

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/43389> holds various files of this Leiden University dissertation

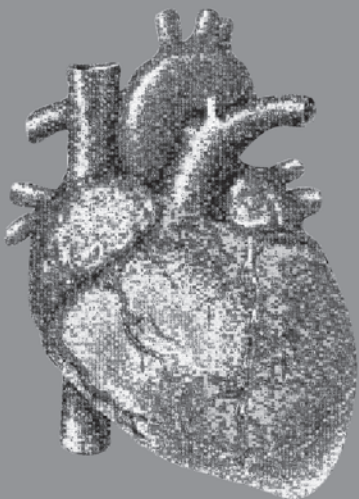
Author: Bingen, Brian O.

Title: Molecular and cellular determinants of cardiac tachyarrhythmias: from trigger to therapy

Issue Date: 2016-10-05

Chapter VII

Summary, conclusions, discussion
and future perspectives.



SUMMARY AND CONCLUSIONS

The general introduction of this thesis, **Chapter I**, described the basic electrophysiological mechanisms involved in the control of cardiac rhythm and contraction in the healthy heart. A multitude of disturbances in this control, which can lead to triggers or substrates for the maintenance of cardiac arrhythmias, are discussed in detail. This was followed by an overview of the anti-arrhythmic strategies that have been applied to date to prevent these triggers or disrupt the maintenance of the arrhythmias, and regain control of cardiac rhythm. Furthermore, disadvantages of current anti-arrhythmic treatment options, attributable to the incomplete understanding of pro-arrhythmic mechanisms, were addressed. Following from these disadvantages, the aim of this thesis was to dissect cellular and molecular pro-arrhythmic mechanisms, and to explore the possibilities for more specific, substrate-oriented and less harmful anti-arrhythmic strategies.

Chapter II evaluated the differences in pro-arrhythmic mechanisms between pathological cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis, as well as their respective influence on the outcome of anti-arrhythmic strategies. As pathological hypertrophy and fibrosis occur simultaneously in the remodelled ventricular myocardium, which is prone to the development of arrhythmias, discerning between their individual contributions to the initiation of arrhythmias is very difficult *in vivo*. Therefore, neonatal rat ventricular cardiomyocyte cultures were incubated with phenylephrine to induce pathological cardiomyocyte hypertrophy, while permitting free proliferation of cardiac (myo)fibroblasts in separate cultures was utilized to mimic fibrosis. This approach allowed us to study the pro-arrhythmic mechanisms involved in the remodelled myocardium separately, *in vitro*. Interestingly, the mechanisms of arrhythmia initiation proved very similar in the hypertrophy and fibrosis models. Both conditions induced significant slowing of conduction and repolarization, leading to formation of early afterdepolarizations (EADs) causing focal tachyarrhythmias (as a consequence of EADs occurring repetitively at the edge of a sustained depolarized area) or reentrant tachyarrhythmias (as a consequence of unidirectional block between areas of phase II EAD initiation and areas still in action potential [AP] phase II). Also, arrhythmia incidence based on either focal or reentrant mechanisms was similar in both models. However, further investigation revealed that the mechanisms underlying EAD formation and conduction slowing differed. While protein levels of Cx43 and Kv4.3 in cardiomyocytes were decreased as a consequence of hypertrophy, no significant differences were found under fibrotic conditions. Conversely, depolarization of the maximal diastolic potential (MDP), through heterocellular coupling between cardiomyocytes and cardiac (myo)fibroblasts was found in fibrosis, while MDP was unaffected under hypertrophic conditions. As a consequence, targeting heterocellular coupling through administration of low doses of 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) and carbenoxolone only reduced the incidence of arrhythmias in fibrotic

cultures. Moreover, L-type calcium channel blockade prevented both focal and reentrant arrhythmias in hypertrophic cultures, but caused conduction block in fibrotic cultures. These findings have yielded novel mechanistic insights into the substrate-specific mechanisms integrated within the remodelled ventricular myocardium and how they might affect therapeutic efficacy.

Chapter III investigated the electrophysiological characteristics that determined the number of rotors (or complexity) maintaining sustained ventricular fibrillation (VF), and the possibilities to use this knowledge to alter key parameters that allow termination of rotors and a consequent reduction of VF complexity. To this purpose, a novel *in vitro* model of sustained VF was developed using monolayers of neonatal rat ventricular cardiomyocytes incubated with the gap junctional uncoupler 2-APB. 2-APB caused a dose-dependent increase in complexity of spontaneously induced spiral wave reentrant tachyarrhythmias, with very high stability resembling sustained VF (0.0 ± 0.1 phase singularities [PSSs]/cm² in control cultures vs 0.0 ± 0.1 , 1.0 ± 0.9 , 3.3 ± 3.2 , 11.0 ± 10.1 and 54.4 ± 21.7 PSSs/cm² in cultures containing 5, 10, 15, 20 and 25 μ M 2-APB, respectively). Arrhythmia complexity was inversely correlated with wavelength (robust standard deviation of the residuals=0.4). The wavelength could only be prolonged by agents that increased the AP duration (APD) at maximal activation frequencies (the minimal APD). Blockade of the inward rectifier potassium current (I_{K1}) by BaCl₂ and potentiation of the L-type calcium current (I_{CaL}) by BayK8644 significantly prolonged minimal APD, which also significantly decreased the complexity and activation frequency of VF *in vitro*. An increase in minimal APD during VF was found to cause a transient destabilization of rotors, leading to rotor termination following critical collisions of the wavefronts emanating from these rotors. Interestingly, similar 2-APB dose-dependent complexity increases could be induced in *ex vivo* Langendorff-perfused adult rat hearts. More importantly, increasing minimal APD by BaCl₂ also significantly reduced VF complexity in the *ex vivo* model. Together these results show that the stability of sustained fibrillation is highly dependent on minimal APD, which knowledge can be exploited to transiently destabilize VF and assist VF termination. As such, this might provide a novel conceptual framework for future anti-arrhythmic drug design and help to extend/refine therapeutic strategies for sustained VF.

Chapter IV described a study in which the effect of downregulation or blockade of Kir3.x channels on the initiation, maintenance and termination of atrial fibrillation (AF) was assessed. As pharmacological treatment of AF can be complicated by ventricular pro-arrhythmia, exploring the possibilities to alter atrial electrophysiology without affecting the ventricles may provide an opportunity to develop less hazardous anti-AF therapy. Kir3.x channels, responsible for the acetylcholine-dependent potassium current ($I_{K_{ACh}}$), are expressed in the atria but not in the ventricles. $I_{K_{ACh}}$ is known to become constitutively active (*i.e.* acetylcholine-independent) in patients suffering from persis-

tent AF, and might therefore be an interesting target for atrium-specific anti-AF therapy. Interestingly, blockade of $I_{K_{ACh}}$ by the specific pharmacological blocker tertiapin, was found to significantly increase the APD (56.5 ± 12.5 to 145.5 ± 20.6 milliseconds; $P < 0.0001$) in primary neonatal rat atrial cardiomyocyte cultures in the absence of acetylcholine, which indicates the presence of constitutively active $I_{K_{ACh}}$ ($I_{K_{ACh-c}}$). Moreover, atrium specificity of both Kir3.1 and Kir3.4 was confirmed in western blot analyses comparing atrial and ventricular cardiomyocytes (Kir3.1 and Kir3.4 levels in homogenates of ventricular cardiomyocyte cultures were $18.3 \pm 0.7\%$ and $7.8 \pm 2.0\%$ of those in their atrial counterparts, respectively). Hence, tertiapin had virtually no effect on the APD in ventricular cardiomyocyte cultures. Spiral wave reentrant tachyarrhythmias could easily be induced by burst pacing in 89.2% of atrial cultures resembling 2-dimensional (2D) AF as a consequence of APD alternans at high activation frequencies. In these cultures, tertiapin significantly increased APD (from 54.7 ± 24.0 to 128.8 ± 16.9 milliseconds, $p < 0.05$), and decreased rotor frequency (14.4 ± 7.4 to 6.6 ± 2.0 Hz; $p < 0.05$) and complexity (6.6 ± 7.7 to 0.6 ± 0.8 PSs, $p < 0.05$). Reentry was terminated by tertiapin treatment in 67.4% of cultures. Moreover, after tertiapin treatment spiral wave reentry could only be induced in 27.2% of cultures. Decreasing Kir3.1 or Kir3.4 expression using lentiviral vectors encoding short hairpin RNAs specific for *KCNJ3* and *KCNJ5*, yielded similar results as the pharmacological approach. Blockade or downregulation of $I_{K_{ACh-c}}$ or its molecular counterparts (Kir3.x) was found to prevent or terminate reentry by prolonging APD and moderating the slope in the APD and conduction velocity (CV) restitution, thereby lowering the probability of APD alternans and decreasing rotor stability.

Similarly, AF could easily be induced *ex vivo* in 90% of whole neonatal rat hearts, which was again reduced by more than 50% through blockade of $I_{K_{ACh-c}}$ by tertiapin.

Collectively, these results indicate that the induction, maintenance and ability to terminate AF are influenced by the atrium-specific $I_{K_{ACh-c}}$ through its effect on the slopes of the APD and CV restitution curves. This study thus has not only provided novel mechanistic insight into atrial tachyarrhythmias but has also identified Kir3.x as a promising atrium-specific anti-arrhythmic target.

