

**Evaluation der strukturellen Remodelingprozesse in einem
Schweinmodell der ischämischen Kardiomyopathie**

von Julia Vlcek

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Evaluation der strukturellen Remodelingprozesse in einem
Schweinemodell der ischämischen Kardiomyopathie**

von **Julia Vlcek**

aus München

München, 2023

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des LMU Klinikums

Mentor: PD Dr. med. Sebastian Clauß

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Uni.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Vorhofflimmern.....	3
2.1.1	Definition und Epidemiologie.....	3
2.1.2	Risikofaktoren für VHF	4
2.1.3	Klinik von VHF.....	5
2.1.4	Diagnostik und Therapieansätze	6
2.2	Elektrophysiologie des Herzens	11
2.2.1	Erregungsleitung	11
2.2.2	Das atriale Aktionspotential.....	12
2.3	Pathophysiologie von Vorhofflimmern	14
2.3.1	Ektopie	16
2.3.2	Reentrys.....	16
2.3.3	Autonomes Remodeling.....	17
2.3.4	Elektrisches Remodeling.....	18
2.3.5	Strukturelles Remodeling.....	19
2.3.6	Extrazelluläre Matrix und interstitielle Fibrose	20
2.4	Tiermodelle des Vorhofflimmerns – Überblick.....	22
2.4.1	Kleintiermodelle.....	23
2.4.2	Großtiermodelle	24
2.5	Hypothese und Ziele.....	25
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	<i>In vivo</i>	27
3.1.1	Verwendete Tiere und Tierhaltung	27
3.1.2	Übersicht zum Versuchsaufbau.....	28
3.1.3	<i>In vivo</i> Material	29
3.1.3.1	Geräte	29
3.1.3.2	Verbrauchsmaterialien	29
3.1.3.3	Instrumente.....	31
3.1.3.4	Hilfsmittel.....	32

3.1.3.5	Medikamente und Chemikalien	32
3.1.3.5.1	Narkotika	32
3.1.3.5.2	Analgetika	33
3.1.3.5.3	Infusionslösungen.....	33
3.1.3.5.4	Antikoagulans.....	33
3.1.3.5.5	Antiarrhythmikum.....	33
3.1.3.5.6	Kontrastmittel.....	33
3.1.3.5.7	Antibiotikum	33
3.1.3.5.8	Sonstige Medikamente und Chemikalien.....	34
3.1.4	<i>In vivo</i> Methoden.....	34
3.1.4.1	Narkoseeinleitung.....	34
3.1.4.2	Intubation und Beatmung.....	34
3.1.4.3	Aufrechterhaltung und Überwachung der Narkose.....	35
3.1.4.4	Schleusenanlage	36
3.1.4.5	Rechtsherzkatheter	38
3.1.4.6	Messung der linksventrikulären Drücke (LVP und LVEDP)	39
3.1.4.7	Bestimmung der Ejektionsfraktion	39
3.1.4.8	Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)	39
3.1.4.9	Sinusknotenerholungszeit (SNRT).....	40
3.1.4.10	Refraktärzeiten (AERP und AVERP)	40
3.1.4.11	Bestimmung des Wenckebach-Punkts (WP).....	41
3.1.4.12	Burststimulation	41
3.1.4.13	Koronarangiographie und Infarzierung.....	42
3.1.4.14	Ausleiten und Nachsorge der IR30-Gruppe	42
3.1.4.15	Herzentnahme im Endversuch	43
3.2	Ex vivo	43
3.2.1	Ex vivo Material.....	43
3.2.1.1	Geräte	43
3.2.1.2	cDNA und qPCR.....	45
3.2.1.3	Sonstiges.....	45
3.2.1.4	Chemikalien	46
3.2.1.5	Antikörper	47
3.2.1.6	Zubereitungen.....	47
3.2.1.6.1	Sodium-Citrat-Puffer.....	47

3.2.1.6.2	Waschpuffer	48
3.2.1.6.3	Blockierlösung	48
3.2.1.6.4	Gel für Elektrophorese	48
3.2.1.7	Software	48
3.2.1.8	Oligonukleotidprimer für die RT-qPCR	48
3.2.2	<i>Ex vivo</i> Methoden.....	50
3.2.2.1	Masson Goldner Trichrom Färbung.....	50
3.2.2.2	Immunfluoreszenzfärbung (IF)	52
3.2.2.3	Mikroskopie	54
3.2.2.4	Genexpressionsanalyse.....	55
3.2.2.4.1	RNA-Isolation	55
3.2.2.4.2	Synthese der komplementären DNA (cDNA)	56
3.2.2.4.3	Primertest	57
3.2.2.4.4	Realtime-qPCR.....	60
3.2.2.5	Statistik.....	62
3.2.2.6	Rassebestimmung.....	62
4	ERGEBNISSE	63
4.1	<i>In vivo</i> Ergebnisse.....	63
4.1.1	Hämodynamik	63
4.1.2	Elektrokardiogramm (EKG).....	65
4.1.3	Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)	66
4.2	<i>Ex vivo</i> Ergebnisse.....	71
4.2.1	Infarktnachweis	71
4.2.2	Evaluation der interstitiellen Fibrose	71
4.2.3	Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie.....	73
4.2.4	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse.....	75
4.3	Ergebnisse analysiert in Abhängigkeit der Rasse	78
4.3.1	Genotypisierung	78
4.3.2	Hämodynamik	79
4.3.3	Elektrokardiogramm (EKG).....	83
4.3.4	Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)	83
4.3.5	Evaluation der interstitiellen Fibrose	89
4.3.6	Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie.....	90

4.3.7	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	92
5	DISKUSSION	99
5.1	Wahl der Tierart	99
5.2	Wahl des Tiermodells.....	100
5.3	Phänotypisierung des Modells	101
5.4	Elektrisches Remodeling.....	102
5.5	Strukturelles Remolleling	103
5.6	Genetische Einflüsse.....	107
5.7	Ausblick und Relevanz	110
6	ZUSAMMENFASSUNG	113
7	SUMMARY.....	115
8	LITERATURVERZEICHNIS	117
9	ANHANG	145
9.1	Abbildungsverzeichnis	145
9.2	Tabellenverzeichnis.....	148
9.3	Danksagung	149

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC	engl. AF Better Care oder Antikoagulation/Bessere Symptombehandlung/ Kardiovaskuläre und Komorbiditätsoptimierung
ACTB	Beta-Aktin
AERP	Atriale effektive Refraktärperiode
ANS	Autonomes Nervensystem
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
α -SMA	Alpha-Smooth-Muscle-Aktin
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventrikulär
AVERP	Atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode
BCL	Basiszykluslänge
BGA	Blutgasanalyse
BL	baseline
bpm	engl. für Schläge die Minute
Ca	Calcium
CAVB	chronischer AV-Block
CCN2 (CTGF)	Cellular Communication Network Factor 2 oder Connective Tissue Growth Factor
cDNA	engl. für komplementäre DNA
CHA ₂ DS ₂ -VASc-Score	C: engl. Congestive Heart Failure, H: Hypertension, A2: Alter >75 Jahre, D: Diabetes mellitus, S ₂ : Früherer Apoplex/TIA/Thrombembolie, V: Vaskuläre Erkrankung, A: Alter 65-74 Jahre, Sc: sex category bzw. weibliches Geschlecht
cJUN	cellulärer JUN =onkogener Transkriptionsfaktor, interagiert z.B. mit
CV	engl. für Kardioversion
D	Deutschland
DAD	engl. für verzögerte Nachdepolarisation
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol (Farbstoff)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	DesoxyNukleosidTriPhosphat
DOAC	direkte orale Antikoagulantien
EAD	engl. für frühe Nachdepolarisation
ECM	Extrazelluläre Matrix

EDF	Fläche des Ventrikels am Ende der Diastole
EDL	Länge des Ventrikels am Ende der Diastole
EDTA	engl. für Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EHRA	European Heart Rhythm Association
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
ERP	effektive Refraktärzeit
ESF	Fläche des Ventrikels am Ende der Systole
ESL	Länge des Ventrikels am Ende der Systole
FN	Fibronektin
FSP1	Fibroblast-specific protein 1
Ic	Ic-Antiarrhythmika: Der schnelle Natriumeinstrom wird gehemmt und die Refraktärzeit der Natriumkanäle nimmt zu; AP bleibt gleich
ICM	engl. für ischämische Kardiomyopathie
IE	internationale Einheiten
I _{Kur}	ultraschnelle Komponente des aktivierenden Kaliumstromes
IR30	Ischämie/Reperfusion für 30 Tage
i.v.	intravenös
K	Kalium
KGW	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LA	linkes Atrium
LAA	linkes Herzohr
LAAC	engl. für LAA-Verschlusstherapie
LAFW	linkes Atrium Freie Wand
LIPV	linke inferiore Pulmonalvene
LR	Deutsche Landrasse
LSPV	linke superiore Pulmonalvene
L-Typ	longlasting oder langanhaltender Strom
LV	linker Ventrikel
LVEDP	engl. für linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVP	engl. für linksventrikulärer Druck
MAPK8	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 8 (auch JNK1)
MMP2	Matrix Metalloproteinase-2 oder Gelatinase
MT	Masson Goldner Trichrom
myoFB	Myofibroblast

Na	Natrium
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung
OSH	Tierhaltung Oberschleißheim
P	Pietrain
PBS	engl. für Phosphat gepufferte Salzlösung
PCI	engl. für perkutane Koronarintervention (Herzkatheter)
PCWP	engl. für Lungenkapillaren-Verschlussdruck
PEEP	engl. für positiver expiratorischer Druck
<i>PITX2</i>	paarweiser Homeobox-Transkriptionsfaktor 2;
PV	Pulmonalvene
PVI	Pulmonalvenenisolation
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RA	rechtes Atrium
RAFW	rechtes Atrium Freie Wand
RAO	engl. für rechte anteriore Schräge; kaudal angulierte Projektion
RIPV	rechte inferiore Pulmonalvene
RNA	Ribonukleinsäure
ROR1/2	Regeneron orphan Rezeptor 1/2; Rezeptor-Tyrosinkinase
RSPV	rechte superiore Pulmonalvene
RV	rechter Ventrikel
SNP	Single Nucleotide Polymorphism; Punktmutationen
SNRT	engl. für Sinusknotenerholungszeit
Tab.	Tabelle
TAC	engl. für transversale Aortenverengung
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TGF β	Transforming Growth Factor β ; transformierender Wachstumsfaktor
TH	Tierhaltung Thalhausen
TIA	transitorisch ischämische Attacke
VHF	Vorhofflimmern
VKA	Vitamin K-Antagonist
WP	Wenckebach Punkt

1 EINLEITUNG

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste Herzrhythmusstörung beim Menschen (Wyndham, 2000, Zulkifly et al., 2018). Höhere Lebenserwartung durch bessere medizinische Versorgung hat in den letzten Jahren zu steigender Inzidenz und Prävalenz geführt (Go et al., 2001, Knuiman et al., 2014). VHF erhöht das Risiko für Schlaganfälle, Demenz und Herzinsuffizienz und damit die Morbidität und Mortalität, weswegen die gesundheits-ökonomische Bedeutung groß ist (Krijthe et al., 2013, Lafuente-Lafuente et al., 2009). Die Therapien sind trotz Fortschritten bei den Ablationstechniken größtenteils weiterhin limitiert und oftmals rein symptomatisch mit deutlichen Nebenwirkungen insbesondere im Bereich der medikamentösen Therapie. Zwar konnten grundlegende pathophysiologische Mechanismen identifiziert werden, allerdings sind diese vor allem auf molekularer und zellulärer Ebene noch nicht vollständig verstanden. Die atriale, interstitielle Fibrose gilt als Schlüsselprozess des strukturellen Remodelings, das als einer der Basisfaktoren zur Entstehung eines vulnerablen Substrats betrachtet wird und letztendlich zur Genese und Aufrechterhaltung von VHF führt (Allessie et al., 2002). Daher war es Ziel dieser Arbeit einen besseren Einblick in die zugrundeliegenden profibrotischen Mechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene zu erlangen.

