumentovali pouze 2 plody se strukturálním postižením srdce z 10 plodů, u kterých byla diagnostikována závažná forma arytmie (Stewart et al., 1983; Copel et al., 2000). V dostupné literatuře však nacházíme také práce, které poukazují na silnou korelaci mezi závažnou arytmií a strukturálním onemocněním srdce. Patří mezi ně práce Schmidt a kol. (Schmidt et al., 1991), která prezentuje soubor 55 fetů s diagnostikovanou kompletní atrioventrikulární blokádou, z nichž 53% mělo prokázanu těžkou strukturální srdeční vadu (izomerismus síní, diskordantní atrioventrikulární spojení atd.). Dalšími autory podporujícími toto tvrzení jsou Vergani et al., kteří prezentují soubor 114 plodů s prokázanými arytmiemi. U 6 plodů se jednalo o bradykardii a u 5 z nich bylo diagnostikováno strukturální onemocnění srdce. Pouze 2 ze 4 plodů s kompletním atrioventrikulární blokádou přežily (Vergani et al., 2005). V kohortě 125 plodů se závažnými arytmiemi prokázala Eronen a kol. výskyt 12 jedinců se současným těžkým strukturálním onemocněním srdce. Skupina fetů bez toho postižení srdce přežívala v 95%, zatímco ve skupině se současným strukturálním postižením srdce a arytmií byla mortalita 75%. Ve skupině plodů, které měly pouze strukturální onemocnění srdce bez arytmie, byla mortalita také vysoká – 67% (Eronen, 1997). Na základě těchto observačních studií lze předpokládat, že jsou bradyarytmie častěji asociovány se závažnými strukturálními srdečními vadami a prognóza těchto jedinců je významně horší. Naopak u jedinců s výskytem tachyarytmií či extrasystolií je prognóza výrazně lepší. Tyto typy arytmií lze snáze léčit a některé z nich mohou i spontánně vymizet ještě prenatálně či krátce po porodu.

### **1.1.2.3 Druhy arytmií, které se vyskytují ve fetálním období**

Mírně zjednodušeně můžeme fetální arytmie rozdělit na tři základní skupiny: ektopickou elektrickou aktivitu, která má nejčastěji původ v síních, tachyarytmie definované jako tepová frekvence přesahující hodnoty 180/min a bradyarytmie s tepovou frekvencí klesající pod hodnoty 110/min (Jaeggi and Nii, 2005). Z uvedených tří typů arytmií lze za relativně bezpečnou formu označit ektopickou aktivitu (Reed, 1989; Vergani et al., 2005). Vergani a kol. ve své observační studii uvádí, že u 87 plodů s extrasystolickou aktivitou došlo k úplné úpravě srdečního rytmu ve 38% ještě prenatálně a u další 49% se stav upravil v časném poporodním

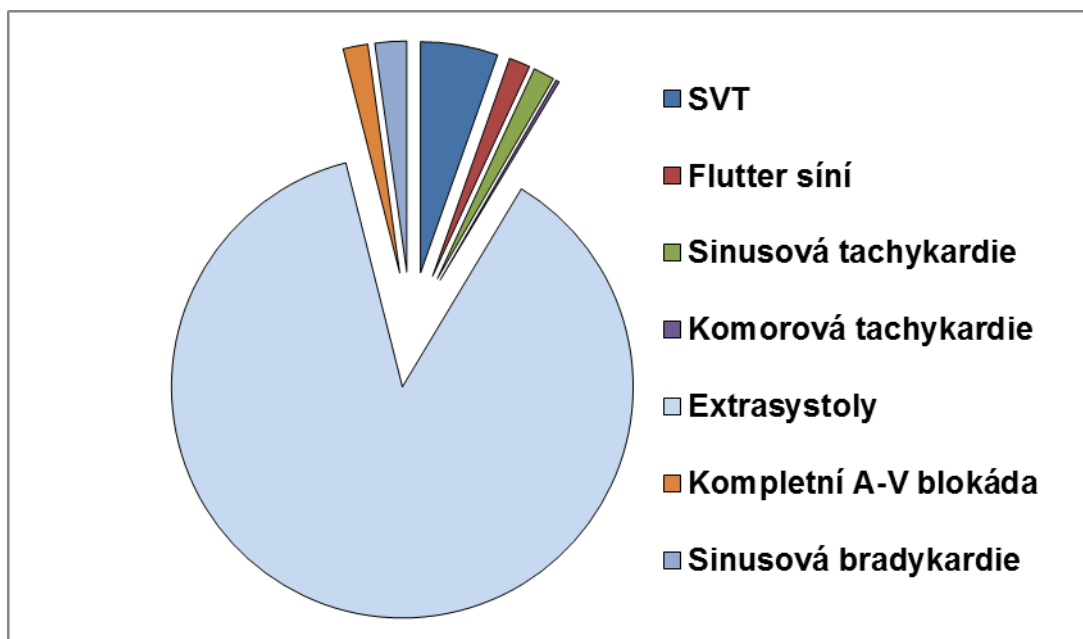
období. Navíc převážná většina jedinců nevyžadovala medikamentózní či jinou terapii. Pouze v jednom případě byla po porodu započata medikamentózní terapie a u 9 jedinců s přetrvávající arytmií do postnatálního období nebyla indikována žádná léčba. Celkem u dvou plodů došlo prenatalně k rozvoji supraventrikulární tachykardie, která byla ještě *in utero* léčena farmakologicky a nevedla k žádné prokazatelné poruše jejich normálního vývoje a nebyla u nich dokumentována ani současná strukturální srdeční vada.

Setrvalá a dlouho trvající bradykardie či tachykardie představují často klinicky závažné arytmie, které mohou mít negativní vliv na další vývoj plodu a jejich negativní efekt může přetrvávat i v poporodním období. V práci Jaeggiho a kol. je uvedena fetální tachykardie z klinicky závažných arytmií v tomto vývojovém období jako nejčastější. Z celkového počtu 66 plodů se signifikantní arytmií byla dokumentována u 57% z nich. Z toho 40% bylo představováno supraventrikulární arytmií, u 11% se jednalo o flutter síní a u 6% o sinusovou tachykardii (Jaeggi and Nii, 2005). Dlouhodobá setrvalá tachykardie je vážný klinický stav, který u plodu vede často k rozvoji hydropsu a někdy dokonce i k úmrtí plodu. Například Simpson a kol. zaznamenali v observační studii u 127 plodů s diagnostikovou tachykardií výskyt hydropsu až u 41% jedinců. Ostatních 75 plodů, u kterých hydrops nebyl zjištěn, reagovalo velmi dobře na transplacentární léčbu převážně digoxinem a bylo dokumentováno jejich výborné přežití až v 96%. Oproti tomu u hydropických plodů došlo k příznivé odpovědi na transplacentální lébu jen u 66% a pouze 73% plodů přežilo až do porodu (Simpson and Sharland, 1998).



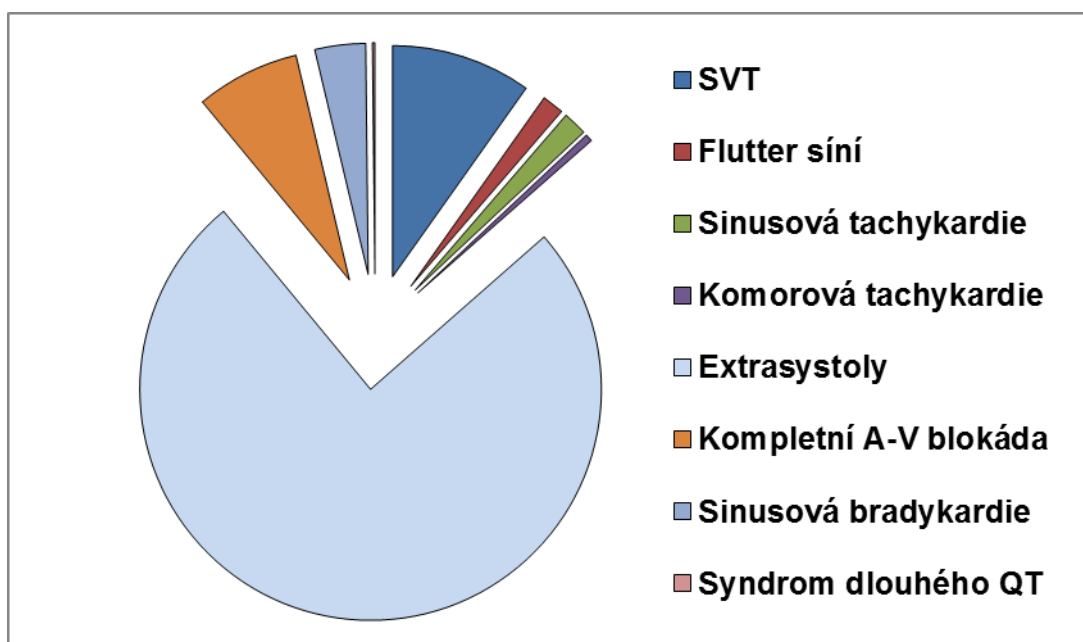
Obrázek 4

Výskyt arytmii v průběhu prenatální vývoje v neselektované populaci. Upraveno podle (Sedmera et al., 2014).



Obrázek 5

Výskyt arytmii v průběhu prenatální vývoje v selektované populaci. Upraveno podle (Sedmera et al., 2014).



#### **1.1.2.3.1 Tachyarytmie ve fetálním období**

Jak již bylo výše řečeno, fetální tachyarytmie jsou nejčastější klinicky významné arytmie v období prenatálního vývoje (Obrázek 4,5). K nejčastěji diagnostikovaným arytmiím tohoto typu patří supraventrikulární arytmie: atrioventrikulární re-entry tachykardie, permanentní junkční reciproční tachykardie a síňová ektopická tachykardie. Na druhém místě z hlediska prevalence je flutter síní, který má původ v makro re-entry okruhu lokalizovaném v srdečních síních. Definitivní diagnózu lze nejlépe stanovit až po narození v těch případech, kdy arytmie přetrvává, nebo když se objeví znovu. EKG umožní například detekci vlny delta, která je typická pro akcesorní převodní spojku síní a komor.

Léčebná strategie se u tohoto typu arytmie opírá především o transplacentární přenos převážně digoxinu u plodů, kde ještě nedošlo k rozvoji hydroopsu. Sotalol, flecainid či amiodaron jsou většinou rezervovány jen pro případy léčby plodů s již rozvinutým hydropsem a nebo jsou indikovány u případů rezistentních tachyarytmií. V případě tachyarytmií, které jsou sekundárním projevem jiného onemocnění, jako je například fetální thyreotoxikóza, anémie či stresová situace plodu atd., je často možná kauzální léčba základního onemocnění, které vede k ústupu arytmie. V takových situacích se zpravidla jedná o čistou sinusovou tachykardii s typickou tepovou frekvencí 180-200/min.

#### **1.1.2.3.2 Bradyarytmie ve fetálním období**

Setrvalá bradykardie dlouhého trvání je podle dostupných pramenů jen o něco méně častá než je tomu u tachykardií. (Obrázek 4,5) V již dříve zmíněném souboru Jaeggiho je udáván její výskyt 43% (Jaeggi and Nii, 2005). Kompletní atrioventrikulární blokáda byla v jeho souboru zastoupena v 38% a pouhých 5% bylo představováno jedinci se sinusovou bradykardií. Možnosti léčby fetální bradykardie jsou velmi omezeny. Jednou z možností je léčba matky vyššími dávkami preparátů, které mají beta-adrenergní stimulační vliv. Tato léčba je však provázena řadou nežádoucích účinků pro mateřský organismus. V literatuře lze nalézt extrémní a jednotlivé případy implantace dočasné kardiostimulace plodu, jejichž výsledek není vždy příznivý a je provázen řadou komplikací (Eghtesady et al., 2011).

V případech, kdy je příčinou rozvoje kompletní atrioventrikulární blokády transplacentární přenos mateřských autoprotilátek, může být indikována léčba kortikosteroidy či imunosupresivní terapií.

Při vyšetření pro podezření na fetální bradykardii musí být vyloučena možnost prosté supraventrikulární bigeminie či trigeminie s atrioventrikulární blokádou. Hlavní známkou této entity bude nepravidelná tepová frekvence a rychlejší kontrakce síní než komor. Prognóza supraventrikulární bigeminie a trigeminie je velmi dobrá a zpravidla nevyžaduje léčbu.

Sinusová bradykardie s 1:1 atrioventrikulárním převodem a s pomalou frekvencí kontrakce síní (méně než 100/min) může být způsobena fetálním stresem například v průběhu epizod hypoxie či redistribuce krve, kdy jsou mozek a srdce zásobeny krví preferenčně. Sinusová bradykardie může být také manifestací syndromu dlouhého QT a všichni novorozenci jejichž tepová frekvence odpovídá  $\leq 3$  percentilu by měli být v tomto smyslu vyšetřeni časně po narození (Mitchell et al., 2012). Spíše vzácně může být sinusová bradykardie manifestací skutečné dysfunkce sinusového uzlu.

#### **1.1.2.3.3 Atrioventrikulární blokáda ve fetálním období**

Atrioventrikulární blokáda 1. stupně je charakterizována izolovaným prodloužením atrioventrikulárního vedení, ale kontrakce síní a komor zůstává v poměru 1:1. Při hodnocení délky atrioventrikulárního intervalu je nezbytné si uvědomit, že se jeho délka v průběhu prenatálního vývoje postupně mění a to ve smyslu jeho prodlužování. Normální hodnoty pro délku atrioventrikulárního převodu ve 30-34 týdnu těhotenství jsou  $122,7 \pm 11,1$  ms měřeno echokardiograficky pomocí dopplerovské modality v oblasti vtokové a výtokové části srdečního komory,  $116,5 \pm 8,8$  ms měřeno dopplerovsky v horní duté žíle a v aortě a nakonec  $142,4 \pm 14,2$  při měření kontrakce síně a komory pomocí Tissue Doppler Imaging (TDI) metody (Nii et al., 2006).

U blokády atrioventrikulárního vedení 2. stupně rozlišujeme Wenckebachovu blokádu neboli Mobitz I a dalším typem je Mobitz II blokáda atrioventrikulárního vedení. Pro Mobitz I je typické postupné prodlužování atrioventrikulárního intervalu až dojde k úplnému nepřevedení eklektického impulzu na komory a chybí tedy jejich kontrakce. Mobitz typ II představuje pokročilejší formu blokády vedení atrioventrikulárním uzlem. Převodní interval se nemění, ale dochází náhle k úplnému výpadku vedení, kdy zcela chybí kontrakce komor. Tento výpadek se může objevovat v pravidelných intervalech a pak hovoříme o atrioventrikulární blokádě Mobitz II například 2:1. Atrioventrikulární blokáda třetího stupně neboli kompletní atrioventrikulární blokáda představuje zpravidla závažnou poruchu srdečního rytmu, pro kterou je typická úplná nezávislost kontrakce síní a komor. Atrioventrikulární

blokáda 3. stupně vede zpravidla k dlouhodobé bradykardii, která má za následek rozvoj srdečního selhání s projevy hydroksu plodu a velmi často vede k jeho úmrtí. Srdeční frekvence je totiž v období embryonálního a fetálního vývoje klíčovým faktorem pro udržení stálého srdečního výdeje (Dunnigan et al., 1987). Kompenzační vliv lepší kontraktility při zvýšené náplni srdečních komor, známý jako Frankův-Starlingův zákon, je v počátečních vývojových stádiích limitován převažující trabekulizací srdečních komor s jen malou tloušťkou kompaktního myokardu. Komora se tedy nemůže naplnit natolik, aby dostatečně zvýšila srdeční výdej (Sedmera, 2011).

#### **1.1.2.3.4 Kompletní atrioventrikulární blokáda ve fetálním období**

Nejčastější bradyarytmií fetálního věku je úplná atrioventrikulární blokáda, která se objevuje často v souvislosti s těžkým strukturálním onemocněním srdce. Další dobře popsanou příčinou rozvoje kompletní blokády vedení jsou cirkulující mateřské autoprotilátky, které prostupují transplacentálně do krevního oběhu plodu. Nejčastěji je tento nález asociován s autoimunitním onemocněním matky typu lupus erythematosus, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida či neklasifikované systémové revmatoidní onemocnění. Zvýšené hladiny protilátek Ro/SSA a anti – La/SSB jsou v těchto případech v séru postižených matek identifikovány. Riziko rozvoje kompletní atrioventrikulární blokády u plodů těchto žen s pozitivitou anti-Ro/SSA protilátek je asi 2% (Brucato et al., 2001). Přítomnost uvedených autoprotilátek v cirkulaci plodu vede k zánětu v myokardu preferenčně v oblasti atrioventrikulárního uzlu a způsobuje tím rozvoj různě pokročilé atrioventrikulární blokády, která se nejčastěji projevuje v období 20-24 týdne těhotenství. Autoprotilátky mohou však způsobovat také rozvoj velmi těžké kardiomyopatie, tzv. endomyokardiální fibrózy, která se může projevit již prenatálně či krátce po porodu. Jak již bylo dříve řečeno, atrioventrikulární blokáda u plodu je provázena významně zvýšenou mortalitou. Proto je těhotným ženám dlouhodobě sledovaným pro autoimunitní onemocnění věnována velká pozornost a k pravidelným vyšetřením patří kontrolní odběry krve ke stanovení hladiny Ro/SSA, anti – La/SSB. V případě jejich zvýšené hladiny je na některých pracovištích indikována léčba kortikosteroidními preparáty či imunosupresivní terapie. Názory odborníků na tuto agresivní farmakologickou léčbu se liší, neexistují randomizovaná data z klinických studií, ale jsou dobře známy vedlejší účinky této léčby, ke kterým patří oligohydramnion, snížená funkce nadledvin u plodu, růstová retardace, atd.

(Huang et al., 1999; Kerzner et al., 2002). Některá pracoviště doporučují zahájit léčbu kortikosteroidy až v případě rozvoje pokročilé srdeční blokády s protrahovanou bradykardií, která zvyšuje riziko rozvoje hydropsu plodu. Podle tvrzení Jaeggiho nález izolovaného prodloužení atrioventrikulárního vedení progreduje do srdeční blokády u těhotných žen s pozitivitou protilátek Ro/SSA, anti – La/SSB jen zřídka a paušální léčba kortikosteroidy proto není indikována (Jaeggi et al., 2011).

#### **1.1.2.4 Léčba maternálních arytmií v průběhu těhotenství a její nežádoucí účinky na vývoj plodu**

Pokrok v oblasti dětské chirurgie srdce v posledních desetiletích dokázal nejen zásadním způsobem snížit mortalitu dětských pacientů s komplexními vrozenými vadami, ale umožnil také zlepšit kvalitu jejich života. Oproti dřívější zkušenosti, kdy bylo těhotenství u žen s vrozenou vadou srdce kontraindikováno, přibývá těhotných žen, které mají anamnézu operace srdce většinou v raném dětství. Avšak i po zcela úspěšných chirurgických výkonech zůstávají v srdečních oddílech četná jizvení, která jsou potenciálním zdrojem arytmií (Balaji and Harris, 2002). Těhotenství samotné, i jakožto zcela fyziologický stav, snižuje vlivem hormonálních, metabolických a hemodynamických změn práh pro rozvoj arytmií (Ferrero et al., 2004). Dalším faktorem vedoucím k nárůstu počtu žen léčených v průběhu těhotenství je jejich narůstající průměrný věk, který je spojen s vyšší pravděpodobností výskytu přidružených onemocnění, jejichž léčba musí pokračovat i v průběhu těhotenství. Toto jsou skutečnosti, které vedou k relativně rychlému nárůstu počtu žen, které v průběhu těhotenství užívají antiarytmickou či antihypertenzní medikaci. Vzhledem k potenciálně negativním účinkům těchto léků na vyvíjející se plod je logické a žádoucí se této otázce věnovat a zkoumat vliv antiarytmické léčby na vyvíjející se plod ať již v experimentu či v observačních klinických studiích.

Účinky antiarytmické léčby na vyvíjející se plod jsou často odlišné od účinků na dospělý organismus. Některá antiarytmika jako amiodaron či atenolol jsou pro plod vyslovené toxická a jejich užití v průběhu těhotenství je kontraindikováno (Kategorie U.S. FDA D – Existuje evidence rizika) (Joglar and Page, 2001). Můžeme se však setkat také s nižším efektem léku na nezralý plod, jehož receptory řízená signalizační kaskáda není ještě dostatečně vyztáhlá, a to i při běžných lékových koncentracích v mateřském organismu. U celé řady léků však čelíme nedostatku informací o jejich

vlivu na vyvíjecí se organismus plodu a v takových případech jsou klinická doporučení pro podávání léku v průběhu těhotenství velmi vágní a tyto léky řadí do kategorie C U.S. FDA (Nedostatek studií u těhotných žen a výzkum na zvířecím modelu buď prokazuje toxicitu anebo také chybí). Takové léky mohou být podle doporučení užity pouze tehdy, jestliže příznivý účinek na mateřský organismus převáží míru rizika pro plod (Joglar and Page, 2001). Nedá se tedy říci, že zařazení převážné většiny léků do kategorie C přináší úlevu do klinické praxe, ale spíše dohady a značnou míru nejistoty. Jen několik antiarytmických léků je zařazeno do kategorie U.S. FDA B (Neexistuje prokazatelné riziko pro těhotné ženy). K těmto lékům patří lidokain a sotalol (Ferrero et al., 2004).

Toxicita katecholaminů a farmak způsobujících blokádu beta-adrenergických receptorů byla studována na kuřecích embryích. Závěry těchto prací ostře kontrastují s výsledky testování řady jiných léků, které mají často silně teratogenní účinky. Ukázalo se totiž, že v časně fázi embryonálního vývoje existuje výrazná rezistence k účinkům obou těchto látek, ať již k beta-stimulačním účinkům nebo k beta-inhibičním účinkům (Zamenhof, 1989). Práce Ošťádal a kol. představuje vzhled do patogeneze katecholaminy indukované kardiomyopatie u kuřecího embrya (Ostadal et al., 1976; Ostadal et al., 1982; Ostadal et al., 1987; Ostadal et al., 1995). Mnohem méně jsou však již známé účinky beta-blokátorů a není ani znám mechanismus, který vede k úmrtí embryí vystavených těmto látkám. Z provedených studií vyplývá, že toxicita beta-blokátorů roste s pokročilostí vývoje embrya. Lze proto předpokládat, že svým účinkem beta-blokátory ovlivňují především funkci kardiovaskulárního systému namísto přímého vlivu na rozvoj malformací, které by nebyly slučitelné s dalším životem embryí.

#### **1.1.2.5 Možnosti akutní léčby fibrilace síní s rychlou odpovědí komor v těhotenství pomocí nitrožilního podání ibutilid fumarátu**

Incidence fibrilace síní u těhotných žen není vysoká, ale stoupá u žen se strukturálním onemocněním srdce. Přesto však představuje závažný problém a terapeutické dilema, neboť v průběhu gravidity je nutné dbát nejen o matku ale také o bezpečnost plodu. Standardní léčbou persistující fibrilace síní v dospělé populaci je farmakologicky či elektricky navozená verze na sinusový rytmus. Jedná se o relativně bezpečné výkony pro těhotnou ženu, ale obě metody představují riziko pro plod.

Většina léků užívaných pro farmakologickou verzi je ve skupině U.S.FDA C (ibutilid, flecainid, propafenon) a často užívaný amiodaron je dokonce ve skupině U.S.FDA D. To znamená, že vliv těchto léků na plod je spíše nežádoucí nebo v časných fázích těhotenství dokonce teratogenní. Elektrická kardioverze zase vyžaduje elektrický výboj a je prováděna výhradně v silné analgosedaci.

Za těchto okolností se jednorázové použití antiarytmika ibutilid fumarátu k verzi fibrilace či flutteru síní u těhotné ženy jeví jako racionální varianta. Ibutilid fumarát patří do III. skupiny antiarytmických přípravků a od roku 1995 ho U.S.FDA označuje za lék indikovaný k ukončení krátce trvající fibrilace či flutteru síní. Prodlužuje trvání akčního potenciálu a také refrakterní fázi v srdečních síních a komorách, v atrioventrikulárním uzlu a v převodním Hisově svazku i Purkyňových vlákních (Murray, 1998). Velmi výhodný je tento preparát pro ukončení fibrilace či flutteru síní u pacientů s akcesorní převodní spojkou – Wolf-Parkinson-White syndrom. Jeho velkou výhodou, která se uplatňuje právě v období těhotenství, je jeho velmi krátký poločas 2-4 hodin. Dostupná data z experimentu na embryích potkana sice hovoří v jeho neprospěch vzhledem k výskytu teratogenních účinků na tato embrya, které jsou nejspíše důsledkem farmakologicky navozené bradykardie a následné hypoxémie embryí (Marks and Terry, 1996; Danielsson et al., 2001). Musíme však vzít v úvahu, že se jednalo o protražovaný efekt ibutilid fumarátu, který byl navíc podáván v minimálně čtyřikrát vyšší dávce, než je tomu v klinické praxi. Protože je ibutilid fumarát pro účely verze na sinusový rytmus podáván v jedné či maximálně dvou 10-ti minutových nitrožilně podaných infúzích, a jeho poločas je velmi krátký, lze ho nejspíše uvážit jako jednu z možných léčebných strategií při léčbě fibrilace či flutteru síní u těhotných žen.

## **1.2 Digoxin a jeho role v současné kardiologii**

Digoxin je nejstarším lékem užívaným v interní medicíně a v kardiologii, a to již více než 200 let především pro léčbu srdečního selhání. Srdeční selhání nastává, když nějaká porucha srdeční funkce způsobí, že srdce není schopno zabezpečit takový výdej krve, aby byly pokryty nároky tkáňového metabolismu nebo když je schopno to činit pouze za cenu zvýšeného plnicího tlaku. Srdeční selhání se rozvíjí buď náhle, a potom ho označujeme za akutní srdeční selhání, či pozvolně v průběhu měsíců a pak

ho označujeme za chronické srdeční selhání. V obou případech je způsobeno poruchou funkce jednotlivých srdečních oddílů. Nejlépe popsanou příčinou je snížení systolické funkce levé srdeční komory, kterou vyjadřujeme ejekční frakcí levé komory (EF). Hodnoty < 50% již představují snížení systolické funkce. Další velkou podskupinu nemocných tvoří pacienti s tzv. srdečním selháním se zachovalou systolickou funkcí levé komory, kdy ejekční frakce zůstává v mezích normy (EF zpravidla nad 50%), avšak alterováno je plnění komor. V literatuře je tato forma nazývána také diastolickým srdečním selháním (Owan et al., 2006; Kuznetsova et al., 2009). Je způsobeno poruchou plnění levé komory v diastolické fázi srdeční revoluce. V praxi se velmi často setkáváme s případy, kdy se známky systolické i diastolické dysfunkce vyskytují současně.

Mezi nejčastější příčiny vedoucí k rozvoji dysfunkce levé komory patří ischemická choroba srdeční, arteriální hypertenze, chlopenní vady, skupina dilatačních kardiomyopatií a jiné vzácnější příčiny.

Prevalence srdečního selhání v populaci je udávána 1-3% a stoupá s přibývajícím věkem. Například v práci Rotterdamských autorů byla prevalence srdečního selhání 3,9% v celé kohortě. U jedinců ve věku 55 až 64 let byla prevalence srdečního selhání 1% a u jedinců starších 85 let se jednalo dokonce až o prevalenci 10% (Mosterd et al., 1999). Prognóza pacientů se srdečním selháním souvisí samozřejmě s pokročilostí onemocnění, ale ve všech případech není příznivá. Je doložen jednoznačně vzestupný trend mortality v závislosti na délce trvání srdečního selhání od stanovení diagnózy. Například podle Framingham Heart Study byla 30-denní mortalita od stanovení diagnózy asi 10%, jednoletá mortalita 20-30% a pětiletá mortalita dosahovala hodnot 45-60% (Levy et al., 2002).

Jak již bylo výše zmíněno, srdeční selhání se může rozvíjet či dekompenzovat náhle. V nejtěžších případech může docházet až k rozvoji kardiogenního šoku, který je zatížen vysokou mortalitou. Význam podávání digoxinu v průběhu akutního srdečního selhání spočívá v jeho bradykardizujícím účinku, který není provázen negativně inotropním efektem jako je tomu u léků ze skupiny beta-blokátorů či inhibitorů vápníkového kanálu, a nezpůsobuje ani pokles krevního tlaku. Digoxin má dokonce lehce pozitivně inotropní účinek, to znamená, že zlepšuje kontraktilitu srdečních komor. Proto je vhodný například u pacientů s persistující fibrilací síní s nepřiměřeně rychlou odpovědí komor. Při vysoké tepové frekvenci dochází ke



zkrácení délky plnění selhávající srdeční komory, což ještě dále zhoršuje jejich funkci a může vést k dalšímu prohlubování srdečního selhání.

Nejčastěji je však digoxin užíván u pacientů s chronickou formou srdečního selhání. Podle doporučení Evropské kardiologické společnosti pro diagnostiku a léčbu akutního a chronického srdečního selhání je digoxin v perorálním podání doporučován pro léčbu pacientů se symptomatickým srdečním selháním a s ejekční frakcí levé komory  $\leq 40\%$  či pro symptomatické pacienty s permanentní fibrilací síní s rychlejší odpovědí komor při již zavedené léčbě beta-blokátory (McMurray et al., 2012a). V některých případech může být přidán k chronické léčbě beta-blokátory také u pacientů s permanentní fibrilací síní i bez současné diagnózy srdečního selhání pro dosažení optimální klidové odpovědi srdečních komor.

Digoxin má sice jen slabě pozitivně inotropní účinek, avšak napomáhá také zlepšení plnění levé srdeční komory svým bradykardizujícím účinkem především u fibrilace síní. Digoxin také snižuje abnormálně zvýšenou aktivaci sympatického nervového systému u pacientů s chronickým srdečním selháním. (Opie, 2005)

K farmakokinetickým účinkům digoxinu lze říci, že sérový poločas digoxinu je 36 hodin. Z celkového množství 75% vstřebeného digoxinu z gastrointestinálního traktu (zbytek je inaktivován střevní mikroflórou na neaktivní metabolit dyhydrodigoxin) je asi 70% vyloučeno ledvinami většinou v nezměněné formě. Dalších asi 30% digoxinu je vyloučeno ve stolici nebo je metabolizováno v játrech. Asi polovina účinného digoxinu je v těle vázána na bílkovinu kosterního svalstva. (Opie, 2005)

Z těchto údajů vyplývá, že především pacienti s renální insuficiencí a sníženou svalovou hmotností budou náchylnější k rozvoji digoxinové toxicity.

### **1.2.1 Digoxin a jeho potenciál pro rozvoj digoxinové toxicity**

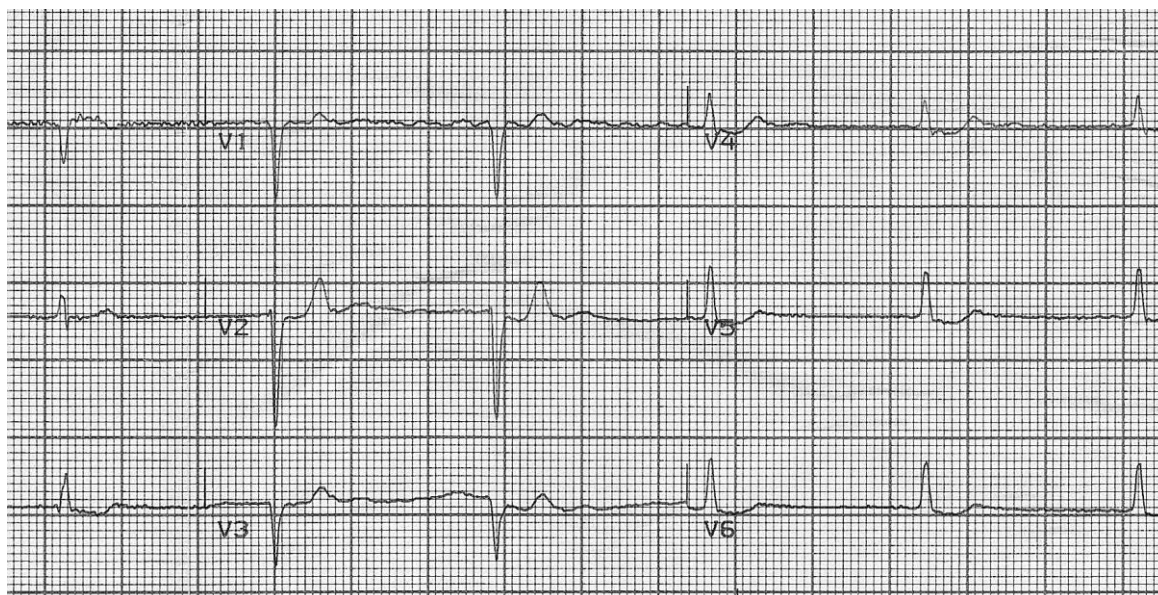
Hlavní nevýhodou digoxinu je nutnost udržení velmi úzkého terapeutického rozmezí sérových hodnot tak, aby byl účinek léku dostatečný a současně nedošlo k rozvoji digoxinové toxicity. Evropská kardiologická společnost doporučuje sérovou hladinu digoxinu v rozmezí 0,8 – 1,5 nmol/l (0,6 – 1,2 ng/ml) jako optimální pro léčbu chronického srdečního selhání (Pfister and Schneider, 2009). Jim odpovídající doporučení American College of Cardiology a American Heart Association (ACC/AHA) doporučují jako optimální sérovou hladinu digoxinu v rozmezí 0,64 – 1,2

nmol/l (0,5 – 0,9 ng/ml) (Hunt, 2005). Sérová hladina digoxinu překračující hodnotu  $\geq 3,0$  nmol/l (2,5 ng/ml) je již považována za toxickou.

Na základě farmakokinetických vlastností digoxinu, které jsou uvedeny v předchozí kapitole, lze říci, že pacienti s renální insuficiencí a sníženou svalovou hmotností budou potenciálně náchylnější k rozvoji digoxinové toxicity. K jejím projevům patří klinické známky, jako jsou gastrointestinální obtíže, poruchy visu, známky postižení centrálního nervového systému, které mohou vyústit až ve zmatenost a bezvědomí. Dalšími projevy, které mohou a nemusí být symptomatické, jsou nejrůznější formy arytmií od blokády sinusového uzlu a atrioventrikulárního uzlu (díky excesivní vagové stimulací vedoucí k bradykardii), až po zvýšenou komorovou automacii. Ta se může projevovat vznikem akcelerovaného junkčního či akcelerovaného idioventrikulárního rytmu, bidirekční tachykardií, častými komorovými ektopiemi atd. U mírných forem digoxinové toxicity lze na EKG nalézt miskovité deprese úseku ST, tzv. scooping (Obrázek 6). (Braunwald et al., 2005)

#### Obrázek 6

*Elektrokardiogram s nálezem typickým miskovitý ST depresí u pacienta s toxickou sérovou hladinou digoxinu 6,61 nmol/l.*



## 2. PŮVODNÍ PRÁCE

### 2.1 Embryotoxický vliv změny tepové frekvence vyvolaný podáním léků s antiarytmickým účinkem u kuřecích embryí

#### 2.1.1 Cíl

Cílem práce bylo důkladné prozkoumání vlivu různě selektivních beta-blokátorů na adrenergní signalizační kaskádu v časném vývojovém období kuřecího embrya. Další zkoumanou látkou byl ivabradin, který v myokardu blokuje specificky  $I_f$  kanály, odpovědné za srdeční automacii. Pro tato farmaka je společný jejich negativně chronotropní účinek na myokard, který následně vede k rozvoji výrazné bradykardie. Protože srdeční frekvence je v době embryonálního a fetálního vývoje hlavním faktorem ovlivňujícím srdeční výdej (Dunnigan et al., 1987), předpokládali jsme, že těmito třemi léky navozená bradykardie povede k sníženému srdečnímu výdeji kvůli omezenému mechanismu kompenzace pomocí Frankova - Starlingova zákona. Tento mechanismus je v časných stádiích embryonálního vývoje výrazně limitován převažující trabekulizací myokardu, který je současně vybaven jen tenkou vrstvou kompaktního myokardu. (Sedmera, 2011) Předpokládali jsme, že je to právě bradykardie, provázená poklesem srdečního výdeje, která působí negativně na vývoj embrya a plodu u matek léčených v těhotenství léky s bradykardizujícími účinky.

#### 2.1.2 Metodika

##### 2.1.2.1 Inkubace embrya a aplikací léků

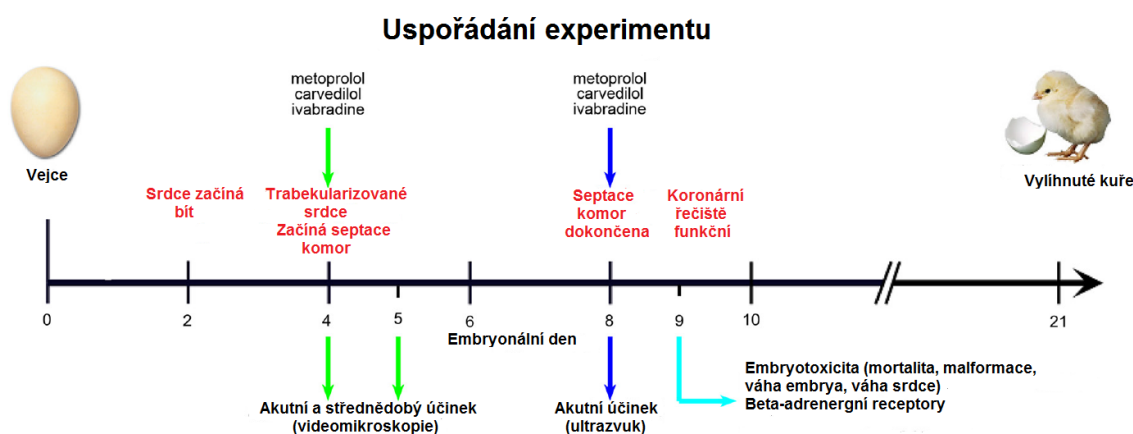
Oplodněná slepičí vejce bílé leghornky byla inkubována ve specializovaném inkubátoru při teplotě 38°C a vlhkost byla udržována 75%, byla otáčena pravidelně ve 4 hodinových intervalech. Takto byla vejce inkubována až do 3-9 embryonálního dne vývoje (ED) (Hamburger-Hamilton stádium 17-35) (Hamburger and Hamilton, 1951). Po dosažení cílového dne vývoje, byl do skořápky vejce vytvořen s největší opatrností nůžkami malý otvor a testovaný lék v cílové dávce, naředěný ve fyziologickém roztoku (metoprolol 1 mg/ml, a carvedilol 1,36 mg/ml) byl aplikován do amniotického vaku. (Obrázek 7)

### 2.1.2.2 Testování embryotoxicity

Embryotoxický vliv byl testován *in ovo* aplikací různých dávek metoprololu, carvedilolu a ivabradinu do amniotického vaku ve stádiu ED4 a ED8 (Tabulka 1,2). U kontrolní skupiny byl intramnioticky aplikován fyziologický roztok. Embrya byla dále *in ovo* inkubována až do ED9. Následně byla embrya vyňata z vejce, byla přesně změřena jejich mokrá a suchá váha a také váha embryonálních srdcí, která sloužila jako jeden z ukazatelů kardiotoxicity. (Obrázek 7)

Obrázek 7

*Morfologie ED4 a ED8 (vývojového stadia kuřecího embrya) a demonstrace jednotlivých metod pro získání dat a jejich analýzu*



### 2.1.2.3 Ex ovo videomikroskopie

Kuřecí embrya stádia ED4, inkubovaná ex ovo, byla vyšetřena videomikroskopicky. Srdeční objemy těchto embryí byly hodnoceny pomocí rovnice pro elipsoid (Sedmera et al., 1999a) (Obrázek 8). Tepový objem levé komory (SV) byl kalkulován odečtením end-systolického objemu od end-diastolického objemu ve třech po sobě jdoucích srdečních cyklech. Zaznamenávány byly smyčky dlouhé 10 sekund a byly nahrávány každou minutu po celkovou dobu 30 minut digitálním fotoaparátem Canon G5 spojeným s disekčním mikroskopem Leica SMZ 16. Z těchto záznamů byla hodnocena tepová frekvence (HR). Ex ovo inkubovaná embrya byla umístěna ve

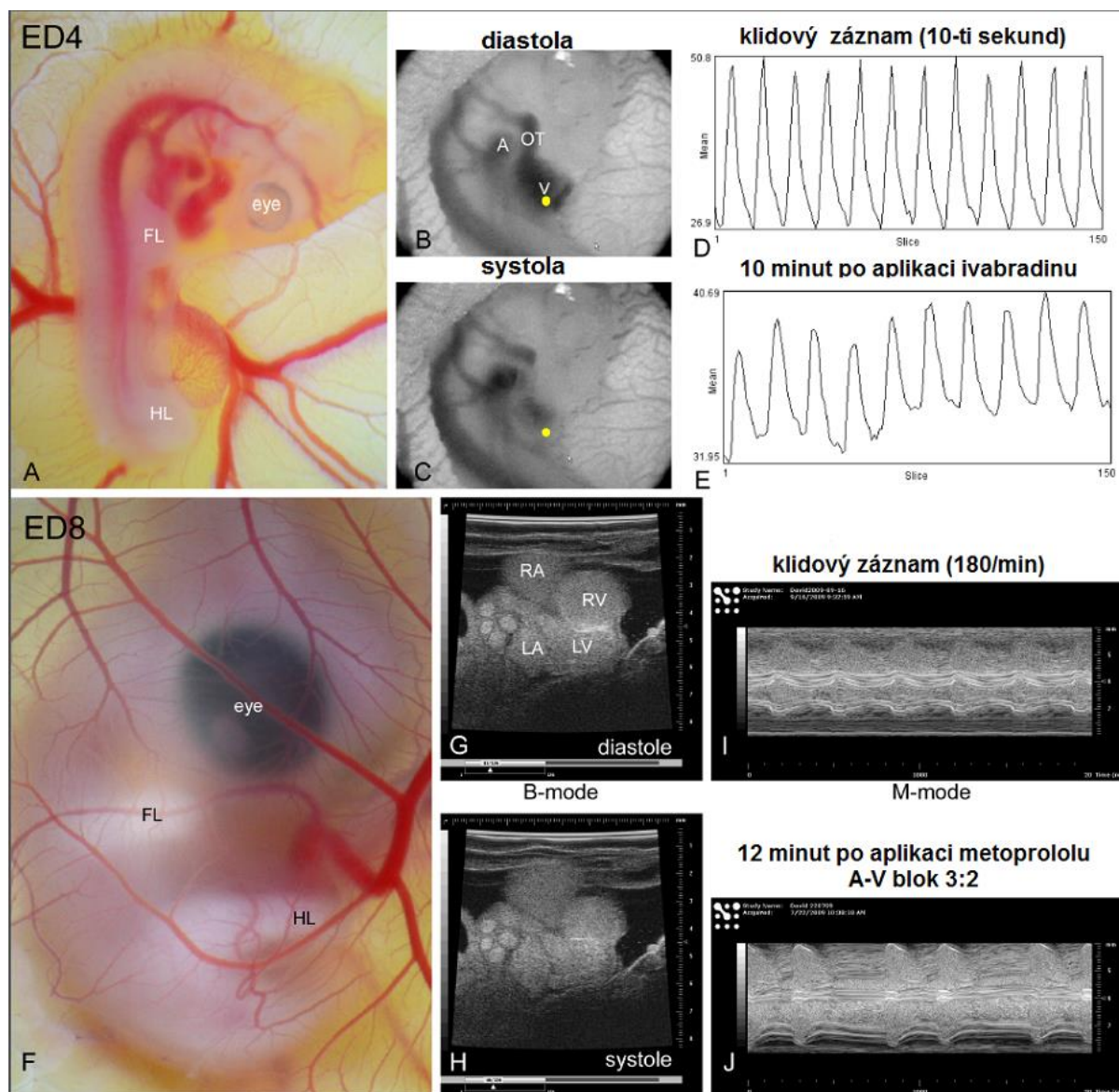
speciální šestiúhelníkové skleněné misce (McQuinn et al., 2007) a po dobu vyšetření byla udržována při teplotě 37,5 °C s použitím kovového kontejneru vyplněného předeřátým Bath Armor suchým médiem umístěným na zahřívacím/chladícím zařízení ECHOTHERM.