Chapter V tested the hypothesis that constitutive activation of $I_{K_{ACh}}$ increases the energy necessary (*i.e.* threshold) to successfully convert AF to sinus rhythm by electrical cardioversion (ECV) and decreases the success rate of ECV. As the success rate of ECV is known to decrease with increasing AF duration, coinciding with an increase in $I_{K_{ACh}}$ through its constitutive activation, might play a key role in determining the ECV threshold and success rate. Therefore to test this hypothesis, we equipped neonatal rat atrial cardiomyocyte monolayers, in which we induced reentry by burst pacing with a custom-made electrical cardioverter. Indeed, incubating these monolayers with tertiapin resulted in a significantly increased success rate of electrical reentry termination (80.0 vs 36.3% at 50V), coinciding with a decrease in threshold for reentry termination (35.5 ± 10.9

vs 60.0 ± 25.1 V in control cultures). Transduction with lentiviral vectors encoding short hairpin RNAs specific for *KCNJ5* yielded similar results. From a mechanistic point of view, $I_{K_{ACh-c}}$ determined ECV threshold through its effect on wavelength (0.48 ± 0.14 cm in tertiapin-treated cultures vs 0.30 ± 0.09 cm in control cultures), which correlated with the decrease in defibrillation threshold ($R^2=0.65$). Moreover, blockade of $I_{K_{ACh-c}}$ moderated the spatial shock-induced differences in depolarization and prevented propagation of shock-induced AP wavefronts, through the increase in wavelength. Optical mapping of ECV in *ex vivo* Langendorff-perfused neonatal rat hearts showed similar effects of tertiapin on the ECV threshold (27.2 ± 0.66 vs 36.1 ± 11.3 V in control hearts and success rate (100 vs 40% in control hearts at 30 V). These findings indicate that constitutive activation of $I_{K_{ACh-c}}$ as occurs during AF, can contribute to an increase in atrial defibrillation threshold and failure of ECV. Hence, $I_{K_{ACh-c}}$ may serve as an interesting target for lowering the energy requirements for ECV and increasing its effectiveness. Moreover, these results imply the possibility to alleviate ventricular pro-arrhythmia associated with drug-enhanced ECV in the context of primary ECV failure as $I_{K_{ACh-c}}$ is atrium-specific.

Chapter VI tested the hypothesis that direct cardioversion could be accomplished without electrical shocks by forced expression and subsequent activation of light-activated depolarizing ion channels into atrial cardiomyocytes. Because the electrical shocks employed to achieve cardioversion are very painful, ECV requires anesthesia, precluding its frequent use and hampering the applicability of device therapy for AF. Hence, exploring shockless direct cardioversion methods may provide significant improvements in AF treatment. To this purpose, neonatal rat atrial cardiomyocyte monolayers were transduced with a lentiviral vector encoding calcium-translocating channelrhodopsin (CatCh, a blue-light activated depolarizing ion channel) fused to enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) to facilitate its detection. Monolayers transduced with a lentiviral vector encoding just the eYFP reporter were used as a control. Spiral wave reentrant tachyarrhythmias resembling 2D AF were induced by burst pacing. Indeed, exposing these monolayers to prolonged blue light pulses of 500 ms, terminated 100% of the tachyarrhythmias in the CatCh-transduced monolayers ($n=31$) compared to 0% in the control group ($n=11$). Mechanistically, CatCh activation caused uniform depolarization which led to a decrease in overall cardiomyocyte excitability as evidenced by a strong light-induced decrease in peak-to-peak amplitude in electrode recordings (251.3 ± 217.1 μ V in CatCh-transduced cultures vs 9.2 ± 9.5 μ V in control cultures). Consequently, the critical wavefront curvature decreased, coinciding with an increase in functional coresize, forcing the PSs to move towards the spiral wave periphery. The resulting light-induced PS drift led to reentry termination by PS-PS or PS-culture boundary collisions. Hence, this study shows that spiral waves in atrial cardiomyocyte monolayers can be terminated effectively by a light-induced depolarizing current, produced by the arrhythmogenic

substrate itself, upon optogenetic engineering. Taken together, these results provide the first proof-of-concept for shockless cardioversion or defibrillation.

In conclusion, cardiac tachyarrhythmias maybe counteracted by preventing the triggers that cause their initiation, altering the substrate that contributes to their maintenance, or promoting the factors that contribute to their termination. Based on the studies described in this thesis it is proposed that among other factors EADs can serve as the triggers for both focal and reentrant ventricular tachyarrhythmias in the context of cardiac remodelling. However, this thesis in the prevention of these triggers, emphasizes on the importance of taking the source of these triggers into consideration as this may affect the outcome of anti-arrhythmic interventions. Additionally, it is concluded that the minimal APD is a major factor contributing to the maintenance of cardiac tachyarrhythmias. This factor can be exploited to decrease the complexity of VF through for instance I_{K1} and I_{CaL} , but also to terminate AF in an atrium-specific manner through $I_{K,ACH-c}$. Moreover, termination of AF by ECV can be enhanced by preventing the post-shock re-emergence of PSs by slowing repolarization through blockade of $I_{K,ACH-c}$. Finally, based on the proof-of-concept provided in a study described in this thesis, immediate termination of AF may be achieved without the application of an electrical shock, through the insertion of depolarizing ion channels that are, for instance, activated by light.

DISCUSSION AND FUTURE PERSPECTIVES

In vitro and ex vivo experimental modelling of cardiac arrhythmias

Over the past decades our understanding of the mechanisms underlying cardiac arrhythmias has increased. Paramount to this development has been the introduction of the optical mapping technique using (among others) voltage-sensitive dyes. The exceptional spatiotemporal resolution provided by this technique allows researchers to get a detailed look into the propagation of APs throughout the myocardium before, during and after cardiac arrhythmias to investigate their initiation, maintenance and termination. As such, optical mapping has become an indispensable tool in the electrophysiological mapping of the heart.¹

Still, when trying to use optical mapping to visualize AP propagation throughout the myocardium *in vivo* any researcher runs into two obvious problems: (1) Normally, the heart resides in the darkness of the inner body. Hence, both the excitation of the voltage-sensitive dye and the capture of any light emitted by the voltage-sensitive dye are precluded without surgical opening of the rib cage and pericardial cavity. (2) The heart is a very complex 3-dimensional (3D) structure. As such, while the entire heart can be incubated with a voltage-sensitive dye, the signal, if successfully captured, is only

the result of a depth-weighted average of the transmembrane potential. In other words, by far the largest component of the optical signal will be derived from epicardial heart muscle tissue. As many of the events that may be critical to the initiation, maintenance or termination of any arrhythmias likely occur subepicardially, the insights gained from whole-heart optical mapping studies is limited. Moreover, the 3D structure can hamper the interpretation of the epicardial signal as well, as the tissue from beneath the surface, by definition, emits light through a scattering volume of tissue and can therefore blur the epicardial signal.²

The methods used throughout this thesis provide innovative solutions to the aforementioned problems by employed *ex vivo* (ad 1) and *in vitro* (ad 1 and 2) models of cardiac arrhythmias. For *ex vivo* optical mapping the organism is removed from the heart (or *vice versa*) and subsequently perfused retrogradely using a Langendorff apparatus, to allow direct visualization of the epicardium, and capture of epicardium-derived signals. In the *in vitro* approach, the heart is (in parts) dissociated and the resulting isolated cardiomyocytes are replated on fibronectin-coated coverslips, after which they are allowed to reestablish their intercellular connections thereby forming a functional 2D syncytium. This specific configuration prevents overlooking of events important to arrhythmia initiation, maintenance and termination during optical mapping, facilitating data interpretation.

An example of events studied in the 2D *in vitro* model is presented in **Chapter IV**, in which the contribution of Kir3.x to the initiation, maintenance and termination of AF was studied. Here, it was shown that the occurrence of APD alternans produced the critical event for initiation of AF by enhancing the probability of unidirectional block formation, which depended on the expression on Kir3.x. Moreover, it was demonstrated that AF can be maintained by rotors showing either stable or unstable period dynamics, linked to the slopes in the restitution curves of the APD and CV, which were again modulated by Kir3.x. Finally, termination of AF, which could be elicited by blockade of Kir3.x channels, depended on the destabilization of rotors and consequent collision of PSs with each other or with the boundaries of the monolayer (*i.e.* the critical event for termination). The same study could serve to illustrate that studying these events in the intact, 3D heart is far more difficult.

In addition to the improved interpretability of critical events, the *in vitro* model allows for superior control of the investigated variables and are highly reproducible. An example in which this superior control is exploited is described in **Chapter II**, in which the individual contributions of pathological hypertrophy and cardiac fibrosis to the pro-arrhythmia associated with cardiac remodelling (as occurs in the context of cardiac pressure or volume overload,) were studied. As hypertrophy and fibrosis occur simultaneously during cardiac remodelling,³ studying the individual contribution of these variables outside the *in vitro* situation is precluded.