Verwendet wurde hierfür ein Schweinemodell der ischämischen Kardiomyopathie mit einem arrhythmogenen Phänotyp und proarrhythmogenen Remodelingprozessen (Clauss et al., 2020). Bei diesem Modell wird eine ischämische Kardiomyopathie (ICM) mittels Myokardinfarkts erzeugt, die zu einer signifikant erhöhten Anfälligkeit für Vorhofflimmern führt. Insgesamt wurden 40 Schweine untersucht. Bei 22 dieser Tiere wurde mittels 90-minütiger Okklusion der linken Vorderwandarterie (LAD) distal des ersten Diagonalasts mit anschließender 30-tägiger Reperfusionszeit ein proarrhythmogenes, atriales Substrat erzeugt. Als Kontrollgruppe dienten alters- und gewichtsadaptierte Tiere ohne Myokardinfarkt. Zur *in vivo* Charakterisierung führten wir 12-Kanal-EKGs, Rechts- und Linksherzkatheter-Untersuchungen sowie eine invasive elektrophysiologische Untersuchung (EPU) mit Induktionsmanövern für atriale Arrhythmien mittels atrialer Burststimulation durch. Im Anschluss wurde das Herz entnommen und für weitere molekularbiologische und histologische Untersuchungen entsprechend unterschiedlich prozessiert und konserviert. Die Genexpression von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und profibrotische

Mediatoren wurde mittels qPCR quantifiziert. Die interstitielle Fibrose wurde histologisch durch eine Masson Goldner Trichrom Färbung evaluiert und die Expression von α -smooth-muscle-Aktin (α -SMA) als Marker für aktivierte Myofibroblasten (MyoFB) wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Wang et al., 2017). Im Rahmen der Analysen zeigte sich, dass einige Tiere trotz signifikanter ICM keine vermehrte Fibrose im Vorhof entwickelten. Daher wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ein genetischer Einfluss auf das strukturelle Remodeling in diesem Schweinmodell besteht. Einige der Schweine hatten vereinzelt dunkle Flecken auf der Haut gezeigt, was auf einen gemischten genetischen Hintergrund mit Anteilen von Pietrain schließen ließ. Daher wurde zusätzlich der genetische Hintergrund der untersuchten Tiere mittels Genotypisierung bestimmt und das strukturelle Remodeling in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Schweinerasse analysiert, um herauszufinden, ob eventuell ein genetisch-bedingter protektiver Mechanismus vorliegt, der einen innovativen Ansatzpunkt für neue therapeutische Anwendungen bieten könnte.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Vorhofflimmern

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Bei Vorhofflimmern (VHF) handelt es sich um eine supraventrikuläre Tachyarrhythmie mit unkoordinierter atrialer Erregungsbildung und –ausbreitung mit folglich ineffektiver, atrialer Kontraktion. Zu den elektrokardiographischen Merkmalen des VHF gehören unregelmäßige, arrhythmische R-R-Intervalle (vorausgesetzt die atrioventrikuläre Überleitung ist nicht beeinträchtigt), das Fehlen von deutlichen, sich wiederholenden P-Wellen und unregelmäßige, atriale Aktivierungen (Hindricks et al., 2021). Sind alle Punkte gegeben spricht man von einer absoluten Arrhythmie bzw. Arrhythmia absoluta (Camm et al., 2010a).

VHF ist die häufigste Herzrhythmusstörung beim Menschen (Wyndham, 2000, Zulkifly et al., 2018). Hohes Lebensalter und bessere medizinische Versorgung bei chronischen Krankheiten führen zu höherer Inzidenz und Prävalenz (Go et al., 2001, Knuiman et al., 2014). VHF tritt bei 3.7%–4.2% der 60- bis 70-jährigen Erwachsenen auf, und bei ca. 9 % der über 80-Jährigen (Zoni-Berisso et al., 2014). Die Hälfte der Patienten mit VHF ist über 75 Jahre alt. Man geht davon aus, dass sich die Anzahl von Patienten mit VHF bis zum Jahre 2050 mehr als verdoppeln wird (**Abb. 1**) (Rolf et al., 2011, Hindricks et al., 2021). VHF wird außerdem mit einem 5-fach erhöhten Schlaganfallrisiko in Verbindung gebracht (Oladiran and Nwosu, 2019, Benjamin et al., 1998). Zusätzlich steigert es das Risiko von Demenz um das 2-fache (Bunch, 2020) und einer Herzinsuffizienz um das 3-fache (Heist and Ruskin, 2006, Wang et al., 2003). Die mit VHF assoziierte Herzinsuffizienz sowie Schlaganfälle erhöhen die Mortalität, Morbidität und beeinträchtigen die Lebensqualität der Betroffenen. Dadurch erlangt VHF auch immer mehr an gesundheits-ökonomischer Bedeutung (Krijthe et al., 2013, Lafuente-Lafuente et al., 2009).

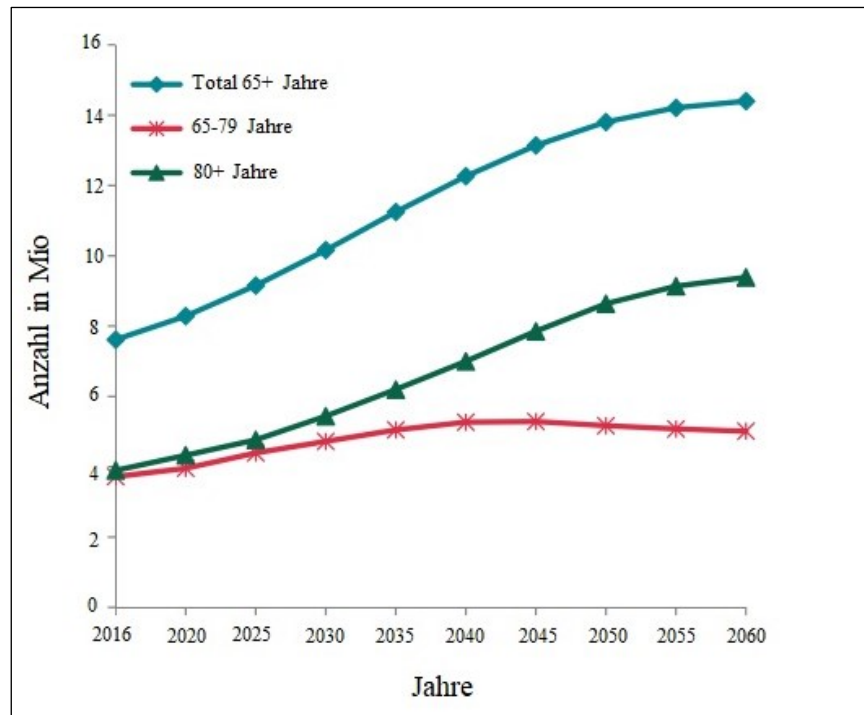


Abb. 1. Prognostizierter Anstieg der Prävalenz von VHF, modifiziert nach Hindricks et al., 2020.

2.1.2 Risikofaktoren für VHF

Um einen besseren Einblick in die Pathophysiologie der Arrhythmie zu bekommen, ist es nötig, sich die Wechselwirkungen zwischen Risikofaktoren bzw. Vorerkrankungen und VHF anzusehen. VHF tritt häufig im Zusammenhang mit bereits bestehenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie z.B. Herzklappendefekte, Herzinsuffizienz, Bluthochdruck, Diabetes mellitus usw. auf (Sun and Hu, 2010), wobei z.B. die Herzinsuffizienz auch in bidirektionaler Beziehung zu VHF stehen kann: VHF erhöht das Risiko einer Herzinsuffizienz und umgekehrt triggert eine Herzinsuffizienz die Entwicklung von VHF. Kongestive Herzinsuffizienz erzeugt gleichfalls ein atriales strukturelles Remodeling (Li et al., 1999). Darüber hinaus verursacht Herzinsuffizienz erhebliche Veränderungen beim Calciumstoffwechsel atrialer Kardiomyozyten (Yeh et al., 2008). Ein weiterer Risikofaktor ist der Myokardinfarkt. Dieser verursacht häufig erhebliche linksventrikuläre Dysfunktionen und Herzinsuffizienz (ischämische Kardiomyopathie), was zu einem Herzinsuffizienz-assoziierten VHF führt. Eine atriale Ischämie kann ebenfalls durch Leitungsstörungen im Zusammenhang mit einer Umverteilung an Gap Junctions (Zellverbindungen in Form von Proteinkanälen) VHF induzieren (Dobrev, 2006). Diese Erkrankungen sowie Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht bedingen atriale Umbauvorgänge (sog. Remodeling), die die Entwicklung von Vorhofflimmern

erleichtern. (**Abb. 2**). So führen zum Beispiel Umbauprozesse im alternden Herzen zu erheblichen elektrischen Leitungsstörungen (Wakili et al., 2011a). Die genaue Grundlage für geschlechtsabhängige Unterschiede im VHF-Risiko ist unklar. Männer weisen eine stärkere Expression wichtiger repolarisierender Ionenkanaluntereinheiten auf, was die atriale Repolarisation beschleunigen, die atriale Refraktärzeit verkürzen und Reentry begünstigen kann (Gaborit et al., 2010). Jedoch scheint die atriale Refraktärzeit geschlechtsunabhängig zu sein. Liu et al. beschreibt, dass die Größe des männlichen Vorhofs allein die Aufrechterhaltung von VHF begünstigen kann (Liu et al., 2004). Hypertonie verursacht ein signifikantes atriales Remodeling mit Vorhoffibrose, was die Entstehung von VHF erleichtert (Lau et al., 2010). Herzklappenerkrankungen wie die Mitralklappeninsuffizienz fördern VHF ebenfalls via strukturellem Remodeling (Verheule et al., 2003).



Abb. 2. Zusammenfassung von Risikofaktoren und Pathomechanismen, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern verantwortlich gemacht werden (in alphabetischer Reihenfolge); KHK=koronare Herzkrankheit, modifiziert nach Andrade et al., 2014

2.1.3 Klinik von VHF

Patienten mit VHF können verschiedene Symptome aufweisen. Initial weisen 50 - 87% der Patienten keinerlei Symptome auf und haben möglicherweise trotzdem eine ungünstigere Prognose (Hindricks et al., 2021). Asymptomatische und symptomatische Phasen können sich beim selben Patienten abwechseln (Israel et al., 2004, Page et al., 1994). Ein Phänomen, das nicht selten bei älteren Patienten mit permanentem VHF auftritt, ist das plötzliche Wegfallen der Palpationen mit folgender Symptomlosigkeit

(Kerr et al., 1998). Die Symptome des VHF sind mannigfaltig und reichen von harmlosen Palpitationen bis hin zu den hämodynamischen und thrombembolischen Folgeerscheinungen wie Schlaganfällen (Fuster et al., 2006). Typisch sind Dyspnoe, Müdigkeit, Engegefühl oder Schmerzen in der Brust, eine geringe Anstrengungstoleranz, Schwindel, Synkopen sowie Schlafstörungen. Bei hämodynamischer Instabilität kommen symptomatische Hypotonie, akutes Lungenödem aufgrund von Herzinsuffizienz, anhaltende myokardiale Ischämie und kardiogener Schock hinzu (Hindricks et al., 2021). Eine Einteilung des Schweregrads der Symptome erfolgt nach dem European Heart Rhythm Association (EHRA)-Score (Wynn et al., 2014, De With et al., 2019) (**Tab. 1**):

	Schwere der Symptome	Definition
EHRA I	keine Symptome	
EHRA II	milde Symptome	Alltagsaktivität ist nicht eingeschränkt
EHRA III	schwere Symptome	Alltagsaktivität ist eingeschränkt
EHRA IV	massive Symptome	Alltagsaktivität ist unmöglich

Tab. 1. EHRA Klassifikation von Symptomen bei Vorhofflimmern; Die häufigsten Symptome sind Palpitationen, Müdigkeit, Schwindel, Atemnot, Brustschmerz, Angst; modifiziert nach Kirchhof, 2007.