#### **2.1.2.4 Použití ultrazvuku pro ex ovo vyšetřování**

Ultrazvuková biomikroskopie byla prováděna výhradně ex ovo (Obrázek 8) s přístrojem Vevo 760, upraveným pro kuřecí embrya (McQuinn et al., 2007). Injekční jehlou a stříkačkou byla aplikována dávka metoprololu – 200 µl, carvedilolu 50 µl a ivabradinu 200 µl intraamnioticky. U kontrol bylo takto aplikováno 200 µl fyziologického roztoku. U carvedilolu byla zvolena nižší dávka proto, že při použití 200 µl byla mortalita časná a velmi vysoká. Touto metodou byla vyšetřována embrya ve stádiu ED8. Ze záznamu projekce srdce z parasternální dlouhé osy byl s pomocí Simpsonovy rovnice vypočten tepový objem a srdeční výdej (srdeční výdej (µl/min) = tepový objem (µl) \* tepová frekvence (n/min)).

## Obrázek 8

Videomikroskopie u ED4 kuřecího embrya se záznamem tepové frekvence (A-E) zobrazující negativní inotropní efekt ivabradinu. Mikrofotografie a ultrazvukové vyšetření v B-modu a M-modu u ED8 kuřecího embryonálního stádia (F-J) dokumentující negativně chronotropní a dromotropní efekt metoprololu. A – atrium (síň), FL – fore limb (horní končetina), HL – hind limb (dolní končetina), LA – left atrium (levá síň), LV – left ventrikle (levá komora), OT – outflow tract (výtokový trakt), RA – right atrium (pravá síň), RV – right ventricle (pravá komora), V – ventrikle (komora). Žluté tečky označují bod zájmu, kde byl detekován záznam tepové frekvence (D, E). Upraveno podle (Kockova et al., 2013).



### 2.1.2.5 Dávky antiarytmických léků

Na jedno vejce (průměrně 57g) bylo podáno 200  $\mu$ l ( $\mu$ g) metoprololu. Tato dávka představuje 16x vyšší dávku než je maximální doporučená dávka pro dospělého člověka (70 kg) vzhledem k poměru váhy a farmakokinetice metoprololu. Dávka 50  $\mu$ l ( $\mu$ g) carvedilolu představuje 4x vyšší dávku než je maximální doporučená denní dávka pro dospělého člověka. Dávka 200  $\mu$ l ( $\mu$ g) ivabradinu je 7x vyšší než maximální doporučená dávka pro dospělého člověka. Maximální okamžitá efektivní koncentrace farmaka v embryu samotném po jeho aplikaci do intraamniotického vaku je asi 20x vyšší bereme-li v úvahu postupnou distribuci látky v celém objemu vejce.

### 2.1.2.6 Analýza beta-adrenergických receptorů

Příprava membrán kardiomyocytů k detekci počtu beta-adrenergických receptorů byla provedena následujícím způsobem. Srdce kuřecích embryí byla rozmělněna, homogenizována v TMES pufru (20 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA a 250 mM sacharóze; pH 7,4) obsahující kompletní spektrum proteázových inhibitorů (Roche Diagnostics) ve sklo-teflonovém homogenizátoru Potter-Elvehjem. Směs buněčných fragmentů a jader byla izolována pomocí nízko-rychlostní centrifugace (600 x g, 10 minut) a membrány buněk byly izolovány centrifugací při 50000 x g po dobu 30 minut při 4 °C. Ty pak byly následně ponořeny do TMES bufferu a uchovány v kontejneru při -80 °C.

Beta-adrenergické receptory byly následně určeny pomocí single-point binding assay obsahující [<sup>3</sup>H]CGP12177 – neselektivní beta-adrenergický antagonist. Membrány kardiomyocytů (60  $\mu$ g) byly inkubovány s 3 nM [<sup>3</sup>H]CGP12177 v inkubačním pufru (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> a 1 mM kyseliny askorbové; pH 7,4) po dobu 60 minut při 37 °C v celkovém objemu 0,5 ml. Tato reakce byla ukončena přidáním 3 ml ledově chladného proplachového roztoku (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,4). Následovala okamžitá filtrace přes Whatman GF/C filtry nasycené 0,3% PEI. Nеспецифické vazby byly identifikovány inkubací s radioaktivně značeným L-propranololem (10  $\mu$ M). Následně byla změřena radioaktivita na filtrech pomocí scintilační metody v 5 ml CytoScint (ICN Biomedicals). Množství receptorů bylo měřeno ve všech vzorcích opakovaně ve 3-5 pokusech a z nich každý byl proveden třikrát. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty s jednotlivými směrodatnými odchylkami (SMOD).

### **2.1.2.7 Statistické metody**

Embryotoxický efekt byl testován užitím Yatesova korigovaného Chi-kvadrátového testu. Embryonální váhy a váhy srdcí byly porovnávány s použitím nepárového Studentova T-testu (Microsoft Excel).

Longitudinální srovnání funkčních parametrů před a po aplikaci farmaka byly provedeny s užitím párového Studentova T-testu a analýzou variance (ANOVA).

Srovnání mezi kontrolami a léčenými skupinami bylo provedeno s pomocí nepárového Studentova T-testu a výsledná hodnota P méně než 0.05 byla považována za statisticky významnou.

### **2.1.3 Výsledky**

Mortalita kontrolní skupiny kuřecích embryí, kterým byl podán pouze fyziologický roztok v dávce 200  $\mu$ l byla 14% pro embrya stádia ED4 a 6% pro stádium ED8. Ve skupině ED4 stádia embryí, kterým byl aplikován metoprolol v různých dávkách, nebyla zjištěna statisticky odlišná mortalita oproti kontrolní skupině. Ve skupině ED8 embryí po aplikaci 200  $\mu$ l metoprololu byla mortalita 39%. Velmi významně zvýšená mortalita byla zjištěna u ED4 embryí po aplikaci 200  $\mu$ l carvedilolu – 86%. U stejné dávky carvedilolu byla u ED8 embryí mortalita jen 44%. Významná závislost mortality (80%) na dávce podaného ivabradinu byla zjištěna u ED4 embryí po aplikaci 200  $\mu$ l ivabradinu (Tabulka 1). U ED8 embryí byl tento efekt méně vyjádřen s mortalitou pouze 10% při stejné dávce ivabradinu (Tabulka 2). Mokrě a suché váhy embryí a embryonálních srdcí se statisticky signifikantně nelišily mezi jednotlivými skupinami (Tabulka 1,2).



**Tabulka 1 Výsledky u embryí po podání farmak ve 4-denním stádiu**

\*p&lt;0,05, † průměr ± SE, +průměr získaný výpočtem z celkového objemu srdcí

| ED4        | Dávka (µg) | N  | Exitus | Mortalita (%) | Váha embrya (g) <sup>†</sup> | Váha srdce (g) <sup>+</sup> |
|------------|------------|----|--------|---------------|------------------------------|-----------------------------|
| Metoprolol | 0          | 11 | 1      | 9             | 1,425 ±0,114                 | 0,0127                      |
|            | 2          | 21 | 0      | 0             | 1,652±0,157                  | 0,0014                      |
|            | 20         | 12 | 0      | 0             | 1,375±0,162                  | 0,0146                      |
|            | 40         | 21 | 2      | 10            | 1,736±0,162                  | 0,0164                      |
|            | 200        | 16 | 0      | 0             | 1,388±0,120                  | 0,0157                      |
| Carvedilol | 0          | 5  | 0      | 0             | 1,317±0,085                  | 0,0156                      |
|            | 2          | 6  | 0      | 0             | 1,264±0,078                  | 0,0145                      |
|            | 20         | 13 | 1      | 8             | 1,350±0,149                  | 0,0142                      |
|            | 40         | 15 | 1      | 7             | 1,416±0,071                  | 0,0156                      |
|            | 200        | 14 | 12     | <b>86*</b>    | 1,405±0,152                  | 0,0163                      |
| ivabradin  | 0          | 13 | 3      | 23            | 0,791±0,056                  | 0,0107                      |
|            | 2          | 10 | 1      | 10            | 0,810±0,889                  | 0,0093                      |
|            | 20         | 10 | 1      | 10            | 0,814±0,079                  | 0,0088                      |
|            | 40         | 29 | 16     | <b>55*</b>    | 0,821±0,103                  | 0,0092                      |
|            | 200        | 15 | 12     | <b>80*</b>    | 0,694±0,164                  | 0,0090                      |

**Tabulka 2 Výsledky u embryí po podání farmak v 8-denním stádiu**

\*p&lt;0,05, † průměr ± SE, +průměr získaný výpočtem z celkového objemu srdcí

| ED8        | Dávka (µg) | N  | Exitus | Mortalita (%) | Váha embrya (g) <sup>†</sup> | Váha srdce (g) <sup>+</sup> |
|------------|------------|----|--------|---------------|------------------------------|-----------------------------|
| metoprolol | 0          | 19 | 2      | 11            | 1,502 ±0,179                 | 0,0165                      |
|            | 2          | 20 | 0      | 0             | 1,830±0,178                  | 0,0184                      |
|            | 20         | 20 | 1      | 5             | 1,717±0,146                  | 0,0190                      |
|            | 40         | 15 | 0      | 0             | 1,332±0,163                  | 0,0135                      |
|            | 200        | 23 | 9      | <b>39*</b>    | 1,604±0,097                  | 0,0135                      |
| carvedilol | 0          | 3  | 0      | 0             | 1,257±0,064                  | n.d.                        |
|            | 2          | 5  | 1      | 20            | 1,249±0,114                  | 0,0138                      |
|            | 20         | 16 | 0      | 25            | 1,339±0,142                  | 0,0137                      |
|            | 40         | 15 | 4      | 0             | 1,366±0,129                  | 0,0151                      |
|            | 200        | 16 | 7      | <b>44*</b>    | 1,314±0,175                  | 0,0105                      |
| ivabradin  | 0          | 12 | 0      | 0             | 1,592±0,147                  | 0,0118                      |
|            | 2          | 12 | 1      | 8             | 1,439±0,163                  | 0,0109                      |
|            | 20         | 12 | 2      | 17            | 1,573±0,147                  | 0,0117                      |
|            | 40         | 12 | 0      | 0             | 1,510±0,156                  | 0,0150                      |
|            | 200        | 20 | 2      | 10            | 1,444±0,191                  | 0,0127                      |

### 2.1.3.1 Funkční efekt v časném embryonálním stadiu ED4

Metoprolol je lék se silně negativně chronotropním účinkem, který vedl k poklesu tepové frekvence až o 33% ve 30 minutách měření po jeho podání ED4 ex ovo embryím. Oproti tomu u ED4 embryí v kontrolní skupině došlo ve 30 minutách měření po aplikaci fyziologického roztoku k malému poklesu tepové frekvence o 6% z původní  $150 \pm 13$  tepů/minutu (průměr $\pm$ SMOD) (Obrázek 9). Tento rozdíl byl statisticky signifikantně odlišný s  $P=0,009\%$ . Srdeční výdej u těchto ED4 embryí poklesl o 1% z původních  $26072 \pm 17791$   $\mu\text{l}/\text{min}$  (průměr $\pm$ SMOD) u kontrolní skupiny, zatímco ve skupině po aplikaci metoprololu byl zaznamenán pokles o 16% (Obrázek 9). Ve skupině metoprololu nebyly statisticky významně odlišné hodnoty srdečního výdeje ani oproti kontrolní skupině ( $P=0,503$ ) ani oproti původním hodnotám před aplikací ( $P=0,930$ ). Pro názornost byly trendy těchto sledovaných parametrů vyjádřeny normalizovanými hodnotami bez naznačení chyb měření (Obrázek 9).

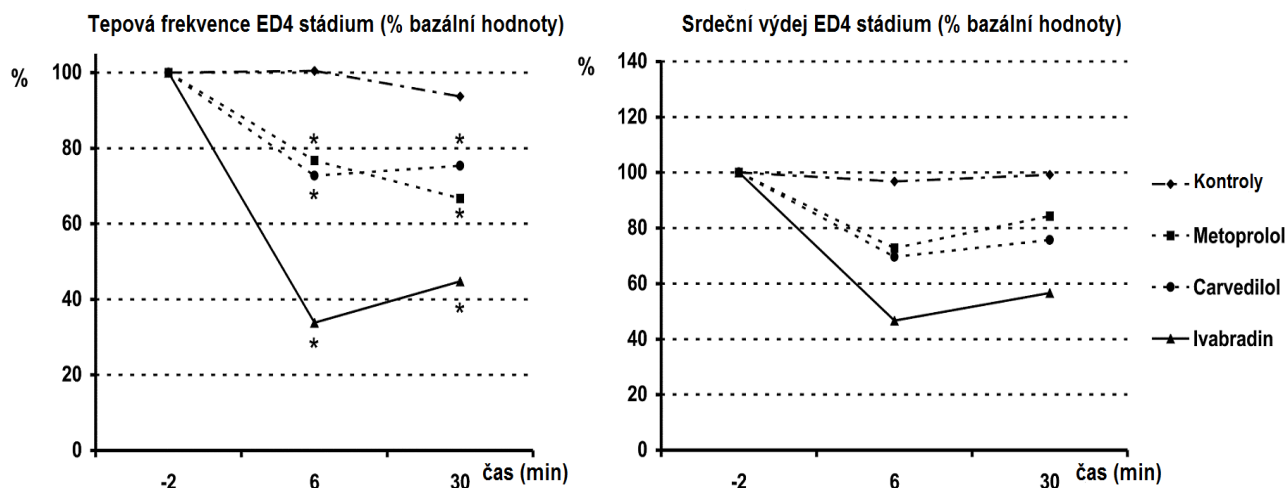
Maximální negativně chronotropní účinek carvedilolu u ED4 embryí byl dosažen již 6 minut po aplikaci, kdy došlo k poklesu o 27% ( $P=0,0003$ ) a k dalšímu poklesu tepové frekvence po dobu sledování (30 minut) již nedošlo (Obrázek 9). Rozdíl mezi tepovou frekvencí v této skupině byl oproti kontrolní skupině statisticky významný v 6 i 30 minutě s  $P=0,001$  a  $P=0,047$ . Statisticky významný rozdíl v srdečním výdeji mezi skupinou carvedilolu ED4 a kontrolní skupinou zjištěn nebyl (Obrázek 9).

Podání ivabradinu ED4 embryím vedlo k poklesu tepové frekvence po 30 minutách sledování až o 55%, zatímco u kontrol to bylo pouze o 6% (Obrázek 9). Tento rozdíl byl vysoce statisticky významný s  $P<0,001$ . Srdeční výdej ve skupině ivabradinu poklesl ve 30 minutách o 43% oproti původním hodnotám (Obrázek 9), zatímco u kontrolní skupiny nebyl tento pokles oproti původním hodnotám ve 30 minutách významný ( $P=0,986$ ).

Obrázek 9

Srdeční frekvence a srdeční výdej, embryonální stádium ED4.

Pokles tepové frekvence vede k poklesu srdečního výdeje. \*  $P < 0,05$  statisticky významný rozdíl. Upraveno podle (Kockova et al., 2013).



### 2.1.3.2 Funkční efekt v embryonálním stádiu ED8

U vývojově pokročilejších ED8 embryí byl negativně chronotropní efekt metoprololu ještě více vyjádřen než tomu bylo u ED4 (Obrázek 10). Tepová frekvence poklesla v průběhu 30 minut sledování o 71% ( $P < 0,001$ ) v porovnání s kontrolní ED8 skupinou, kde došlo k poklesu jen o 36% ( $P < 0,001$ ) oproti původní hodnotě  $205 \pm 28$  tepů/minutu (průměr  $\pm$  SMOD). Rozdíl mezi skupinou metoprololu a kontrolní skupinou byl statisticky významný ve 30 minutách s  $P = 0,011$ . V obou skupinách došlo k významnému poklesu srdečního výdeje společně s poklesem tepové frekvence, o 61% to bylo ve skupině s metoprololem a o 36% v kontrolní skupině oproti původním hodnotám  $37442 \pm 12826$   $\mu\text{l}/\text{min}$  (průměr  $\pm$  SMOD; Obrázek 10). Rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky významný s  $P = 0,001$ .

U ED8 embryí došlo po aplikaci 200  $\mu\text{l}$  carvedilolu k velmi četným epizodám asystolie a k úmrtí (4 embrya z 5 –  $P = 0,004$  hodnoceno Chi-kvadrát testem). Proto byla testovaná dávka carvedilolu snížena na 50  $\mu\text{l}$ .

Podání 50  $\mu\text{l}$  Carvedilolu vedlo k negativně chronotropnímu účinku projevujícímu se poklesem tepové frekvence o 54% původních hodnot ( $P < 0,001$ ) ve 30 minutách. Srovnání s kontrolní skupinou ukázalo statistický významný rozdíl s  $P = 0,037$  (Obrázek 10).

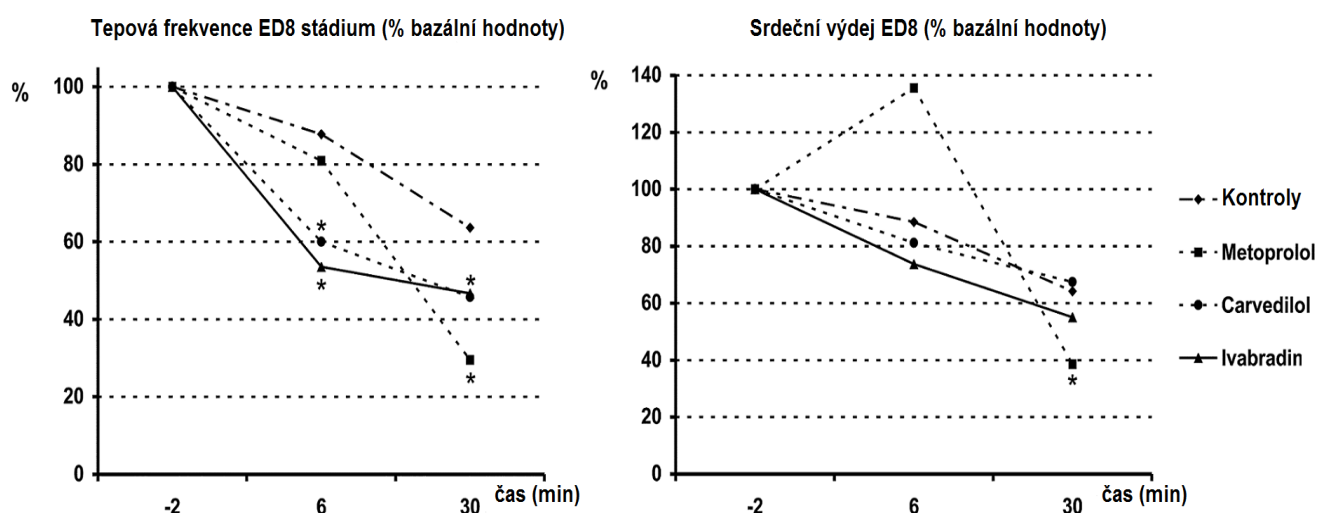
Ve skupině s carvedilolem byl také zaznamenán statisticky významný vzestup tepového objemu v 6 a 30 minutách, který vedl pouze k velmi pozvolnému poklesu srdečního výdeje s klesající tepovou frekvencí. Tento kompenzační vliv vedl k jen mírnému poklesu srdečního výdeje, který pak nedosáhl statistické významnosti oproti kontrolní skupině. U obou skupin došlo k poklesu srdečního výdeje o 36% a 33% ve 30 minutách (Obrázek 10).

Stejný negativně chronotropní účinek byl zjištěn u ED8 embryí ve skupině s ivabradinem. Srdeční frekvence v této skupině poklesla o 53% ( $P < 0.001$ ) ve 30 minutách. Porovnání skupiny s ivabradinem a kontrolní skupiny ukázalo statisticky pouze hraniční rozdíl s  $P = 0,052$  (Obrázek 10). Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v tepovém objemu mezi oběma skupinami. Srdeční výdej poklesl o 45% ve skupině s ivabradinem a o 36% v kontrolní skupině ( $P = 0,128$ ), tento rozdíl však nebyl statisticky významný (Obrázek 10).

#### Obrázek 10

*Srdeční frekvence a srdeční výdej, embryonální stádium ED8.*

*Pokles tepové frekvence vede k poklesu srdečního výdeje. \*  $P < 0,05$  statistický významný rozdíl. Upraveno podle (Kockova et al., 2013).*



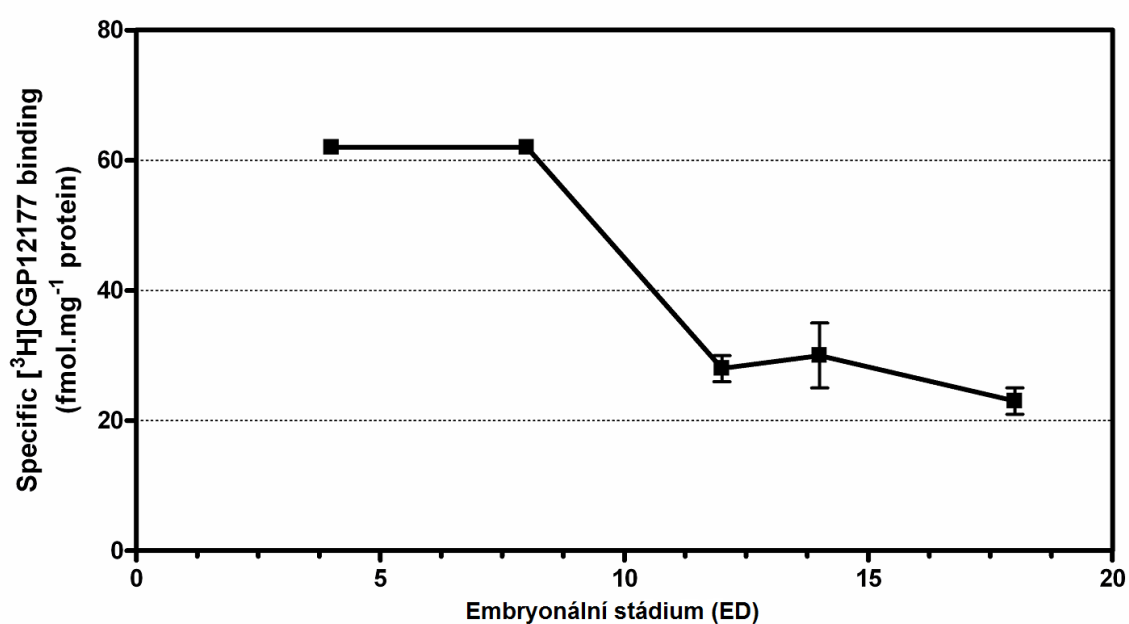
### 2.1.3.3 Beta-adrenergní receptory v průběhu vývoje

V experimentu byl zaznamenán jednoznačný klesající trend v počtu beta-adrenergních receptorů v průběhu vývoje kuřecího embrya. V časných vývojových stádiích ED4 byl počet beta-adrenergních receptorů výrazně vyšší v porovnání s ED18 (Obrázek 11). Množství beta-adrenergních receptorů se mezi ED8 embryi inkubovaných 24 hodin s metoprololem a kontrolní ED9 skupinou nelišilo (76 versus 78 fmol/mg bílkoviny). Pokud byla ED8 embrya stejnou dobu inkubována s carvedilolem, došlo k redukci počtu beta-adrenergních receptorů ve srovnání s kontrolní skupinou (56 versus 72 fmol/mg bílkoviny).

Dále je zajímavé, že embrya časnějšího ED4 stádia inkubovaná s metoprololem a carvedilolem měla výrazně nižší počet beta-adrenergních receptorů ve srovnání s kontrolní skupinou a také s vývojově staršími ED8 embryi. Průměrná hustota beta-adrenergních receptorů ve skupinách ED4 + ED8 embryí s metoprololem byla 55 fmol/mg bílkoviny; ED4 + ED8 embryí po aplikaci carvedilolu jen 37 fmol/mg bílkoviny (Obrázek 12).

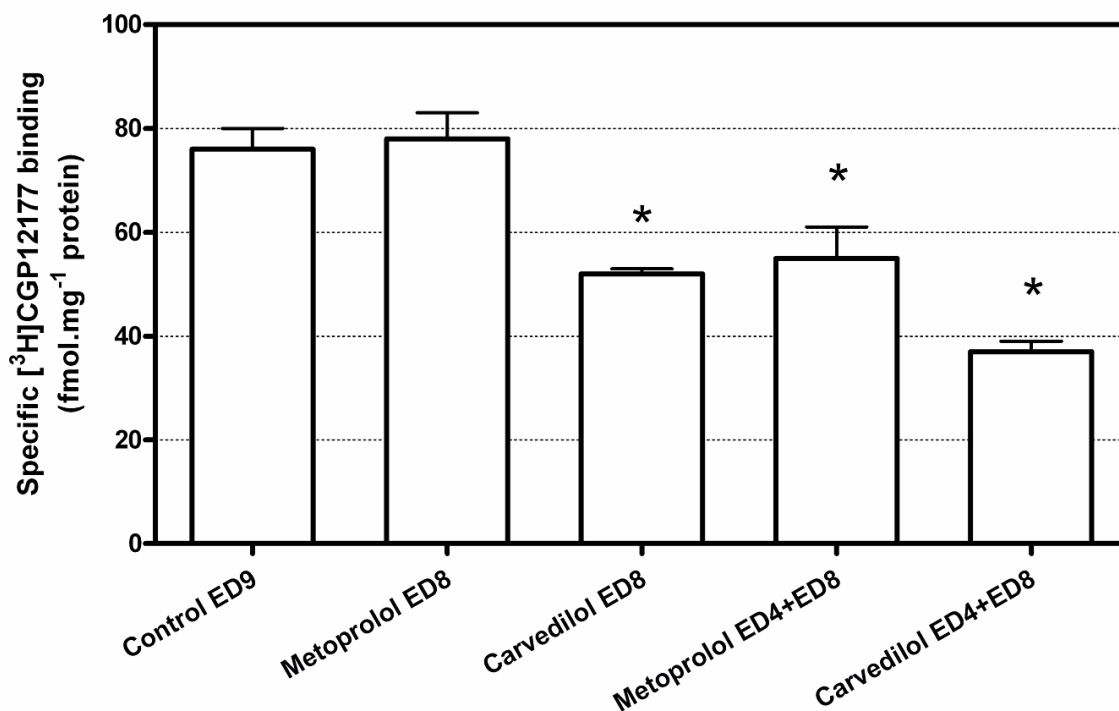
#### Obrázek 11

*Vývoj počtu beta-adrenergních receptorů u kuřecího embrya. Upraveno podle (Kockova et al., 2013).*



Obrázek 12

Down-regulace beta-adrenergických receptorů u kuřecího embrya v důsledku podání beta-blokátorů. \*  $P < 0,05$  statistický významný rozdíl. Upraveno podle (Kockova et al., 2013).



#### 2.1.4 Diskuze

Studovány byly tři různé léky s antiarytmickým účinkem a se silným potenciálem pro snížení tepové frekvence, s tzv. bradykardizujícím účinkem. Metoprolol je středně silně selektivní beta-blokátor (blokuje beta 1 adrenergní receptory) a s negativně chronotropním a také negativně inotropním účinkem (Opie, 2005). Carvedilol patří k neselektivním beta-blokátorům, které přímo inhibují beta-1 a beta-2 receptory přítomné v myokardu ale také v buňkách cévní stěny (Opie, 2005). Jeho široce blokující efekt na adrenergní receptory vede k negativně chronotropnímu efektu, méně vyjádřenému negativně inotropnímu efektu (Brixius et al., 2001), a dále snižuje afterload (dotížení). Ivabradin je relativně novým lékem s přímým účinkem na tzv. „funny“ ( $I_f$ ) kanály přítomné v sinusovém uzlu ve vysoké míře. Tento účinek dává

ivabradinu silný potenciál pro snížení tepové frekvence aniž by byl tento provázen současně negativně inotropním účinkem (Sulfi and Timmis, 2006).

Účinky beta-blokátorů byly studovány v retrospektivních studiích u těhotných žen se syndromem dlouhého QT, ve kterých nebyl dokumentován zvýšený výskyt malformací u novorozenců (Rashba et al., 1998). Žádné malformace u plodů nebyly prokázány ani analýzou souboru těhotných žen léčených metoprololem pro arteriální hypertenzi (Sandstrom, 1978). Metoprolol je doporučen pro léčbu supraventrikulárních arytmií (SVT) v průběhu těhotenství a je zařazen do třídy I s evidencí Level B s poznámkou, že by tyto léky neměly být podávány v prvním trimestru těhotenství, jestliže je to možné (Blomstrom-Lundqvist et al., 2003). Tyto zkušenosti z observačních studií u těhotných žen korelují s našimi nálezy, ve kterých nebyly nalezeny malformace srdce, ale ani jiné malformace u kuřecích embryí po aplikaci metoprololu v kritické fázi jejich vývoje. Vzhledem k našim nálezům, které ukazují spíše menší citlivost mladších ED4 embryí vůči účinkům metoprololu, nemůžeme potvrdit domněnku, že je užívání metoprololu v prvním trimestru provázeno vyšším rizikem pro vývoj plodu. Zjistili jsme, že embrya jsou v časnějších stádiích vývoje méně citlivá k účinku beta-blokátorů a to přestože mají relativně vyšší množství přítomných beta-adrenergických receptorů. Negativně chronotropní účinek beta-blokátorů na novorozence u lidí byl prokázán v placebem kontrolovaných studiích s atenololem, kdy byly těhotné ženy léčeny pro primomanifestaci arteriální hypertenze v průběhu těhotenství. U žen léčených atenololem byla bradykardie u novorozenců častější, ale nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky na plod (Rubin et al., 1982). Také my jsme prokázali silné negativně chronotropní účinky metoprololu u kuřecího embrya u více vyspělých jedinců ED8 ve srovnání s kontrolní skupinou. Tento efekt byl provázen poklesem srdečního výdeje, pravděpodobně proto, že převažující procento myokardiální trabekulizace nad kompaktním myokardem levé komory fetálního srdce neumožňuje plný efekt Frankova-Starlingova mechanismu tak, jak se uplatňuje u dospělých jedinců (Sedmera et al., 1999b). Nedostatečný srdeční výdej může způsobit úmrtí jedince, které bylo v našem experimentu pozorováno u ED8 kuřecích embryí po aplikaci 200 µl metoprololu. Jak již bylo publikováno v dřívějších experimentech, hypoxie způsobená lehkou až středně významnou bradykardií může být mechanismem úmrtí jedince (Danielsson et al., 2001).

Také v kontrolní skupině jsme pozorovali pokles tepové frekvence, který však nebyl významný u ED4 embryí, ale statistické významnosti dosáhl u vývojově starších ED8 embryí. Tento fenomén by bylo možno vysvětlit osycháním amniotické membrány, kterému se přes naše úsilí nepodařilo zcela zabránit. Na poklesu tepové frekvence se mohl podílet částečně také tlak ultrazvukové sondy. Vliv výkonu ultrazvukového přístroje (power output) neměl na pokles tepové frekvence vliv. Křivka poklesu tepové frekvence se nijak nezměnila po snížení výkonu na 50% původní hodnoty. Velmi pečlivě jsme také kontrolovali teplotu v našich kultivačních miskách, abychom udrželi konstantní podmínky v průběhu celého experimentu.

Prozatím chybí zkušenosti s vlivem carvedilolu na lidský plod. Až do dnešního dne nebyly publikovány žádné studie provedené v lidské populaci těhotných žen. Na základě našeho experimentu můžeme prezentovat významné nežádoucí účinky vysokých dávek carvedilolu (200  $\mu$ l) u obou vývojových stádií (embryonální a fetální). Tato dávka je minimálně 16x vyšší, než je dávka běžně podávaná u dospělých jedinců. Vedla k rozvoji velmi signifikantních epizod dlouhých asystolií a nakonec ke smrti jedince. Nižší dávka 50  $\mu$ l carvedilolu se ukázala jako významně bezpečnější a významná toxicita nebyla vůbec prokázána. Negativně chronotropní účinek carvedilolu u ED8 embryí byl významný, ale nedošlo k významnému poklesu srdečního výdeje.

Nejsou známy informace o bezpečnostním profilu ivabradinu v průběhu těhotenství. V dostupné literatuře lze nalézt jeden kazuistický případ, u kterého nebyly prokázány nežádoucí účinky na plod (Babic et al., 2011). Významná embryotoxicita ivabradinu v časných vývojových stádiích vyvolává potřebu dalších studií. Specializované „funny“ kanály pacemakerových buněk jsou přítomny v myokardu již ve velmi časných stádiích a postupně dochází k jejich koncentraci do sinoatriálního a atrioventrikulárního uzlu (Aanhaanen et al., 2010; Sarre et al., 2010). Proto není překvapením, že má ivabradin velmi silný negativně chronotropní účinek na vyvíjející se srdce, jak prokázal *in vitro* Sarre a kol. (Aanhaanen et al., 2010; Sarre et al., 2010) a my tento vliv můžeme potvrdit ve studii *in vivo*.

Endogenní syntéza katecholaminů v oblasti srdečního pacemaku byla prokázána v časných vývojových stádiích savců Ebertem a Thompsonem (Ebert and Thompson, 2001). Tento nálezn je ve shodě s naším nálezem částečné negativně chronotropní odpovědi u embryí ED4. Také jsme prokázali přítomnost funkčních beta-adrenergických receptorů u ED4 embryí. V nezávislém experimentu, ve kterém byla



izolovaná srdce kuřecích embryí kultivována se vzrůstající dávkou adrenalinu 2-20-72  $\mu\text{l}$  ( $\mu\text{g}$ ) ve 2 ml, došlo k nárůstu tepové frekvence o 60% ve srovnání s kontrolní skupinou. Již v dříve publikovaných pracích je dokumentována zvýšená citlivost srdce vůči beta-mimetickým lékům (isoproterenol), a to tím větší, čím je jedinec pokročilejšího vývojového stádia, s maximálním účinkem na ED9 (Ostadal et al., 1982). Tato dříve publikovaná práce je zcela ve shodě s naším pozorováním vyšší akutní citlivosti vůči beta-blokátorům u ED8 embryí oproti ED4 embryonálnímu stádiu. Tento fenomén však nemůže být přičten vyššímu počtu beta-adrenergických receptorů, protože jsme dokumentovali naopak klesající tendenci počtu receptorů v průběhu vývoje od stádií ED4 až do ED18 stádia. Předpokládáme, že lepší propojení receptorů a efektorů (coupling) zvyšuje jejich efektivitu v pozdějších vývojových stádiích, což by mohlo vysvětlit jejich vyšší citlivost vůči účinkům beta-mimetických látek. Navíc již v přechozích studiích bylo dokumentováno, že autonomní sympatický systém dosahuje srdce v průběhu vývoje kuřecího embrya až po parasympatickém nervstvu (vagovém) na ED9 (Verberne et al., 2000; Hildreth et al., 2009). Dále jsme prokázali, že dlouho trvající účinek beta-blokátorů vede k poklesu počtu (down-regulaci) beta-adrenergických receptorů v časných vývojových stádiích. Ze tří testovaných látek byl tento efekt nejvíce vyjádřen u carvedilolu, neselektivního beta-blokátoru, oproti metoprololu, který patří ke středně selektivním beta-blokátorům.

### **2.1.5 Závěr**

Citlivost vůči negativně chronotropnímu účinku metoprololu, carvedilolu a ivabradinu stoupá úměrně prenatalnímu vývoji jedince. V souladu s naší hypotézou se ukázalo, že kuřecí embryonální srdce mají nižší schopnost regulovat srdeční výdej a významná bradykardie způsobuje významný pokles srdečního výdeje, který se podílí na úmrtí embrya. Na základě naší zkušenosti z experimentu můžeme konstatovat, že metoprolol podávaný těhotným ženám v běžných dávkách pravděpodobně nepředstavuje zvýšené riziko pro vývoj plodu. V případě ivabradinu a carvedilolu však máme vážné podezření na možný rozvoj potenciálně nežádoucích účinků na plod a to právě v důsledku ovlivnění jeho tepové frekvence.

## **2.2 Adenylát-cyklázová signalizační kaskáda kuřecího embrya v průběhu vývoje: vliv podání antiarytmických léků**

### **2.2.1 Cíl**

Vzhledem k rostoucí potřebě medikamentózní léčby těhotných žen, jejichž průměrný věk stále stoupá a spolu s ním stoupá také incidence arteriální hypertenze, arytmií a srdečního selhání, roste i potřeba prohloubit naše znalosti o možnostech nežádoucích účinků kardiologických léků na vyvíjející se plod. K nejčastěji předepisovaným lékům v průběhu těhotenství jsou v kardiologických indikacích především beta-blokátory. Několik velmi recentních prací uvádí zvýšené riziko podávání těchto léků pro vyvíjející se plod (Vasilakis-Scaramozza et al., 2013; Yakoob et al., 2013). Je tedy zřejmé, že se musíme věnovat studiu mechanismu účinků těchto léků a v experimentu zkoumat jejich embryotoxicitu a teratogenicitu. Kuřecí embrya představují velmi vhodný model pro studium vlivu beta-blokátorů a katecholaminů (Ruijtenbeek et al., 2002) na vyvíjející se kardiovaskulární systém. V našem předchozím experimentu jsme prokázali silný negativně inotropní efekt beta-blokátorů na srdce kuřecího embrya, který vedl v různé míře také ke sníženému srdečnímu výdeji. Současně jsme prokázali vyšší počet beta-adrenergických receptorů u vývojově mladších jedinců, u kterých byl překvapivě negativně chronotropní účinek vyjádřen slaběji, než tomu bylo u jedinců vývojově pokročilejších. Vysvětlení bylo potřeba hledat v propojení receptoru a adenylát-cyklázové kaskády vedoucí ke zvýšení jejich efektu. Adenylát-cyklázová kaskáda hraje zásadní roli v regulaci funkce srdce, srdeční kontraktility. Cílem naší práce bylo objasnit vliv podaných beta-blokátorů na vyvíjející se kuřecí embryo a to specificky na adenylát-cyklázovou signalizační kaskádu v myokardu.

### **2.2.2 Metodika**

#### **2.2.2.1 Použitý materiál**

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP byl získán od Izotop (Budapest, Maďarsko), [<sup>3</sup>H]cAMP od ARC (St. Louis, MO, USA) a scintilační směs EcoLite od MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA). Acrylamid a bis-acrylamid pocházely od SERVA (Heidelberg, Německo), a aluminum oxid 90 (neutrální aktivity I) od Merck (Darmstadt, Německo). Ostatní chemické

přípravky jsou od Sigma (St. Louis, MO, USA) a byly nejvyšší dosažitelné kvality. AC5 protilátka od Abcam (Cambridge, UK) a G $\alpha$  protilátka od Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA). Příprava a užití G $\alpha$  (1,2) protilátky bylo popsáno dříve (Novotny et al., 2001).