However, regardless of the mechanistic insights offered through utilization of the *in vitro* model, it is important to remain apprehensive of overstating the implications of *in vitro* research. Hence, it is of essence to be cognizant of the methods involved in obtaining the *in vitro* results and how this relates to what they represent: As the *in vitro* model utilizes 2D monolayers, the electrotonic interactions made by each cell are less extensive than in the whole heart (3D) situation. Electrotonic interactions are known to determine the probability of deviations in the electrophysiological behaviour of single cells within the tissue from the average tissue behaviour.⁴ Hence, solely changing the myocardial structure to the 2D state might alter the chance of initiating events such as EADs and APD alternans (as described in **Chapter II** and **Chapter IV**, respectively). In addition, the 2D monolayers lack the anatomical boundaries found in the intact heart such as the coronary vasculature, the annuli fibrosi cordis and the epi- and endocardium (which are composed of different cell types such as endothelial cells, mesothelial cells and smooth muscle cells or contain increased amounts of fibroblasts), but are demarcated by the coverslip boundaries (which have the same cellular composition as any other area within the culture). Hence, boundary conditions found in the *in vitro* model may differ significantly from those found in the intact heart. As the occurrence of a collision between a PS and the boundaries determined the termination of arrhythmias, after for instance I_{K1} blockade (**Chapter III**), Kir3.x blockade (**Chapter IV**) or in many instances of optogenetic depolarization (**Chapter VI**), the boundary conditions of the *in vitro* model itself could in theory be critical for the termination described in these studies. Moreover, the absence in the *in vitro* model of several cell types found in the intact heart (such as endothelial cells or smooth muscle cells, as demonstrated in **Chapter IV**) could alter the outcome of the introduction of disease states such as pathological hypertrophy or cardiac fibrosis (**Chapter II**), as these states are known to modulate the behaviour of non-cardiomyocytes, as well as the (electrophysiological) effect of non-cardiomyocytes on cardiomyocytes.^{5,6} Nonetheless, as described in the studies presented in **Chapter III**, **Chapter IV** and **Chapter V** key results from the *in vitro* model (*i.e.* decreasing complexity of VF upon minimal APD increase, decrease in AF inducibility upon Kir3.x blockade and a decrease of atrial defibrillation threshold after $I_{K_{ACh-c}}$ blockade, respectively) could be reproduced using the intact heart *ex vivo* model, which underlines the relevance of the *in vitro* model. Starting out with a simplified *in vitro* model of cardiac arrhythmias and then gradually increasing the complexity of the model thus allowed uncovering of pro-arrhythmic mechanisms and anti-arrhythmic strategies. Still, further increase of this complexity to the *in vivo* situation, large animals and eventually humans will still be necessary to establish the importance of these parameters for human disease.

Preventing arrhythmic triggers as an anti-arrhythmic strategy

As described in **Chapter I**, cardiac arrhythmias can be counteracted by preventing pro-arrhythmic triggers, by altering the substrate to prevent arrhythmia maintenance or by facilitating or forcing termination of ongoing arrhythmias. Of these three approaches, preventing arrhythmic triggers could be regarded as the preferential anti-arrhythmic strategy. Evidently, preventing an arrhythmia from occurring in the first place is the only approach that (when employed successfully) will alleviate all complications associated with allowing an arrhythmia to initiate, such as thromboembolic events in the case of AF.⁷ Moreover, several studies have demonstrated that even the ectopic triggers of cardiac arrhythmias, such as premature ventricular complexes, can be a sufficient causal factor for cardiac remodelling and for the associated decrease in cardiac function and increase in pro-arrhythmic risk.^{8,9} To prevent such pro-arrhythmic triggers, it is essential to comprehend the origin of the trigger to allow the development of strategies for inhibition of critical steps within the pathway leading to its initiation. Still, it is essential to remain apprehensive of the secondary electrophysiological consequences inhibition of these pathways may have in order to select the right critical step for optimization of anti-arrhythmic treatment:

In **Chapter II** of this thesis it is demonstrated that EADs, dependent on I_{CaL} , are prime triggers for spiral wave reentrant tachyarrhythmias in the context of ventricular remodelling. Concordantly, preventing the trigger by inhibiting I_{CaL} effectively inhibited the occurrence of EADs and the consequent tachyarrhythmias caused by the pathological hypertrophic component/pathway of cardiac remodelling. However, this study also showed that using the same strategy to prevent EADs caused by the fibrotic component can lead to cardiomyocyte inexcitability, as the fibroblast-induced depolarized membrane potentials (causing inactivation of the fast sodium current) leave excitability fully dependent on calcium currents. As inexcitability prevents subsequent activation and contraction of the involved myocardium, blocking I_{CaL} in the fibrotic myocardium could -in theory- severely hamper cardiac function. As such, iatrogenic inexcitability, apart from the effect I_{CaL} blockers may have on vascular tone and inotropy,¹⁰ may contribute to the hemodynamic instability found after treatment of patients with cardiac mechanical dysfunction with I_{CaL} blockers.¹⁰ On the other hand, if the EADs originate from a local fibrotic area, treatment with I_{CaL} blockers may be suitable for trigger prevention. Moreover, if the arrhythmia still proceeds to initiate, the resulting inexcitable area may, hypothetically, facilitate conversion to a fixed macro-reentrant circuit and thereby allow easier termination or ablation of the reentrant pathway. However, as demonstrated in **Chapter III**, a decrease in minimal APD, through I_{CaL} inhibition, during an arrhythmia can also prompt an increase in activation frequency, potentially worsening the cardiac output and possibilities for termination. Thus, prevention of I_{CaL} -dependent EADs by simply blocking I_{CaL} will mean walking a narrow tightrope between pro- and anti-arrhythmia. Hence, future

anti-arrhythmic therapy may benefit, for instance, from research exploring the possibilities to alter I_{CaL} without (substantially) affecting minimal APD and excitability. Conceptually, this may be achieved by modulating the I_{CaL} activation and inactivation dynamics, to decrease the overlap of the steady-state inactivation and activation curves and the resulting I_{CaL} window current or by increasing the time constant of I_{CaL} deinactivation (see also **Chapter I**). Hence, this thesis underlines that EAD prevention is an effective anti-arrhythmic strategy. However, selecting and modulating the right (specific) targets in the pathways that culminate into EAD-dependent arrhythmias, in order to prevent unwanted electrophysiological effect remains relatively elusive and therefore requires additional research.

Another example of trigger prevention as an anti-arrhythmic strategy is described in **Chapter IV**. Here, it is shown that APD alternans, dependent on the slope of the APD and the CV restitution curves, can serve to create unidirectional block and formation of spiral wave reentrant tachyarrhythmias. Decreasing the maximal slope in the restitution curves by blocking the constitutively active acetylcholine-dependent potassium currents ($I_{K,ACH-c}$) prevents this pro-arrhythmic trigger. Again, also with $I_{K,ACH-c}$ blockade, secondary electrophysiological consequences could, in theory, hamper therapeutic efficacy and underpin pro-arrhythmia. Since inhibition of $I_{K,ACH-c}$ lengthens APD, it may increase the probability of EADs. Be that as it may, evidence for EADs underlying AF is relatively scarce. Ventricular arrhythmias, on the other hand, are known to originate from EADs, whose incidence can be increased by prolongation of the refractory period in an attempt to treat AF.⁴ However, as in the heart, Kir3.x channels, which govern $I_{K,ACH-c}$ are almost exclusively present in the atrial cardiomyocytes, blockade of these channels does not lead to ventricular pro-arrhythmia.

Although the possible clinical success of this approach still has to be tested in humans, it underlines the significance of trigger prevention as a prime anti-arrhythmic strategy.

Getting to the core of cardiac tachyarrhythmias to facilitate termination

In this thesis, multiple approaches to modify arrhythmia maintenance to facilitate arrhythmia termination have been demonstrated. In **Chapter III**, it is shown that an increase in minimal APD can decrease VF complexity (*i.e.* the number of rotors) through transient rotor destabilization. Similarly, in **Chapter IV** it is shown that blockade of $I_{K,ACH-c}$ can lead to rotor destabilization and termination. **Chapter VI** demonstrates how an increase in functional coresize through optogenetics can induce spiral wave drift and ultimately termination. Taken together, it seems that any intervention that causes PSs to collide with an anatomical boundary or PSs of opposite chirality leads to their termination. Hence, getting to the core of the reentrant tachyarrhythmia seems to be the key factor to facilitating its termination. Therefore, understanding what happens within and

around the core is regarded by many to be crucial, if we are to make progress in the treatment of cardiac arrhythmias through enhancing termination.

Many studies have attempted to describe, approach, or simulate the behaviour of cells within the core of a functional reentrant circuit. In 1973 the first observations of reentrant tachycardias in the absence of an anatomical obstacle led to the formulation of the 'leading circle concept'.¹¹⁻¹³ This theory proposed that in the absence of an anatomical obstacle the reentrant conduction would assume the shortest path length needed to sustain the arrhythmia. This minimal path length depends on the conduction velocity and refractory period, in such a way that there should be an excitable gap between the wavefront and the waveback. Under these conditions, excitation wavefronts are traveling through tissue with limited excitability. The core, in this case, is rendered refractory by electrotonic depolarization or centripetal activation from the circulating wavefront to the core.¹¹⁻¹³ In contrast, the spiral wave reentry theory proposed that the path of the wavefront's leading edge (or spiral wave tip) depends on the relationship between wavefront curvature and CV. An increased wavefront curvature decreases the source/sink ratio for AP propagation and therefore decreased CV.¹⁴ Accordingly, if a reentrant circuit is to sustain without an anatomical obstacle, given homogeneous basal excitability, wavefront curvature has to increase towards the center of the circuit and CV (as a consequence) has to decrease, causing the wavefront to assume the form of an Archimedean spiral. The functional core is formed where the wavefront curvature hits the critical value and becomes zero. As at this critical curvature the wavefront cannot invade the functional core, tissue within the core is assumed to remain excitable but not excited in contrast to the state of the core as proposed in the leading circle concept.^{14, 15} Moreover, while both theories describe different arrhythmia mechanisms, they do not necessarily exclude each other as cardiac arrhythmias comprise a heterogeneous group of disorders and can therefore be based on different mechanisms. This could imply that the state of the core has to be deduced or determined for each arrhythmia first, in order to apply the most effective therapeutic strategy.