2.1.4 Diagnostik und Therapieansätze

Um die Diagnose VHF zu stellen, ist eine EKG-Dokumentation erforderlich. Dafür kommen eine Standard-12-Kanal-EKG-Aufzeichnung oder eine Ein-Kanal-EKG-Aufzeichnung in Frage. Charakteristisch für klinisches VHF ist ein Rhythmus ohne erkennbare P-Wellen und unregelmäßige RR-Intervalle bei unbeeinträchtigter, atrioventrikuläre Überleitung (**Abb. 3**):

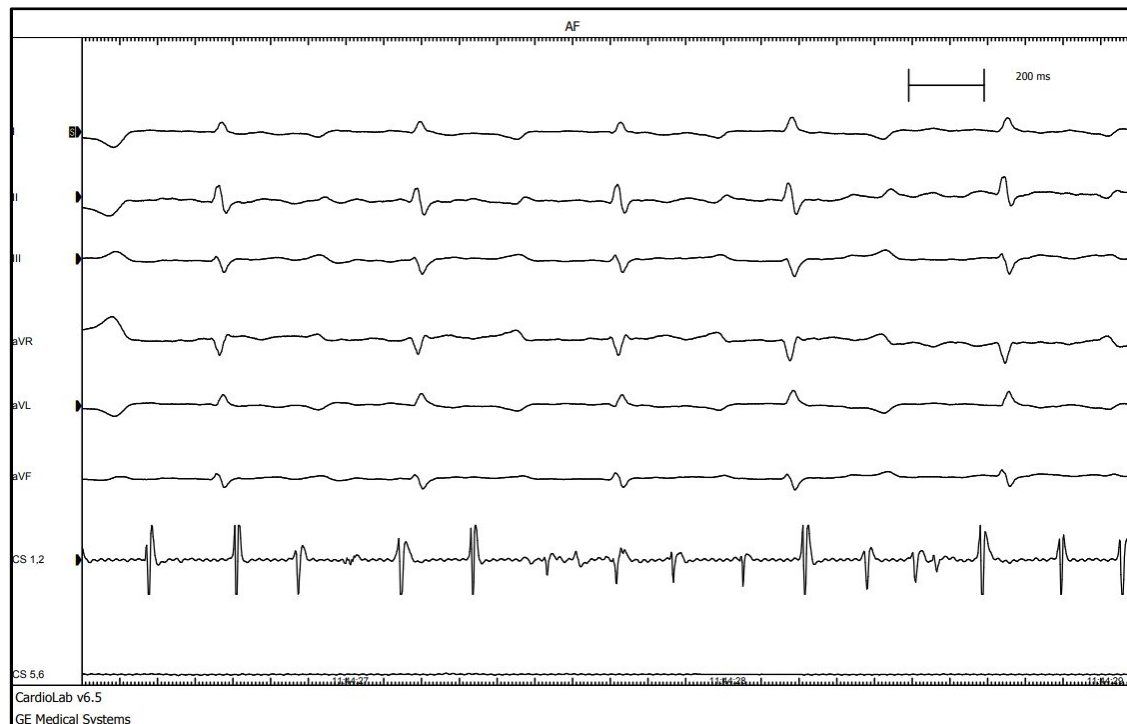


Abb. 3. EKG-Dokumentation eines repräsentativen Beispiels für VHF mit unregelmäßigen RR-Intervallen und fehlenden P-Wellen. Von oben nach unten sind die EKG-Ableitungen I, II, III, aVR, aVL und aVF sowie das intrakardiale Elektrogramm dargestellt, die Aufzeichnungsgeschwindigkeit beträgt 20 mm/Sek.

Die Therapieempfehlungen von VHF leiten sich nach dem sogenannten ABC-Pfad ab (Bosch et al., 2020). ABC steht sowohl für „*Atrial Fibrillation Better Care*“ als auch für A=Antikoagulation/Schlaganfall vermeiden, B=Bessere Symptombehandlung und C=Kardiovaskuläre- und Komorbiditätsoptimierung. Die Hauptstrategien dienen damit der Vermeidung von möglichen schwerwiegenden Komplikationen wie Schlaganfall, der Behandlung von Grunderkrankungen (Hindricks et al., 2021) sowie der Rhythmus- und Frequenzkontrolle, um damit eine Besserung der klinischen Symptomatik zu erzielen (Camm et al., 2010b). Voraussetzungen sind eine strikte Kontrolle der Risikofaktoren und die Vermeidung von Auslösefaktoren (Hindricks et al., 2021). Für eine adäquate Therapie muss abhängig von der Grunderkrankung individuell evaluiert werden. Hier gibt es prinzipiell pharmakologische und nicht-pharmakologische Therapieansätze. Da ein thrombembolisches Ereignis für die Prognose die bedeutendste Komplikation darstellt, ist die risikoadaptierte Verabreichung von antikoagulatorischen Medikamenten entscheidend. Zur Risikoeinschätzung wird üblicherweise der CHA₂DS₂-VASc-Score verwendet (**Tab. 2**):

Merkmal	Score
Herzinsuffizienz	1
Hypertension	1
Diabetes Mellitus	1
Gefäßerkrankung (z.B. Infarkt)	1
Alter 65-74 Jahre	1
Weibliches Geschlecht (>65 Jahre)	1
Alter >75 Jahre	2
Stattgehabter Schlaganfall/TIA	2

Tab. 2. CHA2DS2-VASc-Score zur Beurteilung des Risikos für Schlaganfälle bei VHF. Score von 0-1 $\hat{=}$ geringem Risiko; Score von 2 $\hat{=}$ mittlerem Risiko Score von >6 $\hat{=}$ hohem Risiko; TIA, transitorisch ischämische Attacke, modifiziert nach January et al., 2019

Ab einem CHADS-VASc-Score von 1 bzw. 2 bei Frauen wird eine gerinnungshemmende Therapie empfohlen (January et al., 2019, Jagadish and Kabra, 2019). Als Auslöser eines Thrombus lassen sich grob vereinfacht Gefäßwandschäden, Hypozirkulation (Stase) und gesteigerte Gerinnbarkeit (Hyperkoagulabilität) des Blutes, die sogenannte Virchow-Trias ausmachen (Lasch, 1986). Bei Patienten mit VHF kommt es zur Verlangsamung bis Stase des atrialen Blutflusses vor allem im Bereich des linken Herzhohls aufgrund der fehlenden Vorhofkontraktion. Außerdem können aufgrund von Turbulenzen Schäden an der Intima entstehen (Camm et al., 2010b). Daher wird üblicherweise vor Wahl der Therapie das Risiko für Thrombembolien bestimmt und, wenn nötig, durch orale Antikoagulation gesenkt. Als orale Antikoagulantien wurden klassischerweise Vitamin K-Antagonisten (VKA), auch Cumarine genannt, eingesetzt. Wirkstoffe sind Phenprocoumon und Warfarin. Nachteile sind schwere Blutungskomplikationen und das relativ umständliche Monitoring mit regelmäßigen Bluttests und Dosisanpassungen zur Einstellung des therapeutischen Zielbereichs nach dem INR (Donnan et al., 2004). Alternativ werden daher sogenannte direkte orale Antikoagulantien (DOAC) verwendet, die Faktoren Xa oder IIa der Gerinnungskaskade

inhibieren. DOACs reduzieren Schlaganfälle und systemische Embolien bei Patienten mit Vorhofflimmern mit oder ohne Herzklappenerkrankung bei im Vergleich zu VKAs niedrigerem Blutungsrisiko (Pan et al., 2017). Zu den DOACs gehören Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban (Alban, 2017). Die Antikoagulationstherapie bedeutet ein ständiges Abwägen des Risikos einer gesteigerten Blutungsneigung und einer ausbleibenden gerinnungshemmenden Effizienz (Toso et al., 2018), wobei DOACs wegen des geringeren Risikos für Blutungen den VKAs vorzuziehen sind und demzufolge heutzutage in der Praxis bevorzugt gegeben werden (Camm et al., 2012). Eine weitere Alternative, um das Schlaganfallrisiko zu senken, stellen Vorhofokkluder dar (Lewalter and Jung, 2017). Für die LAA-Verschlussstherapie (LAAC) stehen mittlerweile mehrere Systeme zur Verfügung, die interventionell nach transseptaler Punktion in den linksatrialen Vorhof eingebracht werden können und das LAA abdichten. Nach aktueller Studienlage stellt der interventionelle LAAC eine Alternative bei Hochrisikopatienten mit VHF und hohem Blutungsrisiko oder stattgehabter Blutung dar, um langfristig eine orale Antikoagulationstherapie vermeiden zu können (Landmesser et al., 2018).

Wie ausgeführt, sind weitere Hauptstrategien der Therapie die Frequenz- und die Rhythmuskontrolle. Hierbei wird abgewogen, ob lediglich im Sinne der Frequenzkontrolle versucht werden soll die Herzfrequenz wieder einzustellen und damit Brady- und Tachykardien abzuwenden oder ob im Sinne der Rhythmuskontrolle zusätzlich der Sinusrhythmus wiederhergestellt werden soll. Hierbei müssen u.a. der Patientenzustand, die Symptomatik, der Leidensdruck, die kardialen und extrakardialen Komorbiditäten sowie die Dauer des bestehenden Vorhofflimmerns betrachtet werden. Eine Frequenzkontrolle kann medikamentös und nicht-medikamentös erreicht werden. Pharmakologisch kommen zum Beispiel β -Blocker, Calciumkanalblocker, Digitalispräparate oder eine Kombination dieser Medikamente in Frage. Eine nicht-pharmakologische Alternative ist die AV-Knotenablation mit nachfolgend notwendiger Implantation eines Herzschrittmachers (Chatterjee et al., 2013).

Auch die Rhythmuskontrolle kann medikamentös und nicht-medikamentös in Angriff genommen werden. Antiarrhythmische Medikamente sind zum Beispiel Klasse III-Antiarrhythmika wie Amiodaron oder Sotalol bzw. Klasse IC-Antiarrhythmika wie Flecainid oder Propafenon (Bosch et al., 2020).

Zur nicht-pharmakologischen Rhythmuskontrolle zählt zum Beispiel die elektrische Kardioversion (CV), bei der initial mit 200-360 Joule kardiovertiert wird, um den

Sinusrhythmus wiederherzustellen (Lewalter and Jilek, 2016). Eine elektrische CV erfolgt R-Zacken-synchron, da man durch einen Impuls in der relativen Refraktärphase (aufsteigende T-Welle, bzw. vulnerable Phase) Kammerflattern oder -flimmern auslösen könnte (Goyal et al., 2021). Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie empfiehlt eine elektrische CV ohne vorherige orale Antikoagulation nur anzuwenden, wenn das VHF nicht länger als 2 Tage persistiert (Hindricks et al., 2021), sonst sollte zunächst eine orale Antikoagulation über 4 Wochen durchgeführt werden und/oder intrakardiale Thromben mittels transösophagealer Echokardiografie ausgeschlossen werden.

Als operative/interventionelle Therapien kommen heutzutage drei grundlegende Konzepte in Frage: eine rechts- und linksatriale Cox-Maze-IV Operation, eine ausschließlich linksatriale Pulmonalvenenisolation (PVI) und eine PVI mit zusätzlichen Ablationslinien im linken und eventuell auch im rechten Vorhof (Calkins et al., 2012). Die Katheterablation zur PVI wird zur Rhythmuskontrolle nach einer fehlgeschlagenen Behandlung mit Antiarrhythmika der Klasse I oder III empfohlen, um die Symptome von VHF-Rezidiven bei Patienten mit paroxysmalem VHF oder anhaltendem VHF zu verbessern (Hindricks et al., 2021). Bei der klassischen VHF-Ablation werden die Pulmonalvenen im Vorhof elektrisch isoliert, um die Ausbreitung ungewollter, vorzeitiger Extrasystolen aus den Pulmonalvenen, die in der Regel die Ursprungsregion des Vorhofflimmern darstellen, zu verhindern (Calkins et al., 2012). Um die Pulmonalvenen herum werden dabei Vernarbungen erzeugt, so dass eine Weiterleitung von Impulsen ausbleibt. Sehr selten kann es dabei durch Verletzungen innerhalb der Pulmonalvenen zu Stenosen bis zu einer lebensgefährlichen Okklusion kommen (Holmes et al., 2009, Alfudhili et al., 2017). Daher versucht man möglichst nahe an der Mündung Punkt für Punkt zu abladieren, üblicherweise um die beiden ipsilateralen Pulmonalvenen herum, was sich wegen der besseren Langzeitergebnisse bewährt hat (Arentz et al., 2007) (**Abb. 4**).