### **2.2.2.2 Kultivace kuřecího embrya a aplikace testovaných látek**

Oplodněná vejce slepice bílých leghornek byla inkubována ve speciálním inkubátoru při 38 °C a 75% vlhkosti až do stádia vývoje ED4-18. Vejce byla automaticky otáčena každé 4 hodiny. Na ED4 nebo ED8 nebo ED4+ED8 bylo cestou malého otvoru ve skořápce podáno do amniotického vaku 200  $\mu$ l (1 mg/ml) metoprololu nebo 50  $\mu$ l (1 mg/ml) carvedilolu ředěných ve fyziologickém roztoku. U kontrolní skupiny byl aplikován jen fyziologický roztok. Skořápky vajec byly zalepeny a dále inkubovány za stejných podmínek až do ED9.

### **2.2.2.3 Příprava buněčných membrán**

Kuřecí srdce (normální v různých vývojových stádiích, dále ED9 bez i s podáním beta-blokátorů na stádiích ED4, ED8 a ED4+ED8) byla homogenně rozmělněna v TMES pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA a 250 mM sacharózy (pH 7,4) doplněném směsí bílkovinných inhibitorů (Roche Diagnostics) s použitím sklo-teflonového homogenizátoru Potter-Elvehjem na ledu. Buněčná a jaderná drť byly izolovány pomalou centrifugací (600 g, 10 minut při 4 °C), membrány pak byly izolovány centrifugací při 50,000 g po dobu 30 minut při 4 °C. Pelety byly resuspendovány v TME pufru (20 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EDTA; pH 7,4) a pak přeneseny do zkumavek-eppendorfek a rychle zmrazeny tekutým dusíkem a uschovány při -80 °C.

### **2.2.2.4 Hodnocení aktivity adenylát-cyklázy**

Aktivitu adenylát-cyklázy na membránách kardiomyocytů lze hodnotit měřením míry konverze [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP na [<sup>32</sup>P]cAMP, tedy metodou podle Solomona a kol. (Salomon et al., 1974). Membrány kardiomyocytů (20  $\mu$ g bílkoviny) byly inkubovány s reakční směsí (100  $\mu$ l) obsahující 48 mM Tris-HCl pufru (pH 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ M GTP, 0,8 mg/ml BSA, 5 mM fosfoenolpyruvátu, 3,2 U pyruvát

kinázy, 40  $\mu\text{M}$  3-isobutyl-1-methylxanthinu, 0,1 mM cAMP a asi 10 000 cpm [ $^3\text{H}$ ]cAMP jakožto značky. Aktivita stimulované adenylát-cyklázy byla měřena po přidání 10  $\mu\text{M}$  isoprenalinu nebo 10  $\mu\text{M}$  forskolinu. Po jedné minutě inkubace bylo přidáno 0,4 mM ATP společně s 200,000 cpm [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP a inkubace pokračovala ještě dalších 20 minut při 30  $^\circ\text{C}$ . Reakce byla zastavena přidáním 100  $\mu\text{l}$  0,5 M HCl a zahřátím na 100  $^\circ\text{C}$  po dobu 5 minut. Vzorky byly neutralizovány pomocí 200  $\mu\text{l}$  1,5 M imidazolu. Separace od nově vytvořeného [ $^{32}\text{P}$ ]cAMP byla provedena s užitím suché chromatografie na aluminiových sloupcích (White, 1974).

### **2.2.2.5 Elektroforéza a Western blot analýza**

Vzorky membrán kardiomyocytů byly naředěny Laemmliho pufrém a naplněny (30  $\mu\text{g}$  na řádek) standardně na 10% akrylamidový gel na SDS-PAGE. Po elektroforéze byly uvolněné bílkoviny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (Shchelicher & Schuell), blokovány 5% mlékem bez tuku v TBS pufru (10 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8,0) na 1 hodinu a dále byly inkubovány s relevantními primárními protilátkami přes noc při 4  $^\circ\text{C}$ . Po třikrát 10 minut trvajícím oplachování v TBS obsahujícím 0,3% Tween 20, byly aplikovány sekundární protilátky proti králičímu imunoglobulinu značené křenovou peroxidázou po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po opětovném trojnásobném 10 minut trvajícím oplachování v TBS-Tween, byly bloty znázorněny pomocí zesílené chemoluminiscenční techniky v souladu s doporučeními výrobce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Tyto imunoblots byly digitalizovány a analyzovány kvantitativně pomocí programu ImageQuant<sup>TM</sup> TL (Amersham Biosciences).

## **2.2.3 Výsledky**

### **2.2.3.1 Aktivita adenylát-cyklázy**

Aktivita adenylát-cyklázy v kardiomyocytech kuřecích embryí nebyla významně odlišná mezi ED4 a ED18 vývojového stádia (Obrázek 13). Isoprenalin, který je beta-adrenergním agonistou, zvýšil hodnoty adenylát-cyklázy o 40-45% proti normálním hodnotám. Forskolin, přímý aktivátor adenylát-cyklázové katalytické subjednotky a Gs proteinu, zvýšil aktivitu enzymu až 10x. Lze říci, že se míra stimulačního účinku

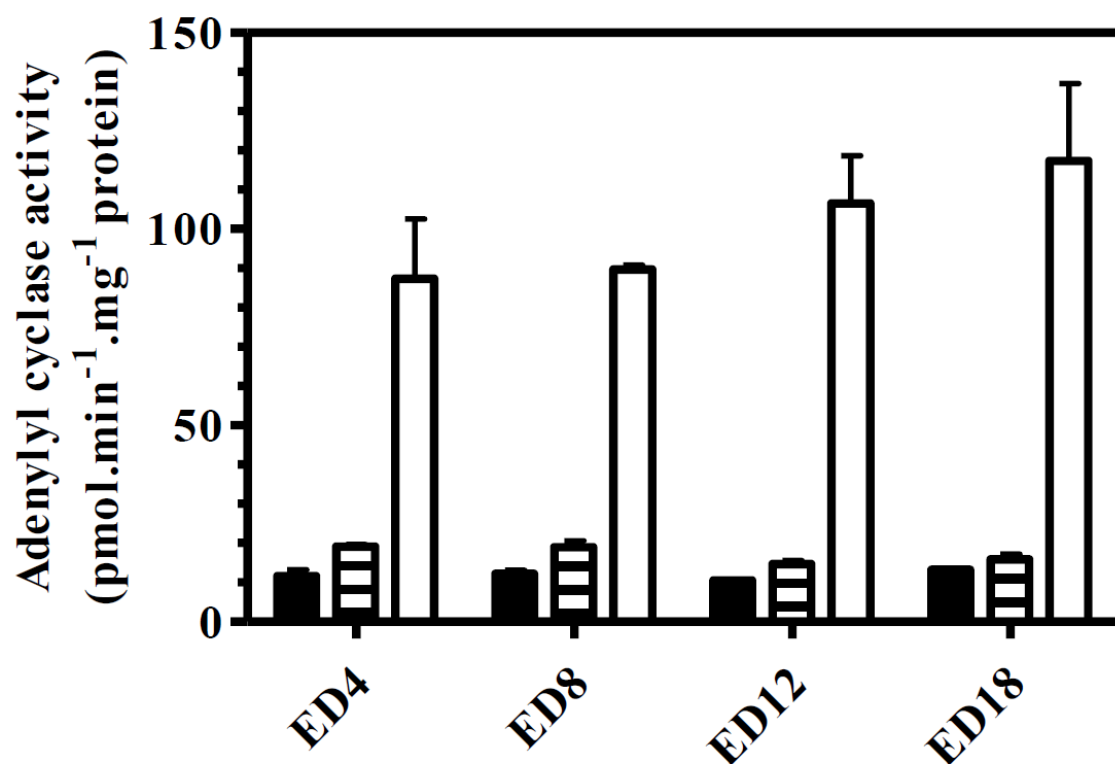
těchto přípravků na aktivitu adenylát-cyklázy nelišila významně mezi jednotlivými vývojovými stádii kuřecího embrya. Nicméně nelze nezmínit, že byla zaznamenána mírná klesající tendence u isoprenalinem stimulované aktivity adenylát-cyklázy v pozdějších stádiích embryonální vývoje.

Další částí experimentu bylo sledování vlivu beta-blokátorů aplikovaných v průběhu vývoje embryí na aktivitu adenylát-cyklázy měřenou na ED9 stádiu. Ani metoprolol a ani carvedilol aplikovaný do amniotického vaku kuřecího embrya ve stádiu ED4 nebo ED4+ED8 neovlivnily aktivitu adenylát-cyklázy měřenou na ED9 stádiu. Obě tyto látky však významně snížily forskolinem stimulovanou aktivitu adenylát-cyklázy, pokud byly aplikovány na ED8 stádiu vývoje (Obrázek 14). Zajímavé bylo také pozorování potlačení forskolinem či isoprenalinem stimulované aktivity adenylát-cyklázy u kuřecích embryí s carvedilolem na ED4+ED8 stádiu. Tento vliv však nebyl statistický významný.

**Obrázek 13**

*Aktivita adenylát-cyklázy u kuřecího embrya v průběhu ontogeneze*

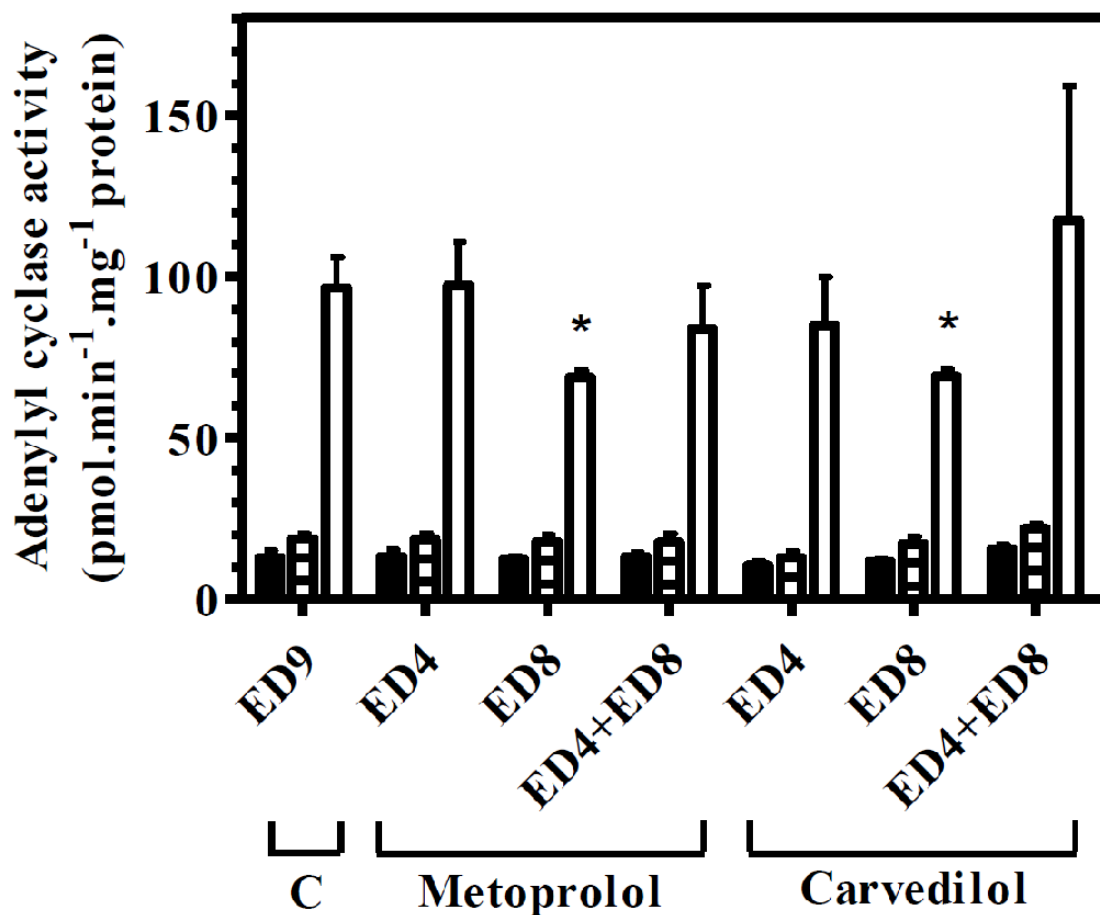
*Bazální hodnoty adenylát-cyklázy (plné sloupce), isoprenalinem stimulovaná hodnota adenylát-cyklázy (příčně pruhované sloupce), forskolinem stimulovaná hodnota adenylát-cyklázy (prázdné sloupce). Hladina adenylát-cyklázy byla měřena na membránách kardiomyocytů různých vývojových stádií. Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SMOD). Upraveno podle (Hejnova et al., 2014).*



Obrázek 14

## Účinek beta-blokátorů na aktivitu adenylát-cyklázy u kuřecího embrya

Metoprolol nebo carvedilol byly aplikovány do amniotického vaku na stádiu ED4, ED8 nebo ED4+ED8. Na ED9 stádiu byly stanoveny hodnoty adenylát-cyklázy membrán kardiomyocytů kuřecích embryí léčených beta-blokátory a kontrolní skupiny, kde byl aplikován pouze fyziologický roztok. Bazální aktivita adenylát-cyklázy (plné sloupce), isoprenalinem stimulovaná hladina adenylát-cyklázy (příčně pruhované sloupce), forskolinem stimulovaná hladina adenylát-cyklázy (prázdné sloupce). \* označuje statisticky významný rozdíl mezi skupinami embryí po aplikaci beta-blokátorů versus kontroly ve stádiu ED9 ( $P < 0,05$ ). Upraveno podle (Hejnova et al., 2014).



### 2.2.3.2 Exprese adenylát-cyklázy a G proteinu v průběhu vývoje

Pomocí metody Western Blot bylo hodnoceno množství adenylát-cyklázy 5 a  $\alpha$  podjednotky stimulačního (Gs) a inhibičního (Gi) proteinu, které představují klíčové komponenty adenylát-cyklázové signalizační kaskády, na jednotlivých vývojových stádiích kuřecího embrya (Obrázek 15). Výskyt dominantní srdeční izoformy adenylát-cyklázy - adenylát-cykláza 5, byl stejný v průběhu časných embryonálních stádií, ale v období ED12 až ED18 došlo jejímu poklesu o více než 30%. Zatímco množství adenylát-cyklázy 5 nebylo v časných stádiích ED4 ovlivněno účinky metoprololu a carvedilolu, jejich podání na ED8 stádiu vedlo k významnému poklesu (o cca 40-50%) adenylát-cyklázy 5 (Obrázek 16). Pokud byly beta-blokátory podány současně v ED4 a ED8 stádiu, došlo k poklesu aktivity adenylát-cyklázy 5, ale pokles byl mnohem méně výrazný (cca o 20%).

Imunochemická analýza vývojového profilu subjednotek G proteinu ukázala, že jejich množství je v časných stádiích vývoje velmi malé, a to jak  $\alpha$  podjednotky Gs tak Gi bílkovin, ale dochází k jejímu dramatickému nárůstu v období mezi ED4 a ED8 (Obrázek 15). Následně již množství  $\alpha$  podjednotek G proteinu zůstalo relativně nezměněno až do ED18. U embryí po aplikaci metoprololu a carvedilolu v ED4 stádiu nedošlo k významnějšímu ovlivnění množství Gs $\alpha$  (Obrázek 16). Ovšem aplikace metoprololu v ED8 stádiu a ED4+ED8 vedla k poklesu (o cca 40%) exprese Gs $\alpha$ . Je zajímavé, že v experimentu nebylo dosaženo stejného efektu na expresi Gs $\alpha$  u embryí po podání carvedilolu ve stejném období vývoje.

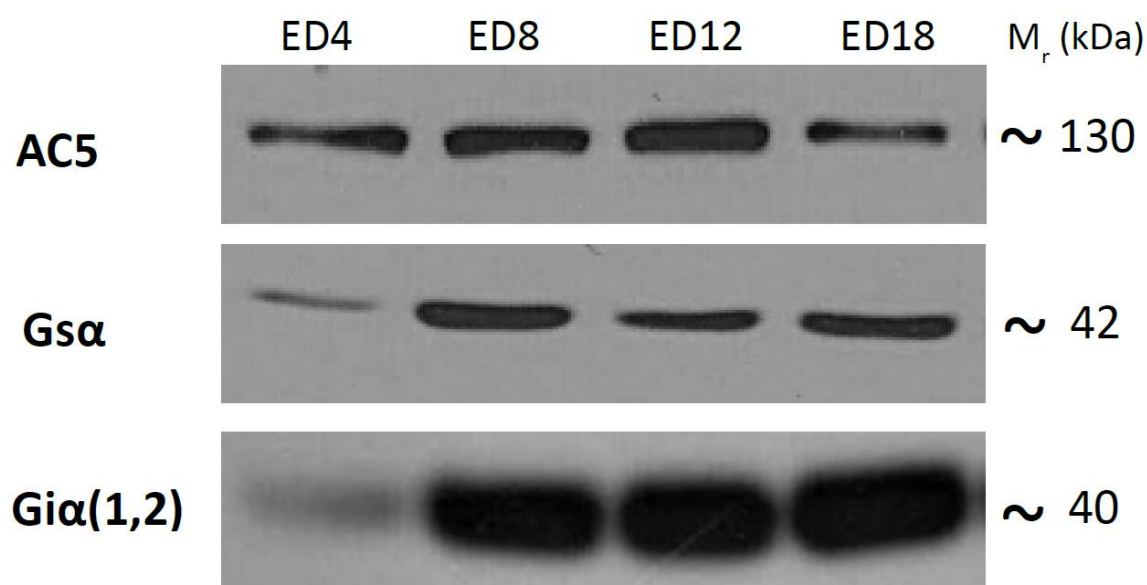
Aplikace obou beta-blokátorů ve stádiu ED4 a aplikace carvedilolu v ED8 nebo ED4+ED8 stádiu výrazně zvýšila (o cca 60%) množství Gi $\alpha$  hodnoceno v ED9 (Obrázek 16).

Aplikace metoprololu u kuřecích embryí v ED8 nebo ED4+ED8 nevedla ke změnám množství Gi $\alpha$  proteinu.



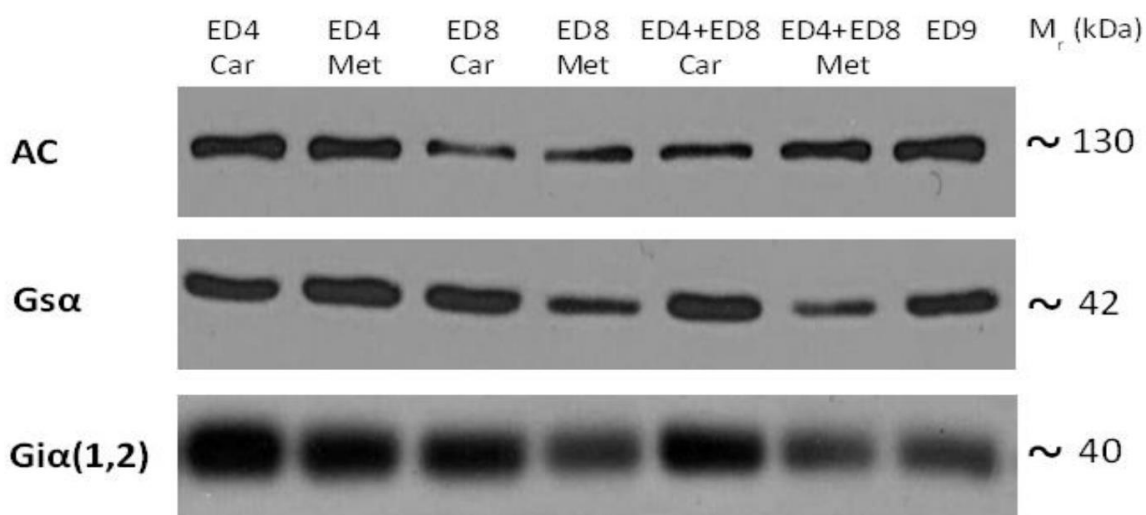
## Obrázek 15

Expresse adenylát-cyklázy a podjednotek G proteinu u vyvíjejícího se kuřecího embrya. Bílkoviny získané z membrán kardiomyocytů, z různých vývojových stádií embryí, rozděleny elektroforeticky, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a označeny specifickými protilátkami proti adenylát-cykláze izoformě A a  $\alpha$  podjednotce Gs a Gi (1,2) bílkoviny. Reprezentativní příklad ze tří provedených měření. Upraveno podle (Hejnova et al., 2014).



Obrázek 16

*Efekt beta-blokátorů na expresi adenylát-cyklázy a podjednotek G proteinu u kuřecího embryonálního srdce. Vzorky bílkovin membrány kardiomyocytů získané z ED9 stádia u embryí s metoprololem (Met) nebo carvedilolem (Car) v ED4, ED8 a ED4+ED8 stádiu a u kontrolní skupiny. Bílkoviny získané z membrány kardiomyocytů byly elektroforeticky rozděleny, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a označeny specifickými protilátkami proti 5 izoformě adenylát-cyklázy a  $\alpha$  podjednotek Gs a Gi (1,2) bílkoviny. Reprezentativní příklad ze tří provedených měření. Upraveno podle (Hejnova et al., 2014).*



#### 2.2.4 Diskuze

Za patologických stavů může být funkce srdce příznivě ovlivňována podáním léků ze skupiny beta-blokátorů. Existují však práce, dokazující potenciálně negativní účinek beta-blokátorů na embryonální a fetální vývoj, pokud jsou podávány těhotným ženám (Lydakís et al., 1999). V naší práci jsme hodnotili vliv dvou často užívaných beta-blokátorů, metoprololu a carvedilolu, na klíčové komponenty a funkci adenylát-cyklázové signalizační kaskády v průběhu vývoje kuřecího embrya. Cílem bylo rozlišit

vliv jednotlivých komponent a objasnit jejich role vedoucí ke zvýšení citlivosti kuřecího embryonálního srdce k vlivu beta-blokátorů v pozdějších stádiích jejich vývoje, jak jsme pozorovali v našem předchozím experimentu (Kockova et al., 2013).

Naše současná experimentální data ukazují, že ačkoliv dochází k poklesu predominantní srdeční izoformy adenylát-cyklázy (adenylát-cykláza 5) v průběhu vývojového období embrya mezi ED12 až ED18, aktivita enzymu zůstává stabilní v průběhu celého prenatalního vývoje kuřecího embrya, což je ve shodě s předchozími pracemi (Alexander et al., 1982; Halvorsen and Nathanson, 1984). Paralelně těmto nálezům jsme zjistili vzestup Gs a Gi proteinu v období mezi ED4 a ED8 embryonálního vývoje. Podobný vzestup srdečního Gi v průběhu časného vývoje kuřecího embrya prokázali také ostatní autoři (Halvorsen and Nathanson, 1984). Výsledky našich předchozích prací a také prací jiných autorů ukazují jasný pokles počtu beta-adrenergických receptorů v myokardu v průběhu prenatalní ontogeneze (Phillips et al., 1986; Stewart et al., 1986; Kockova et al., 2013). Na základě všech těchto poznatků se domníváme, že vývoj počtu beta-adrenergických receptorů, G proteinů a adenylát-cyklázy není v průběhu vývoje zcela jednoduše koordinován. Je také důležité zmínit, že částečný pokles beta-adrenergických receptorů v pozdějších stádiích vývoje embrya byl následován jen částečně sníženou aktivitou isoprenalinem indukované aktivity adenylát-cyklázy. Tento údaj nutí pomyslet na možnost tzv. receptorové rezervy (nadbytečný počet receptorů), takže ne všechny beta-adrenergické receptory musí být nezbytně spojeny s adenylát-cyklázovou signalizační kaskádou a být schopny přenosu signálu na efektorový mechanismus. Již dříve bylo prokázáno, že receptorová rezerva beta-adrenergických receptorů výrazně kolísá v různých tkáních a také mezidruhově (Brown et al., 1992; Jackson and Nathanson, 1995; Dhein et al., 2000). Na základě těchto informací lze tedy předpokládat, že se na zvýšené citlivosti vůči lékům s beta-mimetickými účinky v pozdějších fázích vývoje podílí kvalitnější propojení beta-adrenergických receptorů se signalizační adenylát-cyklázovou kaskádou. Již v předchozí práci jsme pozorovali významný pokles v počtu beta-adrenergických receptorů u kuřecích embryí po podání beta-blokátorů na stádiu ED4 nebo ED8 nebo ED4+ED8 (Kockova et al., 2013). Výsledky současného výzkumu ukazují, že aplikace metoprololu a carvedilolu ve stádiu ED8, ale nikoliv ve stádiích ED4 nebo ED4+ED8, významně snižují aktivitu adenylát-cyklázy stimulované forskolinem. Bazální hodnoty či hodnoty adenylát-cyklázové aktivity stimulované isoprenalinem se však za těchto podmínek

signifikantně nelišily. Tato diskrepance může být alespoň částečně vysvětlena poklesem množství G proteinu, který byl zaznamenán u kuřecích embryí po podání beta-blokátorů ve ED8 stádiu. Forskolin zvyšuje aktivitu adenylát-cyklázy nejen přímým účinkem, ale také cestou aktivace Gs proteinu (Alousi et al., 1991) a proto i nižší množství G proteinu může odpovídat za nižší účinek tohoto preparátu na stimulaci adenylát-cyklázy.

Současné poznatky ukazují, že se regulační mechanismy zapojené do beta-adrenergní signalizační kaskády mohou zásadně lišit nejen v průběhu dozrávání jedince, ale také v průběhu prenatálního vývoje jedince (Slotkin et al., 2003). Zatímco v dospělosti je receptorová signalizace řízená cestou procesu desenzitizace a down-regulace, agonisty-indukovaná stimulace beta-adrenergních receptorů embryonální tkáně nedokáže snížit jejich citlivost a naopak jejich odpověď na stimulaci zesiluje. Tyto specifické mechanismy, které zahrnují adaptační změny na úrovni receptorů, G proteinů a adenylát-cyklázy jsou nezbytné pro fyziologické změny v průběhu prenatálního života a v přípravě na další vývoj post partum. Jak již bylo zmíněno, některá vývojová stadia jsou citlivější k potenciálně škodlivým účinkům beta-blokátorů, které mohou následně negativně ovlivňovat vývoj srdce a jeho funkci (Venturini and Sparber, 2001; Garofolo et al., 2003; Portbury et al., 2003; Drake et al., 2006).

### **2.2.5 Závěr**

Tato naše práce prokazuje, že aplikace beta-blokátorů metoprololu a carvedilolu v první polovině embryonálního vývoje kuřete, významně ovlivňuje beta-receptorovou – adenylát-cyklázovou signalizační kaskádu. Pozorovali jsme, že beta-blokátory užívané především pro jejich antiarytmický efekt, mohou v některých případech negativně ovlivnit expresi beta-adrenergních receptorů, G proteinu a adenylát-cyklázy kardiomyocytů u vyvíjejícího se organismu, a přitom tyto komponenty představují klíčovou signalizační kaskádu potřebnou pro normální embryonální vývoj. Předepisují-li lékaři těhotným ženám tyto preparáty, měli by se o jejich potenciálně nežádoucích účincích řádně informovat.

## **2.3 Pětiletá retrospektivní analýza souboru pacientů dvou center s toxickou sérovou koncentrací digoxinu**

### **2.3.1 Cíl**

Digoxin je nejstarším lékem užívaným v kardiologii již více než 200 let a to především pro léčbu srdečního selhání. Podle doporučení American College of Cardiology - ACC a American Heart Association - AHA z roku 2005 (Hunt, 2005) a Doporučení Evropské kardiologické společnosti (European Society of Cardiology - ESC) z roku 2012 (McMurray et al., 2012b) pro léčbu akutního a chronického srdečního selhání, je digoxin doporučován pro úlevu symptomatologie a snížení počtu hospitalizací u pacientů se srdečním selháním. Evropská kardiologická společnost doporučuje udržovat sérovou hladinu digoxinu v rozmezí 0,8 – 1,5 nmol/l (0,6 – 1,2 ng/ml) jako optimální pro léčbu chronického srdečního selhání (Pfister and Schneider, 2009). Jim odpovídající doporučení ACC/AHA doporučují jako optimální sérovou hladinu digoxinu rozmezí 0,64 – 1,2 nmol/l (0,5 – 0,9 ng/ml) (Hunt, 2005). Sérová hladina digoxinu překračující hodnotu  $\geq 3,0$  nmol/l (2,5 ng/ml) je již považována za toxickou. Digoxin může být také vhodným lékem pro kontrolu tepové frekvence u pacientů s persistující fibrilací síní. Cílem naší studie byla analýza souboru pacientů s toxickou sérovou hladinou digoxinu. Pozornost byla věnována především lékovým interakcím a rozboru základních charakteristik pacientů v souboru, které mají potenciální vliv na rozvoj digoxinové toxicity, a to především ve vztahu k mortalitě.

### **2.3.2 Metodika**

Na základě údajů z databáze centrálního oddělení biochemie dvou fakultních nemocnic v Praze (Všeobecná fakultní nemocnice a Ústřední vojenská nemocnice) jsme získali soubor 222 pacientů interních oddělení v pětiletém časovém období od roku 2001 až 2005 včetně. Všech těchto 222 pacientů mělo toxickou sérovou hladinu digoxinu v hodnotách  $> 3.0$  nmol/ml. Ve stejném pětiletém období bylo na tato interní oddělení postupně přijato celkem 116,276 pacientů. Veškeré medicínské záznamy těchto 222 pacientů byly důsledně analyzovány zkušeným kardiologem. Pro

statistické hodnocení byl použit Fisherův exaktní test a metoda logistické regrese k posouzení souvislosti toxické hladiny digoxinu s jednotlivými charakteristikami jednotlivců v souboru. Studie vyhověla požadavkům Helsinské deklarace pro studie s pacienty.

### 2.3.3 Výsledky a diskuze

Základní charakteristika našeho souboru 222 pacientů s toxickou sérovou hladinou digoxinu přesahující hodnoty  $\geq 3,0$  nmol/ml je vyjádřena v Tabulce 3. Celková mortalita byla hodnocena v průběhu trvání hospitalizace pacienta, to znamená do jeho propuštění z nemocnice, a byla celkem 8,1%. Z toho kardiovaskulární mortalita, která byla prokazatelně v souvislosti s toxicitou digoxinu, dosáhla v celém souboru 1,8%. Při studiu dalších přidružených onemocnění jednotlivých pacientů v našem souboru lze z relevantních údajů zmínit, že jen 14% pacientů mělo normální funkci ledvin vyjádřeno hodnotou clearance kreatininu  $\geq 60$  ml/min. Statisticky signifikantním prediktorem mortality v našem souboru byla nízká hodnota clearance kreatininu s  $P=0,02$  (Odds Ratio 0,95), ale nikoliv sérová koncentrace kreatininu s  $P=0,15$  (Odds Ratio 1,00) jak je vyjádřeno v Tabulce 4. Toto naše zjištění jednoznačně podporuje rutinní kalkulaci clearance kreatininu s pomocí Cockcroftovy-Gaultovy rovnice namísto posuzování funkce ledvin pouze na základě sérové koncentrace kreatininu (Cockcroft and Gault, 1976). Pozitivní prediktivní hodnota nízké clearance kreatininu ve vztahu k mortalitě pacientů v našem souboru může být vysvětlena známými farmakodynamickými charakteristikami digoxinu. Asi 70% digoxinu je z lidského organismu vylučováno v původní formě pomocí aktivní funkce ledvin. To platí jen u těch pacientů, kde je zachována normální funkce ledvin (Opie, 2005).

Tabulka 3

| Tabulka 3 Charakteristika souboru   |         |          |   |
|-------------------------------------|---------|----------|---|
| Charakteristika                     | Počet   | pacientů | v |
|                                     | souboru | n=222    |   |
| Věk (roky)                          | 77,6    | (9,3)    |   |
| Ženské pohlaví <i>n</i> (%)         | 130     | (59)     |   |
| Váha (kg)                           | 72,8    | (16,3)   |   |
| K <sup>+</sup> v séru (mmol/l)      | 4,6     | (0,8)    |   |
| Kreatinin v séru (μmol/l)           | 199,4   | (139,2)  |   |
| Clearance kreatininu (ml/min)       | 35,9    | (22,6)   |   |
| Denní dávka digoxinu (mg)           | 0,195   | (0,100)  |   |
| Podání digoxinu per os <i>n</i> (%) | 184     | (73)     |   |
| Hladina digoxinu v séru (nmol/l)    | 4,5     | (2,2)    |   |
| Ejekční frakce levé komory (%)      | 42,4    | (13,7)   |   |

Data jsou uváděna jako průměrné hodnoty +/- SMODCH případně jako počet a procentuálně zastoupení nemocných.

Tabulka 4

| Tabulka 4 Riziko mortality v celém souboru |            |             |                         |
|--|------------|-------------|-------------------------|
| Charakteristika                            | Odds Ratio | p value     | 95% confidence interval |
| Věk  | 1,02       | 0,61        | (0,948-1,096)           |
| Pohlaví                                    | 2,35       | 0,16        | (0,709-7,820)           |
| Tělesná hmotnost                           | 0,97       | 0,22        | (0,932-1,017)           |
| Sérová hladina K <sup>+</sup>              | 1,17       | 0,63        | (0,616-2,217)           |
| Clearance kreatininu                       | 0,95       | <b>0,02</b> | (0,916-0,992)           |
| Denní dávka digoxinu                       | 0,24       | 0,60        | (0,001-46,781)          |
| Nitrožilní podání digoxinu                 | 3,60       | 0,187       | (0,573-24,119)          |
| Hladina digoxinu v séru                    | 0,90       | 0,52        | (0,656-1,236)           |
| Ejekční frakce levé komory                 | 0,97       | 0,07        | (0,929-1,003)           |

Analýza současně podávané medikace v našem souboru ukázala, že 64% pacientů užívalo alespoň jeden preparát se známou lékovou interakcí s digoxinem, která vede ke zvýšení jeho sérové hladiny. Dokonce 7% pacientů užívalo tři a více takovýchto léků současně. Všechny potenciální lékové interakce v našem souboru jsme detailně analyzovali také ve vztahu k mortalitě či přežívání. Zjistili jsme statisticky signifikantní pozitivní korelaci mezi užíváním léku ze skupiny angiotenzin konvertujícího enzymu a blokátoru angiotenzinového receptoru (ACEI/ARB) a přežíváním. Tyto dvě lékové skupiny měly v našem souboru protektivní účinek, neboť mortalita u pacientů bez této medikace byla 13,46% a mortalita ve skupině pacientů léčených preparáty ze skupiny ACEI/ARB byla 3,37%. Tento rozdíl je statisticky významný ( $p=0,01$ ) viz Tabulka 5. Tyto dvě skupiny pacientů ať již s či bez léčby preparáty ACEI/ARB se od sebe jinak ničím statisticky významně nelišily. Rozdíl nebyl ve věku (77 průměrný věk versus 78 let), v ejekční frakci levé komory (s léčbou 41% versus bez léčby 45%), sérově hladině draslíku (4,7 mmol/l u ACEI/ARB či 4,5 mmol/l bez ACEI/ARB), v hodnotě clearance kreatininu (34,8 ml/min u ACEI/ARB a 34,1 ml/min bez ACEI/ARB). Zaznamenali jsme vyšší počet pacientů léčených intravenózně aplikovaným digoxinem u skupiny pacientů léčených současně ACEI/ARB preparáty – 27% versus 8% u pacientů bez současné léčby ACEI/ARB.

Ochranný účinek ACEI/ARB může být vysvětlen také jejich schopností mírně zadržovat v lidském organismu draslík, ačkoliv v našem souboru rozdíl v sérové koncentraci draslíku nebyl statisticky signifikantně rozdílný a jeho hodnotu tedy nemůžeme považovat za prediktor dalšího vývoje stavu. Dále přichází v úvahu potenciálně antiarytmický efekt ACEI/ARB.

Zaznamenali jsme také statistický trend nižší mortality u pacientů současně léčených medikamenty ze skupiny beta-blokátorů. Mortalita ve skupině pacientů léčených těmito preparáty byla 3,03% zatímco ve skupině neléčené beta-blokátory byla mortalita 10,67%, což představuje statický trend s  $P=0,07$  viz Tabulka 3. Pro ostatní léky běžně užívané v moderní kardiologii jako jsou kyselina acetylsalicylová, furosemid, hydrochlorothiazid, statinové preparáty, warfarin, které se vyskytly v analyzovaném souboru, jsme žádnou další statisticky signifikantní závislost nenalezli, viz Tabulka 5.



Tabulka 5

| Tabulka 5 Analýza současně podávaných léků bez známé interakce s digoxinem |                    |          |                   |                     |             |  |
|--|--------------------|----------|-------------------|---------------------|-------------|--|
| Léky bez známé interakce   | Počet pacientů (n) | léčených | Mortalita s % (n) | Mortalita bez % (n) | P=          |  |
| Kys. acetylsalicylová  | 70                 |          | 7,14 (5)          | 8,84 (13)           | 0,80        |  |
| Hydrochlorothiazid   | 30                 |          | 3,33 (1)          | 9,14 (17)           | 0,48        |  |
| Furosemid  | 132                |          | 8,33 (11)         | 8,33 (7)            | 1,00        |  |
| ACEI/ARB   | 112                |          | 3,57 (4)          | 13,46 (14)          | <b>0,01</b> |  |
| Beta-blokátory   | 66                 |          | 3,03 (2)          | 10,67 (16)          | 0,07        |  |
| Statiny  | 31                 |          | 6,45 (2)          | 8,65 (16)           | 1,00        |  |
| Warfarin   | 36                 |          | 5,56 (2)          | 8,89 (16)           | 0,74        |  |

Dále jsme neprokázali žádnou statisticky signifikantní závislost mezi léky, které mají známou přímou lékovou interakci s digoxinem, například amiodaron, carvedilol, verapamil, spironolacton, omeprazol, makrolidová antibiotika, a mortalitou viz Tabulka 6.

Tabulka 6

| Tabulka 6 Analýza léků se známou přímou interakcí s digoxinem |                    |              |                   |                     |      |  |
|---|--------------------|--------------|-------------------|---------------------|------|--|
| Léky s interakcí s digoxinem                                  | Počet pacientů (n) | léčených (n) | Mortalita s % (n) | Mortalita bez % (n) | P=   |  |
| Amiodaron   | 49                 |              | 6,12 (3)          | 8,98 (15)           | 0,77 |  |
| Carvedilol  | 29                 |              | 6,90 (2)          | 8,56 (16)           | 1,00 |  |
| Makrolidová antibiotika                                       | 2                  |              | 0,00 (0)          | 8,41(18)            | 1,00 |  |
| Verapamil   | 22                 |              | 0,00 (0)          | 9,28 (18)           | 0,23 |  |
| Spironolacton   | 59                 |              | 8,47 (5)          | 8,28 (13)           | 1,00 |  |
| Omeprazol   | 59                 |              | 6,78 (4)          | 8,92 (14)           | 0,79 |  |

### **2.3.4 Závěr**

Digoxinová toxicita je v současné kardiologii relativně vzácná, ale za to je spojena s vysokou mortalitou. Na základě našich dat je typickým pacientem s digoxinovou toxicitou jedinec pokročilého věku, s nízkou tělesnou hmotností (častější u žen), s renální insuficiencí a s mnohočetnou medikamentózní léčbou. Pacienti se sníženou hodnotou kreatinin clearance, s nižší systolickou funkcí levé komory a ti, kteří jsou léčeni nitrožilní aplikací digoxinu, mají vyšší riziko mortality. Lékové interakce či souběžná medikamentózní léčba riziko mortality u pacientů s digoxinovou toxicitou dále nezvyšují a současná léčba ACEI/ARB a beta-blokátory může mít naopak protektivní efekt.

Hlavní limitací naší studie je její retrospektivní charakter a současně také absence kontrolní skupiny. Protože je však počet analyzovaných záznamů s kompletními daty pacientů vysoký, a to zvláště především z hlediska souběžné medikamentózní terapie, domníváme se, že je naše analýza přínosem pro další klinickou praxi.