In **Chapter V**, it is demonstrated that the amplitude of the shock-induced AP decreases at shorter pre-shock peak-to-peak intervals as a consequence of the local refractoriness of the tissue. Following from this relation between refractoriness and amplitude, it can be concluded that if the core is refractory (concordant with the leading circle theory), the electrical shock would induce the least depolarization at this location. As such, the core itself could be a cause for failed defibrillation. In contrast, both the core itself and the distance from the core had no effect on the shock-induced AP amplitude. Concordantly, complexity of fibrillation (*i.e.* the number of rotors) did not seem to determine the defibrillation threshold. In **Chapter VI** it is demonstrated that short decreases in excitability through optogenetics, can increase the functional coresize leading to termination of reentry. In this case, we hypothesised that the reduction in excitability

decreases the critical wavefront curvature, causing the PS to move to a more peripheral point. As the area between the PS before the excitability decrease and the new PS is not invaded as a consequence of the new critical wavefront curvature, the functional coresize is increased (to approximately the area between the old and the new PS). In this situation, the optical signal derived from the new core does not discriminate between refractoriness or absence of excitation. However, assuming that the core is depolarized and dependent on centripetal activation from a more peripheral wavefront, decreasing the excitability would only decrease the velocity of the wavefront, which decreases the wavefront-wavetail interaction, stabilizes the rotor and, importantly, leave the coresize unaltered or even diminished. The reentrant tachyarrhythmias in these cases thus seem to revolve around an excitable core in concordance with the spiral wave theory. Together, this illustrates that the state of the core can be leading in the (theoretical) efficacy of a chosen anti-arrhythmic strategy.

In contrast, in **Chapter III** and **Chapter IV**, different methods to achieve an increase in the minimal APD led to the termination of the rotors maintaining VF and AF, respectively. As this leads to an increase in wavelength both cores activated through centripetal activation or cores that remain unexcited would become destabilized as a consequence of the increased wavetail interaction of the wavefronts in their periphery. Therefore, if indeed arrhythmias exist based on both leading circle reentry and spiral wave reentry, the best way to treat arrhythmias (in absence of knowledge on the state of the core) may be not lie in tackling the core but its periphery.

Taken together, apart from providing proof-of-principle for strategies of reentry termination the results within this thesis can add to the understanding of the state of cells within the core as well as its periphery, which might help to develop new anti-arrhythmic strategies. Still, more research is necessary to fully elucidate the state of the core as well as the wavefronts in its periphery in different disease states, as well as their relation to therapeutic effects, in order to improve treatment of cardiac arrhythmias.

CONCLUSION

Understanding the mechanisms underlying cardiac tachyarrhythmias, including their triggers, maintenance and termination is crucial for their treatment. Additional efforts from the scientific community will be necessary to translate newly acquired knowledge on triggers and maintenance of arrhythmias into safe and effective ways to terminate or prevent them to thereby improve anti-arrhythmic therapy.

DUTCH SUMMARY - NEDERLANDSE SAMENVATTING

Algemene introductie van dit proefschrift, **Hoofdstuk I**, beschreef de basale electrofysiologische mechanismen die betrokken zijn bij het controleren van het hartritme en de contractie in het gezonde hart. Tal van verstoringen in deze controle, welke kunnen leiden tot ritmestoornis-initiërende ‘triggers’ of ‘substraten’ voor het voortbestaan van een hartritmestoornis, werden in detail besproken. Dit werd gevolgd door een overzicht van de bijbehorende anti-aritmische strategieën die tot nu toe zijn bedacht om deze triggers te voorkomen of het substraat verantwoordelijk voor het voortbestaan van de ritmestoornis te doorbreken, om zo controle over het hartritme terug te winnen. Daarnaast, werden de nadelen van de huidige anti-aritmische behandelingen, te wijten aan het incomplete begrip van de pro-aritmische mechanismen, doorgenomen. Volgend uit deze nadelen was het doel van dit proefschrift het uiteenzetten van de cellulaire en moleculaire pro-aritmische mechanismen, en het verkennen van de mogelijkheden tot meer specifieke, minder schadelijke anti-aritmische strategieën.

In **Hoofdstuk II** werden de verschillen in pro-aritmische mechanismen tussen pathologische hypertrofie van de hartspiercel en cardiale fibrose geëvalueerd, alsmede hun onafhankelijke bijdrage aan het resultaat van een anti-aritmische behandeling. Aangezien hypertrofie en fibrose tegelijkertijd voor kunnen komen in de context van ‘remodelling’ van het ventriculaire myocard, hetgeen de ventrikels vatbaar maakt voor ritmestoornissen, is het onderscheid in hun individuele bijdrage aan ritmestoornissen moeilijk te maken. Om die reden werden neonatale ventriculaire hartspiercelkweken geïncubeerd met phenylephrine om hypertrofie te induceren en werden in aparte kweken vrijelijk prolifererende fibroblasten gebruikt als model voor cardiale fibrose. Deze aanpak maakte het mogelijk om, *in vitro*, de pro-aritmische mechanismen in ‘remodelled’ ventriculaire myocard separaat te onderzoeken. Verassend genoeg, bleken de mechanisme verantwoordelijk voor de initiatie van ritmestoornissen vrijwel gelijk in de modellen voor hypertrophy en fibrose. Beide condities induceerden een significante verlaging van de geleidingssnelheid en verlenging van de repolarisatie, wat aanleiding gaf tot het ontstaan van early afterdepolarizations (EADs). EADs lagen aan de basis van het ontstaan van zowel focale- (als gevolg van het repetitief optreden van EADs aan de grens van een continu gedepolariseerd gebied) als reentry-tachyaritmieën (als gevolg van unidirectioneel block tussen het gebied van fase II EAD initiatie en het aangrenzende gebied dat zich nog steeds in fase II van het actiepotentiaal bevond). Daarnaast, waren ook de incidenties van focale- en reentry-tachyaritmieën vergelijkbaar in beide modellen. Nader onderzoek liet echter zien dat de mechanismen die ten grondslag lagen aan de vorming van EADs en de vermindering van de geleidingssnelheid wél verschilden. Terwijl de eiwit levels van connexine43 en Kv4.3 in de hartspiercellen waren verminderd als gevolg van hypertrofie, werden geen significante verschillen gevonden onder fibro-

tische condities. Aan de andere kant werd een depolarisatie van de maximale diastole potentiaal (MDP) alleen gevonden in fibrose, terwijl de MDP niet was aangedaan onder hypertrofe condities. Dientengevolge had het beïnvloeden van de heterocellulaire koppeling door toediening van 2-aminoethoxydiphenyl boraat (2-APB) en carbenoxolon alleen anti-aritmische effect in het fibrotische model. Daarnaast verhinderde blokkade van het L-type calcium kanaal het ontstaan van zowel focale als reentry tachyaritmieën in hypertrofe kweken, maar veroorzaakte geleidingblok in fibrotische kweken. Deze resultaten verschaffen nieuwe inzichten in de substraat-specifieke mechanismen die geïntegreerd zijn in 'remodelled' ventriculair myocard, en hoe deze mechanismen de effectiviteit van anti-aritmische strategieën kunnen beïnvloeden.

Hoofdstuk III onderzocht welke electrofysiologische eigenschappen bepalend zijn voor het aantal rotors (ook wel de complexiteit genoemd) dat de ritmestoornis ventrikelfibrilleren (VF) onderhoudt. Daarnaast werden de mogelijkheden onderzocht deze kennis te gebruiken om deze bepalende parameters te veranderen teneinde rotors te termineren en daarmee de complexiteit van VF te verminderen. Met dit doel werd een nieuw *in vitro* model van VF ontwikkeld, waarbij monolagen van neonatale ratten ventriculaire hartspiercellen werden behandeld met 2-APB (een farmacologische ont-koppelaar van de gap junctions). 2-APB veroorzaakte een dosis afhankelijke toename in de complexiteit van spontaan geïnduceerde spiral wave reentry tachyaritmieën, met een zeer hoge stabiliteit gelijkend op VF (0.0 ± 0.1 phase singularities [PSs]/cm² in control tegenover 0.0 ± 0.1 , 1.0 ± 0.9 , 3.3 ± 3.2 , 11.0 ± 10.1 and 54.4 ± 21.7 PSs/cm² in respectievelijk 5, 10, 15, 20 en 25 μ M 2-APB). Een inverse correlatie werd gevonden tussen de complexiteit en de wavelengh. De wavelengh kon alleen vergroot worden door middelen die de actiepotentiaalduur (APD) bij maximale activatiefrequentie (de minimale APD) konden verlengen. Blokkade van de inward rectifier kaliumstroom (I_{K1}) door BaCl₂ en vergroten van de L-type calciumstroom (I_{CaL}) door BayK8644 induceerde een significante verlenging van de minimale APD, hetgeen eveneens een significante verlaging van de complexiteit en de activatiefrequentie van VF *in vitro* veroorzaakte. Een toename van de minimale APD tijdens VF veroorzaakte een tijdelijke destabilisatie van de rotors, wat leidde tot terminatie van rotors door botsingen van de activatie fronten uitgaand van deze rotors. Een gelijkaardige dosis afhankelijke toename in de complexiteit kon ook worden geïnduceerd door 2-APB in *ex vivo*, Langendorff geperfundeerde adulte ratten harten. Belangrijker nog, het verlengen van de minimale APD door BaCl₂ gaf eveneens een significante reductie van de complexiteit in het *ex vivo* model. Tezamen laten deze resultaten zien dat de stabiliteit van wordt gereguleerd door de minimale APD, welke kan worden gebruikt om VF tijdelijk te destabiliseren zodat VF kan worden getermineerd. Daarmee kunnen deze resultaten mogelijk voorzien in een nieuw conceptueel raamwerk voor toekomstige anti-aritmische medicatie en een uitbreiding in de rationale for therapeutische strategieën gericht tegen VF.