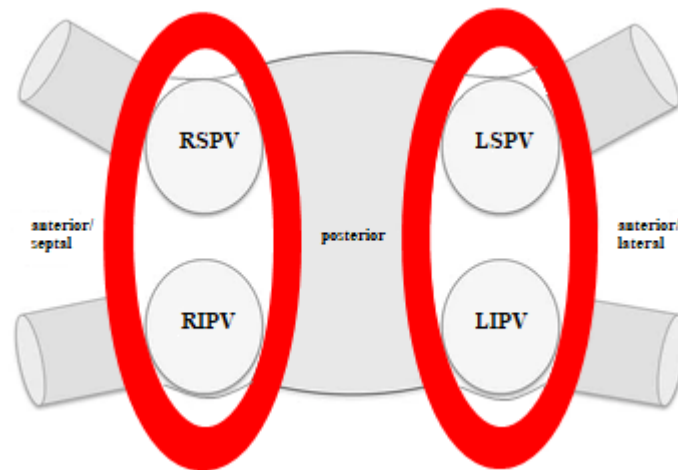


Abb 4. Schematisierte linke und rechte, obere und untere Pulmonalvene mit ipsilateralen zirkumferentiellen Ablationslinien, modifiziert nach Schäffer et al., 2018.

Bei 30-40 % der Patienten kommt es zu Rezidiven, was einen erneuten Eingriff erforderlich macht (Anselmino et al., 2016). Neben der meist verwendeten Radiofrequenzenergie kann die Ablation auch mittels Kälteenergie (Cryoablation) oder endoskopischen Laserballons erfolgen. Da die beschriebenen, etablierten Methoden allesamt keine kausale Therapie darstellen, ist die Entwicklung weiterer Therapiekonzepte besonders wichtig und daher die Grundlagenforschung zum Thema VHF zum verbesserten Verständnis der Pathomechanismen essentiell.

2.2 Elektrophysiologie des Herzens

2.2.1 Erregungsleitung

Das Herz muss jede Zelle des Körpers mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Seine Pumpfunktion beruht auf einem Wechsel von Kontraktion und Relaxation des Myokards. Damit es dazu kommt, ist die sequentielle Aktivierung von spezialisierten Zellen in den sogenannten Schrittmacherregionen nötig sowie die Ausbreitung der elektrischen Aktivität von Zelle zu Zelle des Arbeitsmyokards (Hervé and Sarrouilhe, 2006). Die Kardiomyozyten sind selbsterregend (Autorhythmie) und kontrahieren sich, sobald ein Aktionspotential die Zelle erreicht (Moorman et al., 1997). Nach Relaxation und einer kurzen Refraktärperiode sind die Zellen bereit für ein erneutes Aktionspotential. Der zeitliche Ablauf der Erregungsleitung in den verschiedenen Strukturen des Reizleitungssystems wird im Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG) visualisiert. Das elektrische Signal wird vom Sinusknoten initiiert und über die beiden

Vorhöfe, im EKG als P-Welle beschrieben, weiter zum AV-Knoten geleitet. Die Strecke von Beginn der P-Welle bis zur Q-/R-Zacke spiegelt im EKG die AV-Leitungszeit wider. Das elektrische Signal breitet sich danach vom His-Bündel über den linken und rechten Tawara-Schenkel bis in die Purkinje-Fasern aus. Die Kammermuskulatur wird erregt und es kommt zur Kontraktion der beiden Herzkammern. Der QRS-Komplex spiegelt die ventrikuläre Erregung wider, die Steilheit des Anstiegs der R-Zacke steht dabei für die Dauer der ventrikulären Reizübertragung. Die Depolarisation der Kammern wird durch die ST-Strecke dargestellt, die darauffolgende Repolarisation durch die T-Welle. Die QT-Zeit stellt die Gesamtdauer von Erregungsausbreitung und -rückbildung der Kammer dar und ist abhängig von der Herzfrequenz (Huppelsberg and Walter, 2005).

Ein Aktionspotential zeigt die Abfolge von Aktivierung und Inaktivierung von Ionenkanälen, die depolarisierende Na^+ , Ca^{2+} - und repolarisierende, K^+ -Ionenströme ermöglichen. Wichtig für die Erregungsausbreitung im Arbeitsmyokard ist die elektrische Kopplung zwischen den Zellen. Kardiomyozyten sind über Gap Junctions verbunden, wodurch die Erregung weitergeleitet wird. Der Zellverbund stellt ein funktionelles Synzytium dar. Eine Reihe von Erkrankungen können Störungen innerhalb der Ionenkanäle hervorrufen, wodurch die Aktionspotentialmorphologie verändert und die Erregungsausbreitung gestört wird (Nerbonne and Guo, 2002), was die Entstehung von Arrhythmien, wie beispielsweise Vorhofflimmern, begünstigen kann.

2.2.2 Das atriale Aktionspotential

Entscheidend für die Erregungsbildung und -ausbreitung ist die Form des Aktionspotentials. Es lässt sich in 5 Phasen einteilen, die den Ein- und Ausstrom von Natrium-, Calcium- und Kaliumionen widerspiegeln. Das Ruhemembranpotential einer Zelle liegt bei -90 mV. Wird ein kritisches Schwellenpotential (bei ca. -40 bis -60 mV) überschritten, kommt es zur Depolarisation der Zelle durch spannungsabhängige schnelle Na^+ -Kanäle, die einen Natriumeinstrom erlauben (Roden et al., 2002). Die Erregung wird über Gap Junctions zur nächsten Zelle weitergeleitet, wo nach Überschreiten des Schwellenpotentials das nächste Aktionspotential ausgelöst wird. Die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung hängt dabei von der Depolarisationsgeschwindigkeit ab (Nattel et al., 2007).

Phase 0	<p>Ruhemembranpotential bei ca. -90mV</p> <p>Depolarisation und Anstieg des Membranpotentials auf ca. -65 mV</p> <p>Öffnung der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle</p> <p>Depolarisation auf ein Potential von -40 bis -60 mV</p> <p>(Abb. 5 Ziffer 0, Aufstrich)</p>
Phase 1	<p>Inaktivierung der Na⁺-Kanäle und kurzzeitig aktiver K⁺-Strom in atriale und epikardiale Zellen, sowie in Zellen der Purkinje-Fasern</p> <p>Partielle Repolarisation (Surawicz, 1992)</p> <p>(Abb.5 Ziffer 1, Notch)</p>
Phase 2	<p>>100 ms andauernde Plateauphase, v.a. im Kammermyokard</p> <p>(Keating und Sanguinetti, 2001)</p> <p>Einwärtsstrom von Ca²⁺-Ionen < Auswärtsstrom von K⁺-Ionen</p> <p>langsame Repolarisation (Keating and Sanguinetti, 2001)</p> <p>(Abb. 5 Ziffer 2, Plateau)</p>
Phase 3	<p>Abnahme des Ca²⁺-Stroms und Zunahme des K⁺-Stroms</p> <p>Repolarisation (Baruscotti et al., 2005)</p> <p>(Abb. 5 Ziffer 3, Abfall)</p>
Phase 4	<p>Rückkehr zum Ruhemembranpotential von ca. -90 mV</p> <p>Stabilisierung (Chen et al., 2010)</p> <p>(Abb. 5 Ziffer 4, Baseline)</p>

Tab. 3. Die Phasen des kardialen Aktionspotentials im Überblick

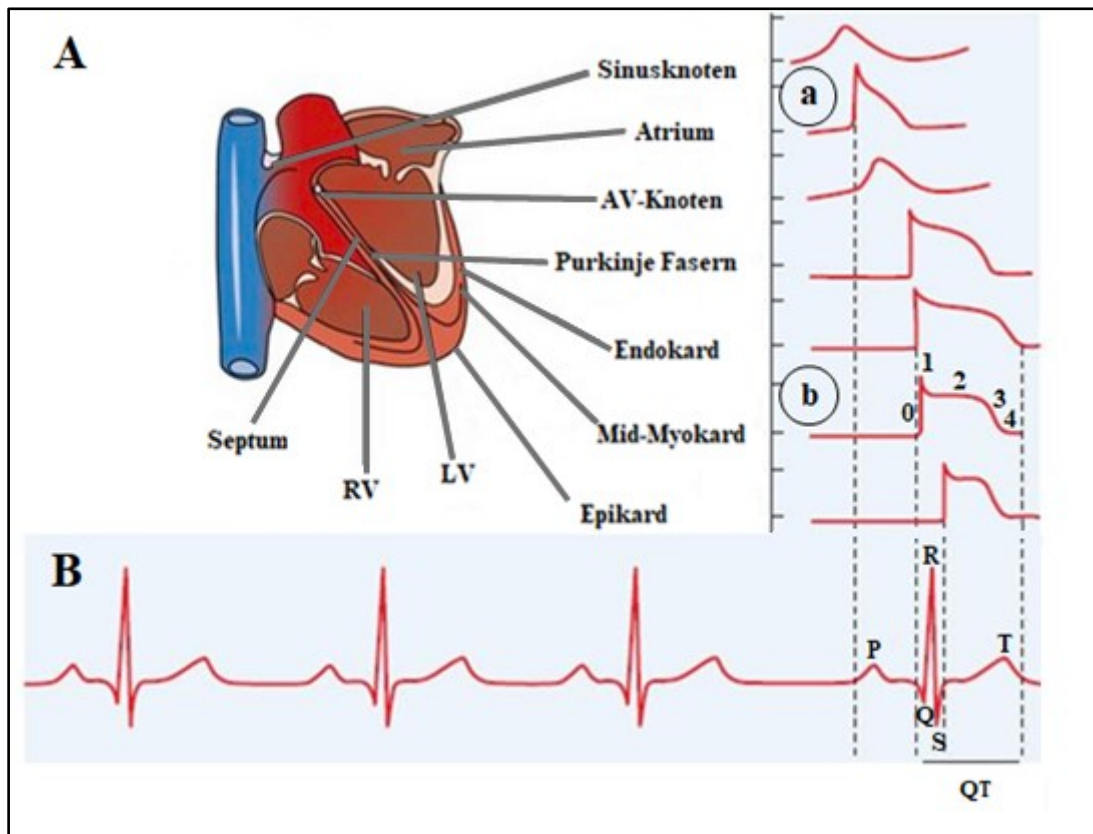


Abb. 5. Normale Erregungsausbreitung. A. Lage der elektrisch aktiven Strukturen und deren jeweiligen typischen Aktionspotentialen. Die Zahlen 0-4 stellen die Phasen des Aktionspotentialen dar; ① Darstellung eines typischen atrialen Aktionspotentialen ② Darstellung eines typischen ventrikulären Aktionspotentialen. B. Elektrokardiogramm; modifiziert nach Nerbonne and Kass, 2005.

Die Ionenkanalausstattung insbesondere auch bei den repolarisierenden K^+ -Kanälen ist speziesabhängig, wodurch tierische Aktionspotentialen zum Teil eine deutlich unterschiedliche Form haben als das humane. Das Schwein hat hierbei aber sehr ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften und ist unter anderem deswegen ein gut geeignetes Modell für die Untersuchung proarrhythmogener Mechanismen (Claus et al., 2019).

2.3 Pathophysiologie von Vorhofflimmern

Es werden drei Typen des Vorhofflimmerns unterschieden: Als paroxysmal bezeichnet man eine oder mehrere Episoden von VHF, die im Allgemeinen spontan terminieren und bis maximal 7 Tage anhalten, wobei die meisten weniger als 24 Stunden andauern. Dauern die Episoden mehr als 7 Tage, wird von persistierendem Vorhofflimmern gesprochen. Deren Beendigung erfolgt mittels elektrischer oder pharmakologischer

Kardioversion bzw. Ablation. Wenn der Sinusrhythmus nicht wiederhergestellt werden kann oder die Persistenz durch Arzt und Patient akzeptiert ist, spricht man von permanentem Vorhofflimmern. Diese Klassifizierung ist nicht unabänderlich, da sich der VHF-Typ im Laufe der Zeit ändern kann und die Einteilung demzufolge neu angepasst werden muss (Lousberg et al., 2004). Für die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF ist ein komplexes, multifaktorielles Geschehen verantwortlich (Nattel, 2002, Wakili et al., 2011a). Als Pathomechanismen werden Veränderungen in der Expression von Ionenkanälen, Störungen der Calciumhomöostase, eine Umverteilung von Gap Junctions, autonome Dysfunktion, eine gesteigerte Automatizität sowie strukturelle Veränderungen des Vorhofs in Form von Entzündung, Fibrose und Dilatation angenommen. Folge ist ein Vorhof-Remodeling, das Ektopie und Reentry begünstigt, die schließlich zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern führen (Iwasaki et al., 2011, Scott et al., 2019) (Abb.6).