## **2.4 Ibutilidem navozená kardioverze fibrilace síní v těhotenství**

### **2.4.1 Úvod**

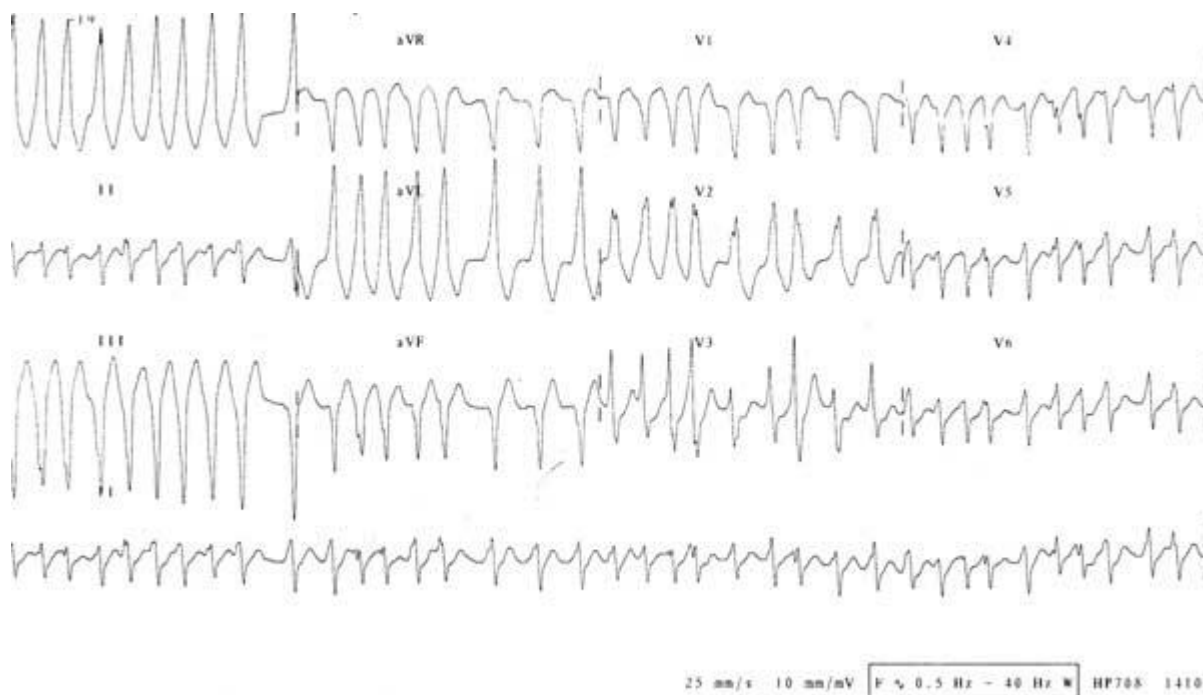
Ačkoliv je incidence fibrilace síní v těhotenství velmi nízká, přestavuje její trvání a léčba riziko ohrožení matky i plodu. Elektrická kardioverze, která je bezpečnou metodou léčby u dospělých, přestavuje v těhotenství zátěž pro plod v důsledku působení elektrického výboje a hluboké analgosedaci, která je pro výkon nezbytná. Stále je tedy nutno hledat další alternativy řešení fibrilace síní u těhotných žen. Jednou z možných vhodných metod může být kardioverze navozená ibutilidem fumarátem. Jedná se o lék v této indikaci velmi účinný a s velmi krátkým poločasem účinku 2-4 hodin. Jediná dostupná data týkající se studia nežádoucích vlivů ibutilid fumarátu na plod pocházejí z experimentu na potkanních embryích a hovoří v jeho neprospěch. Při dlouhodobém působení více než čtyřnásobku běžné dávky užívané v klinické praxi měl ibutilid fumarát teratogenní účinky (Marks and Terry, 1996; Danielsson et al., 2001). Ibutilid fumarát je pro účely farmakologické kardioverze podáván maximálně dvakrát, vždy v 10 minutové nitrožilní infúzi, a jeho poločas je 2-4 hodiny. Domníváme se proto, že jeho užití v těhotenství přestavuje racionální a relativně bezpečnou metodu akutní léčby fibrilace či flutteru síní.

### 2.4.2 Kazuistika 1

27 letá žena, bez anamnézy kardiologického onemocnění, byla urgentně vyšetřována pro náhle vzniklé palpitace ve 30. týdnu těhotenství. Její předchozí těhotenství proběhlo zcela bez komplikací. Při fyzikálním vyšetření byla její tepová frekvence v rozmezí 180-200/min, krevní tlak byl 90/50 mmHg. Gynekologické vyšetření potvrdilo 30. týden normální těhotenství a tepová frekvence plodu byla 152/min. Na elektrokardiogramu byla diagnostikována fibrilace síní s rychlou komorovou odpovědí (Obrázek 17). Echokardiografické vyšetření ukázalo normální nález na srdečních oddílech a normální funkci chlopní. Byl podán 1 gram magnesium sulfátu nitrožilně a ten byl následován 10-ti minutovou infúzí 0,87 mg ibutilidu nitrožilně a stejná dávka ibutilidu byla aplikována opětovně za 30 minut. Po několika minutách došlo k verzi fibrilace síní na sinusový rytmus a klidový elektrokardiogram pacientky ukázal krátký PQ interval a delta vlnu typického Wolff-Parkinson-Whitova (WPW) syndromu. Do domácí péče byla propuštěna s léčbou flecainidem v malé dávce 100 mg dvakrát denně a s malou dávkou atenololu 50 mg per orálně. Žádné další arytmie se po zbytek těhotenství neobjevily a porod proběhl v termínu a bez komplikací. Narozené dítě bylo zcela zdravé. O dva měsíce později postoupila tato žena úspěšnou radiofrekvenční ablací dvou pravostranných akcesorních spojek inferoseptálně a medikace byla zcela vysazena. 13 měsíců po výkonu byla pacientka asymptomatická i bez medikamentózní terapie.

Obrázek 17

12-ti svodové EKG s fibrilací síní s velmi rychlým převodem na komory cestou akcesorní dráhy. Upraveno podle (Kockova et al., 2007).



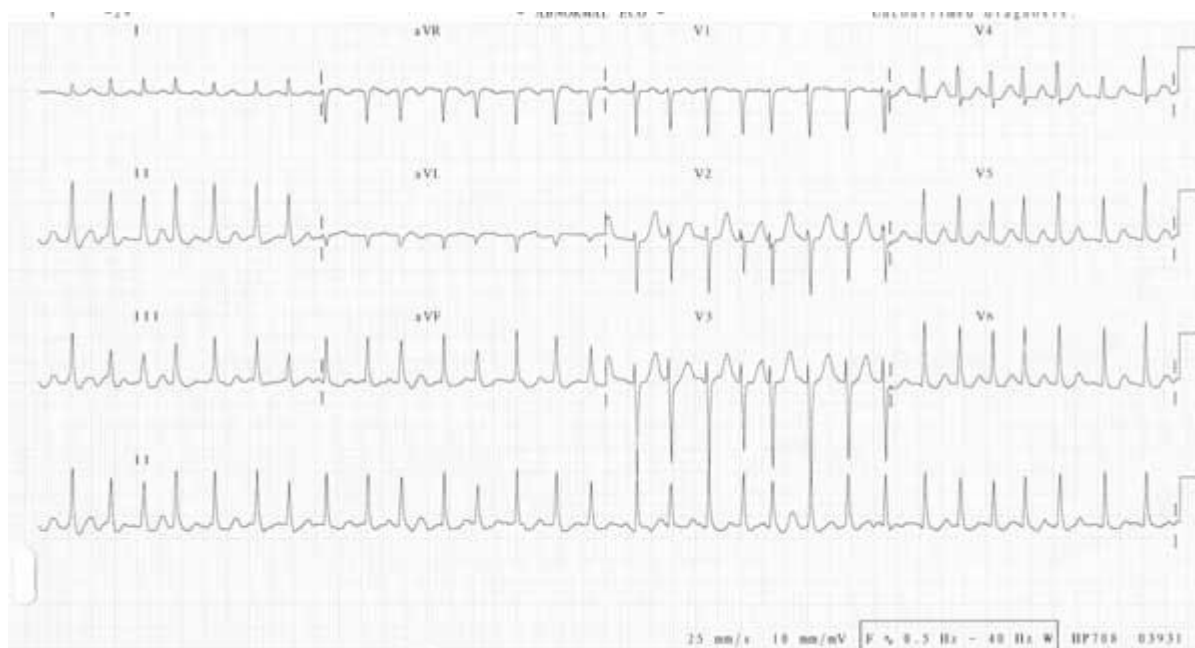
### 2.4.3 Kazuistika 2

34 letá žena byla vyšetřena pro 38 hodin trvající anamnézu palpitací provázených slabostí a epizodou presynkopy. Byla ve 23. týdnu těhotenství komplikovaném pouze přechodným vaginálním krvácením. Pacientka již měla anamnézu hypertrofické kardiomyopatie bez obstrukce výtokového traktu a v minulosti již byla léčena pro nesetrvanou komorovou tachykardií před dvěma lety. Proto byla léčena 5 mg bisoprololu denně per os. V průběhu elektrofyziologické studie před dvěma lety nebyla sice vyvolána komorová tachykardie, ale objevila se setrvalá fibrilace síní, která vyžadovala kardioverzi ibutilidem. Krátce před počítím přerušila pacientka léčbu bisoprololem. Fyzikální vyšetření ukázalo nepravidelný tep s frekvencí komorové odpovědi 180/min a krevní tlak byl 105/85 mmHg, neměla žádné známky srdečního selhávání. Děloha byla zvětšená a gynekologický nález odpovídal 23. týdnu těhotenství a tepová frekvence plodu byla 160/min. Na elektrokardiogramu byla zaznamenána fibrilace síní s komorovou odpovědí 183/min bez dalších patologických

nálezů (Obrázek 18). Byla přijata na jednotku intenzivní péče a nitrožilně byla aplikována dávka 1 g ibutilidu po předchozím podání 1 g magnesiumu sulfátu také nitrožilně. K verzi na sinusový rytmus došlo již po aplikaci 0.25 mg ibutilidu a sinusový rytmus přetrvával i po propuštění do domácí péče, které proběhlo následující den po kardioverzi. Předepsána jí byla dávka 50 mg atenololu/den. Po zbytek těhotenství se již arytmie neobjevily a pacientka porodila zdravé dítě v termínu.

**Obrázek 18**

*EKG s nálezem fibrilace síní s rychlou komorovou odpovědí. Upraveno podle (Kockova et al., 2007).*



#### 2.4.4 Diskuze

Ibutilid patří do III. třídy antiarytmických léků a byl schválen FDA v roce 1995 jako lék vhodný pro akutní verzi fibrilace či flutteru síní při nitrožilní aplikaci. Prodlužuje akční potenciál a refrakterní periodu v síňovém i komorové myokardu, v atrioventrikulárním uzlu a Hisově-Purkyňově systému (Murray, 1998). Ibutilid je zvláště vhodný pro

terminaci fibrilace a flutteru síní u pacientů s WPW syndromem, neboť prodlužuje refrakterní fázi v akcesorní dráze. Doporučená dávka je 1 mg pro 60 kg jedince aplikovaný během 10 ti minutové nitrožilní infúze. Druhá dávka může být podána za 10 minut. Po dobu následujících 4 hodin je nutná monitorace srdečního rytmu, protože se mohou objevit arytmie typu torsades de pointes, které vyžaduje elektrickou kardioverzi (asi  $\leq 4\%$  pacientů). Předchozí nitrožilní aplikace magnesium sulfátu snižuje proarytmické riziko ibutilidu a může zvýšit pravděpodobnost úspěšné verze.

V naší práci uvádíme dva případy těhotných žen se symptomatickou fibrilací síní s rychlou komorovou odpovědí. U žen ve fertilním věku je incidence fibrilace síní velmi nízká a spíše se objevuje u žen s již předchozím onemocněním srdce. Léčba této arytmie je v těhotenství problematická, neboť je zde riziko potenciálních nežádoucích účinků na plod. Běžný způsob léčby je provedení elektrické kardioverze v hluboké analgosedaci následované farmakoterapií, která předchází recidivě arytmie a antikoagulační terapií jako prevenci embolizační příhody. Ačkoliv se elektrická kardioverze jeví jako relativně bezpečná v průběhu těhotenství, její provedení nezůstává bez rizika a pro rodinu představuje i zvýšenou psychologickou zátěž. Ze zhruba 60 dokumentovaných elektrických kardioverzí u těhotných žen, byl dokumentován jeden případ úmrtí plodu, jeden případ těžké kontrakce děložního svalů a jeden případ ztráty variability srdeční frekvence plodu (Barnes et al., 2002). Ve všech třech případech bylo těhotenství ukončeno urgentně provedeným císařským řezem a zmíněné komplikace byly přisuzovány výhradně provedené elektrické kardioverzi. Z těchto důvodů by elektrická kardioverze měla být prováděna pouze v zařízeních s možností monitorace životních projevů plodu a s možností neodkladného provedení císařského řezu (Barnes et al., 2002).

Farmakologická kardioverze fibrilace síní je běžně prováděna v dospělé populaci s použitím různých léků, jako jsou amiodaron, ibutilid, flecainid a propafenon (Fuster et al., 2001). Procainamid a chinidin jsou také často užívány v této indikaci, ale jejich efekt je výrazně nižší (Fuster et al., 2001) a žádné pokusy na zvířatech sloužící k hodnocení teratogenicity ani u prokainamidu ani u chinidinu provedeny nebyly. Užití těchto antiarytmických preparátů nebylo v těhotenství systematicky studováno a s výjimkou amiodaronu, který je ve skupině D, byly tyto léky zařazeny do kategorie C

FDA. Léky jsou do této kategorie C zařazeny, pokud nebyly provedeny reprodukční studie na zvířatech či pokud nebyly provedeny adekvátní kontrolované studie u lidí. Tyto léky mohou být užity jen tehdy, pokud riziko z jejich podání plynoucí pro plod bude vyváženo příznivým účinkem pro matku (labeling, September 2, 2006). Zkušenost s užitím těchto preparátů je limitována malým počtem kazuistických případů (Doig et al., 1992; Mozo de Rosales et al., 1994; Carson et al., 2002). Větší zkušenosti jsou v oblasti farmakologické verze fetálních arytmií (Simpson and Sharland, 1998). Nedávno publikovaná doporučení pro léčbu arytmií označují chinidin jako lék vhodný pro farmakologickou verzi fibrilace síní u těhotných žen, protože narůstající zkušenosti hovoří pro jeho malé nežádoucí účinky na plod (Fuster et al., 2001).

Užití ibutilidu v těhotenství nebylo prozatím publikováno a jeho potenciální teratogenní účinky u lidského plodu nejsou známy. Ve studii NOAEL (no observed adverse effect level), jejímž cílem bylo posouzení míry teratogenicity ibutilidu na modelu potkanů, byl ibutilid podáván dlouhodobě a v relativně vysokých dávkách těhotným potkaním samicím (Marks and Terry, 1996). Mechanismus teratogenního účinku byl vysvětlován bloádou rychlé komponenty draslíkových kanálů (IKr) u embryonálního srdce, které způsobilo bradykardii a arytmiie a ve svém konečném důsledku vedla k rozvoji hypoxie (Danielsson et al., 2001). Teratogenicita spočívala s rozvojem orofaciálních rozštěpů a abnormalitách kardiovaskulárního systému, které byly společné u blokady IKr kanálů a hypoxického vlivu v jiném experimentu. Protože je ibutilid v případě farmakologické kardioverze u lidí podáván jen velmi krátkodobě a má velmi krátký poločas účinku (2-4 hodiny), a jeho dávka je navíc čtyřikrát nižší než v NOAEL, je velmi nepravděpodobné, že by mohla mít závažné nežádoucí účinky na plod. Tento předpoklad je zvláště pravděpodobný u žen léčených ibutilidem až po ukončení prvního trimestru, kdy už se teratogenicita projevuje spíše vzácně. Podání magnesiumu sulfátu v dávce 1 g nitrožilně se jeví jako zcela bezpečné v průběhu těhotenství, neboť je běžně podáván ve výrazně vyšších dávkách například při preeklamptickém stavu a jako lék s tokolytickými účinky. Přitom jeho nežádoucí vliv na plod zatím nebyl dokumentován.

U těhotných žen bychom měli léky předepisovat vždy jen po pečlivé rozvaze a pouze v případech, kdy je to opravdu nezbytné. Vzhledem k velmi příznivému účinku

ibutilidu na kardioverzi fibrilace či flutter síní a jeho malému riziku teratogenicity jsme v případě našich dvou pacientek, které obě překročili hranici prvního trimestru, vyhodnotili užití ibutilidu jako výhodnější než užití běžné používané léčby. Zvláště v případě první pacientky, kde byl rychlý účinek ibutilidu výhodnější, než výrazně pomalejší nástup účinku chinidinu. Navíc ibutilid nezpůsobuje hypotenzi, jako je tomu v případě procainamidu, neboť tato pacientka byla hypotenzní již v úvodu. Ibutilid má navíc mnohem vyšší pravděpodobnost úspěšnosti verze fibrilace síní, než je tomu u procainamidu. V případě druhé pacientky se užití ibutilidu jeví jako bezpečnější také s ohledem na diagnózu hypertrofické kardiomyopatie, neboť antiarytmika 1. třídy jsou nevhodná u pacientů se strukturální srdeční vadou pro jejich proarytmický vliv. Navíc měla tato pacientka anamnézu úspěšné kardioverze fibrilace síní s pomocí ibutilidu před dvěma lety v průběhu elektrofyziologické studie.

#### **2.4.5 Závěr**

Ibutilid měl v případě našich dvou pacientek příznivý efekt na fibrilaci síní ve smyslu kardioverze na sinusový rytmus, a jeho podání nebylo spojeno s výskytem nežádoucích účinků na matku či plod. Vzhledem k tomu, že je ibutilid vysoce efektivní pro verzi krátkodobě persistující fibrilace či flutteru síní, a riziko teratogenicity je velmi nízké, může představovat alternativu elektrické kardioverze u těhotných žen s tímto typem arytmie krátkého trvání.

### **3. ZÁVĚR**

V našem experimentu na kuřecích embryích jsme prokázali, že v průběhu vývojového období kuřecího embrya dochází postupně k poklesu počtu beta-adrenergických receptorů v myokardu a také k poklesu predominantní srdeční izoformy adenylát-cyklázy (adenylát-cykláza 5) a současně k vzestupu množství Gs a Gi proteinu. Přes uvedené změny jsme přitom prokázali jen částečně snížený efekt podání isoprenalinu v pozdějších stádiích vývoje. Toto pozorování si vysvětlujeme dvěma mechanismy, tzv. receptorovou rezervou a kvalitnějším spojením mezi receptorem a efektem – excitation-contraction coupling. Receptorovou rezervou myslíme nadbytečný počet beta-adrenergických receptorů v myokardu, z nichž jen část



je spojena s adenylát-cyklázovou signalizační kaskádou umožňující přenos signálu na efektorový mechanismus.

V další části našeho experimentu, ve kterém jsme se zaměřili na vliv antiarytmické léčby v období prenatalní vývoje srdce a kardiovaskulárního systému v experimentu na kuřecích embryích, jsme prokázali, že citlivost vůči negativně chronotropnímu účinku v experimentu zkoumaných preparátů metoprololu, carvedilolu a ivabradinu stoupá přímo-úměrně se stupněm embryonálního vývoje jedince. Podařilo se nám potvrdit naši hypotézu, ve které jsme předpokládali, že srdce kuřecího embrya nemá dostatečné kompenzační mechanismy, kterými by dokázalo zachovat dostatečný srdeční výdej i při farmaky navozené bradykardii. V našem experimentu jsme prokázali pokles srdečního výdeje odpovídajícího stupni farmaky navozené bradykardie, který se podílel na úmrtí embryí.

Dále se nám podařilo prokázat, že dlouhodobě podávané beta-blokátory v experimentu na kuřecích embryích mohou v některých případech negativně ovlivnit expresi beta-adrenergických receptorů, G proteinu a adenylát-cyklázy kardiomyocytů. Tyto komponenty představují klíčovou signalizační kaskádu potřebnou pro normální embryonální vývoj jedince.

Závěrem naší experimentální práce bychom chtěli zdůraznit, aby lékaři, kteří jsou stále častěji nuceni předepisovat léky těhotným ženám, byli maximálně obeznámeni s jejich potenciálně negativními účinky na vyvíjející se plod. Na základě našich zkušeností z experimentu se domníváme, že je metoprolol v běžných dávkách pravděpodobně bezpečný u těhotných žen. Ivabradine a carvedilol však mohou vést potenciálně k nežádoucím účinkům na plod a to právě na základě ovlivnění jeho tepové frekvence.

V klinické části naší práce referujeme užití ibutilid fumarátu použitého pro akutní farmakologickou kardioverzi fibrilace síní u dvou těhotných pacientek. Ibutilid fumarát měl v obou případech příznivý efekt na fibrilaci síní ve smyslu kardioverze na sinusový rytmus, a jeho podání nebylo spojeno s výskytem nežádoucích účinků na matku či plod. Protože je ibutilid fumarát vysoce efektivní v této indikaci a riziko teratogenicity je velmi nízké, domníváme se, že představuje dobrou alternativu elektrické kardioverze u těhotných žen s tímto typem arytmie krátkého trvání.

V další klinické části našeho výzkumu jsme se snažili objasnit jednotlivé příčiny a míru jejich podílu na rozvoji digoxinové toxicity u pacientů pokročilého věku. Ačkoliv se digoxinová toxicita i v našem souboru ukázala být vzácnou, byla spojena s vysokou mortalitou. Jedinci s digoxinovou toxicitou byli typicky pokročilého věku, měli nízkou tělesnou hmotnost (častěji ženy), měli renální insuficienci a byli současně léčeni řadou léčebných preparátů. Na základě naší práce, můžeme referovat vyšší riziko mortality v souvislosti s digoxinovou toxicitou u pacientů se sníženou hodnotou clearance kreatininu, s nižší systolickou funkcí levé komory a u pacientů léčených digoxinem nitrožilně. Současná léčba preparáty s již dříve prokázanou interakcí s digoxinem neměla na mortalitu pacientů signifikantní vliv. Léčba ACEI/ARB a beta-blokátory měla v našem souboru spíše protektivní efekt z hlediska mortality. Limitací naší práce je především její retrospektivní charakter a současně také absence kontrolní skupiny. Domníváme se však, že počet analyzovaných záznamů s kompletními daty pacientů je dostatečně vysoký, a to především z hlediska souběžné medikamentózní terapie, a proto naše analýza představuje přínos pro další klinickou praxi.

#### 4. LITERATURA

- Aanhaanen WT, Mommersteeg MT, Norden J, Wakker V, de Gier-de Vries C, Anderson RH, Kispert A, Moorman AF, Christoffels VM. 2010. Developmental origin, growth, and three-dimensional architecture of the atrioventricular conduction axis of the mouse heart. *Circ Res* 107:728-736.
- Alexander RW, Galper JB, Neer EJ, Smith TW. 1982. Non-co-ordinate development of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase in chick heart. *Biochem J* 204:825-830.
- Alousi AA, Jasper JR, Insel PA, Motulsky HJ. 1991. Stoichiometry of receptor-Gs-adenylate cyclase interactions. *Faseb J* 5:2300-2303.
- Arguello C, Alanis J, Pantoja O, Valenzuela B. 1986. Electrophysiological and ultrastructural study of the atrioventricular canal during the development of the chick embryo. *J Mol Cell Cardiol* 18:499-510.

- Babic Z, Gabric ID, Pintaric H. 2011. Successful primary percutaneous coronary intervention in the first trimester of pregnancy. *Catheter Cardiovasc Interv* 77:522-525.
- Balaji S, Harris L. 2002. Atrial arrhythmias in congenital heart disease. *Cardiol Clin* 20:459-468, vii.
- Barnes EJ, Eben F, Patterson D. 2002. Direct current cardioversion during pregnancy should be performed with facilities available for fetal monitoring and emergency caesarean section. *Bjog* 109:1406-1407.
- Blomstrom-Lundqvist C, Scheinman MM, Aliot EM, Alpert JS, Calkins H, Camm AJ, Campbell WB, Haines DE, Kuck KH, Lerman BB, Miller DD, Shaeffer CW, Stevenson WG, Tomaselli GF, Antman EM, Smith SC, Jr., Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Gregoratos G, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Russell RO, Jr., Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Burgos EF, Cowie M, Deckers JW, Garcia MA, Klein WW, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais JC, Oto A, Smiseth O, Trappe HJ. 2003. ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias--executive summary. a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the European society of cardiology committee for practice guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias) developed in collaboration with NASPE-Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol* 42:1493-1531.
- Boucek RJ, Murphy WP, Jr., Paff GH. 1959. Electrical and mechanical properties of chick embryo heart chambers. *Circ Res* 7:787-793.
- Braunwald E, Zipes DP, Libby P. 2001. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: Saunders:2281 p.
- Braunwald E, Zipes DP, Libby P, Bonow RO. 2005. *Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine* 7th edition.
- Brixius K, Bundkirchen A, Bolck B, Mehlhorn U, Schwinger RH. 2001. Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium. *Br J Pharmacol* 133:1330-1338.
- Brown L, Deighton NM, Bals S, Sohlmann W, Zerkowski HR, Michel MC, Brodde OE. 1992. Spare receptors for beta-adrenoceptor-mediated positive inotropic

- effects of catecholamines in the human heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 19:222-232.
- Brucato A, Frassi M, Franceschini F, Cimaz R, Faden D, Pisoni MP, Muscara M, Vignati G, Stramba-Badiale M, Catelli L, Lojaco A, Cavazzana I, Ghirardello A, Vescovi F, Gambari PF, Doria A, Meroni PL, Tincani A. 2001. Risk of congenital complete heart block in newborns of mothers with anti-Ro/SSA antibodies detected by counterimmunoelectrophoresis: a prospective study of 100 women. *Arthritis Rheum* 44:1832-1835.
- Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, Hindricks G, Kirchhof P. 2012. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 33:2719-2747.
- Carson MP, Fisher AJ, Scorza WE. 2002. Atrial fibrillation in pregnancy associated with oral terbutaline. *Obstet Gynecol* 100:1096-1097.
- Cockcroft DW, Gault MH. 1976. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41.
- Copel JA, Liang RI, Demasio K, Ozeren S, Kleinman CS. 2000. The clinical significance of the irregular fetal heart rhythm. *Am J Obstet Gynecol* 182:813-817; discussion 817-819.
- Culver NG, Fischman DA. 1977. Pharmacological analysis of sympathetic function in the embryonic chick heart. *Am J Physiol* 232:R116-123.
- Danielsson BR, Skold AC, Azarbayjani F. 2001. Class III antiarrhythmics and phenytoin: teratogenicity due to embryonic cardiac dysrhythmia and reoxygenation damage. *Curr Pharm Des* 7:787-802.
- Dhein S, Rohnert P, Markau S, Kotchi-Kotchi E, Becker K, Poller U, Osten B, Brodde OE. 2000. Cardiac beta-adrenoceptors in chronic uremia: studies in humans and rats. *J Am Coll Cardiol* 36:608-617.
- Doig JC, McComb JM, Reid DS. 1992. Incessant atrial tachycardia accelerated by pregnancy. *Br Heart J* 67:266-268.
- Drake VJ, Koprowski SL, Hu N, Smith SM, Lough J. 2006. Cardiogenic effects of trichloroethylene and trichloroacetic acid following exposure during heart specification of avian development. *Toxicol Sci* 94:153-162.

- Dunnigan A, Hu N, Benson DW, Jr., Clark EB. 1987. Effect of heart rate increase on dorsal aortic flow in the stage 24 chick embryo. *Pediatr Res* 22:442-444.
- Ebert SN, Thompson RP. 2001. Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res* 88:117-124.
- Eghtesady P, Michelfelder EC, Knilans TK, Witte DP, Manning PB, Crombleholme TM. 2011. Fetal surgical management of congenital heart block in a hydropic fetus: lessons learned from a clinical experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 141:835-837.
- Eronen M. 1997. Outcome of fetuses with heart disease diagnosed in utero. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 77:F41-46.
- Ferrero S, Colombo BM, Ragni N. 2004. Maternal arrhythmias during pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 269:244-253.
- Fuster V, Ryden LE, Asinger RW, Cannom DS, Crijns HJ, Frye RL, Halperin JL, Kay GN, Klein WW, Levy S, McNamara RL, Prystowsky EN, Wann LS, Wyse DG, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK, Russell RO, Smith SC, Jr., Alonso-Garcia A, Blomstrom-Lundqvist C, de Backer G, Flather M, Hradec J, Oto A, Parkhomenko A, Silber S, Torbicki A. 2001. ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation) Developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 104:2118-2150.
- Garofolo MC, Seidler FJ, Cousins MM, Tate CA, Qiao D, Slotkin TA. 2003. Developmental toxicity of terbutaline: critical periods for sex-selective effects on macromolecules and DNA synthesis in rat brain, heart, and liver. *Brain Res Bull* 59:319-329.
- Gonzalez MD, Contreras LJ, Jongbloed MR, Rivera J, Donahue TP, Curtis AB, Bailey MS, Conti JB, Fishman GI, Schalij MJ, Gittenberger-de Groot AC. 2004. Left atrial tachycardia originating from the mitral annulus-aorta junction. *Circulation* 110:3187-3192.

- Gourdie RG, Harris BS, Bond J, Justus C, Hewett KW, O'Brien TX, Thompson RP, Sedmera D. 2003. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:46-57.
- Halvorsen SW, Nathanson NM. 1984. Ontogenesis of physiological responsiveness and guanine nucleotide sensitivity of cardiac muscarinic receptors during chick embryonic development. *Biochemistry* 23:5813-5821.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.
- Hejnova L, Hahnova K, Kockova R, Svatunkova J, Sedmera D, Novotny J. 2014. Adenylyl cyclase signaling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs. *Biomed Res Int* 2014:463123.
- Higgins D, Pappano AJ. 1979. A histochemical study of the ontogeny of catecholamine-containing axons in the chick embryo heart. *J Mol Cell Cardiol* 11:661-668.
- Hildreth V, Anderson RH, Henderson DJ. 2009. Autonomic innervation of the developing heart: origins and function. *Clin Anat* 22:36-46.
- Hirota A, Kamino K, Komuro H, Sakai T. 1987. Mapping of early development of electrical activity in the embryonic chick heart using multiple-site optical recording. *J Physiol* 383:711-728.
- Huang WL, Beazley LD, Quinlivan JA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 1999. Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol* 94:213-218.
- Huhta JC. 2005. Fetal congestive heart failure. *Semin Fetal Neonatal Med* 10:542-552.
- Hunt SA. 2005. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 46:e1-82.
- Jackson DA, Nathanson NM. 1995. Subtype-specific regulation of muscarinic receptor expression and function by heterologous receptor activation. *J Biol Chem* 270:22374-22377.
- Jaeggi ET, Nii M. 2005. Fetal brady- and tachyarrhythmias: new and accepted diagnostic and treatment methods. *Semin Fetal Neonatal Med* 10:504-514.

- Jaeggi ET, Silverman ED, Laskin C, Kingdom J, Golding F, Weber R. 2011. Prolongation of the atrioventricular conduction in fetuses exposed to maternal anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies did not predict progressive heart block. A prospective observational study on the effects of maternal antibodies on 165 fetuses. *J Am Coll Cardiol* 57:1487-1492.
- Joglar JA, Page RL. 2001. Antiarrhythmic drugs in pregnancy. *Curr Opin Cardiol* 16:40-45.
- Jongbloed MR, Schaliij MJ, Poelmann RE, Blom NA, Fekkes ML, Wang Z, Fishman GI, Gittenberger-De Groot AC. 2004. Embryonic conduction tissue: a spatial correlation with adult arrhythmogenic areas. *J Cardiovasc Electrophysiol* 15:349-355.
- Kerzner LS, Stonestreet BS, Wu KY, Sadowska G, Malee MP. 2002. Antenatal dexamethasone: effect on ovine placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and fetal growth. *Pediatr Res* 52:706-712.
- Kirby ML. 2007. Innervation of the developing heart. *Cardiac Development*, Oxford University Press:179-197.
- Kockova R, Kocka V, Kiernan T, Fahy GJ. 2007. Ibutilide-induced cardioversion of atrial fibrillation during pregnancy. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18:545-547.
- Kockova R, Svatunkova J, Novotny J, Hejnova L, Ostadal B, Sedmera D. 2013. Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304:H895-902.
- Kuznetsova T, Herbots L, Lopez B, Jin Y, Richart T, Thijs L, Gonzalez A, Herregods MC, Fagard RH, Diez J, Staessen JA. 2009. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in a general population. *Circ Heart Fail* 2:105-112.
- labeling PCC. September 2, 2006. <http://fda.gov/cder/handbook/categc.htm>.
- Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS. 2002. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 347:1397-1402.
- Lydakis C, Lip GY, Beevers M, Beevers DG. 1999. Atenolol and fetal growth in pregnancies complicated by hypertension. *Am J Hypertens* 12:541-547.
- Marks TA, Terry RD. 1996. Developmental toxicity of ibutilide fumarate in rats after oral administration. *Teratology* 54:157-164.
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY,

- Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. 2012a. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33:1787-1847.
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, Bonnet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Jung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P. 2012b. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14:803-869.
- McQuinn TC, Bratoeva M, Dealmeida A, Remond M, Thompson RP, Sedmera D. 2007. High-frequency ultrasonographic imaging of avian cardiovascular development. *Dev Dyn* 236:3503-3513.
- Meilitz A, Kucera P, de Ribaupierre Y, Raddatz E. 1998. Inhibition of bicarbonate transport protects embryonic heart against reoxygenation-induced dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 30:327-335.
- Mitchell JL, Cuneo BF, Etheridge SP, Horigome H, Weng HY, Benson DW. 2012. Fetal heart rate predictors of long QT syndrome. *Circulation* 126:2688-2695.
- Mommersteeg MT, Brown NA, Prall OW, de Gier-de Vries C, Harvey RP, Moorman AF, Christoffels VM. 2007a. Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res* 101:902-909.



- Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, Papaioannou VE, Brown NA, Harvey RP, Moorman AF, Christoffels VM. 2007b. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* 100:354-362.
- Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, Grobbee DE. 1999. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 20:447-455.
- Mozo de Rosales F, Moreno J, Bodegas A, Melchor JC, Fernandez LL, Aranguren G. 1994. Conversion of atrial fibrillation with ajmaline in a pregnant woman with Wolff-Parkinson-White syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 56:63-66.
- Mulder AL, Golde JM, Goor AA, Giussani DA, Blanco CE. 2000. Developmental changes in plasma catecholamine concentrations during normoxia and acute hypoxia in the chick embryo. *J Physiol* 527 Pt 3:593-599.
- Murray KT. 1998. Ibutilide. *Circulation* 97:493-497.
- Nii M, Hamilton RM, Fenwick L, Kingdom JC, Roman KS, Jaeggi ET. 2006. Assessment of fetal atrioventricular time intervals by tissue Doppler and pulse Doppler echocardiography: normal values and correlation with fetal electrocardiography. *Heart* 92:1831-1837.
- Novotny J, Bourova L, Kolar F, Svoboda P. 2001. Membrane-Bound and cytosolic forms of heterotrimeric G proteins in young and adult rat myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J Cell Biochem* 82:215-224.
- Opie LH, Gersh B.J. 2005. *Drugs for the Heart* 6th edition.
- Ostadal B, Janatova T, Krause EG, Pelouch V, Dusek J. 1987. Different effect of propranolol and verapamil on isoprenaline-induced changes in the chick embryonic heart. *Physiol Bohemoslov* 36:301-311.
- Ostadal B, Janatova T, Krause EG, Rychter Z, Pelouch V. 1982. Analysis of the cardiotoxic effect of isoproterenol in chick embryo. *J Physiol (Paris)* 78:867-869.
- Ostadal B, Pelouch V, Ostadalova I, Novakova O. 1995. Structural and biochemical remodelling in catecholamine-induced cardiomyopathy: comparative and ontogenetic aspects. *Mol Cell Biochem* 147:83-88.
- Ostadal B, Rychter Z, Rychterova. 1976. The action of isoproterenol on the chick embryo heart. *J Mol Cell Cardiol* 8:533-544.

- Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. 2006. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 355:251-259.
- Paff GH, Boucek RJ. 1975. Conal contribution to the electrocardiogram of chick embryo hearts. *Anat Rec* 182:169-173.
- Paff GH, Boucek RJ, Harrell TC. 1968. Observations on the development of the electrocardiogram. *Anat Rec* 160:575-582.
- Paff GH, Boucek RJ, Klopfenstein HS. 1964. Experimental Heart-Block in the Chick Embryo. *Anat Rec* 149:217-223.
- Pfister R, Schneider CA. 2009. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: application of natriuretic peptides. *Eur Heart J* 30:382-383; author reply 383.
- Phillips MT, Kirby ML, Stewart DE. 1986. Cyclic AMP in normal and sympathetically aneural chick hearts during development. *J Mol Cell Cardiol* 18:827-835.
- Portbury AL, Chandra R, Groelle M, McMillian MK, Elias A, Herlong JR, Rios M, Roffler-Tarlov S, Chikaraishi DM. 2003. Catecholamines act via a beta-adrenergic receptor to maintain fetal heart rate and survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H2069-2077.
- Raddatz C, Kucera P, Pibaupierre Y. 1997. Response of the embryonic heart to hypoxia and reoxygenation: an in vitro model. *Experimental and Clinical Cardiology* 2:128-134.
- Raddatz E, Thomas AC, Sarre A, Benathan M. 2011. Differential contribution of mitochondria, NADPH oxidases, and glycolysis to region-specific oxidant stress in the anoxic-reoxygenated embryonic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H820-835.
- Rajala GM, Kuhlmann RS, Kolesari GL. 1984. The role of dysrhythmic heart function during cardiovascular teratogenesis in epinephrine-treated chick embryos. *Teratology* 30:385-392.
- Rashba EJ, Zareba W, Moss AJ, Hall WJ, Robinson J, Locati EH, Schwartz PJ, Andrews M. 1998. Influence of pregnancy on the risk for cardiac events in patients with hereditary long QT syndrome. *LQTS Investigators. Circulation* 97:451-456.
- Reed KL. 1989. Fetal arrhythmias: etiology, diagnosis, pathophysiology, and treatment. *Semin Perinatol* 13:294-304.

- Rubin PC, Butters L, Low RA, Reid JL. 1982. Atenolol in the treatment of essential hypertension during pregnancy. *Br J Clin Pharmacol* 14:279-281.
- Ruijtenbeek K, De Mey JG, Blanco CE. 2002. The chicken embryo in developmental physiology of the cardiovascular system: a traditional model with new possibilities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R549-550; author reply R550-541.
- Salomon Y, Londos C, Rodbell M. 1974. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem* 58:541-548.
- Sandstrom B. 1978. Antihypertensive treatment with the adrenergic beta-receptor blocker metoprolol during pregnancy. *Gynecol Invest* 9:195-204.
- Sarre A, Lange N, Kucera P, Raddatz E. 2005. mitoKATP channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1611-1619.
- Sarre A, Maury P, Kucera P, Kappenberger L, Raddatz E. 2006. Arrhythmogenesis in the developing heart during anoxia-reoxygenation and hypothermia-rewarming: an in vitro model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17:1350-1359.
- Sarre A, Pedretti S, Gardier S, Raddatz E. 2010. Specific inhibition of HCN channels slows rhythm differently in atria, ventricle and outflow tract and stabilizes conduction in the anoxic-reoxygenated embryonic heart model. *Pharmacol Res* 61:85-91.
- Sedmera D. 2011. Function and form in the developing cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 91:252-259.
- Sedmera D, Grobety M, Reymond C, Baehler P, Kucera P, Kappenberger L. 1999a. Pacing-induced ventricular remodeling in the chick embryonic heart. *Pediatr Res* 45:845-852.
- Sedmera D, Kockova R, Vostarek F, Raddatz E. 2014. Arrhythmias in the developing heart. *Acta Physiol (Oxf)*.
- Sedmera D, Kucera P, Raddatz E. 2002. Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R379-388.
- Sedmera D, Pexieder T, Rychterova V, Hu N, Clark EB. 1999b. Remodeling of chick embryonic ventricular myoarchitecture under experimentally changed loading conditions. *Anat Rec* 254:238-252.

- Shrier A, Clay JR. 1982. Comparison of the pacemaker properties of chick embryonic atrial and ventricular heart cells. *J Membr Biol* 69:49-56.
- Schmidt KG, Ulmer HE, Silverman NH, Kleinman CS, Copel JA. 1991. Perinatal outcome of fetal complete atrioventricular block: a multicenter experience. *J Am Coll Cardiol* 17:1360-1366.
- Simpson JM, Sharland GK. 1998. Fetal tachycardias: management and outcome of 127 consecutive cases. *Heart* 79:576-581.
- Slotkin TA, Auman JT, Seidler FJ. 2003. Ontogenesis of beta-adrenoceptor signaling: implications for perinatal physiology and for fetal effects of tocolytic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 306:1-7.
- Srinivasan S, Strasburger J. 2008. Overview of fetal arrhythmias. *Curr Opin Pediatr* 20:522-531.
- Stewart DE, Kirby ML. 1985. Endogenous tyrosine hydroxylase activity in the developing chick heart: a possible source of extraneuronal catecholamines. *J Mol Cell Cardiol* 17:389-398.
- Stewart DE, Kirby ML, Aronstam RS. 1986. Regulation of beta-adrenergic receptor density in the non-innervated and denervated embryonic chick heart. *J Mol Cell Cardiol* 18:469-475.
- Stewart PA, Tonge HM, Wladimiroff JW. 1983. Arrhythmia and structural abnormalities of the fetal heart. *Br Heart J* 50:550-554.
- Strasburger JF, Wakai RT. 2010. Fetal cardiac arrhythmia detection and in utero therapy. *Nat Rev Cardiol* 7:277-290.
- Sugiyama T, Miyazaki H, Saito K, Shimada H, Miyamoto K. 1996. Chick embryos as an alternative experimental animal for cardiovascular investigations: stable recording of electrocardiogram of chick embryos in ovo on the 16th day of incubation. *Toxicol Appl Pharmacol* 138:262-267.
- Sulfi S, Timmis AD. 2006. Ivabradine -- the first selective sinus node I(f) channel inhibitor in the treatment of stable angina. *Int J Clin Pract* 60:222-228.
- Tazawa H, Suzuki Y, Musashi H. 1989. Simultaneous acquisition of ECG, BCG, and blood pressure from chick embryos in the egg. *J Appl Physiol* (1985) 67:478-483.
- Van Mierop LH. 1967. Location of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heartbeat. *Am J Physiol* 212:407-415.