Hoofdstuk IV beschrijft een studie waarin het effect van downregulatie of blokkade van Kir3.x kanalen op de initiatie, het onderhoud en de terminatie van atriumfibrilleren (AF) werd bestudeerd. Aangezien farmacologische behandeling van AF kan worden gecompliceerd door pro-aritmische effecten ten aanzien van de ventrikels, kan het verkennen van de mogelijkheden tot het bijstellen van de atriale electrofysiologie zonder die van de ventrikels te veranderen mogelijkheden bieden tot het ontwikkelen van minder schadelijke behandelingen voor AF. Kir3.x kanalen, verantwoordelijk voor de acetylcholine-afhankelijke kaliumstroom ($I_{K_{ACh}}$) worden alleen tot expressie gebracht in de atria en niet in de ventrikels. Van $I_{K_{ACh}}$ is het bekend dat deze constitutief actief wordt (oftewel acetylcholine onafhankelijk) in patiënten met persisterend AF, en zou daarom een interessant doelwit kunnen zijn voor atrium-specifieke behandeling van AF. Blokkade van $I_{K_{ACh}}$ met de specifieke farmacologische blokker tertiapin resulteerde in een significante toename van de APD (56.5 ± 12.5 naar 145.5 ± 20.6 milliseconden; $p < 0.0001$) in primaire neonatale ratten atriale hartspiercellen in afwezigheid van acetylcholine, wat de aanwezigheid van constitutief actieve $I_{K_{ACh}}$ ($I_{K_{ACh-c}}$) in deze cellen demonstreert. Daarnaast werd de atrium-specificiteit van zowel Kir3.1 als Kir3.4 bevestigd in Western blot analyses waarin atriale en ventriculaire cardiomyocyten werden vergeleken (Kir3.1 en Kir3.4 expressie waren respectievelijk $100.0 \pm 6.3\%$ tegenover $18.3 \pm 0.7\%$ en 100.0 ± 2.8 tegenover $7.8 \pm 2.0\%$ in atriale en ventriculaire hartspiercel lysaten). Om die reden had tertiapin vrijwel geen effect op de APD in de ventriculaire hartspiercel kweken. Spiral wave reentry tachyaritmieën, gelijkend op 2D AF, konden eenvoudig worden geïnduceerd door middel van burst pacing in 89.2% van de atriale kweken als gevolg van APD alternans bij hoog frequente activatie. Tertiapin verlengde de APD (van 54.7 ± 24.0 naar 128.8 ± 16.9 ms), verlaagde de rotor frequentie (van 14.4 ± 7.4 naar 6.6 ± 2.0 Hz) en de complexiteit (van 6.6 ± 7.7 naar 0.6 ± 0.8 PSen) significant in deze kweken. Reentry kon worden getermineerd door tertiapin in 67.4% van de kweken. Daarnaast kon na behandeling met tertiapin in nog maar 27.2% van de kweken reentry worden geïnduceerd. Downregulatie van Kir3.1 en Kir3.4 door middel van lentivirale vectoren met sort hairpin RNAs gericht tegen *KCNJ3* en *KCNJ5* resulteerde in soortgelijke resultaten als de farmacologische aanpak. Blokkade van $I_{K_{ACh-c}}$ of downregulatie van Kir3.x bleek reentry te voorkomen of te termineren door de APD te verlengen en de steilheid van de restitutiecurves van de APD en geleidingssnelheid te beperken, hetgeen de kans op APD alternans en rotor destabilisatie veranderde. AF kon eveneens eenvoudig worden geïnduceerd in 90% van de *ex vivo* intacte neonatale ratten harten. Deze induceerbaarheid werd wederom meer dan 50% gereduceerd door behandeling met tertiapin.

Tezamen laten deze resultaten zien dat de inductie, het onderhoud en de terminatie van fibrillatie worden gecontroleerd door het atrium-specifieke $I_{K_{ACh-c}}$ door zijn effect op de steilheid van de restitutiecurves van de APD en geleidingssnelheid. Hiermee biedt deze studie nieuwe mechanistische inzichten in atriale tachyaritmieën en identificeert

deze studie Kir3.x als een veelbelovende atrium-specifiek doelwit voor toekomstige anti-aritmische behandeling.

Hoofdstuk V testte de hypothese dat constitutive activatie van $I_{K_{ACH}}$ de benodigde hoeveelheid energie (drempel) om AF succesvol te converteren naar sinus ritme door middel van elektrische cardioversie (ECV) verhoogt en de kans op een succesvolle cardioversie verlaagt. Aangezien de kans op succesvolle cardioversie blijkt af te nemen naarmate AF langer bestaat, hetgeen eveneens aanleiding geeft tot een toename van $I_{K_{ACH}}$ door constitutieve activatie, zou $I_{K_{ACH-c}}$ een sleutelrol kunnen spelen in het bepalen van de drempel voor ECV. Om deze hypothese te testen werden monolagen van neonatale ratten atriale cardiomyocyten, waarin reentry was geïnduceerd door middel van burst pacing, uitgerust met een speciaal vervaardigde *in vitro* elektrische cardioverter. Incubatie van deze monolagen met tertiapin verhoogde inderdaad de kans op succesvolle ECV (36.3 tegenover 80.0% bij 50V), en verlaagde de drempel voor succesvolle elektrische terminatie van reentry ($35.5 \pm 10.9V$ tegenover $60.0 \pm 25.1V$ in controle kweken). Transductie met lentivirale vectoren, uitgerust met short hairpin RNAs tegen *KCNJ5* resulteerde in soortgelijke verhoging van de succeskans en verlaging van de drempel. Vanuit een meer mechanistisch oogpunt bleek $I_{K_{ACH-c}}$ de ECV drempel te controleren door zijn effect op de wavelength (0.48 ± 0.14 cm in tertiapin behandelde kweken tegenover 0.30 ± 0.09 cm in controles, wat correleerde met een afname in ECV drempel [$R^2=0.65$]). Daarnaast voorkwam $I_{K_{ACH-c}}$ blokkade het opnieuw ontstaan van PSs door het afzwakken van de spatiële verschillen in depolarisatie die ontstaan na de shock en verhinderde het propagatie van wavefronts geïnduceerd door de schok via de verlenging van de wavelength.

Optical mapping in *ex vivo* intacte neonatale ratten harten liet overeenkomstige effecten van tertiapin op de succeskans en drempel van ECV zien (respectievelijk 36.1 ± 11.3 tegenover $27.2 \pm 0.66V$ in controles en 100% vs 40% in controles bij 30V). Zodoende liet deze studie zien dat constitutieve activatie van $I_{K_{ACH}}$ kan bijdragen aan het verhogen van de ECV drempel en het falen van ECV. $I_{K_{ACH-c}}$ kan daarom een interessant mikpunt zijn om de benodigde hoeveelheid energie voor ECV te verlagen en de effectiviteit van ECV te verhogen. Daarnaast impliceren deze resultaten de mogelijkheid tot het voorkomen van ventriculaire ritmestoornissen geassocieerd met conventionele manieren van farmacologische ondersteuning van ECV in de context van primair ECV falen omdat $I_{K_{ACH-c}}$ atrium specifiek is.

Hoofdstuk VI testte de hypothese dat de noodzaak voor een elektrische schok voor directe cardioversie zou kunnen worden teniet gedaan door het forceren van de expressie van licht-geactiveerde depolariserende ionkanalen in atriale hartspiercellen. Omdat de schok die noodzakelijk is voor een ECV zeer pijnlijk is, is enige vorm van anaesthesie noodzakelijk voor ECV, wat frequent gebruik van ECV beperkt en ook de mogelijkheid tot implanteerbare device-therapie ontnemt. Derhalve kan het verken-

nen van de mogelijkheden tot schokvrije cardioversie significante verbeteringen opleveren in de behandeling van AF. Met dit als doel werden neonatale ratten atriale hartspiercellen getransduceerd met een lentiviralen vector uitgerust met calcium-translocating channelrhodopsin (CatCh, een depolariserend ion kanaal, dat activeerbaar is door blauw licht) gefuseerd met enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) als een reporter gen. Monolagen van atriale hartspiercellen getransduceerd met een lentivirale vector uitgerust met uitsluitend het reporter gen werden gebruikt als controle. Spiral wave reentry tachyaritmieën werden geïnduceerd door middel van burst pacing. Het blootstellen van CatCh getransduceerde kweken aan licht-pulsen van 500ms leidde inderdaad tot terminatie van 100% (n=31) van de aritmieën tegenover 0% in de controle groep (n=11). Activatie van CatCh leidden tot een uniforme depolarisatie, wat aanleiding gaf tot een vermindering van de exciteerbaarheid, hetgeen gedemonstreed werd door een afname in de peak-to-peak amplitude in electrode recordings geïnduceerd door licht (251.3 ± 217.1 tegenover 9.2 ± 9.5 μV in controle kweken). Als gevolg hiervan, nam de kritieke wavefront curvatuur af, waardoor de grootte van de functionele core toenam en de PS naar de periferie van de spiral wave geforceerd werd. De hierdoor ontstane PS drift leidde tot terminatie van reentry door botsingen tussen PSs met verschillende draairichting of een PS met de grenzen van de kweek. Deze studie laat daarmee zien dat spiral wave reentry tachyaritmieën in monolagen van atriale hartspiercellen kunnen worden getermineerd door een licht-geïnduceerde depolariserende stroom, geproduceerd door het aritmogene substraat zelf doormiddel van optogenetische modificatie. Tezamen vormen deze resultaten het eerste bewijs voor het concept van shockvrije cardioversie of defibrillatie.