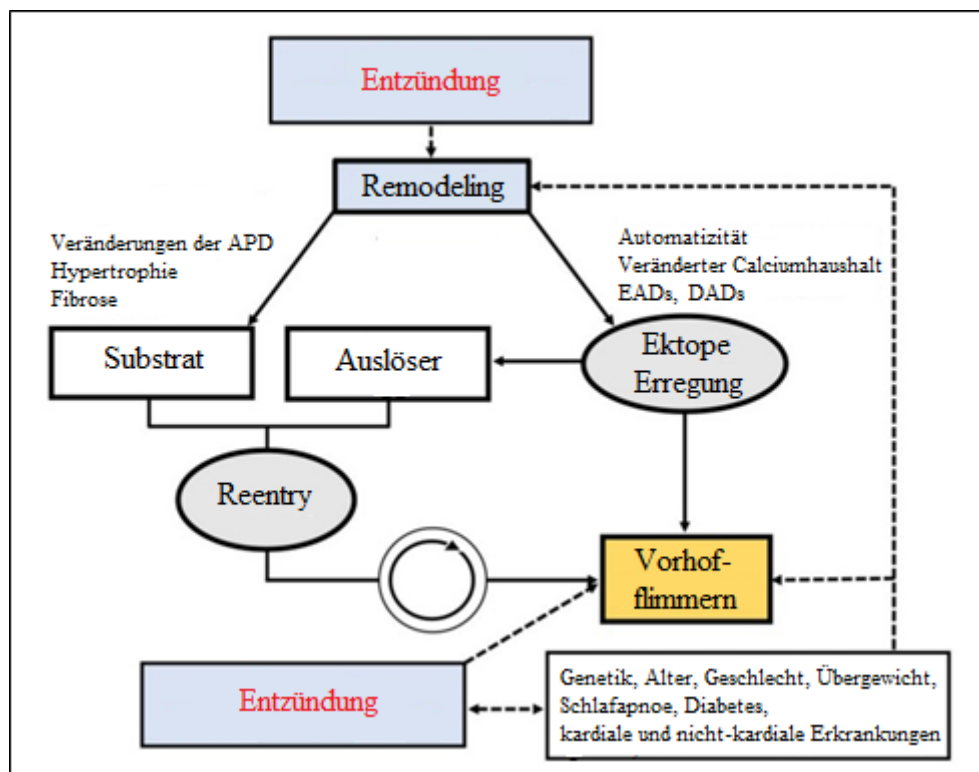


Abb. 6. Grundlegende Mechanismen von VHF. Sog. Remodelingprozesse führen zur Ausbildung eines arrhythmogenen Substrats und zum Auftreten arrhythmogener Trigger, Mechanismen, die funktionell als Ektope und Reentry bezeichnet werden und die fundamentalen Schlüsselmechanismen darstellen. ANS, autonomes Nervensystem; APD, Aktionspotentialdauer; EADs, frühe Nachdepolarisationen; ERP, effektive Refraktärzeit; DADs, verzögerte Nachdepolarisationen), modifiziert nach Scott et. al., 2019.

2.3.1 Ektopie

Physiologischerweise fungiert der Sinusknoten im rechten Atrium als Schrittmacher des Herzens (Murphy and Lazzara, 2016). Allerdings kann prinzipiell jede Zelle bei Überschreitung des Schwellenpotentials einen Impuls abgeben und dadurch zu einer ektopen Erregung führen (Haïssaguerre et al., 1998). Frühe und verzögerte Nachdepolarisationen sowie atriale Automatizität sind die Gründe dieser ektopen Erregungen (Wakili et al., 2011b, Scott et al., 2019). Frühe Nachdepolarisationen treten bei extremer Aktionspotentialverlängerung auf. Dies kann zum Beispiel bei genetischen Ionenkanalerkrankungen wie dem Long-QT-Syndrom der Fall sein (Wakili et al., 2012, Voigt et al., 2012). Hier führt die lange Dauer des Aktionspotentials zu einer möglichen Reaktivierung von Calciumkanälen in der Zellmembran und zum Einstrom von Calcium (Wakili et al., 2012). Durch den Austritt von Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in der Diastole kommt es zu verzögerter Nachpolarisation (Nattel et al., 2008). Während physiologischerweise die Calciumionen im Laufe der Diastole von der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums sowie dem Natrium-Calcium-Austauscher aus der Zelle entfernt werden, kann bei einer atrialen Tachykardie Calcium akkumulieren. Durch die Calcium-Überladung des sarkoplasmatischen Retikulums kann es zu einer Undichtigkeit des Ryanodinrezeptors und damit zu einem unphysiologisch hohem Calciumspiegel in der Zelle kommen (Clauss et al., 2015, Dobrev et al., 2011). Dies führt wiederum zu einem Anstieg des Membranpotentials während der Diastole, zusätzlich unterstützt durch den aktivierten Natrium-Calcium-Austauscher. Wird der Schwellenwert überschritten, kommt es zum ektopen Impuls, zu einer verzögerten Nachdepolarisation (Nattel et al., 2008, Voigt et al., 2012). Zur atrialen Automatizität führt beispielsweise eine gesteigerte Expression bestimmter Natriumkanäle, der sogenannten „funny channels“, die spontane diastolische Depolarisation in Schrittmacherzellen auslösen (Clauss et al., 2015). Beschrieben wurde die Hochregulierung zum Beispiel schon bei der Herzinsuffizienz (Lai et al., 1999). Diese Ektopie-Mechanismen sind an der Entstehung von Vorhofflimmern beteiligt.

2.3.2 Reentrys

Schon früh vertrat man die Hypothese, multiple Wavelets (Wavelets, dt. kleine Wellen) seien die Ursache von VHF. Diese Theorie geht von der Erzeugung mehrerer Wavelets elektrischer Aktivität im rechten und linken Vorhof aus, die in der Lage sind, unregelmäßige Vorhofaktivität zu initiieren und aufrechtzuerhalten (**Abb. 7**). Es wird angenommen, dass eine kritische Anzahl von Wavelets (von 3 bis 6) für die

Aufrechterhaltung von VHF notwendig ist (Costantini and Crema, 2000). In einer weiteren Theorie stehen Reentrys (dt. kreisende Erregungen) im Fokus, die VHF auslösen. Durch schnelle Aktivierung dieser Reentrys wird die regelmäßige und regelrechte Taktgebung des Sinusknotens beeinträchtigt, was zu einem unorganisierten Rhythmus führt (Bhatt and Fischer, 2015, Moe and Abildskov, 1959). Initiiert werden Reentrys durch Trigger-Arrhythmien in den Pulmonalvenen. Es ist bekannt, dass die Kardiomyozyten in den Lungenvenen Herzschrittmacher-ähnliche Aktivität entwickeln, was zu spontaner Depolarisation und/oder Mikro-Reentrys führt (Haïssaguerre et al., 1998). Darüber hinaus beeinflussen veränderte elektrophysiologische und strukturelle Eigenschaften des Vorhofmyokards die Refraktärzeit und die Leitungsgeschwindigkeit, was wiederum zu Arrhythmien führt (Chard and Tabrizchi, 2009).

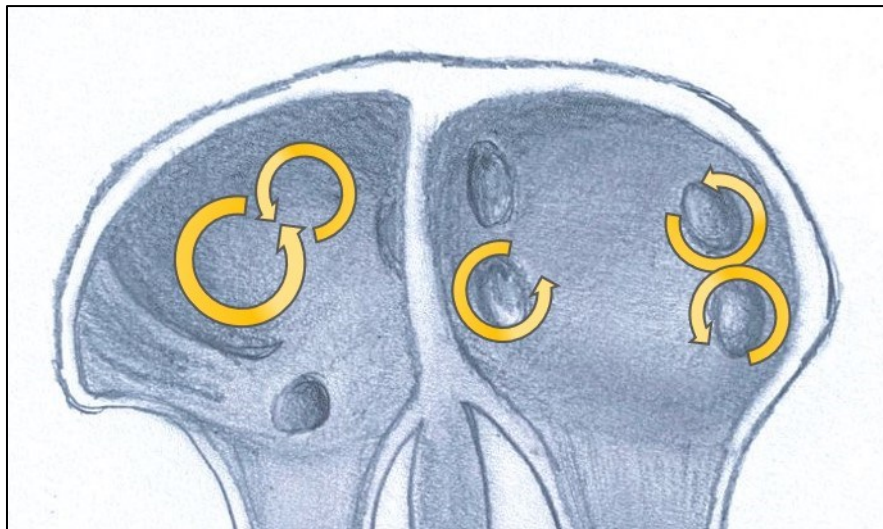


Abb. 7. Multiple Reentry-Kreise, die gleichzeitig und unregelmäßig durch das Vorhofgewebe verlaufen, als Beispiel eines klassischen VHF-Mechanismus, modifiziert nach Nattel and Dobrev, 2017.

2.3.3 Autonomes Remodeling

Die Elektrophysiologie des Herzens wird moduliert durch das autonome Nervensystem. Innerviert wird das Herz sowohl intrinsisch über kardiale Ganglien als auch extrinsisch über Ganglien außerhalb des Herzens und den Nervus vagus (Kawashima, 2005). Das vegetative Nervensystem und insbesondere das adrenerge/cholinerge Gleichgewicht durch sympathische bzw. parasympathische Einflüsse spielen für die Entstehung von Vorhofflimmern eine große Rolle. Adrenerge Stimulation durch Katecholamine kann VHF initiieren und/oder aufrechterhalten (Workman, 2010, Ng et al., 2011). Sowohl

parasympathische als auch sympathische Stimulation wirken durch Verkürzung der Refraktärzeit und erhöhte Heterogenität der Repolarisation nachweislich proarrhythmisch im Vorhof (Liu and Nattel, 1997). Verändert sich die atriale Refraktärzeit wird wiederum das Entstehen von Reentry begünstigt (Costantini and Crema, 2000, Kim et al., 1996). Der posteriore linke Vorhof und die Lungenvenen weisen ein einzigartiges autonomes Profil auf, das zur Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns im normalen Herzen beiträgt (Arora et al., 2007). Fokale „Trigger“ und „Treiber“ in der Pulmonalvene scheinen auch signifikant vom vegetativen Nervensystem modifiziert oder reguliert zu werden (Schauerte et al., 2001). Dass eine Radiofrequenz-Katheterablation der vagalen Innervation stimulations-induziertes, anhaltendes VHF beenden kann, weist zusätzlich auf einen Einfluss der autonomen Nervenaktivität hin (Shen et al., 2011).