- Vasilakis-Scaramozza C, Aschengrau A, Cabral HJ, Jick SS. 2013. Antihypertensive drugs and the risk of congenital anomalies. *Pharmacotherapy* 33:476-482.
- Vatner DE, Asai K, Iwase M, Ishikawa Y, Shannon RP, Homcy CJ, Vatner SF. 1999. Beta-adrenergic receptor-G protein-adenylyl cyclase signal transduction in the failing heart. *Am J Cardiol* 83:80H-85H.
- Venturini L, Sparber SB. 2001. Salicylate and cocaine: interactive toxicity during chicken mid-embryogenesis. *Free Radic Biol Med* 30:198-207.
- Verberne ME, Gittenberger-De Groot AC, Poelmann RE. 2000. Distribution of antigen epitopes shared by nerves and the myocardium of the embryonic chick heart using different neuronal markers. *Anat Rec* 260:335-350.
- Vergani P, Mariani E, Ciriello E, Locatelli A, Strobelt N, Galli M, Ghidini A. 2005. Fetal arrhythmias: natural history and management. *Ultrasound Med Biol* 31:1-6.
- Wachter SB, Gilbert EM. 2012. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology* 122:104-112.
- White AA. 1974. Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography. *Methods Enzymol* 38:41-46.
- Yakoob MY, Bateman BT, Ho E, Hernandez-Diaz S, Franklin JM, Goodman JE, Hoban RA. 2013. The risk of congenital malformations associated with exposure to beta-blockers early in pregnancy: a meta-analysis. *Hypertension* 62:375-381.
- Zamenhof S. 1989. Selective sensitive period in chick embryo: toxic effect of exogenous neurotransmitters. *Cytobios* 58:171-177.

## **PŘÍLOHA 1 - Identifikační záznam**

Kočková, Radka. *Vliv pozitivně inotropních a antiarytmických farmak na kardiovaskulární systém. [The impact of positive inotropic and antiarrhythmic drugs on cardiovascular system]*. Praha, 2014. Počet stran 128, počet příloh 3. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Školitelé: Prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc. a Prof. MUDr. David Sedmera, D.Sc.

## **PŘÍLOHA 2 - Souhrn prací autorky**

### **Práce s IF**

Sramko M, Peichl P, Wichterle D, Tintera J, Weichet J, Maxian R, Pasnisinova S, **Kockova R**, Kautzner J. Clinical value of assessment of left atrial late gadolinium enhancement in patients undergoing ablation of atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2015 Jan 20;179:351-7, **IF=5,509**

Sedmera D, **Kockova R**, Vostarek F, Raddatz E. Arrhythmias in the developing Heart. *Acta Physiol (Oxf).* 2014 Nov 1  
IF=4,251

Vecera J, Bartunek J, Vanderheyden M, Kotrc M, **Kockova R**, Penicka M. Three-dimensional echocardiography-derived vena contracta area at rest and its increase during exercise predicts clinical outcome in mild-moderate functional mitral regurgitation. *Circ J.* 2014 Oct 24;78(11):2741-9  
IF=3,685

Hejnova L, Hahnová K, **Kockova R**, Svatunkova J, Sedmera D, Novotny J. Adenylyl cyclase signalling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs. *Biomed Res Ing.* 2014 Jun; 2014:463125  
IF=2,706

**Kockova R**, Svatunkova J, Novotny J, Hejnova L, Ostadal B, Sedmera D. Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Mar 15;304(6):H895-902  
IF=3,626

Skvaril J, **Kockova R**, Danickova K, Sedlon P. Chronic radial artery occlusion after transradial catheterization. Re-canalization via an ipsilateral ulnar artery. Acta Cardiol 2012; 67(1): 367-70

IF=0,61

**Kockova R**, Skvaril J, Cernohous M, Maly M, Kocka V, Linhart A. Five year two center retrospective analysis of patients with toxic digoxin serum concentration. Int J Cardiol. 2011 Feb 3;146(3):447-8

IF=5,509

**Kockova R**, Kocka V, Kiernan T, Fahy GJ. Ibutilide-induced cardioversion of atrial fibrillation during pregnancy. J Cardiovasc Electrophysiol. 2007 May;18(5):545-7

IF=3,475

### **Práce bez IF**

**Kočková R**. Novinky v zobrazovacích metodách u srdečného selhání. Postgrad Med. 2014 April; 16(Příloha 1):13-21.



**PŘÍLOHA 3 – Kopie publikovaných prací se vztahem k tématu**  
Zachováno původní číslování stránek

## REVIEW

## Arrhythmias in the developing heart

D. Sedmera,<sup>1,2</sup> R. Kockova,<sup>2,3</sup> F. Vostarek<sup>2</sup> and E. Raddatz<sup>4</sup><sup>1</sup> Institute of Anatomy, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic<sup>2</sup> Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic<sup>3</sup> Department of Cardiology, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic<sup>4</sup> Department of Physiology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

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

**Abstract**

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

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

**Disturbances of cardiac rhythm in the human foetus**

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

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

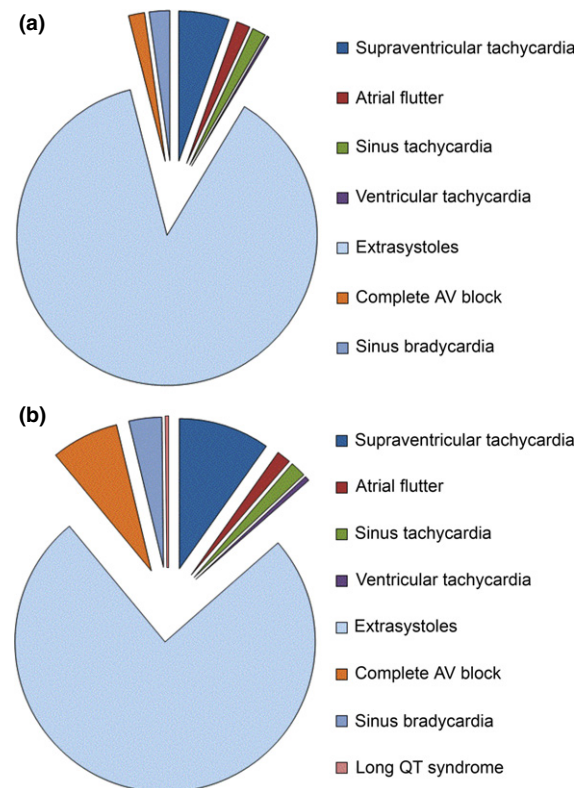
Using all three standard echocardiographic modalities (B-mode, M-mode and Doppler), we can assess atrial and ventricular contraction frequencies and their time relations. An equivalent for P wave on electrocardiogram is the A wave detected by pulse wave Doppler in mitral inflow or atrial wall motion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

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

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

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

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



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

None of these were associated with structural heart disease.

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

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

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

### Diagnosis, classification and management of foetal arrhythmias

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

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

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

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

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

### Foetal AV block

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

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

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

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

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

### Importance of the cardiac conduction system for the origin of arrhythmias

It is widely recognized in clinical practice that the cardiac conduction system (CCS) can be a focal point of arrhythmogenesis (Braunwald *et al.* 2001). This propensity was extensively analysed from developmental perspective by Jongbloed and associates (Jongbloed *et al.* 2004) using CCS-LacZ transgenic mouse model. Detailed analysis of the developing CCS was performed on hearts at embryonic day (ED) 9.5–15.5 stained for beta-galactosidase activity and co-stained with the myocardial marker HHF35 followed by three-dimensional reconstruction. CCS-lacZ expression detected by X-gal staining was observed in the sinoatrial node, left and right venous valves, septum spurium, right and left AV ring, His bundle, bundle branches, moderator band, Bachmann's bundle, left atrial posterior wall surrounding the pulmonary venous orifice and later on in the pulmonary vein wall. These data supported the idea that areas derived from the developing CCS may form the arrhythmogenic substrate in adult hearts.

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

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

### Genetic and epigenetic determination of the CCS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Spontaneously occurring arrhythmias in embryos

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

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

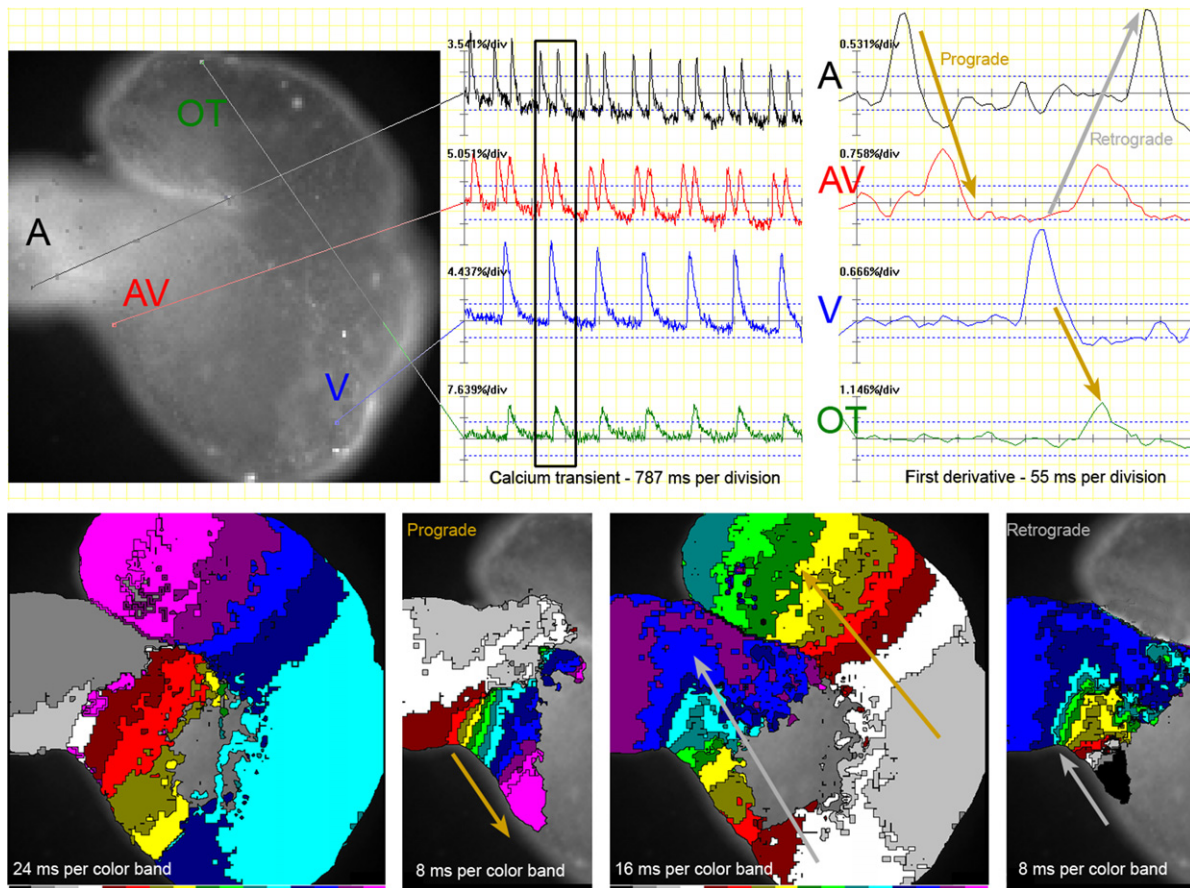
increased after isoproterenol stimulation with 6% incidence of ventricular ectopic rhythms. Addition of carbachol after isoproterenol caused dissociated antegrade and retrograde AV ring conduction in almost 10% of ED10.5–ED11.5 hearts. Re-entry persisting for multiple beats was also observed, but none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

### Genetic mouse models of arrhythmias

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

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

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



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

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

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

### Drug-induced arrhythmias in mammalian models

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

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

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



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

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

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

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

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

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

### Chick embryonic model

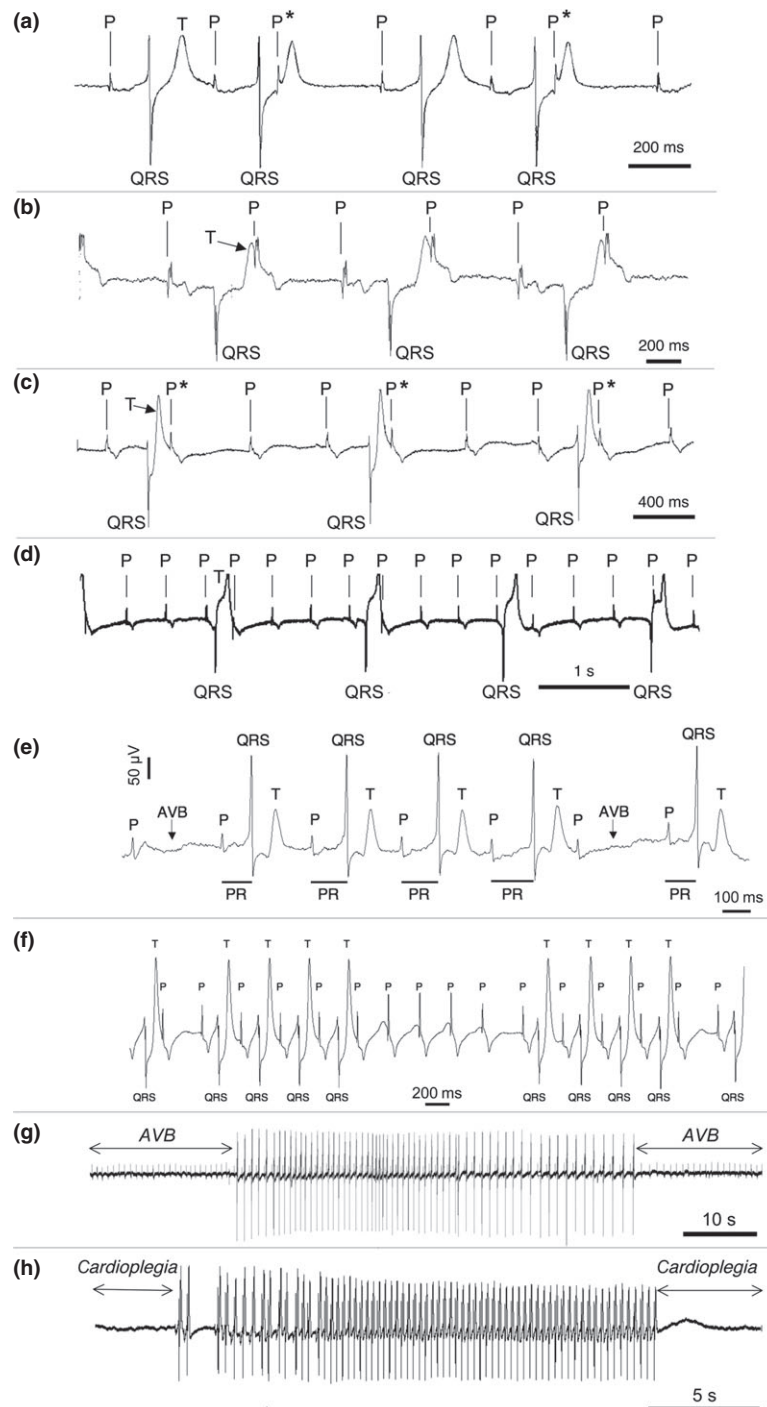
The cardiac electrical activity in the chick embryo has been investigated in pioneering works, *in vivo* (Van Mierop 1967, Rajala *et al.* 1984, Tazawa *et al.* 1989, Sugiyama *et al.* 1996), in the intact embryo (Hoff & Kramer 1939, Paff *et al.* 1964), the dissected heart (Paff *et al.* 1968, Paff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

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

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

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

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



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

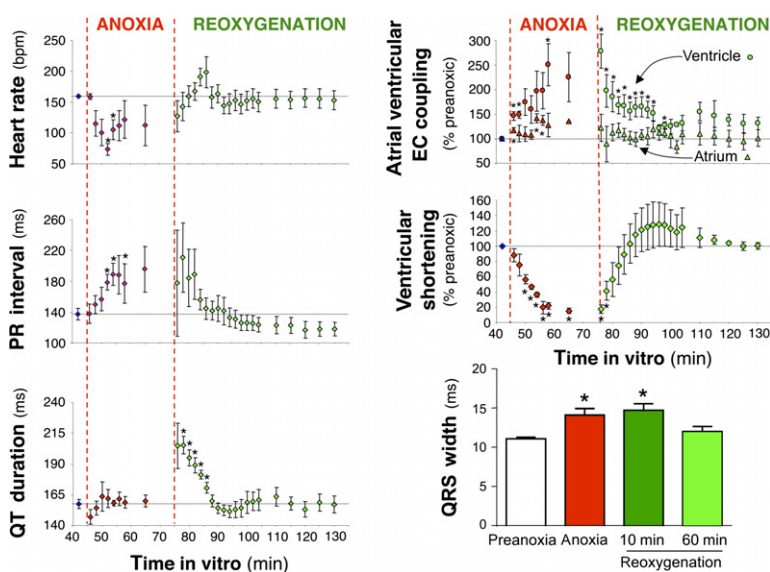
various cardiac drugs on the developing cardiovascular system. Isoproterenol at a teratogenic dose induced increased vascular resistance and reduced cardiac output (Clark *et al.* 1985), suggesting the presence of a functional adrenergic signalling system in the 4-day-old embryonic heart. On the other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

### Arrhythmias during anoxia–reoxygenation

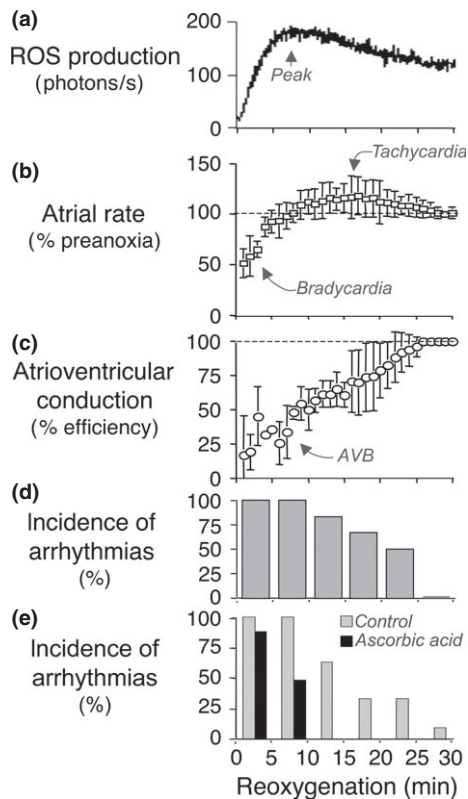
In the 4-day-old embryonic chick heart model (Raddatz *et al.* 1997, Sarre *et al.* 2006), the chrono-, dromo- and inotropic disturbances and the ultrastructural modifications (e.g. mitochondrial and nuclear swelling) induced by 30-min anoxia followed by 60-min reoxygenation are reversible within a period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

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

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



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



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

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

Acidosis (transition from pH 7.4 to 6.5), which can occur under prolonged anoxia, has negative chronotropic and inotropic effects, essentially characterized by intermittent atrial and ventricular activity (bursts). At pH 6.5, heart rate and AV conduction velocity remain significantly decreased, whereas ventricular shortening and contractility recover after 5 min. Under acidotic anoxia and during reoxygenation, inactivation of  $\text{HCO}_3^-$ -dependent mechanisms increases the incidence of arrhythmias. This indicates that in the anoxic-reoxygenated embryonic heart pH

regulation appears to depend predominantly on  $\text{HCO}_3^-$  availability and transport. The  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange (NHE) appears to be protective only under anoxia (Meilzt *et al.* 1998).

Under normoxia,  $\text{H}_2\text{O}_2$  differentially modulates ERK, p38 and JNK pathways in atria, ventricle and outflow tract (Gardier *et al.* 2010). Only exposure to a rather high concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $>500 \mu\text{M}$ ) leads to cardioplegia and markedly increased phosphorylation of ERK2 and p38 specifically in atria and outflow tract, without modifying the level of JNK phosphorylation. Moreover, during the post-anoxic reoxygenation, the phosphorylation level of ERK2 and p38 is altered specifically in the ventricle. During the early phase of post-anoxic reoxygenation, the Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway is activated by ROS, interacts with Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) proteins [(PI3K, Akt, Glycogen Synthase Kinase 3beta (GSK3beta)), Extracellular signal-Regulated Kinase 2 (ERK2)] and reduces arrhythmias (Pedretti & Raddatz 2011).

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

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

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

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

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

Adenosine is a crucial regulator of the developing cardiovascular system, derives from intra- and extracellular ATP degradation and accumulates in the myocardial interstitial fluid under hypoxia or ischaemia. In the embryonic heart, developing normally in an environment poor in oxygen, the physiological concentration of ADO is much higher than in the adult normoxic heart and ADO metabolism relies on ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (CD39), ecto-5'-nucleotidase (CD73), adenosine kinase (AdK) and ADO deaminase (ADA). CD39 and CD73 sequentially convert ATP to ADO and ADA convert ADO into inosine (INO). ADO is transported by equilibrative (ENT1,3,4) or concentrative (CNT3) transporters and interacts with the four subtypes of ADO receptors (AR), A<sub>1</sub>AR, A<sub>2A</sub>AR, A<sub>2B</sub>AR and A<sub>3</sub>AR (Robin *et al.* 2011, 2013). ADO or A<sub>1</sub>AR activation transiently provokes bradycardia, second-degree AVB and Mobitz type I second-degree AVB

(Wenckebach phenomenon). These transient pacemaking and AV conduction disturbances are induced by A<sub>1</sub>AR activation through concomitant stimulation of NADPH oxidase and phospholipase C (PLC), followed by downstream ROS-dependent activation of ERK2 and ROS-independent activation of PKC with Cav1.2 channel as a possible target (Robin *et al.* 2011). Furthermore, A<sub>1</sub>AR activation mediates also a proarrhythmic Ca<sup>2+</sup> entry through the TRPC3 channel functioning as a receptor-operated channel, via the stimulation of the PLC/DAG/PKC cascade in atrial and ventricular cardiomyocytes (Sabourin *et al.* 2012). Inactivation of ENTs (i) increases myocardial ADO level, (ii) provokes atrial ectopy and AVB, (iii) prolongs P wave and QT interval and (iv) increases ERK2 phosphorylation. Inhibition of CD73, MEK/ERK pathway or A<sub>1</sub>AR prevents these arrhythmias. Exposure to INO also causes arrhythmias associated with AVB and ERK2 phosphorylation, which are prevented by A<sub>1</sub>AR or A<sub>2A</sub>AR antagonists exclusively or by MEK/ERK inhibitor. Thus, disturbances of nucleoside metabolism and transport can lead to interstitial accumulation of ADO and INO and provoke arrhythmias in an autocrine/paracrine manner through A<sub>1</sub>AR and A<sub>2A</sub>AR stimulation and ERK2 activation (Robin *et al.* 2013).

### Pathogenesis of autoimmunity-caused congenital heart block

It is well recognized that maternal antibodies causing lupus pass the placenta and can induce prenatal or congenital heart block (CHB, reviewed in (Buyon & Clancy 2003)). Current understanding of its pathogenesis was obtained from animal models that were instrumental in revealing its mechanisms. It is believed that the foetal cardiomyocytes undergoing apoptosis such as those in the AV canal (Cheng *et al.* 2002) expose the originally intracellular Ro and La antigens to their surface, where they can be bound by circulating maternal autoantibodies (anti-SSA/Ro-SSB/La). The macrophages then phagocytose these 'opsonized' cells, leading to the secretion of pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines, leading to fibrosis (which does not normally occur during prenatal tissue healing), differentiation of myofibroblasts and scarring. This overshoots the normal process of reduction of the originally broad myocardial connection between the atria and ventricles to His bundle and leads in extreme cases to a complete ventricular block. More recent studies (Kamel *et al.* 2007) linked the AV bundle and sinoatrial node dysplasia in autoimmune lupus to antiserotonin (5-HT<sub>4</sub>) receptor antibodies in mice.

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

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

Qu *et al.* (2001) identified L-type calcium channel as a potential target for maternal antibodies inducing CHB in the foetus. *In vitro* studies showed the binding of these antibodies to the sarcolemma and *in vivo* demonstrated lower channel density in myocytes isolated from neonatal mice born to immunized dams. Deletion of the neuroendocrine  $\alpha_1D$  Ca channel in mice resulted in significant sinus bradycardia and AV block, a phenotype reminiscent to that seen in CHB. Another study by this group (Qu *et al.* 2005) confirmed expression of the  $\alpha_1D$  Ca channel in human foetal heart, showed the inhibitory effect of anti-Ro/La antibodies on this channel and direct cross-reactivity with this protein. This inhibition was rescued by a Ca channel activator, Bay K8644, opening a potential therapeutic avenue in this disease.

## Conclusions

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

limiting possible detrimental consequences in adulthood.

## Conflict of interests

None.

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

## References

- Aanhaanen, W.T., Brons, J.F., Dominguez, J.N., Rana, M.S., Norden, J., Airik, R., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., Brown, N.A., Kispert, A., Moorman, A.F. & Christoffels, V.M. 2009. The *Tbx2+* primary myocardium of the atrioventricular canal forms the atrioventricular node and the base of the left ventricle. *Circ Res* **104**, 1267–1274.
- Ammirabile, G., Tessari, A., Pignataro, V., Szumska, D., Sardo, F.S., Benes, J. Jr, Balistreri, M., Bhattacharya, S., Sedmera, D. & Campione, M. 2012. *Pitx2* confers left morphological, molecular, and functional identity to the sinus venosus myocardium. *Cardiovasc Res* **93**, 291–301.
- Arguello, C., Alanis, J., Pantoja, O. & Valenzuela, B. 1986. Electrophysiological and ultrastructural study of the atrioventricular canal during the development of the chick embryo. *J Mol Cell Cardiol* **18**, 499–510.
- Azarbayjani, F. & Danielsson, B.R. 2002. Embryonic arrhythmia by inhibition of HERG channels: a common hypoxia-related teratogenic mechanism for antiepileptic drugs? *Epilepsia* **43**, 457–468.
- Baker, C., Taylor, D.G., Osuala, K., Natarajan, A., Molnar, P.J., Hickman, J., Alam, S., Moscato, B., Weinshenker, D. & Ebert, S.N. 2012. Adrenergic deficiency leads to impaired electrical conduction and increased arrhythmic potential in the embryonic mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 536–541.
- Benes, J. Jr, Ammirabile, G., Sankova, B., Campione, M., Krejci, E., Kvasilova, A. & Sedmera, D. 2014. The role of connexin40 in developing atrial conduction. *FEBS Lett* **588**, 1465–1469.
- Blaschke, R.J., Hahurij, N.D., Kuijper, S., Just, S., Wisse, L.J., Deissler, K., Maxelon, T., Anastasiadis, K., Spitzer, J., Hardt, S.E. *et al.* 2007. Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor *Shox2* in sinoatrial and pacemaker development. *Circulation* **115**, 1830–1838.
- Boucek, R.J., Murphy, W.P. Jr & Paff, G.H. 1959. Electrical and mechanical properties of chick embryo heart chambers. *Circ Res* **7**, 787–793.
- Braunwald, E., Zipes, D.P. & Libbt, P. 2001. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, p. 2281. Saunders, Philadelphia.

- Bressan, M., Liu, G. & Mikawa, T. 2013. Early mesodermal cues assign avian cardiac pacemaker fate potential in a tertiary heart field. *Science* **340**, 744–748.
- Brucato, A., Frassi, M., Franceschini, F., Cimaz, R., Faden, D., Pisoni, M.P., Muscara, M., Vignati, G., Stramba-Badiale, M., Catelli, L. et al. 2001. Risk of congenital complete heart block in newborns of mothers with anti-Ro/SSA antibodies detected by counterimmunoelectrophoresis: a prospective study of 100 women. *Arthritis Rheum* **44**, 1832–1835.
- Bruchez, P., Sarre, A., Kappenberger, L. & Raddatz, E. 2008. The L-Type Ca<sup>+</sup> and KATP channels may contribute to pacing-induced protection against anoxia-reoxygenation in the embryonic heart model. *J Cardiovasc Electrophysiol* **19**, 1196–1202.
- Buyon, J.P. & Clancy, R.M. 2003. Neonatal lupus: review of proposed pathogenesis and clinical data from the US-based Research Registry for Neonatal Lupus. *Autoimmunity* **36**, 41–50.
- Chen, F., De Diego, C., Xie, L.H., Yang, J.H., Klitzner, T.S. & Weiss, J.N. 2007. Effects of metabolic inhibition on conduction, Ca transients, and arrhythmia vulnerability in embryonic mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H2472–H2478.
- Chen, F., De Diego, C., Chang, M.G., McHarg, J.L., John, S., Klitzner, T.S. & Weiss, J.N. 2010. Atrioventricular conduction and arrhythmias at the initiation of beating in embryonic mouse hearts. *Dev Dyn* **239**, 1941–1949.
- Cheng, G., Wessels, A., Gourdie, R.G. & Thompson, R.P. 2002. Spatiotemporal distribution of apoptosis in embryonic chicken heart. *Dev Dyn* **223**, 119–133.
- Christoffels, V.M., Hoogaars, W.M. & Moorman, A.F. 2010. Patterning and development of the conduction system of the heart: origins of the conduction system in development. In: N. Rosenthal & R.P. Harvey (eds) *Heart Development and Regeneration*, pp. 171–194. Elsevier, London.
- Chuck, E.T., Freeman, D.M., Watanabe, M. & Rosenbaum, D.S. 1997. Changing activation sequence in the embryonic chick heart. Implications for the development of the His-Purkinje system. *Circ Res* **81**, 470–476.
- Clark, E.B., Hu, N. & Dooley, J.B. 1985. The effect of isoproterenol on cardiovascular function in the stage 24 chick embryo. *Teratology* **31**, 41–47.
- Clark, E.B., Hu, N., Turner, D.R., Litter, J.E. & Hansen, J. 1991. Effect of chronic verapamil treatment on ventricular function and growth in chick embryos. *Am J Physiol* **261**, H166–H171.
- Copel, J.A., Liang, R.I., Demasio, K., Ozeren, S. & Kleinman, C.S. 2000. The clinical significance of the irregular fetal heart rhythm. *Am J Obstet Gynecol* **182**, 813–817; discussion 17–9.
- Danielsson, B.R., Azarbayjani, F., Skold, A.C. & Webster, W.S. 1997. Initiation of phenytoin teratogenesis: pharmacologically induced embryonic bradycardia and arrhythmia resulting in hypoxia and possible free radical damage at reoxygenation. *Teratology* **56**, 271–281.
- Danielsson, C., Azarbayjani, F., Skold, A.C., Sjogren, N. & Danielsson, B.R. 2007. Polytherapy with hERG-blocking antiepileptic drugs: increased risk for embryonic cardiac arrhythmia and teratogenicity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **79**, 595–603.
- Donofrio, M.T., Moon-Grady, A.J., Hornberger, L.K., Copel, J.A., Sklansky, M.S., Abuhamad, A., Cuneo, B.F., Huhta, J.C., Jonas, R.A., Krishnan, A. et al. 2014. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **129**, 2183–2242.
- Eghtesady, P., Michelfelder, E.C., Knilans, T.K., Witte, D.P., Manning, P.B. & Crombleholme, T.M. 2011. Fetal surgical management of congenital heart block in a hydropic fetus: lessons learned from a clinical experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* **141**, 835–837.
- Eronen, M. 1997. Outcome of fetuses with heart disease diagnosed in utero. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **77**, F41–F46.
- Frank, D.U., Carter, K.L., Thomas, K.R., Burr, R.M., Bakker, M.L., Coetzee, W.A., Tristani-Firouzi, M., Bamshad, M.J., Christoffels, V.M. & Moon, A.M. 2012. Lethal arrhythmias in Tbx3-deficient mice reveal extreme dosage sensitivity of cardiac conduction system function and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, E154–E163.
- Friedman, D.M., Kim, M.Y., Copel, J.A., Llanos, C., Davis, C. & Buyon, J.P. 2009. Prospective evaluation of fetuses with autoimmune-associated congenital heart block followed in the PR Interval and Dexamethasone Evaluation (PRIDE) Study. *Am J Cardiol* **103**, 1102–1106.
- Gardier, S., Pedretti, S., Sarre, A. & Raddatz, E. 2010. Transient anoxia and oxyradicals induce a region-specific activation of MAPKs in the embryonic heart. *Mol Cell Biochem* **340**, 239–247.
- Gonzalez, M.D., Contreras, L.J., Jongbloed, M.R., Rivera, J., Donahue, T.P., Curtis, A.B., Bailey, M.S., Conti, J.B., Fishman, G.I., Schalij, M.J. & Gittenberger-de Groot, A.C. 2004. Left atrial tachycardia originating from the mitral annulus-aorta junction. *Circulation* **110**, 3187–3192.
- Gourdie, R.G., Wei, Y., Kim, D., Klatt, S.C. & Mikawa, T. 1998. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6815–6818.
- Gourdie, R.G., Harris, B.S., Bond, J., Justus, C., Hewett, K.W., O'Brien, T.X., Thompson, R.P. & Sedmera, D. 2003. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69C**, 46–57.
- Gurjarpadhye, A., Hewett, K.W., Justus, C., Wen, X., Stadt, H., Kirby, M.L., Sedmera, D. & Gourdie, R.G. 2007. Cardiac neural crest ablation inhibits compaction and electrical function of conduction system bundles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1291–H1300.
- Hall, C.E., Hurtado, R., Hewett, K.W., Shulimovich, M., Poma, C.P., Reckova, M., Justus, C., Pennisi, D.J., Tobita, K., Sedmera, D., Gourdie, R.G. & Mikawa, T. 2004. Hemodynamic-dependent patterning of endothelin converting enzyme 1 expression and differentiation of impulse-conducting Purkinje fibers in the embryonic heart. *Development* **131**, 581–592.
- Hildreth, V., Anderson, R.H. & Henderson, D.J. 2009. Autonomic innervation of the developing heart: origins and function. *Clin Anat* **22**, 36–46.

- Hirota, A., Kamino, K., Komuro, H., Sakai, T. & Yada, T. 1985. Early events in development of electrical activity and contraction in embryonic rat heart assessed by optical recording. *J Physiol* **369**, 209–227.
- Hirota, A., Kamino, K., Komuro, H. & Sakai, T. 1987. Mapping of early development of electrical activity in the embryonic chick heart using multiple-site optical recording. *J Physiol* **383**, 711–728.
- Hoff, E.C. & Kramer, T.C. 1939. The development of the electrocardiogram of the embryonic heart. *Am Heart J* **17**, 471–488.
- Hoogaars, W.M., Engel, A., Brons, J.F., Verkerk, A.O., de Lange, F.J., Wong, L.Y., Bakker, M.L., Clout, D.E., Wakker, V., Barnett, P., Ravesloot, J.H., Moorman, A.F., Verheijck, E.E. & Christoffels, V.M. 2007. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* **21**, 1098–1112.
- Huhta, J.C. 2005. Fetal congestive heart failure. *Semin Fetal Neonatal Med* **10**, 542–552.
- Jaber, M., Koch, W.J., Rockman, H., Smith, B., Bond, R.A., Sulik, K.K., Ross, J. Jr, Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. & Giros, B. 1996. Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12974–12979.
- Jaeggi, E.T. & Nii, M. 2005. Fetal brady- and tachyarrhythmias: new and accepted diagnostic and treatment methods. *Semin Fetal Neonatal Med* **10**, 504–514.
- Jaeggi, E.T., Silverman, E.D., Laskin, C., Kingdom, J., Golding, F. & Weber, R. 2011. Prolongation of the atrioventricular conduction in fetuses exposed to maternal anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies did not predict progressive heart block. A prospective observational study on the effects of maternal antibodies on 165 fetuses. *J Am Coll Cardiol* **57**, 1487–1492.
- Jay, P.Y., Harris, B.S., Maguire, C.T., Buerger, A., Wakimoto, H., Tanaka, M., Kupersmidt, S., Roden, D.M., Schultheiss, T.M., O'Brien, T.X., Gourdie, R.G., Berul, C.I. & Izumo, S. 2004. Nk2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *J Clin Invest* **113**, 1130–1137.
- Jerome, L.A. & Papaioannou, V.E. 2001. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet* **27**, 286–291.
- Jongbloed, M.R., Schalij, M.J., Poelmann, R.E., Blom, N.A., Fekkes, M.L., Wang, Z., Fishman, G.I. & Gittenberger-De Groot, A.C. 2004. Embryonic conduction tissue: a spatial correlation with adult arrhythmogenic areas. *J Cardiovasc Electrophysiol* **15**, 349–355.
- Kamel, R., Garcia, S., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R., Muller, S., Hoebek, J. & Eftekhari, P. 2007. Immunomodulation by maternal autoantibodies of the fetal serotonergic 5-HT<sub>4</sub> receptor and its consequences in early BALB/c mouse embryonic development. *BMC Dev Biol* **7**, 34.
- Karppinen, S., Rapila, R., Makikallio, K., Hanninen, S.L., Rysa, J., Vuolteenaho, O. & Tavi, P. 2013. Endothelin-1 signalling controls early embryonic heart rate *in vitro* and *in vivo*. *Acta Physiol (Oxf)* **210**, 369–380.
- Kasuya, Y., Matsuki, N. & Shigenobu, K. 1977. Changes in sensitivity to anoxia of the cardiac action potential plateau during chick embryonic development. *Dev Biol* **58**, 124–133.
- Kockova, R., Svatunkova, J., Novotny, J., Hejnova, L., Ostadal, B. & Sedmera, D. 2013. Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**, H895–H902.
- Kolditz, D.P., Wijffels, M.C., Blom, N.A., van der Laarse, A., Markwald, R.R., Schalij, M.J. & Gittenberger-de Groot, A.C. 2007. Persistence of functional atrioventricular accessory pathways in postseptated embryonic avian hearts: implications for morphogenesis and functional maturation of the cardiac conduction system. *Circulation* **115**, 17–26.
- Kolditz, D.P., Wijffels, M.C., Blom, N.A., van der Laarse, A., Hahurij, N.D., Lie-Venema, H., Markwald, R.R., Poelmann, R.E., Schalij, M.J. & Gittenberger-de Groot, A.C. 2008. Epicardium-derived cells in development of annulus fibrosis and persistence of accessory pathways. *Circulation* **117**, 1508–1517.
- Leaf, D.E., Feig, J.E., Vasquez, C., Riva, P.L., Yu, C., Lader, J.M., Kontogeorgis, A., Baron, E.L., Peters, N.S., Fisher, E.A., Gutstein, D.E. & Morley, G.E. 2008. Connexin40 imparts conduction heterogeneity to atrial tissue. *Circ Res* **103**, 1001–1008.
- Liang, X., Wang, G., Lin, L., Lowe, J., Zhang, Q., Bu, L., Chen, Y., Chen, J., Sun, Y. & Evans, S.M. 2013. HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors. *Circ Res* **113**, 399–407.
- Liddicoat, J.R., Klein, J.R., Reddy, V.M., Klautz, R.J., Teitel, D.F. & Hanley, F.L. 1997. Hemodynamic effects of chronic prenatal ventricular pacing for the treatment of complete atrioventricular block. *Circulation* **96**, 1025–1030.
- Liu, J., Bressan, M., Hassel, D., Huisken, J., Staudt, D., Kikuchi, K., Poss, K.D., Mikawa, T. & Stainier, D.Y. 2010. A dual role for ErbB2 signaling in cardiac trabeculation. *Development* **137**, 3867–3875.
- Lo, C.W., Yu, Q., Shen, Y., Leatherbury, I., Francis, R., Xiao-Quing, Z., Zhang, Z., Wessels, A., Huang, G. & Chatterjee, B. 2010. Exploring the genetic basis for congenital heart disease with mouse ENU mutagenesis. In: N. Rosenthal & R.P. Harvey (ed.) *Heart Development and Regeneration*, pp. 753–778. Elsevier, London.
- Maeno, Y.V., Boutin, C., Hornberger, L.K., McCrindle, B.W., Cavalle-Garrido, T., Gladman, G. & Smallhorn, J.F. 1999. Prenatal diagnosis of right ventricular outflow tract obstruction with intact ventricular septum, and detection of ventriculocoronary connections. *Heart* **81**, 661–668.
- Maurer, M. Jr 1979. Developmental factors contributing to the susceptibility to bradycardia in isolated, cultured fetal mouse hearts. *Pediatr Res* **13**, 1052–1057.
- Maury, P., Sarre, A., Terrand, J., Rosa, A., Kucera, P., Kappenberger, L. & Raddatz, E. 2004. Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide. *Mol Cell Biochem* **265**, 141–149.
- Meiltz, A., Kucera, P., de Ribaupierre, Y. & Raddatz, E. 1998. Inhibition of bicarbonate transport protects embryonic heart