Samengevat kunnen hartritmestoornissen worden tegengegaan door het voorkomen van de triggers die initiatie veroorzaken, het veranderen van het substraat dat bijdraagt aan het onderhoud, of het bevorderen van factoren die bijdrage aan terminatie van een ritmestoornis. Op basis van de studies beschreven in dit proefschrift kan worden geconcludeerd dat onder andere early afterdepolarizations kunnen fungeren als trigger voor focale en reentry tachyaritmieën in de context van ventriculaire remodeling. In de preventie van deze triggers blijkt het echter belangrijk rekening te houden met de bron van de triggers omdat deze de uitkomst van anti-aritmische interventies kunnen beïnvloeden. Daarnaast kon worden geconcludeerd dat de minimale APD een belangrijke factor is voor het onderhoud van ritmestoornissen. Deze factor kan worden uitgebuit om de complexiteit van VF te verlagen door het veranderen van de I_{K1} of de I_{CaLr} maar ook om AF te termineren op een atrium-specifieke manier door $I_{K_{ACh-c}}$ aan te pakken. Terminatie van AF door ECV van daarnaast worden bevorderd door het verminderen van het opnieuw ontstaan van PSs na de schok door het blokkeren van de $I_{K_{ACh-c}}$. Tenslotte, kan gebaseerd op het proof-of-concept geleverd in dit proefschrift, directe terminatie

van AF worden bewerkstelligd zonder een elektrische schok, door geforceerde expressie van ion kanalen die geactiveerd worden door andere mechanismen dan extracellulair voltage, bijvoorbeeld via optogenetica.

DISCUSSIE EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

In vitro en ex vivo experimentele modellen van hartritmestoornissen

In de afgelopen decennia is het begrip ten aanzien van het mechanisme dat ten grondslag ligt aan hartritmestoornissen sterk toegenomen. In deze ontwikkeling is de introductie van de optical mapping techniek, waarbij gebruik wordt gemaakt van (onder andere) voltage-gevoelige kleurstoffen. De hoge spatiotemporele resolutie van deze techniek maakt het voor onderzoekers mogelijk de propagatie van actiepotentialen door het myocard voor (het onderzoeken van triggers), tijdens (het onderzoeken van het onderhoud) of na (het onderzoeken van de terminatie) van hartritmestoornissen zeer gedetailleerd te bestuderen. Om die reden is optical mapping een onmisbaar hulpmiddel geworden in het in kaart brengen van de cardiale electrofysiologie.¹

Desalniettemin, zal iedere onderzoeker wanneer getracht wordt de propagatie van actiepotentialen door het hart te visualiseren door middel van optical mapping tegen twee vanzelfsprekende problemen aanlopen: (1) In iedere fysiologische toestand is het hart omringd door een organisme. Derhalve worden zowel de excitatie van de voltage-gevoelige kleurstof als het vastleggen van het uitgezonden signaal vrijwel onmogelijk gemaakt. (2) Het hart is een zeer complexe 3-dimensionale (3D) structuur. Zodoende is, hoewel het hele hart kan worden geïncubeerd met een voltage gevoelige kleurstof, het resulterende signaal slechts het resultaat van een voor de diepte gewogen gemiddelde van de transmembraan potentiaal. Met andere woorden, met afstand de grootste component van het signaal is afkomstig van het epicard. Aangezien veel van de verschijnselen die cruciaal zijn voor de initiatie, onderhoud of terminatie van een ritmestoornis subepicardiaal kunnen voorkomen, wordt de interpretatie van deze verschijnselen zeer bemoeilijkt. De 3D kan structuur ook de interpretatie van het epicardiale signaal belemmeren, doordat het weefsel onder de epicardiale oppervlakte, per definitie, licht uitzend door een hoeveelheid weefsel die verstrooiing van dit licht teweeg brengt, hetgeen het epicardiale signaal kan vertroebelen.²

De methodes die door dit gehele proefschrift zijn toegepast bieden innovatieve oplossingen voor de hiervoor genoemde problemen, vertegenwoordigd door de *ex vivo* (*ad 1*) en de *in vitro* modellen (*ad 2*) van hartritmestoornissen. Voor het *ex vivo* optical mapping wordt het hart uit het organisme verwijderd en retrograad geperfundeed gebruik makend van een Langendorff opstelling, waardoor directe visualisatie van het epicardium, en het vastleggen van het (overwegend) epicardiale signaal mogelijk

wordt. Voor de *in vitro* benadering wordt het hart (in delen) gedissocieerd en de hieruit voortgekomen geïsoleerde hartspiercellen opnieuw uitgeplaat op fibronectine-gecoate dekglasaasjes, waarna de cellen opnieuw hun intercellulaire connecties kunnen vormen zodat ze wederom een functioneel syncytium vormen. De cellen vormen op deze manier een functionele monolaag van hartspiercellen, hetgeen het onopgemerkt blijven van verschijnselen die bepalend zijn voor de initiatie, het onderhoud en de terminatie van ritmestoornissen op de multicellulaire schaal vrijwel onmogelijk maakt. Een voorbeeld van hoe deze verschijnselen onderzocht kunnen worden in het *in vitro* model is gegeven in **Hoofdstuk IV**, waarin de bijdrage van Kir3.x in de initiatie, onderhoud en terminatie van AF werd bestudeerd. Hier werd gedemonstreerd dat het optreden van APD alternans (m.a.w. het bepalende verschijnsel) de initiatie van AF veroorzaakte door het vergroten van de kans op unidirectioneel block, hetgeen afhankelijk bleek van de Kir3.x expressie. Daarnaast werd aangetoond dat AF kan worden onderhouden door rotors met stabiele en onstabiele period dynamics, wat gekoppeld is aan de steilheid van de restitutiecurves van de APD en de geleidingsnelheid, welke wederom werden bepaald door de Kir3.x expressie. Tenslotte bleek de terminatie van AF, die kon worden geïnduceerd door IK₁, ACh-c blokkade, afhankelijk van de destabilisatie van rotors en de hieruitvolgende botsingen tussen PSen en de grenzen van de kweken (m.a.w. het verschijnsel bepalend voor de terminatie). Dezelfde studie kan gebruikt worden om te illustreren dat het bestuderen van deze verschijnselen in het 3D, intacte hart vele malen moeilijker is.

Naast de toegenomen interpreteerbaarheid van bepalende verschijnselen geeft het *in vitro* model ook de mogelijkheid tot superieure reproduceerbaarheid en controle van de onderzochte variabelen. Een voorbeeld van deze superieure controle is beschreven in **Hoofdstuk II**, waarin de individuele bijdragen van pathologische hypertrofie en cardiale fibrose aan de ritmestoornissen geassocieerd met ventriculaire remodeling (zoals ontstaat in de context van druk of volume overbelasting, bijvoorbeeld na een hartinfarct) werden bestudeerd. Doordat hypertrofie en fibrose simultaan voorkomen tijdens cardiac remodelling,³ is het bestuderen van de individuele bijdrage van beide factoren buiten de *in vitro* situatie vrijwel onmogelijk.

Het is echter, ongeacht de mechanistische inzichten die geboden kunnen worden het gebruik van de *in vitro* modellen, belangrijk om te waken voor overschatting van de implicaties van *in vitro* onderzoeksresultaten. Het is daarom belangrijk om bewust te blijven van de methodes die gebruikt zijn om tot dergelijke resultaten te komen, en wat deze methodes vertegenwoordigen: Aangezien het *in vitro* model gebruikt maakt van 2D monolagen van hartspiercellen, zijn het aantal electrotone interacties per cell significant lager dan in het intacte (3D) hart. Van electrotone interacties is het bekend dat ze bepalend zijn voor de kans op deviaties in het electrophysiologische gedrag van enkele cellen van het gemiddelde gedrag van cellen binnen het weefsel.⁴ Derhalve kan 'slechts'