2.3.4 Elektrisches Remodeling

Das Aktionspotential des menschlichen Herzens wird, wie oben ausgeführt, vor allem durch spannungsabhängige Ionenkanäle (Natrium-, Kalium-, Calcium- aber auch Chloridkanäle) bestimmt. Im Rahmen der Genese von Vorhofflimmern sind diese deutlich verändert, was Änderungen der elektrischen Leitungseigenschaften bedingt. Diese elektrischen Veränderungen wiederum können VHF selbst verstärken und aufrechterhalten (Allessie et al., 2001, Nattel, 2002, Nattel et al., 2008). Ursächlich sind hier induzierte Änderungen in der Ionenkanal-Expression. Insbesondere Calcium spielt eine grundlegende Rolle sowohl bei der Induktion als auch bei der Aufrechterhaltung von VHF. Dies ist auch daran festzumachen, dass eine Therapie mit Calciumkanalblockern eine Verminderung der Depolarisationsgeschwindigkeit im Sinus- und AV-Knoten bedingt, was eine Verlängerung der atrioventrikulären Überleitung nach sich zieht, und eine Erhöhung der effektiven Refraktärzeit bewirkt mit Unterdrückung von arrhythmogenen Nachpotentialen (Nattel et al., 2008, Voigt et al., 2012, Denham et al., 2018). Bei VHF steigt die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle massiv an, da bei jedem Aktionspotential immer mehr positiv geladenes Calcium in die Zelle strömt. Die Zelle verfügt normalerweise über einen Selbstregulationsmechanismus, der dem gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom entgegenwirkt. Die Expression von L-Typ Calciumkanälen wird reduziert und die der Kaliumkanäle wird hochreguliert (Ravens and Cerbai, 2008). Daraus folgt eine verkürzte Aktionspotentialdauer (APD) und somit ein geringerer Ca^{2+} -Einstrom (Schotten et al., 2011, Iwasaki et al., 2011). Allerdings

begünstigt ein verkürztes Aktionspotenzial die Bildung von Reentry und trägt damit zur Aufrechterhaltung von VHF bei. Durch die Aktivität des Natrium-Calcium-Austauschers wird dem Calcium-Overload der Zelle ebenfalls entgegengewirkt, allerdings strömen für jedes Calciumion, das aus der Zelle transportiert wird, drei Natriumionen in die Zelle, wodurch es zu einer zunehmenden Depolarisation der Zelle kommt. Statt VHF damit zu terminieren, wird es durch diese Mechanismen sogar noch stabilisiert (Wijffels et al., 1995). Zusätzlich führen die Veränderungen in der Calciumhomöostase zur Erhöhung der diastolischen Calciumabgabe und damit zur Steigerung der fokalen Aktivitäten. Das Risiko Vorhofflimmern zu entwickeln nimmt somit weiter zu (Wakili et al., 2011b, Allesie et al., 2001).

2.3.5 Strukturelles Remodeling

Strukturelle Veränderungen finden durch Störungen im komplexen Zusammenspiel zwischen Kardiomyozyten sowie Zellen und Komponenten, die an der Regulation der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt sind, statt. Bei VHF findet man bei Kardiomyozyten eine Zunahme der Zellgröße, Akkumulation von Glykogen, einen zentralen Verlust von Sarkomeren durch Myolyse, Änderung der Mitochondrienform, Fragmentation des sarkoplasmatischen Retikulums, homogene Verteilung des nukleären Chromatins und Änderungen der Quantität und Lokalisation von Strukturproteinen (Ausma et al., 1997). Die ECM besteht hauptsächlich aus verschiedenen Kollagenen. Eine atriale Fibrose, also Bindegewebsvermehrung im Herzmuskelgewebe, folgt aus einem Ungleichgewicht im Kollagenturnover. Es kommt zu einer Akkumulation von Kollagen-Ablagerungen im Interstitium, die zu einer Verbreiterung des Interstitiums führen und die funktionellen Eigenschaften des kontraktile und elektrisierbaren Vorhofgewebes verändern (Burlew and Weber, 2002). Folge des strukturellen Remodelings sind dadurch elektrische Leitungsstörungen, die wiederum das VHF aufrecht erhalten (Ehrlich and Götte, 2011). Die strukturellen Umbauprozesse sind einerseits physiologisch sinnvoll, um nach pathologischen Vorkommnissen wie einem Infarkt adaptiv und reparativ wirken zu können, können aber auf der anderen Seite pathologische Konsequenzen nach sich ziehen. So verringert das fibröse Ersatzgewebe nach ischämischen Insult zwar das Risiko einer Ruptur, wirkt sich andererseits aber negativ auf die elektrische Kopplung der Herzmuskelzellen aus und trägt somit erst zur Arrhythmogenese bei (Saffitz, 2000).

2.3.6 Extrazelluläre Matrix und interstitielle Fibrose

Das gesunde Myokard besteht nicht nur aus Kardiomyozyten, sondern auch zu einem wichtigen Anteil aus extrazellulärer Matrix (ECM). Die ECM ist für die verschiedenen Gewebetypen spezifisch zusammengesetzt und entscheidet über die physikalischen Eigenschaften eines Gewebes. Sie unterstützt den Erhalt der funktionellen Struktur. Im gesunden Herzen sorgt sie für eine stabile Zellarchitektur und ist in der Lage den mechanischen Kräften während eines Kontraktionszyklus durch Kraftübertragung entgegenzuwirken (Walma and Yamada, 2020). Die wichtigsten in der ECM vorkommenden Makromoleküle sind Kollagene, Elastin und Fibrillin, nicht-kollagene Glykoproteine, Glykosaminoglykane und Proteoglykane (Frantz et al., 2010). Im Myokard konnten bislang fünf Kollagentypen identifiziert werden. 90% des Interstitiums machen Kollagen Typ I und III aus, wobei Kollagen I dickere Fibrillen ausbildet und Kollagen III ein retikuläres Netzwerk darstellt (Speiser et al., 1991). Kollagen IV findet man in der Basalmembran von Myozyten und von Endothelzellen der Kapillaren. Fibronectin ist wie Kollagen Typ VI gleichmäßig im Interstitium verteilt und ein weiterer Bestandteil der Basalmembran (Speiser et al., 1992). Bei vielen pathologischen Herzzuständen unterliegen ECM-Komponenten Veränderungen, wodurch die Architektur des Matrixnetzwerks verzerrt wird. Sie modulieren die Proliferation, Migration und Aktivierung von kardialen Myofibroblasten (MyoFB) und spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von zu Herinsuffizienz führenden Herzerkrankungen (Li et al., 2018). Fibrotische Veränderungen im ECM-Raum führen zur Abspaltung und auch zur funktionellen Beeinträchtigung des Myozytenverbands. Sauerstoff- und Substrataustausch werden durch längere Diffusionswege beeinträchtigt, die elektrische Kopplung und in Folge auch die koordinierte Kontraktion werden gestört. Die kardiale Compliance vermindert sich durch eine erhöhte Steifigkeit und die veränderte Zellstruktur (Mackenna et al., 1994). Ischämien können dynamische Veränderungen in der kardialen ECM verursachen, die Entzündung und Reparatur regulieren helfen, aber auch nachteiliges kardiales Remodeling vermitteln. Die zellbiologischen Mediatoren, die ECM-Remodeling vermitteln, und die molekularen Pathomechanismen, die zu Veränderungen in der umgebenden ECM führen, sind noch weitestgehend unbekannt (Frangogiannis, 2019). Man weiß, dass Auf- und Abbau der Komponenten der ECM von Proteinasen und deren Inhibitoren kontrolliert werden. Für den Abbau kommt den Matrixmetalloproteasen (MMPs) die größte Rolle zu. Sie werden unter anderem von Fibroblasten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen produziert (Woessner, 1991). MMPs können jedoch

auch die ECM-Produktion und Fibrose fördern, indem sie die Aktivität von kardialen Fibroblasten regulieren. So setzt zum Beispiel MMP2 den ECM-gebundenen latenten Transforming Growth Faktor beta (TGF- β) frei und induziert dadurch die Kollagensynthese. Dementsprechend führt eine kardiale Überexpression von MMP2 zu einer schweren myokardialen Fibrose (Fan et al., 2012). Reguliert wird Auf- und Abbau von Zytokinen wie TGF- β (Heidinger et al., 2006). TGF- β , eines der wichtigsten Signalmoleküle in der Fibroseentstehung, fördert einerseits die Expression von Kollagen Typ I und III, Fibronectin und Elastin und reduziert andererseits aber auch die Sekretion von MMPs, so dass der Abbau zusätzlich verringert wird (Lijnen and Petrov, 2002, Igotz and Massagué, 1986). Über den TGF- β -Signalweg werden darüberhinaus Myofibroblasten aktiviert und der MAPK8-Signalweg induziert (Umbarkar et al., 2021), ein weiterer profibrotischer Signalweg. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase MAPK8 (auch JNK1), die als Reaktion auf eine Vielzahl pathologischer Ereignisse wie Ischämie/Reperfusion und Myokardinfarkt aktiviert wird, induziert die Bildung myokardialer Fibrose (Petrich et al., 2004). cJUN und MAPK8 spielen ebenfalls bei der Differenzierung von Zellen wie zum Beispiel der Fibroblasten zu Myofibroblasten eine Rolle (Leppä and Bohmann, 1999). Der Connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) wurde gleichfalls als Mediator fibrotischer Reaktionen beschrieben, die durch andere Faktoren, einschließlich TGF- β induziert werden. CCN2 spielt gemeinsam mit TGF- β eine Rolle bei der Aufrechterhaltung profibrotischer Reaktionen (Tejera-Muñoz et al., 2021). CCN2 fördert die Produktion von ECM-Proteinen und aktiviert Myofibroblasten (Lipson et al., 2012). Über die beiden Rezeptor-Tyrosinkinasen ROR1 und ROR2 kann es ebenfalls zur Aktivierung von kardialen Fibroblasten kommen (Chavkin et al., 2021). So setzt ROR2 zum Beispiel nach Bindung seines einzigen bekannten Liganden WNT5A, ein Glykoprotein, das an transmembrane Rezeptoren bindet, unter anderen den bereits erwähnten MAPK8/cJUN-Signalweg in Gang (Edwards et al., 2020). Produziert werden die ECM-Bestandteile in Zellen des Binde- und Stützgewebes, die in die ECM eingebettet sind (Christ, 2018). Hierbei spielt eine bereits erwähnte Untergruppe aktivierter kardialer Fibroblasten, die Myofibroblasten, eine bedeutende Rolle. Sie gelten als wichtige Effektorzellen der Gewebefibrogenese (Fan et al., 2012, Zhao et al., 2018). Die internen Mikrofilamente der Myofibroblasten sind mit extrazellulärem Fibronectin über spezialisierte Adhäsionskomplexe verbunden. Dies ermöglicht den Myofibroblasten, eine kontraktile Kraft auf die sie umgebende ECM auszuüben (Fan et al., 2012). Eine Herzverletzung löst eine Differenzierung der kardialen Fibroblasten in Myofibroblasten aus, die die Fähigkeit haben, ECM-Proteine

zu produzieren. Den Myofibroblasten kommt folglich eine Schlüsselrolle bei der reparativen Fibrose im infarzierten Herzen zu (Calderone et al., 2006).

Charakteristisch für die interstitielle Vorhoffibrose ist eine abnorme Akkumulation der Kollagenfibrillen. Es werden dabei Kollagenfaserbündel mit eingelagerten Fibroblasten, also Zellen, die an der Regulation des Kollagen-Turnovers maßgeblich beteiligt sind, gebildet (Burlew and Weber, 2002). Muskelfasern sind von feinen Kollagensträngen und Septen umgeben, die bei einer interstitiellen Fibrose je nach Umfang lokal, diffus oder generalisiert, verbreitert sein können, was bis hin zur Isolation einzelner Myozyten führen kann. Die Anhäufung von fibrillären Kollagenablagerungen tritt am häufigsten als Reparaturprozess auf, um degenerierendes Myokardparenchym mit begleitender reaktiver Fibrose zu ersetzen, und verursacht eine interstitielle Expansion (Burstein and Nattel, 2008a). Wie bereits erwähnt, verändert die Fibrose die atriale Leitungsgeschwindigkeit und stellt ein irreversibles Substrat für VHF dar (Allessie et al., 2002, Ehrlich and Götte, 2011). Fibrose beeinträchtigt sowohl die Kontraktilität als auch die Relaxation und Füllung des Herzens (Burlew and Weber, 2002). Auf Vorhofebene kommt es zu Zellkopplungsstörungen, die zu Unregelmäßigkeiten der Erregungsleitung innerhalb der Vorhöfe und zwischen den Vorhöfe führen (Fan et al., 2000). Besonders Areale mit fibrotischem Gewebe sind an Reentry-Kreisläufen beteiligt (Li et al., 1999). Zusätzlich erzeugt auch VHF selbst Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der Kardiomyozyten im Vorhof und bewirkt strukturelle Umbauprozesse (Thijssen et al., 2000), wodurch es auch hier zu einem Teufelskreis kommt.