- against reoxygenation-induced dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 30, 327–335.
- Mitchell, J.L., Cuneo, B.F., Etheridge, S.P., Horigome, H., Weng, H.Y. & Benson, D.W. 2012. Fetal heart rate predictors of long QT syndrome. *Circulation* 126, 2688–2695.
- Mommersteeg, M.T., Brown, N.A., Prall, O.W., de Gier-de Vries, C., Harvey, R.P., Moorman, A.F. & Christoffels, V.M. 2007a. Pitx2c and Nk2-5 Are Required for the Formation and Identity of the Pulmonary Myocardium. *Circ Res* 101, 902–909.
- Mommersteeg, M.T., Hoogaars, W.M., Prall, O.W., de Gier-de Vries, C., Wiese, C., Clout, D.E., Papaioannou, V.E., Brown, N.A., Harvey, R.P., Moorman, A.F. & Christoffels, V.M. 2007b. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* 100, 354–362.
- Moorman, A.F., van den Berg, G., Anderson, R.H. & Christoffels, V.M. 2010. Early cardiac growth and the ballooning model of cardiac chamber formation. In: N. Rosenthal & R.P. Harvey (eds) *Heart Development and Regeneration*, pp. 219–236. Elsevier, London.
- Moskowitz, I.P., Pizard, A., Patel, V.V., Bruneau, B.G., Kim, J.B., Kupersmidt, S., Roden, D., Berul, C.I., Seidman, C.E. & Seidman, J.G. 2004. The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development* 131, 4107–4116.
- Nanka, O., Krizova, P., Fikrle, M., Tuma, M., Blaha, M., Grim, M. & Sedmera, D. 2008. Abnormal myocardial and coronary vasculature development in experimental hypoxia. *Anat Rec (Hoboken)* 291, 1187–1199.
- Nicholson, A., Chmait, R., Bar-Cohen, Y., Zheng, K. & Loeb, G.E. 2012. Percutaneously injectable fetal pacemaker: electronics, pacing thresholds, and power budget. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2012, 5730–5733.
- Nii, M., Hamilton, R.M., Fenwick, L., Kingdom, J.C., Roman, K.S. & Jaeggi, E.T. 2006. Assessment of fetal atrioventricular time intervals by tissue Doppler and pulse Doppler echocardiography: normal values and correlation with fetal electrocardiography. *Heart* 92, 1831–1837.
- Nomura-Kitabayashi, A., Phoon, C.K.L., Kishigami, S., Rosenthal, J., Yamauchi, Y., Abe, K., Yamamura, K., Samtani, R., Lo, C.W. & Mishina, Y. 2009. Outflow tract cushions perform a critical valve-like function in the early embryonic heart requiring BMPRIA-mediated signaling in cardiac neural crest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1617–H1628.
- Paff, G.H. & Boucek, R.J. 1975. Conal contribution to the electrocardiogram of chick embryo hearts. *Anat Rec* 182, 169–173.
- Paff, G.H., Boucek, R.J. & Klopfenstein, H.S. 1964. Experimental heart block in the chick embryo. *Anat Rec* 149, 217–224.
- Paff, G.H., Boucek, R.J. & Harrell, T.C. 1968. Observations on the development of the electrocardiogram. *Anat Rec* 160, 575–582.
- Pedra, S.R., Smallhorn, J.F., Ryan, G., Chitayat, D., Taylor, G.P., Khan, R., Abdoell, M. & Hornberger, L.K. 2002. Fetal cardiomyopathies: pathogenic mechanisms, hemodynamic findings, and clinical outcome. *Circulation* 106, 585–591.
- Pedretti, S. & Raddatz, E. 2011. STAT3alpha interacts with nuclear GSK3beta and cytoplasmic RISK pathway and stabilizes rhythm in the anoxic-reoxygenated embryonic heart. *Basic Res Cardiol* 106, 355–369.
- Phoon, C.K. 2006. Imaging tools for the developmental biologist: ultrasound biomicroscopy of mouse embryonic development. *Pediatr Res* 60, 14–21.
- Phoon, C.K., Aristizabal, O. & Turnbull, D.H. 2002. Spatial velocity profile in mouse embryonic aorta and Doppler-derived volumetric flow: a preliminary model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H908–H916.
- Phoon, C.K., Ji, R.P., Aristizabal, O., Worrada, D.M., Zhou, B., Baldwin, H.S. & Turnbull, D.H. 2004. Embryonic heart failure in NFATc1<sup>-/-</sup> mice: novel mechanistic insights from *in utero* ultrasound biomicroscopy. *Circ Res* 95, 92–99.
- Qu, Y., Xiao, G.Q., Chen, L. & Boutjdir, M. 2001. Autoantibodies from mothers of children with congenital heart block downregulate cardiac L-type Ca channels. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1153–1163.
- Qu, Y., Baroudi, G., Yue, Y. & Boutjdir, M. 2005. Novel molecular mechanism involving alpha1D (Cav1.3) L-type calcium channel in autoimmune-associated sinus bradycardia. *Circulation* 111, 3034–3041.
- Raddatz, E., Kucera, P. & De Ribaupierre, Y. 1997. Response of the embryonic heart to hypoxia and reoxygenation: an *in vitro* model. *Exp Clin Cardiol* 2, 128–134.
- Raddatz, E., Thomas, A.C., Sarre, A. & Benathan, M. 2011. Differential contribution of mitochondria, NADPH oxidases, and glycolysis to region-specific oxidant stress in the anoxic-reoxygenated embryonic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H820–H835.
- Rajala, G.M., Kuhlmann, R.S. & Kolesari, G.L. 1984. The role of dysrhythmic heart function during cardiovascular teratogenesis in epinephrine-treated chick embryos. *Teratology* 30, 385–392.
- Reckova, M., Rosengarten, C., deAlmeida, A., Stanley, C.P., Wessels, A., Gourdie, R.G., Thompson, R.P. & Sedmera, D. 2003. Hemodynamics is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system. *Circ Res* 93, 77–85.
- Reed, K.L. 1989. Fetal arrhythmias: etiology, diagnosis, pathophysiology, and treatment. *Semin Perinatol* 13, 294–304.
- Reed, K.L., Appleton, C.P., Anderson, C.F., Shenker, L. & Sahn, D.J. 1990. Doppler studies of vena cava flows in human fetuses. Insights into normal and abnormal cardiac physiology. *Circulation* 81, 498–505.
- Reinisch, J.M., Simon, N.G., Karow, W.G. & Gandelman, R. 1978. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science* 202, 436–438.
- Rentschler, S., Zander, J., Meyers, K., France, D., Levine, R., Porter, G., Rivkees, S.A., Morley, G.E. & Fishman, G.I. 2002. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10464–10469.
- Rentschler, S., Harris, B.S., Kuznekoff, L., Jain, R., Manderfield, L., Lu, M.M., Morley, G.E., Patel, V.V. & Epstein, J.A. 2011. Notch signaling regulates murine atrioventricu-

- lar conduction and the formation of accessory pathways. *J Clin Invest* 121, 525–533.
- Robin, E., Sabourin, J., Benoit, R., Pedretti, S. & Raddatz, E. 2011. Adenosine A1 receptor activation is arrhythmogenic in the developing heart through NADPH oxidase/ERK- and PLC/PKC-dependent mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 51, 945–954.
- Robin, E., Sabourin, J., Marcillac, F. & Raddatz, E. 2013. Involvement of CD73, equilibrative nucleoside transporters and inosine in rhythm and conduction disturbances mediated by adenosine A1 and A2A receptors in the developing heart. *J Mol Cell Cardiol* 63, 14–25.
- Sabourin, J., Robin, E. & Raddatz, E. 2011. A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. *Cardiovasc Res* 92, 226–236.
- Sabourin, J., Antigny, F., Robin, E., Frieden, M. & Raddatz, E. 2012. Activation of transient receptor potential canonical 3 (TRPC3)-mediated Ca<sup>2+</sup> entry by A1 adenosine receptor in cardiomyocytes disturbs atrioventricular conduction. *J Biol Chem* 287, 26688–26701.
- Sankova, B., Machalek, J. & Sedmera, D. 2010. Effects of mechanical loading on early conduction system differentiation in the chick. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H1571–H1576.
- Sankova, B., Benes, J. Jr, Krejci, E., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Miquerol, L. & Sedmera, D. 2012. The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. *Cardiovasc Res* 95, 469–479.
- Sarre, A., Lange, N., Kucera, P. & Raddatz, E. 2005. mitoKATP channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H1611–H1619.
- Sarre, A., Maury, P., Kucera, P., Kappenberger, L. & Raddatz, E. 2006. Arrhythmogenesis in the developing heart during anoxia-reoxygenation and hypothermia-rewarming: an *in vitro* model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17, 1350–1359.
- Sarre, A., Gardier, S., Maurer, F., Bonny, C. & Raddatz, E. 2008. Modulation of the c-Jun N-terminal kinase activity in the embryonic heart in response to anoxia-reoxygenation: involvement of the Ca<sup>2+</sup> and mitoKATP channels. *Mol Cell Biochem* 313, 133–138.
- Sarre, A., Pedretti, S., Gardier, S. & Raddatz, E. 2010. Specific inhibition of HCN channels slows rhythm differently in atria, ventricle and outflow tract and stabilizes conduction in the anoxic-reoxygenated embryonic heart model. *Pharmacol Res* 61, 85–91.
- Schmidt, K.G., Ulmer, H.E., Silverman, N.H., Kleinman, C.S. & Copel, J.A. 1991. Perinatal outcome of fetal complete atrioventricular block: a multicenter experience. *J Am Coll Cardiol* 17, 1360–1366.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Hu, N. & Clark, E.B. 1998. A quantitative study of the ventricular myoarchitecture in the stage 21–29 chick embryo following decreased loading. *Eur J Morphol* 36, 105–119.
- Sedmera, D., Kucera, P. & Raddatz, E. 2002. Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R379–R388.
- Sedmera, D., Wessels, A., Trusk, T.C., Thompson, R.P., Hewett, K.W. & Gourdie, R.G. 2006. Changes in activation sequence of embryonic chick atria correlate with developing myocardial architecture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1646–H1652.
- Sedmera, D., Harris, B.S., Grant, E., Zhang, N., Jourdan, J., Kurkova, D. & Gourdie, R.G. 2008. Cardiac expression patterns of endothelin-converting enzyme (ECE): implications for conduction system development. *Dev Dyn* 237, 1746–1753.
- Shrier, A. & Clay, J.R. 1982. Comparison of the pacemaker properties of chick embryonic atrial and ventricular heart cells. *J Membr Biol* 69, 49–56.
- Simpson, J.M. & Sharland, G.K. 1998. Fetal tachycardias: management and outcome of 127 consecutive cases. *Heart* 79, 576–581.
- Skold, A.C. & Danielsson, B.R. 2000. Developmental toxicity of the class III antiarrhythmic agent almokalant in mice. Adverse effects mediated via induction of embryonic heart rhythm abnormalities. *Arzneimittelforschung* 50, 520–525.
- Srinivasan, S. & Strasburger, J. 2008. Overview of fetal arrhythmias. *Curr Opin Pediatr* 20, 522–531.
- Stewart, P.A., Tonge, H.M. & Wladimiroff, J.W. 1983. Arrhythmia and structural abnormalities of the fetal heart. *Br Heart J* 50, 550–554.
- Strasburger, J.F. & Wakai, R.T. 2010. Fetal cardiac arrhythmia detection and *in utero* therapy. *Nat Rev Cardiol* 7, 277–290.
- Strasburger, J.F., Cheulkar, B. & Wakai, R.T. 2008. Magnetocardiography for fetal arrhythmias. *Heart Rhythm* 5, 1073–1076.
- Sugiyama, T., Miyazaki, H., Saito, K., Shimada, H. & Miyamoto, K. 1996. Chick embryos as an alternative experimental animal for cardiovascular investigations: stable recording of electrocardiogram of chick embryos *in vivo* on the 16th day of incubation. *Toxicol Appl Pharmacol* 138, 262–267.
- Suzuki, H., Silverman, E.D., Wu, X., Borges, C., Zhao, S., Isacovics, B. & Hamilton, R.M. 2005. Effect of maternal autoantibodies on fetal cardiac conduction: an experimental murine model. *Pediatr Res* 57, 557–562.
- Sydorak, R.M., Nijagal, A. & Albanese, C.T. 2001. Endoscopic techniques in fetal surgery. *Yonsei Med J* 42, 695–710.
- Takebayashi-Suzuki, K., Yanagisawa, M., Gourdie, R.G., Kanzawa, N. & Mikawa, T. 2000. *In vivo* induction of cardiac Purkinje fiber differentiation by coexpression of preproendothelin-1 and endothelin converting enzyme-1. *Development* 127, 3523–3532.
- Tazawa, H., Suzuki, Y. & Musashi, H. 1989. Simultaneous acquisition of ECG, BCG, and blood pressure from chick embryos in the egg. *J Appl Physiol* (1985) 67, 478–483.
- Tenthorey, D., de Ribaupierre, Y., Kucera, P. & Raddatz, E. 1998. Effects of verapamil and ryanodine on activity of the embryonic chick heart during anoxia and reoxygenation. *J Cardiovasc Pharmacol* 31, 195–202.
- Terrand, J., Felley-Bosco, E., Courjault-Gautier, F., Rochat, A.C., Kucera, P. & Raddatz, E. 2003. Postanoxic func-

- tional recovery of the developing heart is slightly altered by endogenous or exogenous nitric oxide. *Mol Cell Biochem* **252**, 53–63.
- Tran, L., Kucera, P., de Ribaupierre, Y., Rochat, A.C. & Raddatz, E. 1996. Glucose is arrhythmogenic in the anoxic-reoxygenated embryonic chick heart. *Pediatr Res* **39**, 766–773.
- Valderrabano, M., Chen, F., Dave, A.S., Lamp, S.T., Klitzner, T.S. & Weiss, J.N. 2006. Atrioventricular ring reentry in embryonic mouse hearts. *Circulation* **114**, 543–549.
- Van Mierop, L.H. 1967. Location of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heartbeat. *Am J Physiol* **212**, 407–415.
- Vergani, P., Mariani, E., Ciriello, E., Locatelli, A., Strobelt, N., Galli, M. & Ghidini, A. 2005. Fetal arrhythmias: natural history and management. *Ultrasound Med Biol* **31**, 1–6.
- Vostarek, F., Sankova, B. & Sedmera, D. 2014. Studying dynamic events in the developing myocardium. *Prog Biophys Mol Biol*, **115**, 261–269.
- Wakimoto, K., Kobayashi, K., Kuro, O.M., Yao, A., Iwamoto, T., Yanaka, N., Kita, S., Nishida, A., Azuma, S., Toyoda, Y. *et al.* 2000. Targeted disruption of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat. *J Biol Chem* **275**, 36991–36998.
- Zhang, S.S., Kim, K.H., Rosen, A., Smyth, J.W., Sakuma, R., Delgado-Olguin, P., Davis, M., Chi, N.C., Puvion-Vandier, V., Gaborit, N. *et al.* 2011. Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 13576–13581.
- Zhao, H., Strasburger, J.F., Cuneo, B.F. & Wakai, R.T. 2006. Fetal cardiac repolarization abnormalities. *Am J Cardiol* **98**, 491–496.

### Supporting Information

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

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

# Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo

Radka Kockova,<sup>1,2</sup> Jarmila Svatunkova,<sup>1</sup> Jiri Novotny,<sup>3</sup> Lucie Hejnova,<sup>3</sup> Bohuslav Ostadal,<sup>1</sup> and David Sedmera<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Physiology, Prague, Czech Republic; <sup>2</sup>Institute of Clinical and Experimental Medicine, Department of Cardiology, Prague, Czech Republic; <sup>3</sup>Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Physiology, Prague, Czech Republic; <sup>4</sup>Charles University in Prague, First Faculty in Medicine, Institute of Anatomy, Prague, Czech Republic

Submitted 12 September 2012; accepted in final form 7 January 2013

**Kockova R, Svatunkova J, Novotny J, Hejnova L, Ostadal B, Sedmera D.** Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: H895–H902, 2013. First published January 11, 2013; doi:10.1152/ajpheart.00679.2012.—A significant increase in cardiovascular medication use during pregnancy occurred in recent years. Only limited evidence on safety profiles is available, and little is known about the mechanisms of adverse effect on the fetus. We hypothesized that drug-induced bradycardia is the leading mechanism of developmental toxicity. Embryotoxicity was tested in ovo after administration of various doses of metoprolol, carvedilol, or ivabradine. Embryonic day (ED) 4 and 8 chick embryos were studied by video microscopy and ultrasound biomicroscopy ex ovo after intra-amniotic injection of the drug for a period of 30 min. Stroke volume was calculated by the Simpson method and prolate ellipsoid formula. Significant dose-dependent mortality was achieved in embryos injected with carvedilol and ivabradine. In ED4 embryos, metoprolol, carvedilol, and ivabradine reduced the heart rate by 33%, 27%, and 55%, respectively, compared with controls (6%). In ED8 embryos this effect was more pronounced with a heart rate reduction by 71%, 54%, and 53%, respectively (controls, 36%). Cardiac output decreased in all tested groups but only proved significant in the metoprolol group in ED8 embryos. The number of  $\beta$ -adrenergic receptors showed a downward tendency during embryonic development. A negative chronotropic effect of metoprolol, carvedilol, and ivabradine was increasingly pronounced with embryonic maturity despite a downward trend in the number of  $\beta$ -adrenergic receptors. This effect was associated with reduced cardiac output in chick embryos, probably leading to premature death. Although standard doses of these drugs appear relatively safe, high doses have a potentially adverse effect on the fetus through reduced heart rate.

$\beta$ -blocking agents; embryonic heart; embryotoxicity; pregnancy; bradycardia

ADVANCES IN PEDIATRIC CARDIAC surgery have resulted in improved survival of children with congenital heart disease, as well as improved quality of their life, which allows some mothers in whom pregnancy was previously strictly contraindicated to have their own offspring. However, surgical scars in operated hearts predispose to the development and maintenance of arrhythmias (3) that are often managed medically. In addition, as the average age of pregnant women increases, we face the need of drug treatment during pregnancy more frequently. Furthermore, there is a documented increase in ma-

ternal cardiac arrhythmias during pregnancy, secondary to metabolic, hormonal, and hemodynamic changes (9).

The effects of antiarrhythmic drugs on the developing cardiovascular system are often different from the effects on the adult heart. Some (e.g., amiodarone or atenolol) are too toxic for the developing embryo, so their use in pregnancy is contraindicated (Category U.S. FDA D-positive evidence risk) (13). More often, the response to clinically relevant concentrations is blunted due to the immaturity of receptor-mediated signal transduction systems. Generally, the effects of the drugs are not fully characterized, and the recommendations for their use in pregnancy are vague (Category C: Studies in pregnant women are lacking, and animal studies are either positive for fetal risk or lacking as well; use only when benefits clearly outweigh risks) (13) and, therefore, of limited value for daily clinical practice. Only very few antiarrhythmic drugs (such as lidocaine or sotalol) are labeled as safe (Category B: No evidence of risk in pregnant women) (9). The human placental model was developed as an experimental model to test transplacental perfusion of different drugs (12). There were only four drugs with the antiarrhythmic potential (atenolol, propranolol, digoxin, labetalol) tested and the ratio of transplacental transfer mother to fetus was in the range of 0.1–1 both in the experimental model and in vivo.

The developmental toxicity of catecholamines and  $\beta$ -blockers was studied in the chick embryo. In sharp contrast with the most teratogenic drugs, these studies showed that the early embryos are significantly more resistant to both  $\beta$ -mimetic and  $\beta$ -blocking drugs than the fetal stages (29). We have some insight into the pathogenesis of catecholamine-induced cardiomyopathy in the chick embryo (16–19), but little is known about the mechanisms by which  $\beta$ -blocking drugs cause embryoletality. Because the toxicity is more pronounced at advanced embryonic stages, it is likely that the impact is on function, rather than causing malformations incompatible with embryonic survival.

For our experiments we specifically chose three drugs that are frequently used in cardiology daily practice. A negative chronotropic effect is typical for  $\beta$ -blocking agents and ivabradine, although they present two different groups of cardiovascular drugs. The indications for  $\beta$ -blocking agents (metoprolol, carvedilol) include the treatment of arrhythmias, arterial hypertension, heart failure, ischemic heart disease, and thyrotoxicosis. Ivabradine is mainly used for the treatment of ischemic heart disease and arrhythmias. Metoprolol does cross the placental barrier, whereas carvedilol shows only low transfer (<http://polaros.com/carvedilol-pharmacokinetics.html>). Ivabra-

Address for reprint requests and other correspondence: Radka Kockova, Dept. of Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic, (e-mail: radka.kockova@ikem.cz).

dine, the newest of the drugs tested, is not recommended in pregnancy, since embryotoxicity was observed in rats even in standard clinical dosing (European Medicine Agency; [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_Scientific\\_Discussion/human/000598/WC500035338.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000598/WC500035338.pdf)).

We focused our investigations on the effects of commonly used anti-arrhythmic drugs on the function of the developing chick heart as a determinant of embryonic survival. Because the heart rate is the most important determinant of cardiac output in the embryonic heart (7), we hypothesized that drug-induced bradycardia is the leading mechanism of heart failure. We found that  $\beta$ -blockers caused stage-dependent reduction of heart rate, translating in decreased cardiac output despite some Frank-Starling compensation (24). Similar findings were obtained with ivabradine, a new drug supposed to decrease heart rate without any direct effect on the working myocardium. These results suggest that any drug causing significant bradycardia in the embryo or fetus has considerable embryolethal potential.

## MATERIAL AND METHODS

**Embryo incubation and drug application.** Fertilized white Leghorn chicken eggs were incubated blunt end up in a forced draft incubator at 38°C and 75% humidity up to embryonic day (ED) 4–14 (Hamburger-Hamilton stage 20 to 38) (10). The eggs were turned automatically every 4 h. A small opening was then made carefully in the egg shell, and the tested drug dissolved in normal saline (1 mg/ml for metoprolol and carvedilol and 1.36 mg/ml for ivabradine) was administered intraamniotically through the air space after removal of the papyraceous membrane.

**Embryotoxicity evaluation.** Embryotoxicity was tested in ovo after intraamniotic administration of various doses of metoprolol, carvedilol, or ivabradine at ED4 or ED8 (Tables 1 and 2) and compared with controls that received normal saline. Subsequently, the eggs were incubated until ED9 when the wet and dry weight of the embryo and embryonic heart was measured as a marker of embryotoxicity. In addition, the surviving embryos were thoroughly screened for external and internal malformations (limb defects, orofacial anomalies, body wall closure defects, gut defects, and microdissection of the heart).

Table 1. Results from treatment at ED4

| ED4 and dose, $\mu$ g | N  | Dead | Mortality, % | Embryo weight, g  | Heart weight+, g | HBWR, g/g |
|-----------------------|----|------|--------------|-------------------|------------------|-----------|
| <b>Metoprolol</b>     |    |      |              |                   |                  |           |
| 0                     | 11 | 1    | 9            | 1.425 $\pm$ 0.114 | 0.0127           | 0.0089    |
| 2                     | 21 | 0    | 0            | 1.652 $\pm$ 0.157 | 0.0140           | 0.0085    |
| 20                    | 12 | 0    | 0            | 1.375 $\pm$ 0.162 | 0.0146           | 0.0106    |
| 40                    | 21 | 2    | 10           | 1.736 $\pm$ 0.162 | 0.0164           | 0.0094    |
| 200                   | 16 | 0    | 0            | 1.388 $\pm$ 0.120 | 0.0157           | 0.0113    |
| <b>Carvedilol</b>     |    |      |              |                   |                  |           |
| 0                     | 5  | 0    | 0            | 1.317 $\pm$ 0.085 | 0.0156           | 0.0118    |
| 2                     | 6  | 0    | 0            | 1.264 $\pm$ 0.078 | 0.0145           | 0.0115    |
| 20                    | 13 | 1    | 8            | 1.350 $\pm$ 0.149 | 0.0142           | 0.0105    |
| 40                    | 15 | 1    | 7            | 1.416 $\pm$ 0.071 | 0.0156           | 0.0110    |
| 200                   | 14 | 12   | 86*          | 1.405 $\pm$ 0.152 | 0.0163           | 0.0116    |
| <b>Ivabradine</b>     |    |      |              |                   |                  |           |
| 0                     | 13 | 3    | 23           | 0.791 $\pm$ 0.056 | 0.0107           | 0.0135    |
| 2                     | 10 | 1    | 10           | 0.810 $\pm$ 0.889 | 0.0093           | 0.0115    |
| 20                    | 10 | 1    | 10           | 0.814 $\pm$ 0.079 | 0.0088           | 0.0108    |
| 40                    | 29 | 16   | 55*          | 0.821 $\pm$ 0.103 | 0.0092           | 0.0110    |
| 200                   | 15 | 12   | 80*          | 0.694 $\pm$ 0.164 | 0.0090           | 0.0130    |

Values are means  $\pm$  SE. ED, embryonic day; HBWR, heart-to-body weight ratio. \* $P < 0.05$ ; +average calculated from pooled hearts.

Table 2. Results from treatment at ED8

| ED8 and dose, $\mu$ g | N  | Dead | Mortality, % | Embryo weight, g  | Heart weight+, g | HBWR, g/g |
|-----------------------|----|------|--------------|-------------------|------------------|-----------|
| <b>Metoprolol</b>     |    |      |              |                   |                  |           |
| 0                     | 19 | 2    | 11           | 1.502 $\pm$ 0.179 | 0.0165           | 0.0110    |
| 2                     | 20 | 0    | 0            | 1.830 $\pm$ 0.178 | 0.0184           | 0.0101    |
| 20                    | 20 | 1    | 5            | 1.717 $\pm$ 0.146 | 0.0190           | 0.0111    |
| 40                    | 15 | 0    | 0            | 1.332 $\pm$ 0.163 | 0.0135           | 0.0101    |
| 200                   | 23 | 9    | 39*          | 1.604 $\pm$ 0.097 | 0.0135           | 0.0084    |
| <b>Carvedilol</b>     |    |      |              |                   |                  |           |
| 0                     | 3  | 0    | 0            | 1.257 $\pm$ 0.064 | ND               | ND        |
| 2                     | 5  | 1    | 20           | 1.249 $\pm$ 0.114 | 0.0138           | 0.0110    |
| 20                    | 16 | 4    | 25           | 1.339 $\pm$ 0.142 | 0.0137           | 0.0102    |
| 40                    | 15 | 0    | 0            | 1.366 $\pm$ 0.129 | 0.0151           | 0.0111    |
| 200                   | 16 | 7    | 44*          | 1.314 $\pm$ 0.175 | 0.0105           | 0.0080    |
| <b>Ivabradine</b>     |    |      |              |                   |                  |           |
| 0                     | 12 | 0    | 0            | 1.592 $\pm$ 0.147 | 0.0118           | 0.0074    |
| 2                     | 12 | 1    | 8            | 1.439 $\pm$ 0.163 | 0.0109           | 0.0076    |
| 20                    | 12 | 2    | 17           | 1.573 $\pm$ 0.147 | 0.0117           | 0.0074    |
| 40                    | 12 | 0    | 0            | 1.510 $\pm$ 0.156 | 0.0150           | 0.0099    |
| 200                   | 20 | 2    | 10           | 1.444 $\pm$ 0.191 | 0.0127           | 0.0088    |

Values are means  $\pm$  SE. ND, not determined. \* $P < 0.05$ ; +average calculated from pooled hearts.

**Ex ovo videomicroscopy.** ED4 chick embryos cultured ex ovo were studied by video microscopy to calculate cardiac volumes using prolate ellipsoid formula (25) (Fig. 1). Ten-second loops were recorded every minute for 30 min with a Canon G5 CCD camera mounted on a Leica SMZ16 dissecting microscope. The embryos in ex ovo culture dishes (14) were maintained at 37.5°C using a metal container filled with preheated Bath Armor dry medium placed on an ECHOTHERM chilling/heating plate.

Additional group of embryos was studied at ED5 in ovo 24 h after injection of the drugs (Fig. 1). Because of less clear view of the heart due to more advanced stage of development and turning of the embryo, only heart rate and regularity were evaluated.

**Ex ovo ultrasound investigation.** Ultrasound biomicroscopy ex ovo (Fig. 1) was performed on a Vevo 760 setup, adapted for chick embryos (14), after acute intraamniotic injection of 200  $\mu$ l of metoprolol, 50  $\mu$ l of carvedilol, or 200  $\mu$ l of ivabradine or 200  $\mu$ l of normal saline for a period of 30 min. A lower dose of carvedilol was used because acute mortality was too high with the 200  $\mu$ l dose. In the ED8 embryos, stroke volume was calculated from the long parasternal short-axis view, using the Simpson method in ED8 embryos. Cardiac output was then calculated from the following equation: cardiac output (in  $\mu$ l/min) = stroke volume (in  $\mu$ l) \* heart rate (in beats/min).

**Doses of antiarrhythmic drugs.** For the functional studies, we used 200  $\mu$ l of metoprolol per egg (57 g on average), which represents a dose 16 times higher than the maximum recommended dose for human (70 kg) with respect to the body weight and its pharmacokinetics. Administration of 50  $\mu$ l of carvedilol represents a dose four times higher than the maximum recommended dose for human; 200  $\mu$ l of ivabradine is seven times higher. The maximal acute effective concentration in the embryo itself with the intraamniotic application is ~20 times higher considering the gradual distribution to the entire volume of one egg. We chose these high doses of the three drugs for our experiment because there was no effect noticed on chick embryonic heart rate at the lower doses recommended for humans. We tested different drug doses in the increasing fashion, and finally we chose doses with obvious effect on embryonic heart rate. The results thus reflect potential toxic effect of accidental overdose, rather than the effects occurring in the usual clinical setting.

**$\beta$ -Adrenergic receptors analysis.** The preparation of myocardial membranes and determination of  $\beta$ -adrenergic receptors was performed as follows. The chick hearts (normal at various developmental stages, and ED9 with and without treatment with  $\beta$ -blockers at ED4

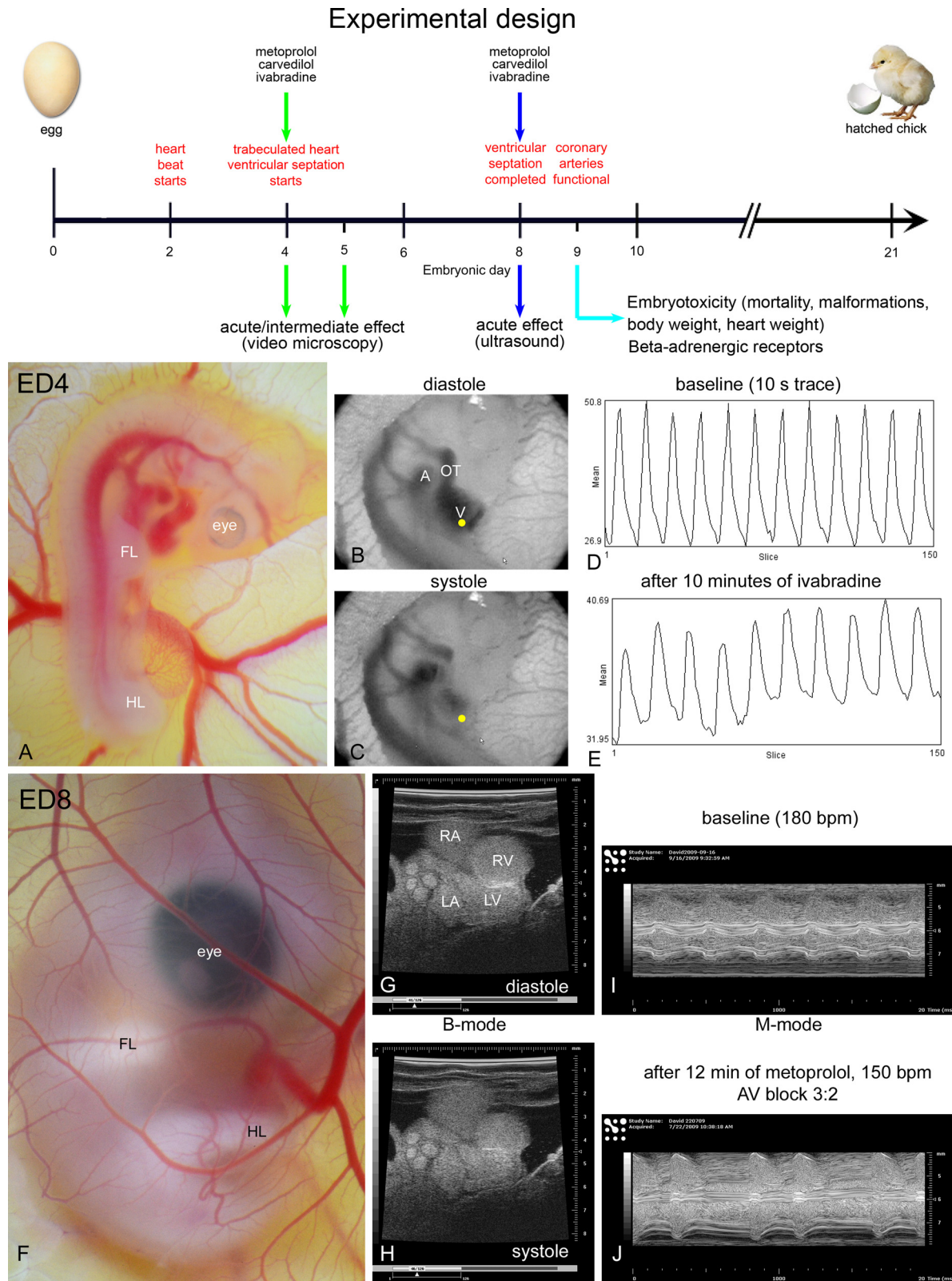


Fig. 1. Experimental outline, morphology of embryonic day (ED)4 and ED8 embryos, and demonstration of methods for data acquisition and analysis. *Top*: schematically the experimental design of treatment and sampling with evaluation using various methods. Videomicroscopy at ED4 chick embryonic stage with the heart rate recordings (A–E) shows a negative inotropic effect of ivabradine. Microphotograph and ultrasound B mode and M mode in ED8 chick embryonic stage (F–J) show a negative chronotropic and dromotropic effect of metoprolol. A, atrium; FL, fore limb; HL, hind limb; LA, left atrium; LV, left ventricle; OT, outflow tract; RA, right atrium; RV, right ventricle; V, ventricle. The yellow dot shows the region of interest from which the rhythm strip (D and E) was generated. Bpm, beats/min.

and/or ED8) were homogenized in TMES buffer containing (in mM) 20 Tris-HCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 1 EDTA, a 250 sucrose (pH 7.4) containing a complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics), using a Potter-Elvehjem glass-teflon homogenizer. Coarse cell debris and nuclei were removed by low-speed centrifugation (600 g, 10 min), and membranes were then pelleted by centrifugation at 50,000 g for 30 min at 4°C. The pellets were suspended in TMES buffer and stored in aliquots at -80°C.

$\beta$ -Adrenergic receptors were determined by a single-point binding assay using [<sup>3</sup>H]CGP12177, a nonselective  $\beta$ -adrenergic antagonist. Myocardial membranes (60  $\mu$ g) were incubated with 3 nM [<sup>3</sup>H]CGP12177 in incubation buffer containing (in mM) 50 Tris-HCl, 10 MgCl<sub>2</sub>, and 1 ascorbic acid (pH 7.4) for 60 min at 37°C in a total volume of 0.5 ml. The reaction was terminated by the addition of 3 ml of ice-cold washing buffer containing 50 mM Tris-HCl and 10 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4) and immediate filtration through Whatman GF/C filters presoaked with 0.3% PEL. Nonspecific binding was assessed by incubating the samples with radioligand in the presence of 10  $\mu$ M L-propranolol. The radioactivity retained on filters was measured by scintillation counting in 5 ml of CytoScint (ICN Biomedicals). Receptors in all samples were determined in 3–5 independent experiments, each done in triplicate. The results are expressed as the mean, with error bars denoting standard deviations.

**Statistics.** The embryotoxic effect was tested using a Yates corrected  $\chi^2$ -test. Embryo and heart weights were compared using an unpaired Student's *t*-test.

Longitudinal comparisons of functional parameters before and after drug administration were performed using both a paired Student's *t*-test (for changes in time within group) and the ANOVA and Scheffe' test for multiple comparisons between the saline and drugs groups. *P* value below 0.05 was considered as significant in all tests.

## RESULTS

**Embryotoxic effects.** In the control group injected with 200  $\mu$ l of normal saline the background mortality was 14% for ED4 embryos and 6% for ED8 embryos. No significant increase in mortality was observed in ED4 embryos injected with different doses of metoprolol, and 39% mortality was achieved in ED8 embryos injected with 200  $\mu$ l of metoprolol. A significant mortality of 86% was observed in ED4 embryos injected with 200  $\mu$ l of carvedilol; this effect was less pronounced in ED8 embryos with a mortality of 44%. Significant dose-dependent mortality (80%) was achieved in ED4 embryos injected with 200  $\mu$ l of ivabradine (Table 1). In ED8 embryos this effect was

less pronounced with only 10% mortality at the same dose (Table 2). Wet and dry embryo and embryonic heart weights were not significantly different among the groups (Tables 1 and 2). No external or internal malformations, growth retardation, or edema were noted in the survivors.

**Functional effects at the early embryonic stage.** Metoprolol is a drug with a strong negative chronotropic effect leading to a 33% decrease of heart rate measured 30 min after administration in ED4 ex ovo embryos compared with a nonsignificant 6% reduction from the baseline of  $150 \pm 13$  beats/min (mean  $\pm$  SD) in the normal saline group (Fig. 2). The difference was statistically significant with *P* = 0.009. Cardiac output in ED4 embryos decreased by 1% from the baseline of  $26,072 \pm 17,791$   $\mu$ l/min (mean  $\pm$  SD) in the control group and by 16% in the metoprolol group (Fig. 2). Within the metoprolol group there was no statistically significant difference compared with the baseline values (*P* = 0.930) as well as compared with the controls (*P* = 0.503). In more complex figures showing the time trends of normalized values, error bars were omitted for clarity of presentation.

The maximum negative chronotropic effect of 50  $\mu$ l carvedilol dose injected to ED4 ex ovo embryos was achieved already after 6 min, when the heart rate significantly decreased by 27% (*P* = 0.003), with no further change after 30 min (Fig. 2). The difference in heart rate between the control and carvedilol groups was statistically significant at 6 and 30 min, with *P* = 0.001 and *P* = 0.047, respectively. There was no statistically significant difference in cardiac output between the groups (Fig. 2).

Ivabradine injection to ED4 embryos resulted in a decrease of heart rate after 30 min by 55%, whereas in the controls there was only a 6% decrease (Fig. 2). This difference was highly statistically significant with *P* < 0.001. In the ivabradine group cardiac output decreased significantly against the baseline by 43% at 30 min (Fig. 2), whereas in the controls the difference at 30 min did not reach statistical significance (*P* = 0.986).

To obtain further insight into the durability of these effects, a separate group of embryos injected with the highest doses tested was studied by in ovo videomicroscopy 24 h after injection at ED5. No effect on heart rate and regularity was noticed with the  $\beta$ -blockers (controls: heart rate  $161 \pm 12$ ,

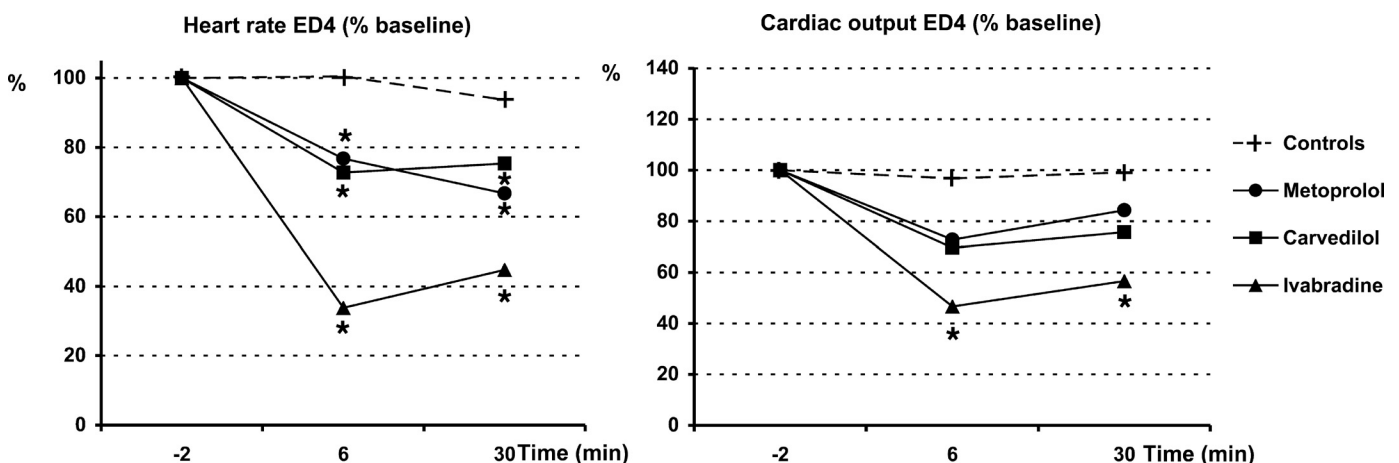


Fig. 2. Heart rate (HR) and cardiac output (CO) at ED4 embryonic stage. Decrease in HR translates into reduced CO. \**P* < 0.05, statistically significant difference vs. control.