het veranderen van de myocardiale structuur naar de 2D situatie de kans op initierende verschijnselen zoals early afterdepolarizations en APD alternans (zoals beschreven in respectievelijk **Hoofdstuk II** en **Hoofdstuk IV**) veranderen. Daarnaast ontbreken de normale anatomische barrières uit het intacte hart zoals het epi- en endocard en de vasculatuur (die worden gevormd door verschillende celtypen als endotheelcellen, gladde spiercellen of toegenomen hoeveelheden fibroblasten) in het *in vitro* model, waar de barrières in het *in vitro* model slechts the randen van het dekglasje bedekken (en daarmee dezelfde cellulaire compositie hebben als alle andere gebieden binnen de kweek). De effecten van deze barrières kunnen daarom verschillen in het *in vitro* model in vergelijking met het intacte hart. Aangezien de botsingen tussen PSen en anatomische barrières onmisbaar lijken voor de terminatie van reentry tachyarritmieën *in vitro*, na bijvoorbeeld IK1 blokkade (**Hoofdstuk III**), Kir3.x blokkade (**Hoofdstuk IV**), of optogenetische depolarisatie (**Hoofdstuk VI**), kunnen de effecten van de aanwezige barrières bepalend zijn voor de terminatie zoals beschreven in deze studies. Daarnaast kan het gebrek aan celtypen die worden gevonden in het intacte hart maar niet in het *in vitro* model (zoals endotheelcellen en gladde spiercellen, zoals aangetoond in **Hoofdstuk IV**) de uitkomst van het introduceren van ziekte-condities zoals pathologische hypertrofie of fibrose (**Hoofdstuk II**) beïnvloeden, aangezien het bekend is dat deze condities ook effecten hebben op zowel het gedrag van niet-hartspiercellen als hun effecten op de hartspiercellen zelf.^{5,6} Desalniettemin was het mogelijk om de belangrijkste resultaten uit het *in vitro* model zoals beschreven in de studies die worden gepresenteerd in **Hoofdstuk III**, **Hoofdstuk IV** en **Hoofdstuk V**, worden gereproduceerd in het intacte hart, hetgeen de relevantie van het *in vitro* model onderstreept. Op deze manier kan door het starten met een vereenvoudigd *in vitro* model van hartritmestoornissen, om vervolgens de complexiteit te vergroten naar het intacte hart pro-aritmische mechanismen en anti-aritmische strategieën worden effectieve en relevante manier worden blootgelegd. Het vergroten van de complexiteit van deze modellen naar de *in vivo* en de humane situatie blijft echter noodzakelijk om de rol van de gevonden verschijnselen in humane ziekte ontegenzeggelijk vast te stellen.

Het voorkomen van pro-aritmische triggers als anti-aritmische strategie.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk I**, kunnen hartritmestoornissen worden tegengegaan door het voorkomen van de pro-aritmische trigger, door het veranderen van het substraat om zo het onderhoud van een ritmestoornis te voorkomen of door het faciliteren of forceren van terminatie van reeds ontstane ritmestoornissen. Van deze drie manieren van aanpak, zou preventie van trigger gezien kunnen worden als de preferentiele anti-arrhythmische strategie. Vanzelfsprekend is het beletten van het ontstaan van een ritmestoornis (wanneer met succes toegepast) de enige manier strategie die alle complicaties geassocieerd met het laten ontstaan van een ritmestoornis (zoals trom-

boembolische events in het geval van atriumfibrilleren) voorkomt.⁷ Daarnaast is door verschillende studies aangetoond dat zelfs de ectopische triggers van ritmestoornissen, zoals premature ventriculaire complexen, een voldoende causale factor kunnen zijn voor het ontstaan van remodelling en hiermee geassocieerde vermindering in hartfunctie en pro-aritmie.^{8,9} Om een trigger te voorkomen is het essentieel de oorsprong van deze trigger te begrijpen, om zo te kunnen zoeken naar en in te grijpen op stappen die cruciaal zijn in de cascade die leidt tot deze trigger. Nogthans is het van groot belang om bedacht te blijven op de secundaire electrofysiologische consequenties die inhibitie van deze stappen heeft teneinde anti-aritmische behandeling te optimaliseren:

In **Hoofdstuk II** van dit proefschrift werd aangetoond dat early afterdepolarizations (EADs), afhankelijk van I_{CaL} , de voornaamste triggers zijn van spiral wave reentry tachyaritmieën in de context van ventriculaire remodelling. Het voorkomen van deze triggers door het inhiberen van I_{CaL} bleek een effectieve manier om EADs en de hieruitvolgende ritmestoornissen in de context van de pathologisch hypertrofe component van remodelling. Dezelfde studie toonde echter ook dat dezelfde strategie, met als doel het voorkomen van EADs in de context van de fibrotische component van remodelling, inexcitability van de hartspiercellen kan veroorzaken, aangezien de fibroblastgeïnduceerde depolarisatie van de rustmembraanpotentiala (hetgeen inactivatie van het snelle natrium kanaal veroorzaakt) de exciteerbaarheid volledig afhankelijk van de calcium stromen maakt. Inexciteerbaarheid van de hartspiercellen maakt activatie en contractie van het betrokken myocard onmogelijk. Het blokkeren van de I_{CaL} in fibrotisch myocard kan daarom -in theorie- de hartfunctie significant beperken. Op deze manier zou iatrogene inexciteerbaarheid, buiten het effect dat I_{CaL} -blokkers hebben op de vasculaire tonus en inotropie,¹⁰ kunnen bijdragen aan de hemodynamische instabiliteit die kan worden gevonden in patiënten met cardiale mechanische dysfunctie na behandeling met I_{CaL} -blokkers.¹⁰ Daarentegen, zou, mits de EAD hun oorsprong vinden in een lokaal fibrotisch gebied, I_{CaL} -blokkade geschikt kunnen zijn voor de preventie van triggers. Als de ritmestoornis in dat geval nog steeds wordt geïnitieerd zou het inexciteerbare gebied, hypothetisch, conversie naar een gefixeerd macroreentrant circuit kunnen faciliteren en daarmee terminatie of ablatie van resp. reentry geleiding of het reentry circuit kunnen vergemakkelijken. Echter, zoals werd aangetoond in **Hoofdstuk III**, kan een vermindering van de minimale APD door I_{CaL} -blokkade tijdens een hartritmestoornissen juist een toename van de activatiefrequentie bewerkstelligen, hetgeen in potentie de cardiac output en de mogelijkheden tot terminatie kan verslechteren. Zodoende, werd aangetoond dat preventie van I_{CaL} -afhankelijke EADs, door simpelweg het blokkeren van de EADs, zou betekenen dat men opereert in een nauwe balans tussen pro- en anti-aritmische effecten. Om die reden zou anti-aritmische behandeling in de toekomst kunnen profiteren van onderzoek naar de mogelijkheden om I_{CaL} te moduleren zonder-, of met minimaal effect op de minimale APD en exciteerbaarheid. In

theorie zou dit kunnen worden bewerkstelligd door het corrigeren van de activatie en inactivatie dynamics van I_{CaL} , om zo de overlap in de steady-state inactivatie en activatie curves, en de hieruitvolgende I_{CaL} -window stroom te verminderen of door het reduceren van de tijdsconstante van I_{CaL} -deinactivatie (zie ook **Hoofdstuk I**). Dit proefschrift onderschrijft daarmee dat EAD-preventie een effectieve anti-aritmische strategie is. Het selecteren en corrigeren van de juiste (specifieke) targets in de cascades die resulteren in EAD-afhankelijke ritmestoornissen, teneinde ongewilde electrofysiologische effecten te voorkomen, blijft een relatief gecompliceerd doel en behoeft daarom additioneel onderzoek.

Een ander voorbeeld van trigger-preventie als anti-aritmische strategie is beschreven in **Hoofdstuk IV**. Hierin werd gedemonstreerd dat APD alternans afhankelijk is van de steilheid van de APD- en CV-restitutiecurves en kan bijdrage aan het ontstaan van unidirectioneel geleidingsblok en ritmestoornissen op basis van reentry. Het verminderen van de maximale steilheid in deze curves door het inhiberen van de constitutief actieve acetylcholine-afhankelijke kalium stroom ($I_{K_{ACh-c}}$) voorkomt deze pro-aritmische trigger. Ook in het geval van $I_{K_{ACh-c}}$ blokkade zouden secundaire electrofysiologische effecten ongewenste pro-aritmische gevolgen kunnen hebben. Aangezien blokkade van $I_{K_{ACh-c}}$ de APD laat toenemen zou de kans op EADs kunnen toenemen. Desondanks, is het wetenschappelijke bewijs voor EADs als oorzaak voor AF schaars. Voor de relatie tussen EADs, die ook kunnen worden veroorzaakt door het verlengen van de refractaire periode in een poging AF te behandelen,⁴ en ventriculaire ritmestoornissen bestaat een duidelijk grotere bewijslast. Kir3.x kanalen, verantwoordelijk voor $I_{K_{ACh-c}}$ komen echter binnen het hart alleen tot expressie in de hartspiercellen van de boezems. Blokkade van deze kanalen zal daarom niet leiden tot ventriculaire ritmestoornissen. Hoewel ieder mogelijk klinisch succes van deze aanpak nog onderzocht moet worden, onderschrijft deze studie wederom de mogelijkheid om ritmestoornissen te voorkomen door trigger-preventie.

Het aanpakken van de kern van de hartritmestoornis ten behoeve van terminatie

In dit proefschrift zijn meerdere methodes om het onderhoud van ritmestoornis te veranderen, teneinde terminatie te faciliteren aangetoond. In **Hoofdstuk III** werd gedemonstreerd dat een toename in de minimale APD een vermindering in de complexiteit van VF (m.a.w. terminatie van rotors) kan bewerkstelligen, door middel van transiente rotor destabilisatie. In **Hoofdstuk IV** werd eveneens aangetoond dat blokkade van $I_{K_{ACh-c}}$ eveneens kan leiden tot rotor destabilisatie en terminatie. Hoofdstuk VI laat zien hoe een toename in de grootte van de functionele kern van door middel van optogenetics kan leiden tot spiral wave drift en uiteindelijk terminatie. Tezamen lijkt het erop dat iedere interventie die ervoor zorgt dat PSen botsen met PSen van tegenover-

gestelde draairichting of anatomische grenzen leiden tot PS-eliminatie. Het aanpakken van de kern van de rotor lijkt daarmee de sleutel tot het faciliteren van terminatie. Om die reden is het begrijpen wat er gebeurt binnen en om de kern van de ritmestoornis cruciaal indien we de behandeling van hartritmestoornissen willen verbeteren.