2.4 Tiermodelle des Vorhofflimmerns – Überblick

Zahlreiche Tiermodelle wurden entwickelt, um die Pathophysiologie von VHF näher untersuchen zu können. Tiermodelle sind wichtig, da sie es unter anderem ermöglichen, Gewebe aus verschiedenen Regionen für molekulare und histologische Untersuchungen zu entnehmen. Die Gewinnung von Probengewebe im Menschen ist naturgemäß limitiert und nur während invasiver Eingriffe durchführbar. Zudem hat man in der experimentellen Forschung die Möglichkeit, umfangreiche Untersuchungen und Mappings vorzunehmen, die möglicherweise am Patienten nicht in Summe machbar oder ethisch nicht zu rechtfertigen wären. Klinische Studien können mit den aus Experimenten gewonnenen Erkenntnissen ergänzt werden, um im besten Fall therapeutische Fortschritte zu erzielen (Nishida et al., 2010).

2.4.1 Kleintiermodelle

Mausmodelle klinischer Risikofaktoren von VHF führen im Allgemeinen zu atrialem Remodeling und erhöhter VHF-Induzierbarkeit und sind vor allem wertvoll bei der Identifizierung von grundlegenden Signalwegen (Schüttler et al., 2020). Zur Induktion einer Herzhypertrophie werden am häufigsten die transversale Aortenverengung (TAC), der chronische AV-Block und der AV-Shunt verwendet. Im TAC-Modell wird die Aorta durch eine Ligatur verengt, was zu einer Aortenstenose mit aus der Drucküberlastung resultierenden linksventrikulären Hypertrophie führt (Marionneau et al., 2008). In Folge dessen kommt es zu sekundärem atrialem Remodeling mit Hypertrophie, Dilatation und Fibrose. Kleintier-TAC-Modelle gibt es vom Kaninchen, vom Meerschweinchen, der Ratte und der Maus, wobei nur bei der Maus und auch nicht von allen Forschungsgruppen eine erhöhte Anfälligkeit für Arrhythmien einschließlich VHF beobachtet werden konnte (Clauss et al., 2019). Das Wissen, dass VHF sich selbst erhält (Wijffels et al., 1995), führte zur Entwicklung eines weiteren Modells, das Modell des Tachypacings. Das Kaninchen ist hier der typische Vertreter im Kleintierbereich und kann zur Untersuchung des elektrischen Remodeling verwendet werden (Jia et al., 2013). Ein weiteres VHF-Modell erfolgt über das Erzeugen einer ischämischen Kardiomyopathie. Bei Mäusen und Ratten kann eine ventrikuläre Ischämie durch Unterbindung der linken vorderen absteigenden Koronararterie (LAD) oder durch Kryoverletzung induziert werden, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für atriale und ventrikuläre Arrhythmien führt (Boixel et al., 2003, Gehrman et al., 2001). Durch Erzeugen einer sterilen Inflammation wird ein weiterer Pathomechanismus genutzt, um VHF zu verursachen. Myokarditis ist eine entzündliche Erkrankung, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für Arrhythmien bei Patienten einhergeht. Mehrere Mausmodelle wurden entwickelt, um die zugrunde liegenden Mechanismen der Myokarditis-assoziierten Arrhythmogenese zu untersuchen. Zum Beispiel kann durch Injektion von Myosin 6-Peptid zusammen mit komplettem Freundschem Adjuvans in BALB/c-Mäusen eine Autoimmun-Myokarditis induziert werden (Grabmaier et al., 2016). Einen anderen Pathomechanismus machten sich Chan et al. zu Nutze: Sie fütterten Ratten einmal mit fettreicher und einmal mit fruktose-/cholesterinreicher Diät, um zwei Insulinresistenz-Modelle zu entwickeln. Beide Modelle waren durch Burst-Stimulation anfälliger für VHF (Chan et al., 2019). Neueren Datums sind genetisch veränderte Mausstämme wie das *PITX2*-Knockout-Modell. *PITX2* ist ein Homeobox-Transkriptionsfaktor, der für die physiologische Entwicklung des Herzens eine Rolle spielt. Diese Mäuse sind anfällig für stimulationsinduziertes VHF (Zhang et al., 2019).

2.4.2 Großtiermodelle

Bei den Großtiermodellen wiederholen sich manche Ansätze, die bereits bei den Kleintiermodellen erwähnt wurden. Bei der Ziege wurde 1995 auch erstmals das bereits bei den Kleintieren erwähnte atriale Tachypacing-Modell etabliert (Wijffels et al., 1995). Atriale Tachypacing-Modelle existieren auch im Hund, im Schwein und im Schaf (Takemoto et al., 2017). Beim Hund existiert zusätzlich ein Modell des ventrikulären Tachypacings, was zu einem sekundären atrialen strukturellen Umbau mit erhöhter Expression extrazellulärer Matrixproteine führt (Schüttler et al., 2020). Das bereits beim Kleintier beschriebene Inflammationsmodell gibt es auch bei der Ziege und beim Hund (Clauss et al., 2019). Hierbei wird entweder eine sterile Perikarditis (bei Hund und Ziege) oder eine Periodontitis (beim Hund) hervorgerufen (Yu et al., 2010). Atriale Ischämie Modelle wurden nur bei Hunden etabliert. Der akute atriale Myokardinfarkt induziert Umbauprozesse, die Reentry und VHF begünstigen (Sinno et al., 2003). Daneben gibt es mehrere etablierte ventrikuläre Ischämie-Modelle bei Hund und beim Schwein, bei denen die LAD permanent oder vorübergehend verschlossen wird, was im Langzeitversuch zu einer erhöhten Inzidenz und Dauer von stimulationsinduziertem VHF führt (Schüttler et al., 2020, Clauss et al., 2020). Ein weiterer, noch nicht erwähnter Ansatz ist die Erzeugung eines vaskulären Shunts zwischen der Aorta und dem linken Atrium bei Ziegen. Dadurch kommt es zu einer fortschreitenden Dilatation des linken Vorhofs und einer Erhöhung des LA-Drucks. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der VHF-Dauer nach Burst-Stimulation bis hin zu persistierendem VHF (Remes et al., 2008). Ein weiteres Modell stellt das Modell des chronischen AV-Blocks (CAVB) dar. Es wurde zunächst bei Hunden beschrieben und ist ein weiteres etabliertes Modell zur Induktion einer Herzhypertrophie. CAVB wird durch Injektion von Formaldehyd in den AV-Knoten oder durch Ablation des proximalen His-Bündels induziert, was zu einem akuten Abfall der Herzfrequenz und des Herzzeitvolumens mit anschließender Volumenüberlastung führt (Oros et al., 2008), was aber bislang nur bei der Ziege zu VHF führte.

2.5 Hypothese und Ziele

Die Bildung interstitieller Fibrose ist ein Schlüsselprozess des sog. strukturellen zu Vorhofflimmern führenden Remodelings. Kardiale Fibrose reduziert sowohl die Kontraktilität als auch die Relaxation und Füllung des Herzens (Burlew and Weber, 2002) und führt zu Verzögerungen und Inhomogenitäten der elektrischen Leitung, d.h. zur Bildung eines proarrhythmogenen Substrats und trägt damit wesentlich zur Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF bei (Fan et al., 2000). Das Ziel dieser Arbeit war es, in einem klinik-nahen Schweinmodell für Vorhofflimmern das strukturelle Remodeling auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene zu evaluieren. Da das Ausmaß interstitieller Fibrose in diesem Modell trotz gleichen Versuchsaufbaus, Infarktgrößen und ähnlicher Haltungsbedingungen sehr variabel ausgeprägt war und einige Schweine zudem dunkle Flecken auf der Haut aufwiesen, ergab sich der Verdacht auf einen gemischten genetischen Hintergrund. Wir formulierten daher die Hypothese, dass der genetische Hintergrund einen entscheidenden Faktor des strukturellen Remodelings darstellt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, erfolgte die Genotypisierung der Schweine mit nachfolgender Analyse aller Ergebnisse in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds.

3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

3.1 *In vivo*

3.1.1 Verwendete Tiere und Tierhaltung

Alle Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen ROB-55.2-2532.Vet_02-15-209 genehmigt. Die Versuchstiere der Schweinerasse Deutsche Landrasse (LR) wurden im Alter von drei bis vier Monaten bezogen. Die Tiere entstammten dem Moorversuchsgut des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim (OSH), alternativ vom Institut für Biotechnologie der Nutztiere von Prof. Schnieke in Weihenstephan (Thalhausen (TH), bzw. Ampertshausen-Kreuzberg), sowie aus dem Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München. Die Schweine wurden für die Versuchsdurchführung in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin der LMU in Großhadern untergebracht. Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen entsprechend der Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Die Innenboxen mit 2,59 m² und der Auslauf mit ca. 13 m² stehen für 5 Schweine bis 30 kg KGW bzw. 4 Schweine bis 50 kg KGW oder 3 Schweine bis 70 kg KGW zur Verfügung. Beide Bereiche sind mit automatischen Nippeltränken ausgestattet. Die Außenboxen sind außer zu den täglichen Reinigungszeiten jederzeit, auch nachts, frei zugänglich. Der Fliesenboden der Innenboxen ist mit Stroh ausgelegt. Der Innenbereich ist klimatisiert und wird konstant bei 22-24°C gehalten. Die relative Luftfeuchte beträgt 50-60%. Zum Enrichment zählen Tierbälle in den Ausläufen sowie trockene Nudeln im Stroh des Innenbereichs. Die Tiere erhielten Wasser ad libitum sowie ein pelletiertes Schweinefutter. Zwischendurch wurden Obst oder Gemüse angeboten. Zu Futter und Wasser bestand jederzeit freier Zugang. Die Gruppengröße wurde bei größeren Gruppen gewichtsabhängig angepasst. Sie betrug im Schnitt 2-4 Tiere pro Box. Zur Akklimatisierung der Tiere sowie zur Stressreduktion vor Beginn der Interventionen wurde eine Eingewöhnungsphase von einer Woche bei den Tieren, wo eine ischämische Kardiomyopathie induziert wurde, eingehalten. Die Tiere der Kontrollgruppe hatten mindestens vier Tage Zeit, sich an die Umgebung zu gewöhnen. Die Tiere wurden täglich mindestens einmal in Augenschein

genommen. Präoperativ unterlagen die Tiere einer 12-stündigen Nahrungskarenz. Wasser stand weiterhin frei zur Verfügung.

3.1.2 Übersicht zum Versuchsaufbau

Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip den Versuchsgruppen zugeteilt (Randomisierung), entweder zur Kontrollgruppe oder zur Ischämiegruppe (Ischämie-30-Tage-Reperfusiongruppe; im Folgenden IR30-Gruppe genannt). Insgesamt wurden 40 Schweine untersucht, davon dienten 18 als Kontrollen und 22 als IR30-Tiere. Bei der Kontrollgruppe wurde an Tag 1 der Endversuch, entsprechend dem Zweiteingriff der IR30-Gruppe, durchgeführt. Die Verfolgten in totaler intravenöser Intubationsnarkose (Propofol + Opiate). Die IR30-Gruppe erhielt an Tag 1 den Ersteingriff mit Okklusion der LAD distal des 1. Diagonalastes mittels konventionellem PTCA-Ballon (90 min, Druck 12 atm) zur Erzeugung eines akuten Myokardinfarkts (AMI) mit Ausbildung einer ischämischen Kardiomyopathie über die nächsten 30 Tage nach Ersteingriff. Bei allen Eingriffen erfolgte initial die invasive Bestimmung hämodynamischer Basisparameter mittels Rechtsherzkatheter und Linksherzkatheter sowie die Bestimmung der systolischen Auswurfleistung durch linksventrikuläre Angiographie in zwei Projektionen. Danach erfolgte bei der IR30-Gruppe folgte die Koronarangiographie, mit der erwähnten Induktion des AMI. Nach 90 Minuten wurde die Reperfusion wurde durch erneute koronarangiographische Darstellung kontrolliert, die Narkose ausgeleitet und die Tiere für weitere 30 Tage in die Stallungen zurückgebracht. Bei der Kontrollgruppe erfolgte nach den hämodynamischen Messungen zunächst eine invasive Elektrophysiologische Untersuchung mit Bestimmung der atrialen und atrioventrikulären Leitungseigenschaften sowie die Induktion von Vorhofarrhythmien wie VHF mittels Burststimulation (1200 bpm) im rechten Atrium. Im Anschluss erfolgte die Thorakotomie: Die Tiere wurden hier in tiefer Narkose mittels kardialer Kaliuminjektion euthanasiert und das Herz entnommen. Gewebe wurde für histologische und molekularbiologische Untersuchungen asserviert. Die IR30-Gruppe erhielt nach 30 Tagen den Zweiteingriff, der entsprechend dem Endversuch der Kontrollgruppe mit elektrophysiologischer Untersuchung aufgebaut war. Auch hier wurden die Tiere wie oben beschrieben euthanasiert und das Herz zur Gewebeasservation entnommen.