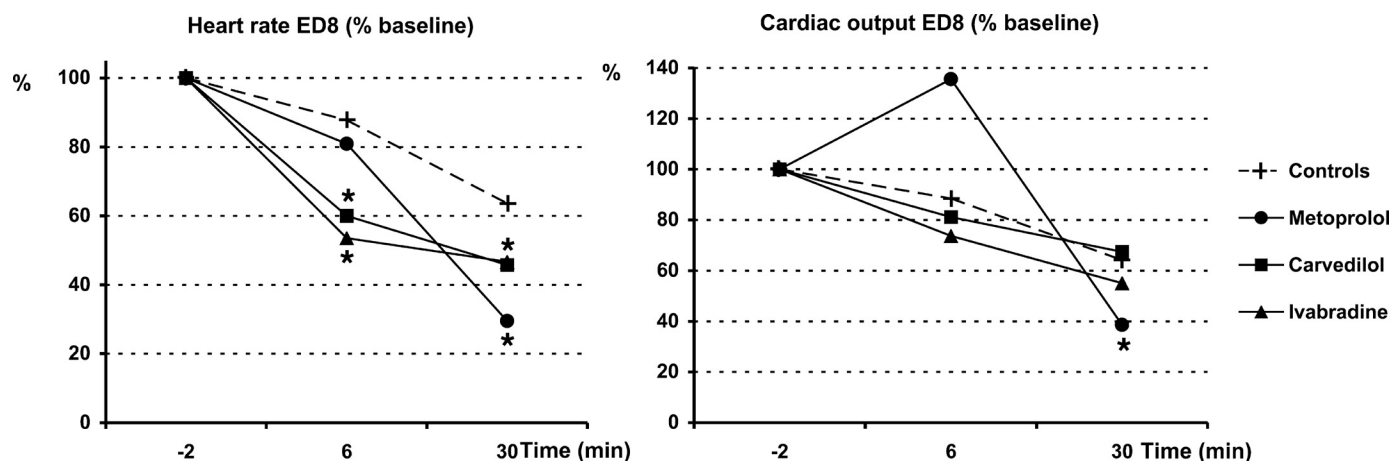


Fig. 3. HR and CO at ED8 embryonic stage. \*  $P < 0.05$ , statistically significant difference vs. control.

mean  $\pm$  SD,  $N = 14$ ; metoprolol  $155 \pm 9$ ,  $N = 8$ ; carvedilol  $160 \pm 11$ ,  $N = 13$ ). However, there was a significant reduction in baseline heart rate in the ivabradine group ( $141 \pm 18$ ,  $N = 15$ ,  $P = 0.003$ ), where we also observed in the majority of embryos periods of even more profound bradycardia and brief asystole over the 30-min recording period, during which 2 of 15 embryos actually died.

**Functional changes at the fetal stage.** In more mature ED8 embryos, the negative chronotropic effect of metoprolol was even more pronounced (Fig. 3), with the heart rate decreasing by 71% ( $P < 0.001$ ) compared with the controls where the heart rate decreased only by 36% ( $P < 0.001$ ) from the baseline of  $205 \pm 28$  beats/min (mean  $\pm$  SD). The difference between the metoprolol group and the controls was significant at 30 min with  $P = 0.011$ . In both groups the cardiac output decreased significantly concomitantly with the heart rate by 61% in the metoprolol group and by 36% in the control group from the baseline of  $37,442 \pm 12,826$   $\mu\text{l}/\text{min}$  (means  $\pm$  SD; Fig. 3). The difference between the control and metoprolol groups was statistically significant ( $P = 0.001$ ).

In ED8 embryos injected with 200  $\mu\text{l}$  of carvedilol, we observed pronounced periods of asystole and embryonic death (4 embryos out of 5;  $P = 0.004$  in a  $\chi^2$ -test). Therefore, a reduced dose of 50  $\mu\text{l}$  was used afterward. Administration of 50  $\mu\text{l}$  of carvedilol caused a negative chronotropic response resulting in a decrease of heart rate by 54% from the base line ( $P < 0.001$ ) at 30 min. When compared with that of the controls, the difference was statistically significant with  $P = 0.037$  (Fig. 3). In the carvedilol group we also noticed a statistically significant increase in stroke volume at 6 and 30 min that was sufficient to keep the cardiac output decreasing only slowly with the decreasing heart rate. This compensatory effect resulted in no difference in cardiac output between the carvedilol and control groups. In both groups, cardiac output decreased by 36% and 33% in 30 min (Fig. 3).

The same, more pronounced, negative chronotropic effect in more mature embryos was also observed after ivabradine treatment. The heart rate decreased significantly by 53% in the ivabradine group ( $P < 0.001$ ). There was a borderline difference between the ivabradine group and the controls with  $P = 0.052$  (Fig. 3). There was no significant difference in stroke volume between the two groups. Cardiac output decreased by 45% in the ivabradine group and by 36% in the controls

( $P = 0.128$ ) with no significant difference between the groups (Fig. 3).

**Developmental profiling of  $\beta$ -adrenergic receptors.** We observed a clear downward trend in the number of  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -ARs) during chick embryonic development. The early embryonic stages ED4 had a considerably higher number of  $\beta$ -ARs compared with the more mature ED18 (Fig. 4). The density of  $\beta$ -ARs was not significantly different between ED8 embryos incubated for 24 h with metoprolol compared with ED9 controls (76 vs. 78 fmol/mg protein). However, administration of carvedilol reduced the number of  $\beta$ -ARs in ED8 embryos compared with the controls (56 vs. 72 fmol/mg protein). Interestingly, early stage ED4 chick embryos expressed a significantly lower number of  $\beta$ -ARs when incubated with metoprolol and carvedilol compared with the more matured ED8 embryos or controls. The mean myocardial  $\beta$ -AR density in the group of ED4 + ED8 embryos treated with metoprolol was 55 fmol/mg protein; in ED4 + ED8 embryos treated with carvedilol it fell to 37 fmol/mg protein (Fig. 5).

## DISCUSSION

We studied three different antiarrhythmic drugs with a strong potential to slow down the heart rate. Metoprolol is a moderately selective  $\beta_1$ -blocking agent with a negative chronotropic and inotropic effect (15). Carvedilol is a nonselective  $\beta$ -blocker directly inhibiting both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs as well as

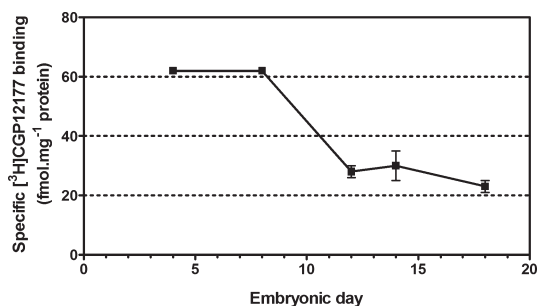


Fig. 4. Developmental profiling of  $\beta$ -adrenergic receptors in the chick embryonic heart.



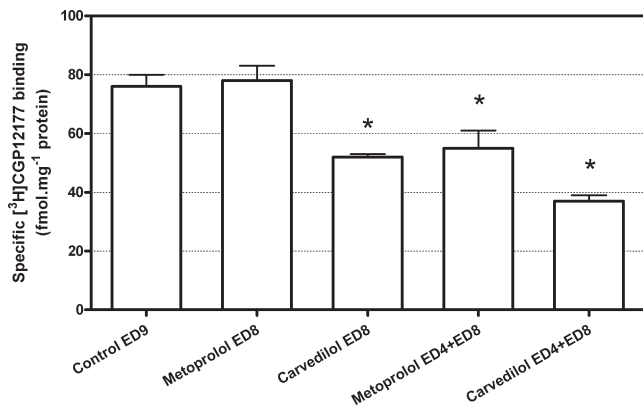


Fig. 5.  $\beta$ -Adrenergic receptors in the chick embryonic heart are downregulated after treatment with  $\beta$ -blockers. \* $P < 0.05$ , statistically significant difference.

$\beta$ -ARs present in blood vessel walls (15). This wide blocking effect of adrenergic receptors results in a negative chronotropic effect, a less pronounced negative inotropic effect (5), and decreased afterload. Ivabradine is a relatively new drug with a direct effect on the funny ( $I_f$ ) channels expressed in the sinus node in high concentration. This effect gives ivabradine a strong potential to slow down the heart rate without negative effects on myocardial contractility (27).

The effects of  $\beta$ -blocking agents were studied retrospectively in pregnant women with hereditary long QT syndrome, and there were no reported fetal malformations (20). Metoprolol use for the treatment of arterial hypertension during pregnancy exhibited no abnormal effect on the fetus (22). Metoprolol is recommended for the treatment of supraventricular tachycardias during pregnancy as class I, level of evidence B, with a note that  $\beta$ -blocking agents should not be taken in the first trimester, if possible (4). Metoprolol has nearly a 100% effectiveness in crossing the placental barrier as its concentrations determined in blood serum were found to be close to equal in both mother and fetus according to manufacturer's data. Although this corresponds well with our findings of no cardiac or other malformations in the chick embryos treated during the critical period for induction of developmental defects (ED4) even with the highest doses of these agents, we could not support the statement about not using these drugs in the first trimester. We found that early embryos are much less sensitive to  $\beta$ -blockers than older ones, despite the presence of relatively high levels of  $\beta$ -ARs. A negative chronotropic effect of a  $\beta$ -blocking agent on human newborns was also proven in a placebo-controlled trial of atenolol for the treatment of hypertension associated with pregnancy. Neonatal bradycardia was more common after atenolol, but no adverse effect on the fetus was noticed (21). We also noticed a significant negative chronotropic effect of metoprolol in chick embryos at more mature fetal stages (ED8), compared with controls. This effect was followed by a significant decrease in cardiac output because the trabecular structure and volume of the fetal left ventricle (26) are not able to increase stroke volume with the Frank-Starling mechanism as effectively as described in the adult heart. Insufficient cardiac output might be the cause of fetal death, which we observed during our experiment with ED8 chick embryos injected with 200  $\mu$ l of metoprolol. As reported earlier, prolonged hypoxia as a consequence of mild

to moderate bradycardia may be a mechanism for embryonic death (6).

We observed a decrease in heart rate in the control group, which was not significant in the early embryonic ED4 stage but became significant in the more mature ED8-fetal stage group. This phenomenon can be explained by the amniotic membrane drying up despite our effort to stop this process. The pressure of the ultrasound probe on the embryo might influence heart rate. The ultrasound power output itself had no influence on embryonic heart rate. The heart rate remained unchanged when we reduced the ultrasound power output by 50%. We also monitored closely the temperature in the culture dishes, which remained constant during the experiments.

Clinical evidence of the adverse effect of carvedilol on the human fetus is lacking. To date, no human studies or case reports have been published. No data are available regarding the transplacental transfer of carvedilol in humans. Low placental transfer was demonstrated in animal studies (<http://polaros.com/carvedilol-pharmacokinetics.html>). Based on our results we can report a significant adverse effect of high carvedilol dose (200  $\mu$ l) on both (embryonic and fetal) stages. This dose, at least 16 $\times$  times higher than the one used routinely in humans, led to highly significant periods of prolonged asystole and embryonic death when acute effects of this drug were tested. A reduced dose of 50  $\mu$ l of carvedilol showed a much better safety profile with no significant embryotoxicity. The negative chronotropic effect of carvedilol in ED8 embryos was significant but led to a nonsignificant decrease of cardiac output.

The safety of ivabradine during pregnancy in humans is unknown; only one case report has been published, showing no adverse effect on the fetus (2). No data are available to specify how much ivabradine crosses the placental barrier. Ivabradine was found in amniotic fluid of pregnant rats and was excreted into maternal milk of rats in experiments ([http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000598/WC500035338.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000598/WC500035338.pdf)). Furthermore, teratogenicity (ectrodactylia) and increased intrauterine demise was noticed in the rabbits. The significant embryotoxicity of ivabradine in early embryonic stages should warrant further investigations, to discern whether they represent direct teratogenic effects, or consequences of abnormal cardiac function. The pacemaking funny current is present in the developing heart from the earliest stages and becomes gradually restricted to the sinoatrial and atrioventricular nodes (1, 23). It is therefore not surprising that ivabradine has a negative chronotropic effect on the developing heart, as was shown in vitro by Sarre et al. (1, 23) and confirmed in vivo by our data.

Endogenous synthesis of catecholamines in the pacemaking area reported in the early mammalian heart by Ebert and Thompson (8) supports our findings of moderate negative chronotropic response even at ED4. We have further proved the presence of functional  $\beta$ -ARs in the chick embryo at ED4. In this independent experiment performed on isolated chick hearts incubated with a ramped dose of 2–20–72  $\mu$ l ( $\mu$ g) adrenaline per 2 ml, there was a 60% increase of heart rate, compared with saline controls. It was also shown previously that the sensitivity of the heart to  $\beta$ -mimetic agents (isoproterenol) increases during chick development, with a peak at ED9 (17). We have confirmed these observations by finding relatively higher acute sensitivity to the same dose of  $\beta$ -blocker at

the fetal stage (ED8) compared with the pre-innervation embryonic stage (ED4). This cannot be attributed to a greater number of  $\beta$ -ARs because we found a significant downward trend in the expression of these receptors during the developmental stages from ED4 to ED18. We hypothesize that more efficient coupling of the receptors to their downstream effectors in the later developmental stages may well explain the increased sensitivity to  $\beta$ -mimetics, and we plan to perform systematic evaluation of downstream effectors (adenylate cyclase activity measurements) in future research focused on this experimental model. Moreover, it has been reported that sympathetic autonomic innervation reaches the developing chick heart after the parasympathetic (vagal) nerves at ED9 (11, 28). We also observed that long-lasting effect of  $\beta$ -blocking agents lead to the downregulation of  $\beta$ -ARs specifically in early embryonic stages. This effect is more pronounced in carvedilol, a nonselective  $\beta$ -blocking agent, rather than in metoprolol, which is a moderately selective  $\beta_1$ -blocking agent.

### Conclusions

Sensitivity to the negative chronotropic effect of metoprolol, carvedilol, and ivabradine increases with development. In agreement with our hypothesis, the embryonic heart has a limited potential to regulate stroke volume, and significant bradycardia is therefore followed by a significant decrease in cardiac output, likely leading to embryonic death. According to our animal data, metoprolol in standard doses appears to be relatively safe in pregnancy, which complies with the clinical experience. However, any bradycardia-inducing drugs at high enough dose might lead to a potentially adverse effect on the fetus through their influence on fetal heart rate, and clinical experience with carvedilol and ivabradine is still lacking.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Vera Lanska for advice on statistics.

### GRANTS

This study was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic P302/11/1308 and 304/08/0615, Ministry of Education MSM 0021620806-PRVOUK-P35/LF1/5; MSM 0021620858; and Academy of Sciences AV0Z50110509-RVO: 67985823.

### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

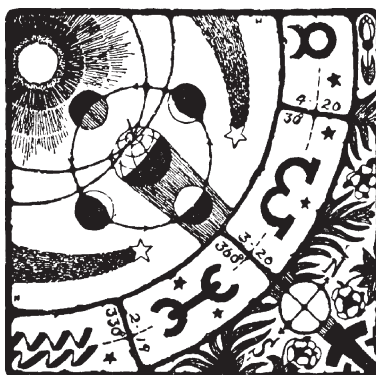
### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: R.K. and B.O. conception and design of research; R.K., J.S., and L.H. performed experiments; R.K., J.S., J.N., and L.H. analyzed data; R.K., J.N., and L.H. prepared figures; R.K. drafted manuscript; R.K. and D.S. approved final version of manuscript; J.N., B.O., and D.S. interpreted results of experiments; J.N., B.O., and D.S. edited and revised manuscript.

### REFERENCES

- Aanhaanen WT, Mommersteeg MT, Norden J, Wakker V, de Gier-de Vries C, Anderson RH, Kispert A, Moorman AF, Christoffels VM. Developmental origin, growth, and three-dimensional architecture of the atrioventricular conduction axis of the mouse heart. *Circ Res* 107: 728–736, 2010.
- Babic Z, Gabric ID, Pintaric H. Successful primary percutaneous coronary intervention in the first trimester of pregnancy. *Catheter Cardiovasc Interv* 77: 522–525, 2011.
- Balaji S, Harris L. Atrial arrhythmias in congenital heart disease. *Cardiol Clin* 20: 459–468, 2002.
- Blomstrom-Lundqvist C, Scheinman MM, Aliot EM, Alpert JS, Calkins H, Camm AJ, Campbell WB, Haines DE, Kuck KH, Lerman BB, Miller DD, Shaeffer CW, Stevenson WG, Tomaselli GF, Antman EM, Smith SC Jr, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Gregoratos G, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Russell RO Jr, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Burgos EF, Cowie M, Deckers JW, Garcia MA, Klein WW, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais JC, Oto A, Smiseth O, Trappe HJ. ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias—executive summary a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the European society of cardiology committee for practice guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias) developed in collaboration with NASPE-Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol* 42: 1493–1531, 2003.
- Brixius K, Bundkirchen A, Bolck B, Mehlhorn U, Schwinger RH. Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium. *Br J Pharmacol* 133: 1330–1338, 2001.
- Danielsson BR, Skold AC, Azarbayjani F. Class III antiarrhythmics and phenytoin: teratogenicity due to embryonic cardiac dysrhythmia and reoxygenation damage. *Curr Pharm Des* 7: 787–802, 2001.
- Dunnigan A, Hu N, Benson DW Jr, Clark EB. Effect of heart rate increase on dorsal aortic flow in the stage 24 chick embryo. *Pediatr Res* 22: 442–444, 1987.
- Ebert SN, Thompson RP. Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res* 88: 117–124, 2001.
- Ferrero S, Colombo BM, Ragni N. Maternal arrhythmias during pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 269: 244–253, 2004.
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology* 88: 49–92, 1951.
- Hildreth V, Anderson RH, Henderson DJ. Autonomic innervation of the developing heart: origins and function. *Clin Anat* 22: 36–46, 2009.
- Hutson JR, Garcia-Bournissen F, Davis A, Koren G. The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs. *Clin Pharmacol Ther* 90: 67–76, 2011.
- Joglar JA, Page RL. Antiarrhythmic drugs in pregnancy. *Curr Opin Cardiol* 16: 40–45, 2001.
- McQuinn TC, Bratoeva M, Dealmeida A, Remond M, Thompson RP, Sedmera D. High-frequency ultrasonographic imaging of avian cardiovascular development. *Dev Dyn* 236: 3503–3513, 2007.
- Opie LH, Gersch BJ. *Drugs for the Heart*. Elsevier, 2005, p. 437.
- Ostadal B, Janatova T, Krause EG, Pelouch V, Dusek J. Different effect of propranolol and verapamil on isoprenaline-induced changes in the chick embryonic heart. *Physiol Bohemoslov* 36: 301–311, 1987.
- Ostadal B, Janatova T, Krause EG, Rychter Z, Pelouch V. Analysis of the cardiotoxic effect of isoproterenol in chick embryo. *J Physiol (Paris)* 78: 867–869, 1982.
- Ostadal B, Pelouch V, Ostadalova I, Novakova O. Structural and biochemical remodelling in catecholamine-induced cardiomyopathy: comparative and ontogenetic aspects. *Mol Cell Biochem* 147: 83–88, 1995.
- Ostadal B, Rychter Z, Rychterova. The action of isoproterenol on the chick embryo heart. *J Mol Cell Cardiol* 8: 533–544, 1976.
- Rashba EJ, Zareba W, Moss AJ, Hall WJ, Robinson J, Locati EH, Schwartz PJ, Andrews M. Influence of pregnancy on the risk for cardiac events in patients with hereditary long QT syndrome. LQTS Investigators. *Circulation* 97: 451–456, 1998.
- Rubin PC, Butters L, Low RA, Reid JL. Atenolol in the treatment of essential hypertension during pregnancy. *Br J Clin Pharmacol* 14: 279–281, 1982.
- Sandstrom B. Antihypertensive treatment with the adrenergic beta-receptor blocker metoprolol during pregnancy. *Gynecol Invest* 9: 195–204, 1978.
- Sarre A, Pedretti S, Gardier S, Raddatz E. Specific inhibition of HCN channels slows rhythm differently in atria, ventricle and outflow tract and stabilizes conduction in the anoxic-reoxygenated embryonic heart model. *Pharmacol Res* 61: 85–91, 2010.
- Sedmera D. Function and form in the developing cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 91: 252–259, 2011.
- Sedmera D, Grobety M, Reymond C, Baehler P, Kucera P, Kappenberger L. Pacing-induced ventricular remodeling in the chick embryonic heart. *Pediatr Res* 45: 845–852, 1999.

26. **Sedmera D, Pexieder T, Rychterova V, Hu N, Clark EB.** Remodeling of chick embryonic ventricular myoarchitecture under experimentally changed loading conditions. *Anat Rec* 254: 238–252, 1999.
27. **Sulfi S, Timmis AD.** Ivabradine—the first selective sinus node I(f) channel inhibitor in the treatment of stable angina. *Int J Clin Pract* 60: 222–228, 2006.
28. **Verberne ME, Gittenberger-De Groot AC, Poelmann RE.** Distribution of antigen epitopes shared by nerves and the myocardium of the embryonic chick heart using different neuronal markers. *Anat Rec* 260: 335–350, 2000.
29. **Zamenhof S.** Selective sensitive period in chick embryo: toxic effect of exogenous neurotransmitters. *Cytobios* 58: 171–177, 1989.



## Research Article

# Adenylyl Cyclase Signaling in the Developing Chick Heart: The Deranging Effect of Antiarrhythmic Drugs

Lucie Hejnova,<sup>1</sup> Klara Hahnova,<sup>1</sup> Radka Kockova,<sup>2</sup> Jarmila Svatunkova,<sup>2</sup>  
David Sedmera,<sup>2,3</sup> and Jiri Novotny<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, 128 43 Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Institute of Anatomy, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Jiri Novotny; [jiri.novotny@natur.cuni.cz](mailto:jiri.novotny@natur.cuni.cz)

Received 28 February 2014; Revised 14 May 2014; Accepted 29 May 2014; Published 23 June 2014

Academic Editor: Diego Franco

Copyright © 2014 Lucie Hejnova et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The adenylyl cyclase (AC) signaling system plays a crucial role in the regulation of cardiac contractility. Here we analyzed the key components of myocardial AC signaling in the developing chick embryo and assessed the impact of selected  $\beta$ -blocking agents on this system. Application of metoprolol and carvedilol, two commonly used  $\beta$ -blockers, at embryonic day (ED) 8 significantly downregulated (by about 40%) expression levels of AC5, the dominant cardiac AC isoform, and the amount of Gs $\alpha$  protein at ED9. Activity of AC stimulated by forskolin was also significantly reduced under these conditions. Interestingly, when administered at ED4, these drugs did not produce such profound changes in the myocardial AC signaling system, except for markedly increased expression of Gi $\alpha$  protein. These data indicate that  $\beta$ -blocking agents can strongly derange AC signaling during the first half of embryonic heart development.

## 1. Introduction

Cardiovascular diseases represent frequent life-threatening health problems in the western society and they can also be encountered during pregnancy [1, 2]. It is evident that the need of expanded use of cardiac medication goes hand in hand with the increasing age of pregnant women. Nowadays,  $\beta$ -blockers are the most commonly used agents for treatment of arrhythmias, ischemic heart disease, heart failure, and hypertension [3]. Nevertheless, there is only sparse information concerning potential harmful effects of the  $\beta$ -blockers on fetal development and child health when used in pregnancy. Some recent findings indicate that children of mothers treated with  $\beta$ -blockers during pregnancy may be at higher risk for cardiovascular defects [4–6]. However, the embryotoxic mechanisms of these compounds are still not well understood.

The chick embryonic heart has proven to be a good model for studying developmental physiology of the cardiovascular system and it can also be useful for exploring cardiotoxicity

of catecholamines and  $\beta$ -blocking agents [7]. In the chick embryo, the onset of sympathetic cardiac innervation occurs at about embryonic day (ED) 9 and this system is functional by ED16 [8]. During subsequent stages of development, the number of myocardial  $\beta$ -adrenergic receptors increases, reaching adult values on postnatal day 7 [9]. However, autonomic receptor-mediated effector mechanisms seem to be present in the heart before there is functional innervation. The ability of exogenous noradrenaline to elicit acceleration of heart rate has been observed already in the early stages of chick embryo development [10]. Interestingly, the preneuronal period of heart development is characterized by the presence of relatively high levels of catecholamines, which may be secreted by the developing adrenal medulla or sympathetic chain ganglia [11, 12].

Some early experiments with catecholamines and  $\beta$ -blockers revealed that the chick heart is more resistant to these drugs in early embryonic stages than in later stages of prenatal development [13]. Our previous study focused on determining the effect of metoprolol and carvedilol, two

$\beta$ -blockers frequently used in clinical practice, indicated that administration of these drugs at ED8 may cause much more pronounced decrease in heart rate when compared to treatment at ED4 [14]. Interestingly, this effect was mediated by lower number of  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -ARs) in older chick embryos. In contrast to metoprolol, carvedilol lowered the number of myocardial  $\beta$ -ARs, but metoprolol reduced heart rate more effectively than carvedilol [14].

It is well known that  $\beta$ -ARs receptors transfer information through their cognate G proteins to adenylyl cyclase (AC), and this signaling system is crucially involved in the regulation of cardiac function [15, 16]. The main aim of our present work was to characterize the major components of the chick myocardial AC signaling system during embryonic development and to assess the potential impact of  $\beta$ -blockers on its function.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Materials.** [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP was purchased from Izotop (Budapest, Hungary), [ $^3$ H]cAMP from ARC (St. Louis, MO, USA), and scintillation cocktail EcoLite from MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA). Acrylamide and bisacrylamide were from SERVA (Heidelberg, Germany), and aluminum oxide 90 (neutral, activity I) was from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO, USA) and they were of the highest purity available. AC5 antibody was from Abcam (Cambridge, UK) and G $\alpha$  and actin antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA). Preparation and characterization of Gi $\alpha$ (1,2) antibody were described previously [17].

**2.2. Chick Embryo Incubation and Drug Application.** Fertilized white Leghorn chicken eggs were incubated with their blunt end up in forced draft incubator at 38°C and 75% humidity up to embryonic days (ED) 4–18. The eggs were turned automatically every 4 h. At ED4 or ED8 or ED4 + ED8, 200  $\mu$ L metoprolol (1 mg/mL) or 50  $\mu$ L carvedilol (1 mg/mL) dissolved in normal saline was administered intramniotically through a small opening made in the egg shell. More specifically, the eggs were divided into seven groups. Whereas the first group received metoprolol and the second group carvedilol at ED4, the third and fourth group received, respectively, metoprolol and carvedilol only at ED8. The fifth group received metoprolol at both ED4 and ED8 (ED4 + ED8), and the sixth group received carvedilol at both ED4 and ED8 (ED4 + ED8). Normal saline was administered to the seventh group (control, ED9) at both ED4 and ED8. After finishing injecting, all the eggs were sealed and further incubated until ED9.

**2.3. Preparation of Crude Membranes.** Chick hearts (normal at various developmental stages and ED9 with and without treatment with beta-blockers at ED4, ED8, and ED4 + ED8) were homogenized in TMES buffer containing 20 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, and 250 mM sucrose (pH 7.4) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche

Diagnostics), using Potter-Elvehjem glass-teflon homogenizer on ice. Coarse cell debris and nuclei were removed by low-speed centrifugation (600 g, 10 min, 4°C), and membranes were then pelleted by centrifugation at 50,000 g for 30 min at 4°C. The pellets were resuspended in TME buffer (20 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM EDTA; pH 7.4), aliquoted into Eppendorf tubes, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

**2.4. Assessment of Adenylyl Cyclase Activity.** Adenylyl cyclase (AC) activity in myocardial membranes was determined by measuring the conversion of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP to [ $^{32}$ P]cAMP according to the method of Salomon et al. [18]. Myocardial membranes (20  $\mu$ g of proteins) were incubated in the reaction mixture (100  $\mu$ L) containing 48 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ M GTP, 0.8 mg/mL BSA, 5 mM phosphoenolpyruvate, 3.2 U of pyruvate kinase, 40  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.1 mM cAMP, and about 10 000 cpm [ $^3$ H]cAMP as a tracer. Stimulated AC activity was measured after addition of 10  $\mu$ M isoprenaline or 10  $\mu$ M forskolin. After 1 minute preincubation 0.4 mM ATP was added along with 200,000 cpm [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP and incubation proceeded for 20 min at 30°C. The reaction was stopped by addition of 200  $\mu$ L 0.5 M HCl and heating at 100°C for 5 min. Samples were neutralized by 200  $\mu$ L 1.5 M imidazole. Separation of newly formed [ $^{32}$ P]cAMP was performed by using dry alumina column chromatography as described by White [19]. Column recovery was usually about 70–75%.

**2.5. Electrophoresis and Western Blotting.** Samples of myocardial membranes were solubilized in Laemmli buffer and loaded (30  $\mu$ g per lane) on standard 10% acrylamide gels for SDS-PAGE. After electrophoresis, the resolved proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell), blocked with 5% nonfat dry milk in TBS buffer (10 mM Tris and 150 mM NaCl; pH 8.0) for 1 h, and then incubated with relevant primary antibodies overnight at 4°C. After three 10 min washes in TBS containing 0.3% Tween 20, the secondary anti-rabbit IgG labeled with horseradish peroxidase was applied for 1 h at room temperature. After another three 10 min washes in TBS-Tween, the blots were visualized by enhanced chemiluminescence technique according to the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). To ensure equal protein loading on the gel, the membranes were stripped and reprobed with actin antibody. The immunoblots were scanned and quantitatively analyzed by ImageQuant TL software (Amersham Biosciences). Relative expression levels of AC5, G $\alpha$ , and Gi $\alpha$  were always normalized to the corresponding expression of actin.

## 3. Results

**3.1. Adenylyl Cyclase Activity.** Activity of AC in myocardial preparations from chick embryos did not significantly differ between ED4 and ED18 (Figure 1). Whereas the  $\beta$ -adrenergic agonist isoprenaline increased the basal AC activity by about

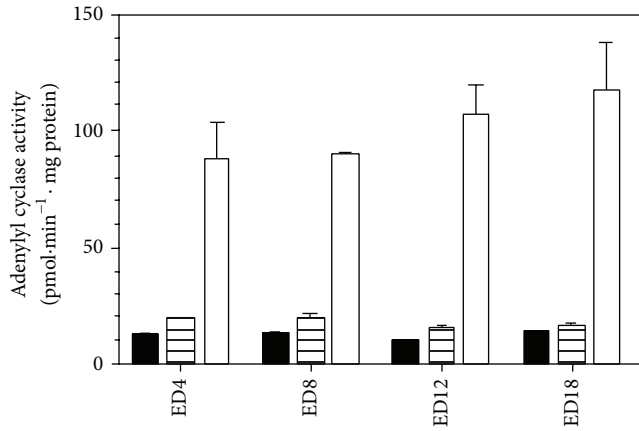


FIGURE 1: Adenylyl cyclase activity in the chick embryonic heart during ontogenesis. Basal (solid bars), isoprenaline-stimulated (hatched bars), and forskolin-stimulated (open bars) AC activity was monitored in myocardial membrane preparations from different stages of embryonic development. All values represent the mean  $\pm$  SEM of three determinations measured in triplicate.

40–45%, forskolin, a direct activator of the AC catalytic subunit and Gs protein, augmented the enzyme activity up to 10-fold. However, the extent of the stimulatory effects of both of these activators did not significantly differ between samples prepared from different developmental stages of the chick embryo. It is worth noting that there was a slight downward tendency in isoprenaline-stimulated AC activity in the later stages of embryonic development.

In the next series of experiments we investigated the impact of  $\beta$ -blockers applied during early developmental stages on myocardial AC activity assessed at ED9. Neither metoprolol nor carvedilol injected into the developing chick embryos at ED4 or ED4 + ED8 altered AC activity at ED9 but both of these drugs significantly suppressed forskolin-stimulated AC activity when administered at ED8 (Figure 2).

**3.2. Developmental Expression of Adenylyl Cyclase and G Proteins.** The distribution of AC5 and  $\alpha$  subunits of the stimulatory (Gs) and inhibitory (Gi) G proteins as the key components of the AC signaling system was determined in myocardial preparations from different developmental stages of the chick embryo by western blotting (Figure 3). The expression level of the dominant cardiac AC isoform, AC5, slightly increased during early stages of embryonic development, but it fell by over 30% between ED12 and ED18. Whereas AC5 expression was not affected by metoprolol or carvedilol at ED4, administration of these drugs at ED8 resulted in a marked decrease (by about 50%) in cardiac AC5 (Figure 4). When applied at ED4 + ED8, the  $\beta$ -blockers also reduced AC5 levels, but to a much lesser extent (by about 20%).

Immunochemical assessment of the developmental profile of selected G protein subunits indicated relatively very low expression levels of the  $\alpha$  subunits of Gs and Gi proteins in the earliest stages of heart development and these levels increased dramatically between ED4 and ED8 (Figure 3).

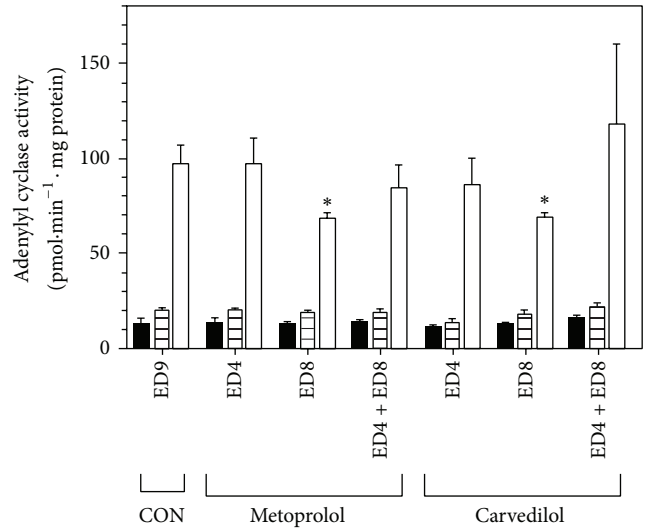


FIGURE 2: Effect of  $\beta$ -blockers on adenylyl cyclase activity in the chick embryonic heart. A dose of metoprolol or carvedilol was injected into chick embryos either at ED4 (ED4 Met or ED4 Car) or at ED8 (ED8 Met or ED8 Car) or at both ED4 and ED8 (ED4 + ED8 Met or ED4 + ED8 Car). Control embryos (CON) received normal saline at ED4 and ED8. All the embryos were incubated until ED9. Subsequently, all ED9 embryos (both control and those affected by  $\beta$ -blockers) were used for preparation of myocardial membranes and determination of basal (solid bars), isoprenaline-stimulated (hatched bars), and forskolin-stimulated (open bars) AC activity. Data shown are means  $\pm$  SEM of triplicate measurements. \* Indicates a statistically significant difference between the indicated group affected by  $\beta$ -blockers and control ( $P < 0.05$ ).

Thereafter, the expression of G protein  $\alpha$  subunits remained relatively unchanged until ED18. When applied on ED4, metoprolol and carvedilol did not significantly affect Gs $\alpha$  levels in the developing chick heart (Figure 4). However, injection of metoprolol at ED8 and ED4 + ED8 led to a decline (by about 40–60%) in Gs $\alpha$  expression. Interestingly, no such effects were observed after treatment with carvedilol. By contrast, carvedilol applied at ED4 + ED8 increased Gs $\alpha$  expression by about 30%. Application of both  $\beta$ -blockers at ED4 and application of carvedilol at ED8 or ED4 + ED8 markedly increased (by about 60%) the amount of Gi $\alpha$  at ED9 (Figure 4). Treatment of chick embryos with metoprolol at ED8 or ED4 + ED8 did not elicit such profound changes in the content of myocardial Gi $\alpha$  protein.

#### 4. Discussion

Heart function can be favorably modulated by  $\beta$ -blocking agents under some pathological conditions. However, there is also some evidence that these drugs may be potentially harmful to embryonic or fetal development when administered during pregnancy. In the present work we set to evaluate the impact of two widely used  $\beta$ -blockers, namely, metoprolol and carvedilol, on the key components and function of the myocardial adenylyl cyclase signaling system in the developing chick embryo.

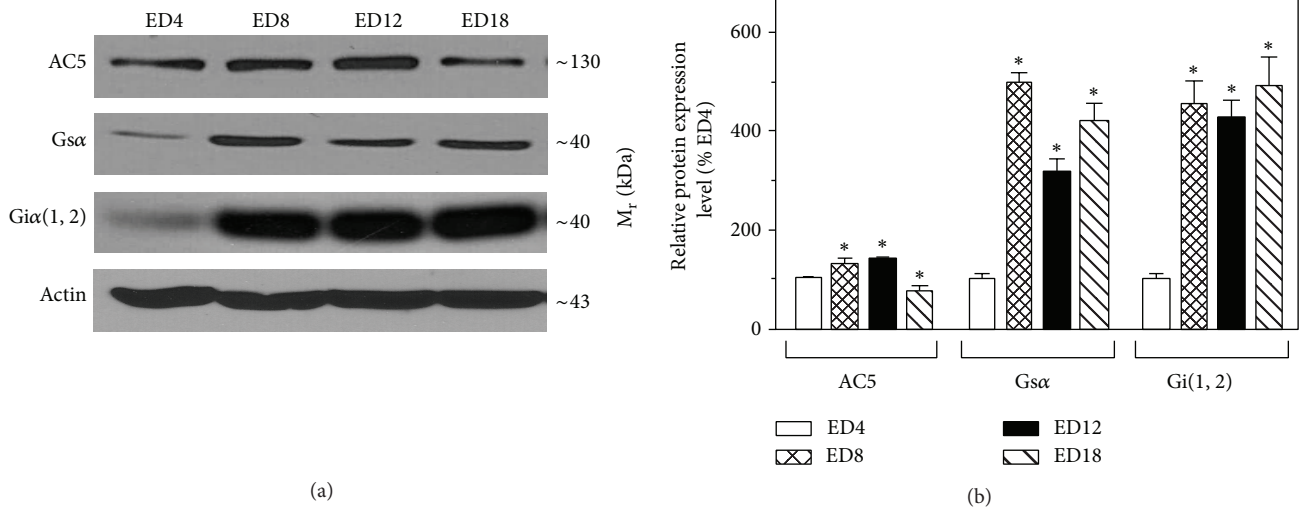


FIGURE 3: Expression of adenylyl cyclase and G protein subunits in the developing chick heart. Proteins from myocardial membrane preparations derived from different developmental stages of the chick embryo were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with specific antibodies to AC5 isoform and  $\alpha$  subunits of Gs and Gi(1,2) proteins. After stripping, the membranes were re probed with actin antibody to control for differences in protein loading. Representative blots are shown, each of three independently performed experiments (a) and the graphical representation of relative expression levels (means  $\pm$  SEM) of AC5, Gs $\alpha$ , and Gi $\alpha$  normalized to the corresponding expression of actin (b). \* Indicates significantly different expression of the individual proteins in samples from ED8, ED12, and ED12 as compared to ED4 ( $P < 0.05$ ).

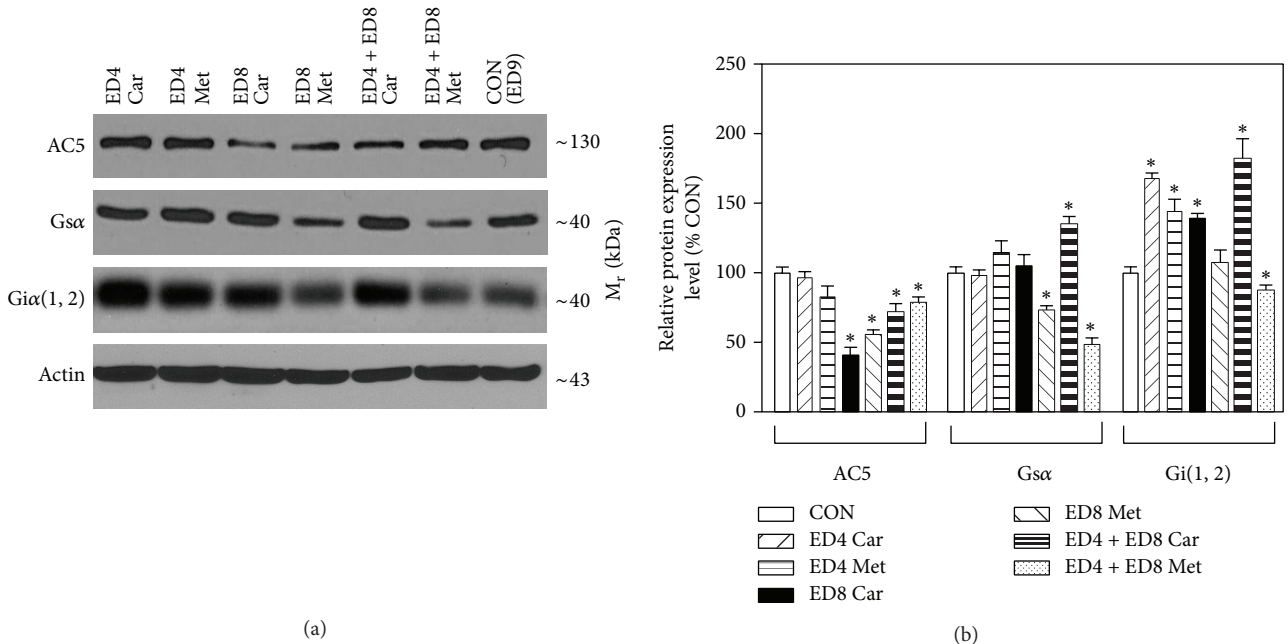


FIGURE 4: Effect of  $\beta$ -blockers on expression of adenylyl cyclase and G protein subunits in the chick embryonic heart. Samples of myocardial membrane proteins prepared from ED9 chick embryos, both control (CON) and previously treated with metoprolol (Met) or carvedilol (Car) at ED4, ED8, or ED4 + ED8, were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with specific antibodies to AC5 isoform and  $\alpha$  subunits of Gs and Gi(1,2) proteins. After stripping, the membranes were re probed with actin antibody to control for differences in protein loading. Representative blots are shown, each of three independently performed experiments (a) and the graphical representation of relative expression levels (means  $\pm$  SEM) of AC5, Gs $\alpha$ , and Gi $\alpha$  normalized to the corresponding expression of actin (b). \* Indicates a statistically significant difference between the indicated group affected by  $\beta$ -blockers and control ( $P < 0.05$ ).