Vele onderzoeken hebben getracht het gedrag van cellen in de kern van een functioneel reentry circuit te beschrijven, te benaderen of te simuleren. In 1973 leidden de eerste observaties van een tachycardie in afwezigheid van een anatomische obstakel tot de formuleren van het "leading circle concept".¹¹⁻¹³ Deze theorie veronderstelt dat in afwezigheid van een anatomisch obstakel het functionele reentry circuit de minimale lengte aanneemt de het voortzetten van de ritmestoornis toe laat. Deze minimale lengte hangt af van de geleidingssnelheid en de refractaire periode, op zo'n manier dat een klein exciteerbaar gebied blijft bestaan tussen de wavefront en waveback. De wavefront bewegen zodoende door weefsel met beperkte exciteerbaarheid. De kern van de rotor is in dit geval refractair/inexciteerbaar door electrotonic depolarisatie of centripetale activatie van het circulerende wavefront naar de kern.¹¹⁻¹³ In tegenstelling hiermee, veronderstelt de spiral wave reentry theorie dat het pad van de spiral wave tip (de voorflank van het wavefront in functionele reentry) af hangt van de relatie tussen de wavefront curvatuur en de geleidingssnelheid. Een toegenomen wavefront curvatuur zorgt voor een afgenomen source/sink ratio voor propagatie van een actiepotentiaal en verlaagd daarmee de geleidingssnelheid.¹⁴ Gegeven homogene exciteerbaarheid, kan een functioneel reentry circuit zodoende alleen in stand worden gehouden als wavefront curvatuur toeneemt en de geleidingssnelheid afneemt richting de kern van de rotor, waardoor de wavefront de vorm aanneemt van een Archimedische spiraal. De functionele kern wordt gevormd op de plek waar de wavefront curvatuur de kritieke waarde bereikt waarbij de geleidingssnelheid tot het nulpunt daalt. Aangezien het wavefront bij deze kritieke waarde niet kan worden voortgeleid richting de kern, wordt aangenomen dat de kern exciteerbaar maar niet geexciteerd wordt, in contrast tot de staat van de core volgens het leading circle concept.^{14, 15} Hoewel deze theorieën verschillende mechanismen van ritmestoornissen beschrijven hoeven ze elkaar niet uit te sluiten omdat ritmestoornissen als geheel uit een heterogene groep afwijkingen bestaat en om die reden gebaseerd kunnen zijn op verschillende pathofysiologie. Dit zou kunnen betekenen dat de staat van de kern voor iedere ritmestoornis zou moeten worden beredeneerd of bepaald teneinde de meest effectieve therapeutische strategie toe te passen.

In **Hoofdstuk V** werd gedemonstreed dat de amplitude van de actiepotentiaal gereduceerd door een elektrische schok afneemt bij korte pre-schok piek-tot-piek intervallen als gevolg van lokale refractoriteit in het weefsel. Uit deze relatie tussen refractoriteit en amplitude kan worden geconcludeerd dat als de kern van de ritmestoornis refractair is (zoals verondersteld in de leading circle theorie) zou de hoeveelheid depolarisatie

geïnduceerd door een electroschok moeten afnemen richting de kern. De kern zou zou op zichzelf een reden kunnen zijn voor het falen van defibrillatie. Zowel de kern, als de afstand tot de kern bleken echter geen invloed te hebben op de amplitude van de actiepotentialen geïnduceerd door elektrische schokken. In overeenstemming met deze bevinding had leek de complexiteit (m.a.w. het aantal rotors) van een ritmestoornis weinig effect te hebben op de energie benodigd voor succesvolle defibrillatie. Hoofdstuk VI liet zien dat kortstondige reducties in de exciteerbaarheid door middel van optogenetics, de grootte van de functionele kern kunnen doen toenemen, wat uiteindelijk kan leiden tot terminatie van de ritmestoornis. In dit geval werd verondersteld dat de afname in exciteerbaarheid de kritieke waarde van de wavefront curvatuur doet afnemen, waardoor de PS zich naar een meer perifeer punt begeeft. Aangezien het wavefront niet kan worden voorgeleid naar het gebied tussen de PS voor de afname van de exciteerbaarheid en de nieuwe PS, als gevolg van de nieuwe kritieke wavefront curvatuur, neemt de kern toe in grootte (naar ongeveer het gebied tussen de oude en de nieuwe PS). In deze situatie kan het optische signaal uit de kern niet discrimineren tussen refractoriteit of afwezigheid van excitatie. Wanneer echter wordt aangenomen dat de core is gedepolariseerd en afhangt van centripetale activatie vanuit een meer perifere voorflank, zou het kortstondig verminderen van de exciteerbaarheid mogelijk slechts de geleidingssnelheid vertragen, waardoor de wavefront-waveback interactie afneemt, de rotor stabiliseert en de grootte van de kern niet verandert of juist verkleint. Deze ritmestoornissen op basis van reentry lijken daarmee te roteren rond een exciteerbare kern, in overeenstemming met de spiral wave theorie. Tezamen illustreert dit dat de staat van de kern leidend kan zijn in de (theoretische) effectiviteit van een gekozen anti-aritmische strategie.

In **Hoofdstuk III en IV** daarentegen, worden verschillende methoden gebruikt om de minimale APD te verlengen en daarmee rotors die respectievelijk VF of AF onderhouden te termineren. Aangezien deze interventie leidt tot een toename in de wavelengh zouden zowel kernen van reentry die centripetaal worden geactiveerd als kernen die niet geëxiteerd worden gedestabiliseerd als gevolg van de toegenomen interactie van de wavefronts en de wavebacks in hun periferie. Als ritmestoornissen inderdaad kunnen bestaan op basis van zowel de leading circle als spiral wave reentry mechanismen, zou de beste manier om ritmeproblematiek te behandelen mogelijk niet kunnen liggen in tackelen van de kern maar juist de periferie.

Tezamen biedt dit proefschrift, naast proof-of-principle for strategieën voor reentry terminatie, nieuwe inzichten in de staat van cellen in de kern en de periferie van functionele reentry, hetgeen kan helpen in de ontwikkeling van nieuwe anti-aritmische strategieën. Desondanks is meer onderzoek nodig om de staat van de kern (voor verschillende ritmestoornissen) volledig te begrijpen, alsmede het effect van deze staat op

de therapeutische effect, als we verbeteringen willen aanbrengen in de behandeling van hartritmestoornissen.

CONCLUSIE

Het begrijpen van de mechanismen die ritmestoornissen veroorzaken, met inbegrip van triggers onderhoud en terminatie is cruciaal voor hun behandeling. Additionele inspanningen van de wetenschappelijke gemeenschap zullen nodig zijn om gewonnen kennis met betrekking tot triggers, onderhoud om te zetten in terminatie of preventie van hartritmestoornissen om zodoende anti-aritmische behandelingen te verbeteren.

REFERENCE LIST

1. Efimov IR, Nikolski VP, Salama G. Optical imaging of the heart. *Circulation research*. 2004;95:21-33
2. Bishop MJ, Gavaghan DJ, Trayanova NA, Rodriguez B. Photon scattering effects in optical mapping of propagation and arrhythmogenesis in the heart. *Journal of electrocardiology*. 2007;40:575-80
3. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circulation research*. 1989;64:1041-1050
4. Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Chen PS, Qu Z. Early afterdepolarizations and cardiac arrhythmias. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2010;7:1891-1899
5. Shah AM, Grocott-Mason RM, Pepper CB, Mebazaa A, Henderson AH, Lewis MJ, Paulus WJ. The cardiac endothelium: Cardioactive mediators. *Progress in cardiovascular diseases*. 1996;39:263-284
6. Tian Y, Morrisey EE. Importance of myocyte-nonmyocyte interactions in cardiac development and disease. *Circulation research*. 2012;110:1023-1034
7. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: The framingham study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1991;22:983-988
8. Bhushan M, Asirvatham SJ. The conundrum of ventricular arrhythmia and cardiomyopathy: Which abnormality came first? *Current heart failure reports*. 2009;6:7-13
9. Yarlagadda RK, Iwai S, Stein KM, Markowitz SM, Shah BK, Cheung JW, Tan V, Lerman BB, Mittal S. Reversal of cardiomyopathy in patients with repetitive monomorphic ventricular ectopy originating from the right ventricular outflow tract. *Circulation*. 2005;112:1092-1097
10. Epstein SE, Rosing DR. Verapamil: Its potential for causing serious complications in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1981;64:437-441
11. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. *Circulation research*. 1973;33:54-62
12. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. li. The role of nonuniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block, as studied with multiple microelectrodes. *Circulation research*. 1976;39:168-177
13. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. lii. The "leading circle" concept: A new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circulation research*. 1977;41:9-18
14. Fast VG, Kleber AG. Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovascular research*. 1997;33:258-271
15. Karagueuzian HS, Athill CA, Yashima M, Ikeda T, Wu TJ, Mandel WJ, Chen PS. Transmembrane potential properties of atrial cells at different sites of a spiral wave reentry: Cellular evidence for an excitable but nonexcited core. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*. 1998;21:2360-2365