Our current experimental results have indicated that, despite a perceptible decrease in the amount of the predominant isoform of cardiac adenylyl cyclase (AC5) between ED12 and ED18, the enzyme activity of AC is relatively stable in the course of chick embryo development, which is in line with some earlier findings [20, 21]. In parallel, rather incongruently, there was a marked increase in Gs and Gi protein levels between ED4 and ED8. However, a similar rise in myocardial Gi during the early development of the chick embryo was reported also by others [21]. Results of our previous study and some other studies indicated a clear drop in the number of myocardial  $\beta$ -adrenergic receptors during prenatal ontogenesis [14, 22, 23]. Together, these data suggest that  $\beta$ -ARs, G proteins, and AC are not coordinately regulated during development. It is also important to notice that partial loss of myocardial  $\beta$ -ARs in the later stages of embryonic development was reflected only by moderate insignificant diminution of isoprenaline-stimulated AC activity. This implies that there might have been sufficient receptor reserve (spare receptors) and that apparently not all the  $\beta$ -ARs must be necessarily coupled to AC to ensure the effective and reliable signal transmission. It has been reported previously that the amount of spare  $\beta$ -ARs may vary greatly between different tissues and species [24–26]. Furthermore, these findings can lead to the assumption that increased sensitivity to  $\beta$ -mimetics detected in the later stages of chick heart development is substantiated by a more efficient coupling of the  $\beta$ -ARs to their downstream effector AC.

We have previously observed that injection of  $\beta$ -blockers into the developing chick embryos at ED4, ED8, or ED4 + ED8 considerably reduced the number of myocardial  $\beta$ -ARs [14]. Results of our current research have shown that application of metoprolol and carvedilol at ED8, but not at ED4 or ED4 + ED8, can noticeably suppress AC activity stimulated by forskolin. However, basal and isoprenaline-stimulated AC activity was not significantly changed under these conditions. This seeming discrepancy can be at least partially explained by the decreased levels of G proteins, which were found in myocardial preparations from chick embryos affected with  $\beta$ -blockers at ED8. Forskolin can increase AC activity not only through direct interaction with the enzyme but also via Gs protein [27] and therefore lower amount of this G protein may well lie behind the diminished capacity of this agent to stimulate AC.

There is ample evidence to show that the regulatory mechanisms engaged in  $\beta$ -ARs-mediated signaling may substantially differ in the mature organism and during the prenatal period of development [28]. Whereas receptor signaling is controlled through the processes of desensitization and downregulation in adulthood, agonist-induced stimulation of  $\beta$ -ARs in the embryonic tissues fails to produce desensitization, and instead responsiveness increases. The peculiar regulatory mechanisms, which may include adaptive changes at the level of the receptors, G proteins, and AC, are instrumental for the necessary physiological adjustments during prenatal life and preparation for the postpartum period. It has become clear that there are unique developmental stages of susceptibility between species and embryonic exposure

to harmful substances may lead to impairment of cardiac development and function [13, 29–32]. Our current research has revealed that application of the  $\beta$ -blockers metoprolol and carvedilol to the chick embryo during the first half of prenatal development can markedly derange myocardial  $\beta$ -ARs-mediated AC signaling. We have observed that  $\beta$ -blockers, which are used for their antiarrhythmic effects, may not always be beneficial but they can also affect the expression of myocardial  $\beta$ -ARs, G proteins, and AC as well as the function of this important signaling system during embryonic development. Therefore, physicians should be aware of potentially harmful side effects when prescribing these drugs during pregnancy.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This study was supported by the Charles University Grant Agency (610612), the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (SVV-260087/2014), and PRVOUK (P35/LF1/5). Further support by the Academy of Sciences (RVO: 67985823) and Grant Agency of the Czech Republic (P302/11/1308) is gratefully acknowledged.

## References

- [1] S. Nanda, C. Nelson-Piercy, and L. Mackillop, "Cardiac disease in pregnancy," *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, vol. 12, no. 6, pp. 553–560, 2012.
- [2] M. A. Nickens, R. C. Long, and S. A. Geraci, "Cardiovascular disease in pregnancy (Women's Health Series)," *Southern Medical Journal*, vol. 106, no. 11, pp. 624–630, 2013.
- [3] W. H. Frishman, " $\beta$ -adrenergic blockade in cardiovascular disease," *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, vol. 18, no. 4, pp. 310–319, 2013.
- [4] A. R. Caton, E. M. Bell, C. M. Druschel et al., "Antihypertensive medication use during pregnancy and the risk of cardiovascular malformations," *Hypertension*, vol. 54, no. 1, pp. 63–70, 2009.
- [5] C. Vasilakis-Scaramozza, A. Aschengrau, H. J. Cabral, and S. S. Jick, "Antihypertensive drugs and the risk of congenital anomalies," *Pharmacotherapy*, vol. 33, no. 5, pp. 476–482, 2013.
- [6] M. Y. Yakoob, B. T. Bateman, E. Ho et al., "The risk of congenital malformations associated with exposure to  $\beta$ -blockers early in pregnancy: a meta-analysis," *Hypertension*, vol. 62, no. 2, pp. 375–381, 2013.
- [7] K. Ruijtenbeek, J. G. R. De Mey, C. E. Blanco, and H. Ehmke, "The chicken embryo in developmental physiology of the cardiovascular system: A traditional model with new possibilities," *American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 283, no. 2, pp. R549–R551, 2002.
- [8] M. L. Kirby, "Innervation of the developing heart," in *Cardiac Development*, pp. 179–197, Oxford University Press, 2007.
- [9] D. Higgins and A. J. Pappano, "A histochemical study of the ontogeny of catecholamine-containing axons in the chick embryo heart," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 11, no. 7, pp. 661–668, 1979.



- [10] N. G. Culver and D. A. Fischman, "Pharmacological analysis of sympathetic function in the embryonic chick heart," *The American Journal of Physiology*, vol. 232, no. 3, pp. R116–R123, 1977.
- [11] D. E. Stewart and M. L. Kirby, "Endogenous tyrosine hydroxylase activity in the developing chick heart: a possible source of extraneuronal catecholamines," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 17, no. 4, pp. 389–398, 1985.
- [12] A. L. M. Mulder, J. M. C. G. van Golde, A. A. C. van Goor, D. A. Giussani, and C. E. Blanco, "Developmental changes in plasma catecholamine concentrations during normoxia and acute hypoxia in the chick embryo," *Journal of Physiology*, vol. 527, no. 3, pp. 593–599, 2000.
- [13] S. Zamenhof, "Selective sensitive period in chick embryo: toxic effect of exogenous neurotransmitters," *Cytobios*, vol. 58, no. 234–235, pp. 171–177, 1989.
- [14] R. Kockova, J. Svatunkova, J. Novotny, L. Hejnova, B. Ostadal, and D. Sedmera, "Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo," *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, vol. 304, no. 6, pp. H895–H902, 2013.
- [15] D. E. Vatner, K. Asai, M. Iwase et al., "Beta-adrenergic receptor-G protein-adenylyl cyclase signal transduction in the failing heart," *American Journal of Cardiology*, vol. 83, no. 12, pp. 80H–85H, 1999.
- [16] S. B. Wachter and E. M. Gilbert, "Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application," *Cardiology*, vol. 122, no. 2, pp. 104–112, 2012.
- [17] J. Novotny, L. Bouřová, F. Kolář, and P. Svoboda, "Membrane-bound and cytosolic forms of heterotrimeric G proteins in young and adult rat myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 82, no. 2, pp. 215–224, 2001.
- [18] Y. Salomon, C. Londos, and M. Rodbell, "A highly sensitive adenylyl cyclase assay," *Analytical Biochemistry*, vol. 58, no. 2, pp. 541–548, 1974.
- [19] A. A. White, "Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography," *Methods in Enzymology*, vol. 38, pp. 41–46, 1974.
- [20] R. W. Alexander, J. B. Galper, E. J. Neer, and T. W. Smith, "Non-co-ordinate development of  $\beta$ -adrenergic receptors and adenylyl cyclase in chick heart," *Biochemical Journal*, vol. 204, no. 3, pp. 825–830, 1982.
- [21] S. W. Halvorsen and N. M. Nathanson, "Ontogenesis of physiological responsiveness and guanine nucleotide sensitivity of cardiac muscarinic receptors during chick embryonic development," *Biochemistry*, vol. 23, no. 24, pp. 5813–5821, 1984.
- [22] M. T. Phillips, M. L. Kirby, and D. E. Stewart, "Cyclic AMP in normal and sympathetically aneural chick hearts during development," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 18, no. 8, pp. 827–835, 1986.
- [23] D. E. Stewart, M. L. Kirby, and R. S. Aronstam, "Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptor density in the non-innervated and denervated embryonic chick heart," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 18, no. 5, pp. 469–475, 1986.
- [24] L. Brown, N. M. Deighton, S. Bals et al., "Spare receptors for  $\beta$ -adrenoceptor-mediated positive inotropic effects of catecholamines in the human heart," *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 19, no. 2, pp. 222–232, 1992.
- [25] D. A. Jackson and N. M. Nathanson, "Subtype-specific regulation of muscarinic receptor expression and function by heterologous receptor activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 38, pp. 22374–22377, 1995.
- [26] S. Dhein, P. Röhnert, S. Markau et al., "Cardiac beta-adrenoceptors in chronic uremia: studies in humans and rats," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 36, no. 2, pp. 608–617, 2000.
- [27] A. A. Alousi, J. R. Jasper, P. A. Insel, and H. J. Motulsky, "Stoichiometry of receptor-GS-adenylyl cyclase interactions," *The FASEB Journal*, vol. 5, no. 9, pp. 2300–2303, 1991.
- [28] T. A. Slotkin, J. T. Auman, and F. J. Seidler, "Ontogenesis of  $\beta$ -adrenoceptor signaling: Implications for perinatal physiology and for fetal effects of tocolytic drugs," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 306, no. 1, pp. 1–7, 2003.
- [29] L. Venturini and S. B. Sparber, "Salicylate and cocaine: interactive toxicity during chicken mid-embryogenesis," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 30, no. 2, pp. 198–207, 2001.
- [30] M. C. Garofolo, F. J. Seidler, M. M. Cousins, C. A. Tate, D. Qiao, and T. A. Slotkin, "Developmental toxicity of terbutaline: critical periods for sex-selective effects on macromolecules and DNA synthesis in rat brain, heart, and liver," *Brain Research Bulletin*, vol. 59, no. 4, pp. 319–329, 2003.
- [31] A. L. Portbury, R. Chandra, M. Groelle et al., "Catecholamines act via a  $\beta$ -adrenergic receptor to maintain fetal heart rate and survival," *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, vol. 284, no. 6, pp. H2069–H2077, 2003.
- [32] V. J. Drake, S. L. Koprowski, N. Hu, S. M. Smith, and J. Lough, "Cardiogenic effects of trichloroethylene and trichloroacetic acid following exposure during heart specification of avian development," *Toxicological Sciences*, vol. 94, no. 1, pp. 153–162, 2006.

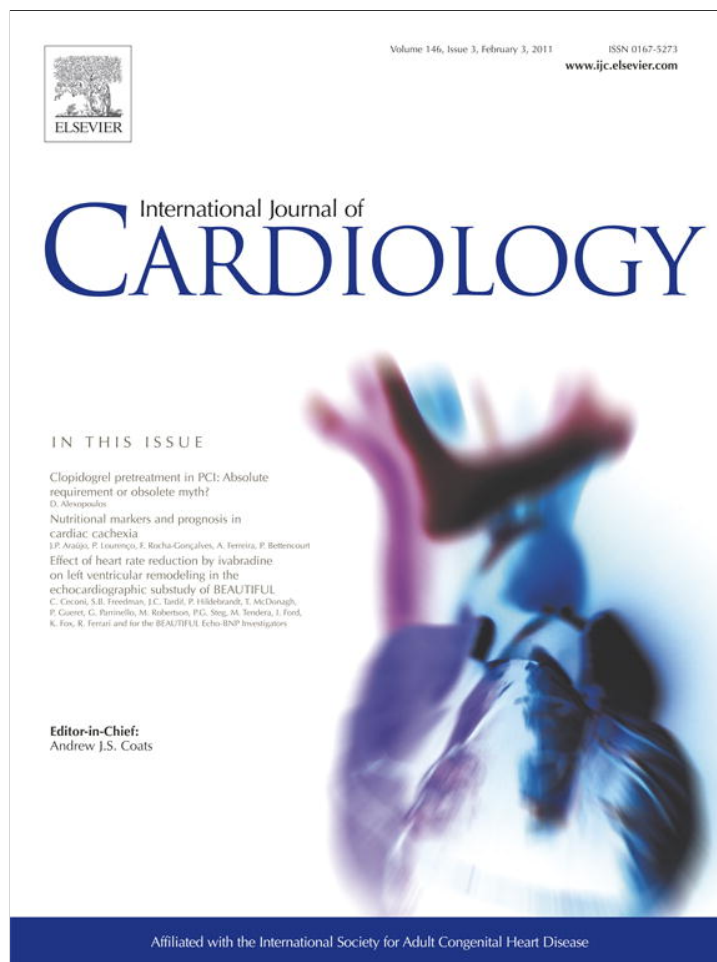


# Hindawi

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

- [19] Manfredini R, Boari B, Salmi R, et al. Day-of-week variability in the occurrence and outcome of aortic diseases: does it exist? *Am J Emerg Med* 2008;23:363–6.
- [20] Bell CM, Redelmeier DA. Waiting for urgent procedures on the weekend among emergently hospitalized patients. *Am J Med* 2004;117:175–81.
- [21] Angus DC, Shorr AF, White A, Dremsizov TT, Schmitz RJ, Kelley MA. Critical care delivery in the United States: distribution of services and compliance with Leapfrog recommendations. *Crit Care Med* 2006;34:1016–24.
- [22] Tickoo S, Fonarow GC, Hernandez AF, Liang L, Cannon CP. Weekend/holiday versus weekday hospital discharge and guideline adherence (from the American Heart Association's Get with the Guidelines – Coronary Artery Disease Database). *Am J Cardiol* 2008;102:663–7.
- [23] Horwich TB, Hernandez AF, Liang L, et al. Weekend hospital admission and discharge for heart failure: association with quality of care and clinical outcomes. *Am Heart J* 2009;158:415–8.
- [24] LaBounty T, Eagle KA, Manfredini R, et al. The impact of time and day on the presentation of acute coronary events. *Clin Cardiol* 2006;29:542–6.
- [25] Wunsch H, Mapstone J, Brady T, Hanks R, Rowan K. Hospital mortality associated with day and time of admission to intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30:895–901.
- [26] Bell CM, Redelmeier DA. Mortality among patients admitted to hospitals on weekends as compared with weekdays. *N Engl J Med* 2001;345:663–6.
- [27] Shewan LG, Coats AJ. Ethics in the authorship and publishing of scientific articles. *Int J Cardiol* 2010;144:1–2.

0167-5273/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.ijcard.2010.10.113

## Five year two center retrospective analysis of patients with toxic digoxin serum concentration

Radka Kockova<sup>a,\*</sup>, Jan Skvaril<sup>b</sup>, Miroslav Cernohous<sup>b</sup>, Marek Maly<sup>c</sup>, Viktor Kocka<sup>d</sup>, Ales Linhart<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Department of Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Cardiology Department, First Faculty of Medicine Charles University in Prague and Central Military Hospital Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

<sup>d</sup> Cardiocenter, Third Faculty of Medicine Charles University in Prague, Czech Republic

<sup>e</sup> 2nd Department of Internal Cardiovascular Medicine, First Faculty of Medicine Charles University in Prague, General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 October 2010

Accepted 23 October 2010

Available online 24 November 2010

#### Keywords:

Digoxin

Digoxin toxicity

Drug interaction

Digoxin is the oldest cardiovascular drug and it has been used over the past 200 years for the treatment of heart failure. American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) guidelines from 2005 [1] and European Society of Cardiology (ESC) guidelines from 2008 [2], on the management of acute and chronic heart failure, recommend digoxin for symptom relief and reducing hospital admissions. The ESC-recommended serum digoxin levels used for treating of chronic heart failure are 0.8–1.5 nmol/l (0.6–1.2 ng/ml) [2] and equivalent ACC/AHA guidelines recommend 0.64–1.2 nmol/l (0.5–0.9 ng/ml) [1]. A serum digoxin level  $\geq 3.0$  nmol/l (2.5 ng/ml) is considered to be toxic. Digoxin is also used in frequency control strategies in atrial fibrillation patients. The aim of our study was to analyze a patient population with toxic serum digoxin levels, paying particular attention to drug interactions and characteristics associated with patient mortality.

Central biochemistry databases from two teaching hospitals in Prague, Czech Republic (General University Hospital and Central Military Hospital), were reviewed retrospectively over a period of five years between 2001 and 2005. The studies identified 222 medical patients with a serum digoxin level  $\geq 3.0$  nmol/ml. The total number of consecutive hospital admissions to all medical departments during

this period was 116,276. Medical records for these patients were analyzed in detail by a qualified cardiologist. Fisher's exact test and logistic regression were used to test the significance of associations. The study complied with the Declaration of Helsinki.

Baseline characteristics of our cohort of 222 patients with a serum digoxin level  $\geq 3.0$  nmol/ml are shown in Table 1. Total mortality until discharge was 8.1%. Cardiac mortality directly attributable to digoxin toxicity was reported in 1.8% of cases. Regarding co-morbid conditions of relevance, only 14% of patients had creatinine clearance in the normal range of  $\geq 60$  ml/min. Statistically significant predictors of mortality included low creatinine clearance with  $p = 0.02$  (Odds Ratio 0.95) but not serum creatinine level with  $p = 0.15$  (Odds Ratio 1.00) on the total cohort of patients (Table 2). Our data support routine calculations of creatinine clearance (Cockcroft–Gault equation) [3]. The positive predictive value of lower creatinine clearance on mortality can be explained by digoxin pharmacokinetics – 70% of digoxin content is eliminated from the human body unchanged by active kidney processes in those with normal renal function [4].

Concomitant medication analysis has shown that 64% of patients were prescribed at least one drug with a known interaction that directly increases the serum digoxin level. Seven percent of patients were taking three or more drugs with known drug interaction. Drug interactions were

**Table 1**  
Patient characteristics.

| Characteristic                  |           | Total population n = 222 |
|---------------------------------|-----------|--------------------------|
| Age (years)                     | Mean (SD) | 77.6 (9.3)               |
| Female gender                   | n (%)     | 130 (59)                 |
| Weight (kg)                     | Mean (SD) | 72.8 (16.3)              |
| Serum K <sup>+</sup> (mmol/l)   | Mean (SD) | 4.6 (0.8)                |
| Serum creatinine ( $\mu$ mol/l) | Mean (SD) | 199.4 (139.2)            |
| Creatinine clearance (ml/min)   | Mean (SD) | 35.9 (22.6)              |
| Digoxin daily dose (mg)         | Mean (SD) | 0.195 (0.100)            |
| Oral digoxin administration     | n (%)     | 184 (73)                 |
| Serum digoxin level (nmol/l)    | Mean (SD) | 4.5 (2.2)                |
| LV ejection fraction (%)        | Mean (SD) | 42.4 (13.7)              |

\* Corresponding author. Tel.: +420 606 483 586; fax: +420 973203073.  
E-mail address: radka.kockova@centrum.cz (R. Kockova).

**Table 2**  
Mortality risk in total cohort of patients.

| Patient characteristic      | Odds Ratio | p value | 95% confidence interval |
|-----------------------------|------------|---------|-------------------------|
| Age                         | 1.02       | 0.61    | (0.948–1.096)           |
| Gender                      | 2.35       | 0.16    | (0.709–7.820)           |
| Weight                      | 0.97       | 0.22    | (0.932–1.017)           |
| Serum K <sup>+</sup> level  | 1.17       | 0.63    | (0.616–2.217)           |
| Creatinine clearance        | 0.95       | 0.02    | (0.916–0.992)           |
| Digoxin daily dose          | 0.24       | 0.60    | (0.001–46.781)          |
| I.v. digoxin administration | 3.60       | 0.187   | (0.573–24.119)          |
| Serum digoxin level         | 0.90       | 0.52    | (0.656–1.236)           |
| LV ejection fraction        | 0.97       | 0.07    | (0.929–1.003)           |

**Table 3**  
Analysis of concomitant medication without digoxin interaction.

| Concomitant drugs without interaction | Number of patients on medication <i>n</i> | Mortality with % ( <i>n</i> ) | Mortality without % ( <i>n</i> ) | p value |
|---------------------------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|---------|
| Acetylsalicylic acid                  | 70  | 7.14 (5)                      | 8.84 (13)                        | 0.80    |
| Hydrochlorothiazide                   | 30  | 3.33 (1)                      | 9.14 (17)                        | 0.48    |
| Furosemide                            | 132                                       | 8.33 (11)                     | 8.33 (7)                         | 1.00    |
| ACEI/ARBs                             | 112                                       | 3.57 (4)                      | 13.46 (14)                       | 0.01    |
| Betablocker                           | 66  | 3.03 (2)                      | 10.67 (16)                       | 0.07    |
| Statin                                | 31  | 6.45 (2)                      | 8.65 (16)                        | 1.00    |
| Warfarin                              | 36  | 5.56 (2)                      | 8.89 (16)                        | 0.74    |

analyzed in detail and every single drug was analyzed in relation to survival. The only statistically significant difference was identified with the concomitant use of angiotensin-converting enzyme inhibitor/angiotensin receptor blocker (ACEI/ARB), which seems to have a protective effect (13.46% mortality without concomitant ACEI/ARB and 3.57% mortality in patients on ACEI/ARB treatment,  $p=0.01$ ) (Table 3). Groups of patients with/without ACEI/ARB treatment were not different with respect to their average age (77 years as opposed to 78 years), left ventricle ejection fraction (41% with treatment, 45% without), serum potassium (4.7 mmol/l in the treated group as opposed to 4.5 mmol/l) or creatinine clearance (34.8 ml/min with treatment, 34.1 ml/min without treatment). There were more patients treated by intravenous (i.v.) digoxin in the ACEI/ARB-treated group (27% as opposed to 8%). A protective effect of ACEI/ARB might be explained by the potassium-sparing effects of ACEI/ARB, however, potassium levels were not different in treated patients and the potassium level could not be used to predict an outcome. Therefore, a direct antiarrhythmic effect of ACEI/ARB can be hypothesized.

There was a statistical trend toward lower mortality in patients with concomitant use of betablockers (10.67% mortality without concomitant betablocker treatment and 3.03% mortality in betablocker-treated patients,  $p=0.07$ ) (Table 3). No significant difference between survival and nonsurvival groups was identified for other concomitant medications frequently used in modern cardiology (for example, acetylsalicylic acid, hydrochlorothiazide, furosemide, statins, and warfarin) (Table 3). There was no statistically significant relationship between drugs with known direct digoxin interaction (for example, amiodarone, carvedilol, verapamil, spironolactone, omeprazole, and macrolide antibiotic) and patient mortality (Table 4).

Other characteristics (such as gender, digoxin dose, serum potassium level, age, and serum digoxin level) had no statistically significant effect on mortality in our patient cohort. This might be influenced by the small number of patient who died. A borderline association between mortality and low ejection fraction of the left ventricle was noticed with  $p=0.07$  (Odds Ratio 0.97) (Table 2).

After adjustment for the group of patients where all data were available (141 patients), i.v. administration of digoxin appeared to be

**Table 4**  
Analysis of drugs with known direct digoxin interaction.

| Drugs with known interaction | Number of patients on medication <i>n</i> | Mortality with % ( <i>n</i> ) | Mortality without % ( <i>n</i> ) | p value |
|------------------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|---------|
| Amiodarone                   | 49  | 6.12 (3)                      | 8.98 (15)                        | 0.77    |
| Carvedilol                   | 29  | 6.90 (2)                      | 8.56 (16)                        | 1.00    |
| Macrolide antibiotics        | 2   | 0.00 (0)                      | 8.41 (18)                        | 1.00    |
| Verapamil                    | 22  | 0.00 (0)                      | 9.28 (18)                        | 0.23    |
| Spironolactone               | 59  | 8.47 (5)                      | 8.28 (13)                        | 1.00    |
| Omeprazole                   | 59  | 6.78 (4)                      | 8.92 (14)                        | 0.79    |

a statistically significant predictor of mortality with  $p=0.02$  (Odds Ratio 32.56). This finding should be interpreted with caution because sicker patients were treated by the i.v. route. Association between mortality and low ejection fraction of the left ventricle was even more marked than in the total cohort with  $p=0.05$  (Odds Ratio 0.95). Systolic function of the left ventricle is generally one of the strongest predictors of patient mortality in many clinical situations [5–7].

A borderline association between mortality and low body weight was noticed with  $p=0.08$  (Odds Ratio 0.94) in the group of patients where all data were available. This can be explained by the distribution volume of digoxin. Approximately half of the digoxin body content is bound to skeletal muscle receptors [4]. Thus, our finding is in good accordance with previous studies that demonstrated that elderly patients [8] and women [9] are at higher risk of digoxin toxicity with potentially worse outcomes.

The main limitation of our study is its retrospective character with the absence of a control group. The number of records analyzed with high data completeness regarding the concomitant medication does, however, make our analysis of high clinical relevance.

This study was partially supported by research grant MSM0021620817.

The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology [10,11].

## References

- [1] Hunt SA. ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 2005;46:e1–82 [Published correction appears in *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1503–5].
- [2] ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2008;29:2388–442.
- [3] Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31–41.
- [4] Opie LH, Gersh BJ. *Drugs for the heart* 6th edition. Philadelphia: Elsevier; 2005.
- [5] Bigger Jr JT, Fleiss JL, Kleiger R, Miller JP, Rolnitzky LM. The relationships among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction, and mortality in the 2 years after myocardial infarction. *Circulation* 1984;69:250–8.
- [6] The Multicenter Postinfarction Research Group Risk stratification and survival after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1983;309:331–6.
- [7] Volpi A, De Vita C, Franzosi MG, Geraci E, Maggioni AP, Mauri F, et al. Determinants of 6-month mortality in survivors of myocardial infarction after thrombolysis: results of the GISSI-2 data base: the Ad hoc Working Group of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-2 Data Base. *Circulation* 1993;88:416–29.
- [8] Hanratty CG, McGlinchey P, Johnson GD, Passmore AP. Differential pharmacokinetics of digoxin in elderly patients. *Drugs Aging* 2000;17(5):353–62 Nov.
- [9] Rathore SS, Wang Y, Krumholz HM. Sex-based differences in the effect of digoxin for the treatment of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347(18):1403–11.
- [10] Shewan LG, Coats AJ. Ethics in the authorship and publishing of scientific articles. *Int J Cardiol* 2010;144:1–2.
- [11] Coats AJ. Ethical authorship and publishing. *Int J Cardiol* 2009;131:149–50.

# Ibutilide-Induced Cardioversion of Atrial Fibrillation During Pregnancy

RADKA KOCKOVA, M.D., VIKTOR KOCKA, M.D., THOMAS KIERNAN, M.B., M.R.C.P.I.,  
and GERARD J. FAHY, M.D., F.R.C.P.I.

From the Department of Cardiology, South-Infirmary Victoria Hospital, Cork, Ireland

**Ibutilide-Induced Cardioversion of Atrial Fibrillation.** We present two cases of successful cardioversion of atrial fibrillation using intravenous ibutilide during pregnancy. One patient had atrial fibrillation, complicating the Wolff-Parkinson-White syndrome and the other had a history of nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy. No adverse maternal or fetal effects were observed during or after pregnancy in either case. (*J Cardiovasc Electrophysiol*, Vol. 18, pp. 1-3, May 2007)

*atrial fibrillation, cardioversion, ibutilide, pregnancy, teratogenicity*

## Introduction

The incidence of atrial fibrillation during pregnancy is low and usually occurs in those with underlying heart disease. When it occurs, it presents more of a therapeutic challenge because of the extra potential to harm the fetus. Conventional management during pregnancy consists of electrical cardioversion during a short period of general anesthesia. Although this is relatively safe, it does involve a stressful intervention with the potential for complications.<sup>1</sup> Although the use of antiarrhythmic drugs is well described during pregnancy to terminate fetal arrhythmias, there is scant experience in their use in pharmacologic conversion of maternal atrial fibrillation. The use of ibutilide has not been previously described during pregnancy. We present two cases of atrial fibrillation during pregnancy, both of which were treated successfully with ibutilide.

## Case Report 1

A 27-year-old woman presented emergently with sudden onset palpitation without other symptoms. She was 30 weeks pregnant and had no previous cardiac history. A previous pregnancy was uneventful. Her heart rate was 180–200/minute and blood pressure was 90/50 mmHg. Gynecological assessment was consistent with a normal gestation of 30 weeks and fetal heart rate was 152/minute on admission. ECG showed atrial fibrillation with a rapid preexcited ventricular response (Fig. 1). A transthoracic echocardiogram was normal. One gram of magnesium sulphate was administered intravenously. This was followed by ibutilide 0.87 mg intravenously over 10 minutes and repeated at the same dosage after 30 minutes. A few minutes later she reverted to sinus rhythm. Her ECG showed a short P-R interval and a delta wave typical of Wolff-Parkinson-White (WPW) syndrome. She was discharged home the following day on flecainide 100 mg bd and atenolol 50 mg od. No further arrhythmias occurred. A healthy baby was delivered normally at term; two months later she underwent successful radiofrequency ablation

of two right-sided manifest inferoseptal accessory bypass tracts and her medication was discontinued. She is asymptomatic 13 months later without medication.

## Case Report 2

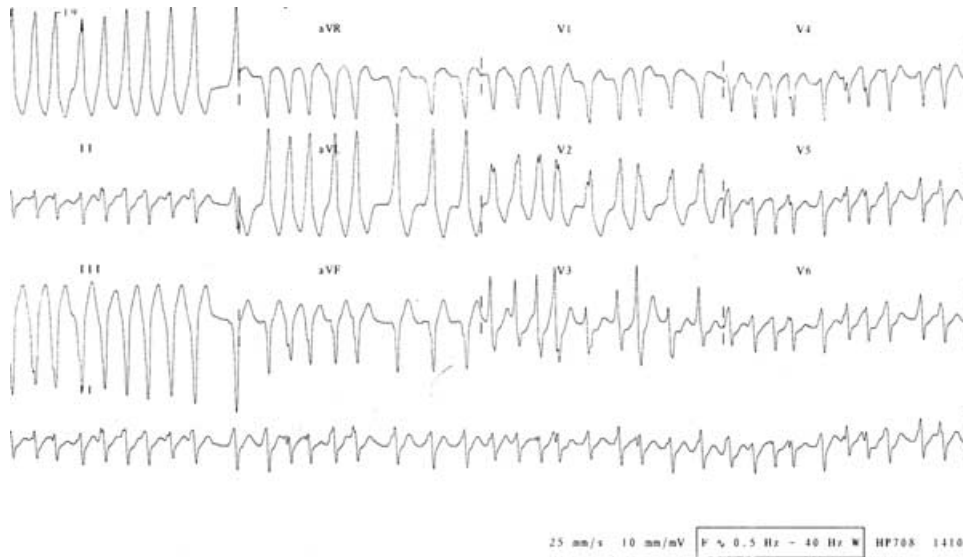
A 34-year-old woman presented with a 38-hour history of palpitation, weakness, and an episode of near syncope. She was 23 weeks pregnant with no complications during pregnancy except transient vaginal bleeding. She was diagnosed with hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy and symptomatic non-sustained ventricular tachycardia two years previously and was treated with bisoprolol 5 mg/day. An electrophysiology study at that time failed to induce ventricular tachycardia, but sustained atrial fibrillation was induced and required pharmacologic cardioversion with ibutilide. The patient had stopped bisoprolol herself shortly before pregnancy. Physical examination revealed an irregularly irregular pulse and ventricular rate of 180/minute. The blood pressure was 105/85 mmHg and she had no signs of cardiac failure. The uterus was enlarged, consistent with 23 weeks of gestation, and fetal heart rate was 160/minute. The ECG showed atrial fibrillation with ventricular response of 183/minute with no other abnormalities (Fig. 2). She was admitted to the intensive care unit and ibutilide was commenced intravenously after 1 g of magnesium sulphate was given intravenously. She reverted to sinus rhythm after 0.25 mg of ibutilide was administered and remained in sinus rhythm during hospitalization. She was discharged home the following day on atenolol 50 mg/day and has remained asymptomatic since. A healthy baby was delivered at term.

## Discussion

Ibutilide is a class III antiarrhythmic agent approved by the FDA in 1995 for intravenous termination of atrial fibrillation and flutter. It prolongs the action potential duration and refractory period in atrial and ventricular myocardium, atrioventricular node, and His-Purkinje system.<sup>2</sup> Ibutilide is particularly useful for termination of atrial fibrillation and flutter in WPW syndrome, as it also prolongs refractoriness in accessory pathways. The recommended dose is 1 mg over 10 minutes for a patient over 60 kg and, if there is no response, a second dose of 1 mg over 10 minutes can be given 10 minutes after completion of the first dose. Continuous cardiac monitoring is recommended for at least 4 hours after administration, as torsades des pointes may occur, requiring cardioversion in  $\leq 4\%$  of patients. Pretreatment with magnesium

Address for correspondence: Gerard J. Fahy, M.D., Consultant Cardiologist, Department of Cardiology, South-Infirmary Victoria Hospital, Old Blackrock Road, Cork, Ireland. Fax. +353214926306; E-mail: fahysdls@eircom.net

Manuscript received 10 July 2006; Revised manuscript received 20 November 2006; Accepted for publication 21 November 2006.



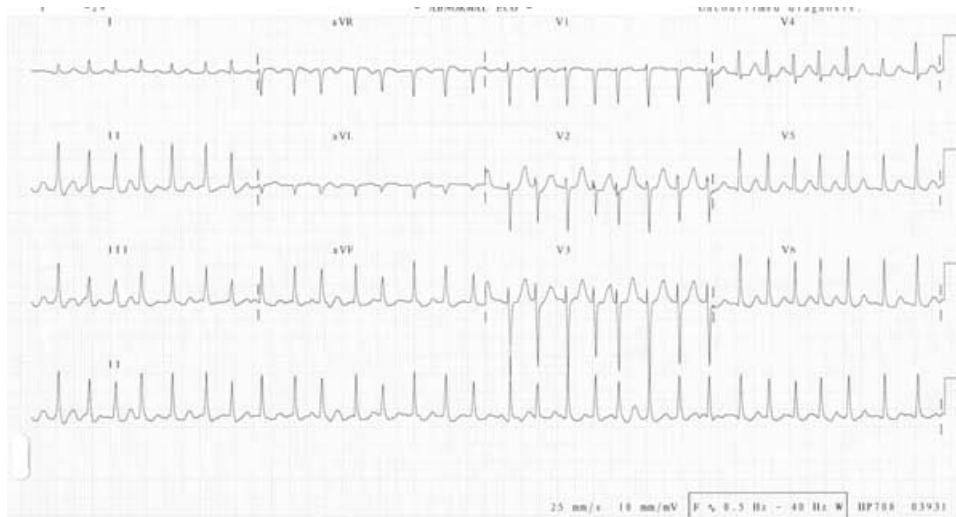
**Figure 1.** The 12-lead ECG shows atrial fibrillation with a rapid ventricular response over an accessory bypass tract.

sulphate is recommended to reduce the risk of proarrhythmia and may result in increased cardioversion rates.

We describe the use of ibutilide in two patients who presented with symptomatic atrial fibrillation during pregnancy. Atrial fibrillation in women of childbearing age is uncommon and usually occurs in those with underlying heart disease. Its management is more challenging because of the extra potential for the arrhythmia and its treatment to harm the fetus. The usual treatment consists of electrical cardioversion under general anesthesia followed by pharmacotherapy to prevent recurrence and thromboembolic events. Although electrical cardioversion during pregnancy appears to be reasonably safe, it is not without risk and is often psychologically upsetting for the patient and family. There was one fetal death, one case of a tightly contracted uterus, and one loss of fetal heart rate variability documented in about 60 previously reported cases of electrical cardioversion in pregnancy.<sup>1</sup> In all three cases, an urgent caesarean section was performed and all complications were thought to be related to cardioversion.

Thus electrical cardioversion should be performed only if facilities are available for fetal heart rate monitoring and urgent caesarean section.<sup>1</sup>

Pharmacological cardioversion of atrial fibrillation is routinely used in nonpregnant patients using various agents of proven efficacy, such as amiodarone, ibutilide, flecainide, and propafenone.<sup>3</sup> Procainamide and quinidine are also commonly used, but are considered to be less effective and incompletely studied.<sup>3</sup> No animal studies have been carried out to determine the teratogenic potential of either procainamide or quinidine. The use of these antiarrhythmic agents has not been systematically studied during pregnancy and all are labeled as category C by the FDA except amiodarone, which is category D. Drugs are included in category C “if animal reproduction studies have shown an adverse effect on the fetus, if there are no adequate and well-controlled studies in humans, and if the benefits from the use of the drug in pregnant women may be acceptable despite its potential risks.”<sup>4</sup> Experience of these agents for cardioversion of maternal atrial arrhythmias



**Figure 2.** The 12-lead ECG shows atrial fibrillation with a rapid ventricular response.

is limited to a small number of case reports.<sup>5-7</sup> More experience has accumulated with pharmacological cardioversion of fetal atrial arrhythmias.<sup>8</sup> Recently published guidelines recommend the use of quinidine for pharmacological conversion of atrial fibrillation during pregnancy as most experience has accumulated with use of this agent in pregnancy and it appears to be relatively safe.<sup>3</sup>

The use of ibutilide during pregnancy in humans has not been previously reported and therefore, its teratogenic potential in humans is unknown. In a study used to establish the NOAEL (no observed adverse effect level) in rats, teratogenic effects of ibutilide were only seen using relatively high doses of ibutilide for prolonged periods of rat gestation.<sup>9</sup> The mechanism of teratogenic effects is thought to be caused by selectively blocking the rapid component of the delayed rectified potassium channel (IKr) in the embryonic heart causing fetal bradycardia and arrhythmias, which in turn causes hypoxia.<sup>10</sup> The teratogenic effects of orofacial clefts skeletal malformations and cardiovascular abnormalities are very similar to those caused by other IKr blockers and also very similar to those caused by hypoxia. As ibutilide is prescribed for very short-term use and has a very short half-life of 2–4 hours and its dose is four times lower than the NOAEL, it is very unlikely to have any significant adverse effect on the fetus. This is particularly true in our patients, both of whom were treated after the first trimester when teratogenesis is unlikely to occur. Pretreatment using 1 g of magnesium sulphate appears to be safe during pregnancy, as this agent is used routinely in much higher doses to prevent seizures during preeclampsia and as a tocolytic agent without adverse maternal or fetal effects.

The use of new drugs during pregnancy should be discouraged and administered only if absolutely necessary. However, given the available evidence for the efficacy of ibutilide in cardioversion of recent-onset atrial fibrillation and its low chance of teratogenicity and that both of our patients presented after the first trimester, we felt that the risk/benefit profile of ibutilide was as favorable, if not better than, conventional treatment in each case. The use of ibutilide could be further justified in patient 1 as ibutilide offered the advantage over quinidine of a more rapid onset of action, and ibutilide does not cause hypotension, which made it a more suitable agent than intravenous procainamide in this patient who was already hypotensive. Furthermore, ibutilide is more likely to cardiovert atrial fibrillation than intravenous procainamide.

In Patient 2, ibutilide could be justified as class 1 antiarrhythmic drugs could not be used safely because of the presence of hypertrophic cardiomyopathy, and ibutilide had successfully cardioverted this patient from atrial fibrillation two years previously at the time of electrophysiology study.

Ibutilide was effective in our patients with atrial fibrillation and was not associated with any adverse maternal or fetal effects. As the efficacy of ibutilide for cardioversion of recent onset atrial fibrillation has been rigorously demonstrated and as it has a low chance of teratogenicity, it may be a reasonable alternative to electrical cardioversion in pregnant patients presenting with atrial fibrillation of recent onset.

## References

1. Barnes EJ, Eben F, Patterson D: Direct current cardioversion during pregnancy should be performed with facilities available for fetal monitoring and emergency caesarean section. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:1406-1407.
2. Murray KT: Ibutilide. *Circulation* 1998;97:493-497.
3. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey J-Y, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prys-towsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc J-J, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Zamorano JL: ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for practice guidelines (Writing committee to revise the 2001 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation). *Circulation* 2006;114:e257-e354.
4. Pregnancy "Category C" labeling. <http://fda.gov/cder/handbook/categc.htm>. Accessed September 2, 2006.
5. Carson MP, Fisher AJ, Scorza WE: Atrial fibrillation in pregnancy associated with oral terbutaline. *Obstet Gynecol* 2002;100:1096-1097.
6. Doig JC, McComb JM, Reid DS: Incessant atrial tachycardia accelerated by pregnancy. *Br Heart J* 1992;67:266-268.
7. Mozo de Rosales F, Moreno J, Bodegas A, Melchor JC, Fernandez LLebrez L, Aranguren G: Conversion of atrial fibrillation with ajmaline in a pregnant woman with Wolff-Parkinson-White syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1994;56:63-66.
8. Simpson JM, Sharland GK: Fetal tachycardias: Management and outcome of 127 cases. *Heart* 1998;79:576-581.
9. Marks TA, Terry RD: Developmental toxicity of ibutilide fumarate in rats after oral administration. *Teratology* 1996;54:157-164.
10. Danielsson BR, Skold AC, Azarbayjani F: Class III antiarrhythmics and phenytoin teratogenicity due to embryonic cardiac dysrhythmia and reoxygenation damage. *Curr Pharm Des* 2001;7:787-802.