3.1.3 *In vivo* Material

3.1.3.1 Geräte

300A Servo Ventilator, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
C-Bogen Exposcop 8000 Ziehm GmbH, Nürnberg
Druckabnehmer Statham Transducer, P23 ID Statham Instruments, Inc., Oxnard, California, USA
Elektrokauter VIO® 50 C, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen
HP Codemaster XL Defibrillator, Soma Tech Intl., Bloomfield, CT, USA
MLCL CardioLab System, GE Healthcare, USA
Modul für Multiparameter-Monitor Infinity Hemo4, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck
OP-Sauger KATASPIR PRO, Medutek, Bremen
Perfusor Space, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Pulsoxymeter Ohmeda BIOX 3700e Ohmeda Louisville, CO, USA
RAPIDLab® 1200 Blutgasmessgerät, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
SC 9000XL Patientenmonitor, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
Universal Heart Stimulator UHS 20, Biotronik, Baar, Schweiz

3.1.3.2 Verbrauchsmaterialien

Argyle starres Yankauer Sauginstrument, 34 F, bauchige Spitze mit Vakuumregler, Cardinal Health GmbH, Deutschland
Argyle Verbindungsschlauch mit Trichterkonnectoren, Cardinal Health GmbH, Deutschland
Biopsie- und Einbettkassetten, Histosette® II, M493, Simport Scientific, Bernard-Pilon, Kanada

Blue Sensor® VL-00S EKG-Elektroden, Ambu GmbH, Bad Nauheim
Cryovial sterile 2 ml, Simport Scientific, Bernard-Pilon, Kanada
Ethibond Excel Sutupak 6 x 45 cm Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Flexi-Kit arteriell Einmaldruckwandler, Merit Medical GmbH, Eschborn
Foliodrape® Protect Lochtücher selbstklebend, Paul Hartmann AG, Deutschland
0,014“Führungsdraht Road Runner Extra Support, Cook Denmark Holding ApS, Bjæverskov, Dänemark
Gaze NobagazeR Kompressen, Noba Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter
In-/Deflator Sedat, Irigny, Frankreich
Intersurgical Guedel-Tubus Größe 3, Intersurgical Beatmungsprodukte GmbH, Deutschland
Intrafix Primeline, 150 cm, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Introcan Safety 3 22G, 25 x 0,9 mm, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Judkins-Links-Katheter JL4 Thrulumen, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Judkins-Rechts-Katheter JR4 Thrulumen, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Katheterschleusen 8-F arterial sheath Avanti+, 9-F venous sheath Avanti+, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
LeukoplastR Rollenpflaster, BSN medical GmbH, Hamburg
Leukosilk S Rollenpflaster, 2,5 cm x 9,2 m, BSN medical GmbH, Hamburg
Multipolarer Diagnostikkatheter, BIOTRONIK SE & Co. KG, Berlin
Nessy Omega Elektrode, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen
Perfusorleitung, 1,0 x 2,0 mm, PE, 150 cm, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Perfusorspritze 50 ml, transparent, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG,

Melsungen
6-F Super Torque Plus pigtail diagnostic catheter, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
12/3.0 PTCA-Ballon Quantum™ Maverick® Monorail Ballon Katheter Boston Scientific, Natick, MA, USA
Rüsch Super SafetyClear Endotrachealtubus 6.5-8.0 mm, Wolfram Droh GmbH, Mainz
Spatelektrode, gerade, 2,3 x 19 mm, Länge 45 mm, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen
Spritze steril Luer 20 ml Discardit BD
Spritze steril Luer 10 ml Discardit BD
Spritze steril Luer 5 ml Discardit BD
Sterican Kanülen 0,90 x 40 mm, 20 G x 1 ½“, Gr. 1, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Swan-Ganz Katheter 7-F, Edwards Lifesciences LLC, USA
Vicryl CTX Plus 70 cm Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt

3.1.3.3 Instrumente

Anatomische Pinzette, straight serrated, 14,5 cm, Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Chirurgische Pinzette, 2x3 teeth, 14,5 cm Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Chirurgische Schere, straight, sharp/blunt, 16,5 cm, Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Cushing Nerv- und Gefäßshäkchen, 90° gewinkelt, 19 cm, stumpf, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Irisschere, straight, sharp/sharp, 10,5 cm, Fine Science Tools GmbH, Deutschland

Kelly Klemme, curved, serrated, 14 cm, Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Mathieu Nadelhalter, with lock, 14 cm, Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Micro-Mosquito, curved, serrated, 12 cm, Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Morse Sternumspreizer mit konvexen Halteblättern für totale Sternotomie, Fehling Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Rosenschere P68, Fiskars Germany GmbH
Sektionsmesser für Gehirn, 45 cm, Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Weitlaner Wundspreizer 3x4 Zähne, stumpf, Aesculap Ag, Tuttlingen, Deutschland
Wertheim Schere, gebogen, stumpf/stumpf, 23 cm, Fehling Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland

3.1.3.4 Hilfsmittel

Ambu® Silikon-Beatmungsbeutel, Ambu GmbH, Bad Nauheim
HEINE Standard Laryngoskop-Batteriegriff, HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG, Gilching
Miller VET F.O. LED Laryngoskop-Spatel, Covetrus AT GmbH, Brunn am Gebirge
PORTEX® Intubationsmandrin, Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
Stethoskop Littmann Master Classic II, 3M Deutschland GmbH, Neuss

3.1.3.5 Medikamente und Chemikalien

3.1.3.5.1 Narkotika

Ketaset 100 mg/ml, Injektionslösung, Zoetis Deutschland GmbH
Midazolam Amp. 15 mg / 3 ml, Ratiopharm GmbH
Propofol 2% (20 mg/ml) MCT Fresenius, Emulsion zur Infusion, Fresenius Kabi Deutschland GmbH

Stresnil 40mg/ml, Injektionslösung für Schweine, Elanco Deutschland GmbH

3.1.3.5.2 Analgetika

Fentadon 50 µg/ml, Injektionslösung, Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH

Rimadyl 100 mg, Kautabletten für Hunde, Zoetis Deutschland GmbH

Rimadyl 50 mg/ml Injektionslösung für Rinder, Zoetis Deutschland GmbH

3.1.3.5.3 Infusionslösungen

Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius freeflex, 1000 mlphilipp

Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Braun Ecoflac, 500 ml

Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius Frekaflasche, 50 ml

3.1.3.5.4 Antikoagulans

Heparin-Na Durchstechflasche, 25.000 IE / 5ml, Ratiopharm GmbH

3.1.3.5.5 Antiarrhythmikum

Amiodaron-HCl, Amp. 150 mg/3 ml, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing

3.1.3.5.6 Kontrastmittel

Imeron 350, Iomeprol Bracco Imaging, Konstanz

3.1.3.5.7 Antibiotikum

Hostamox LA 150 mg/ml Inj. Suspension, MSD Tiergesundheit

3.1.3.5.8 Sonstige Medikamente und Chemikalien

Atropinsulfat Amp. 0,5 mg / 1 ml, B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Deutschland
Kaliumchloridlösung 7,45% Amp. 20 ml, B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Magnesiumsulfat 50% Amp. 5 g / 10 ml, Inresa Arzneimittel GmbH, Deutschland
Ultraschallgel Sonosid, Asid Bonz GmbH, Herrenberg

3.1.4 *In vivo* Methoden

3.1.4.1 Narkoseeinleitung

Die Tiere wurden am Tag vor der Operation möglichst stressfrei zur Bestimmung der Körpergewichts-adaptierten Medikamentendosierungen gewogen. Über Nacht hatten die Schweine freien Zugang zu Wasser, wurden ansonsten aber nüchtern gelassen. Am OP-Tag wurden sie einzeln in die Innenbox verbracht, um dort einzuleiten. Zur Einleitung wurde eine Kombinationsnarkose aus Ketamin (20 mg/kg KGW), Azaperon (2 mg/kg KGW) und Atropinsulfat (0,05 mg/kg KGW) in die Nackenmuskulatur bzw. den *Musculus biventer cervicis* verabreicht. Durch die Kombination lässt sich eine ausreichende Muskelrelaxation und Sedierung bei weiterhin erhaltener Spontanatmung erreichen. Durch Verwendung einer Perfusorleitung konnten die Tiere sich auch während der Applikation in der Box frei bewegen und eine Stressreduktion durch fehlende Fixierung gewährleistet werden. Die vollständige Verabreichung wurde durch das Nachspülen von Kochsalzlösung erreicht. Daraufhin wurde die Box wieder verlassen, um den Tieren Zeit und Ruhe für das Ablegen zu lassen. Wenn die Tiere ausreichend sediert waren, wurde ein venöser Zugang in die *Vena auricularis lateralis* gelegt. Hierfür wurde mittels Gazestreifens am Ohrgrund gestaut und die Venenverweilkanüle im Anschluss mit Leukoplast Rollenpflaster fixiert, der Stau entfernt und die Narkose nach Aspiration und Spülen mit NaCl 0,9% mittels Midazolam (0,5 mg/kg KGW) i.v. vertieft.

3.1.4.2 Intubation und Beatmung

Anschließend wurden die Tiere in den OP und dort für die endotracheale Intubation in Bauchlage gebracht. Bei stark vorhandenem Schluckreflex oder Widerstand beim

Einführen des Tubus wurde ein zusätzlicher Bolus Propofol (0,5-1 mg/kg KGW i.v.) verabreicht. Das Maul der Tiere wurde durch eine Assistenz mithilfe zweier Gazetüchern passiv geöffnet und der Kopf insgesamt in die Waagerechte angehoben. Die Zunge wurde seitlich aus dem Maul geführt. Mit dem Laryngoskop wurde die Stimmritze dargestellt. Durch leichten Druck auf die Zunge sowie gegebenenfalls mit Hilfe eines stumpfen, langen Gegenstands (z.B. eines Yankauer Absaugkatheters) wurde die Epiglottis vom weichen Gaumen gelöst, so dass der mandringestützte Tubus (6.0–8.5 mm innerer Durchmesser und 26–28 cm Länge, je nach Körpergewicht des Tieres) unter Sichtkontrolle eingeführt werden konnte. Hiernach wurde der Tubus durch Luftinflation mittels einer 20 ml Spritze geblockt. Durch Auskultation beider Lungenflügel während einer manuellen Beatmung mittels Beatmungsbeutel wurde der korrekte Sitz kontrolliert und im Anschluss der Tubus mit Leukosilk Rollenpflaster am Oberkiefer des Schweines fixiert. Danach wurde für die Neutralelektrode des Kauters der Rücken stellenweise rasiert. Die Schweine wurden in Rückenlage auf den OP-Tisch verbracht und druckkontrolliert beatmet. Eingestellt wurde initial ein Beatmungsdruck von 20-25 mbar, ein PEEP von 5 mbar und eine Atemfrequenz von 16/min., um ein Atemzugvolumen von 8-12 ml/kg KGW zu erreichen. Durch wiederholte Blutgasanalysen im Verlauf der OP wurden die Werte kontrolliert und die Einstellungen der Beatmung gegebenenfalls angepasst. Als Normalwerte der arteriellen Blutgasanalyse galten hierfür: pH: 7,40-7,53; pCO₂: 35-44 mmHg; HCO₃⁻: 22-33 mmol/l; pO₂: 73-92 mmHg; sO₂ > 95 % (Hannon et al., 1990).

3.1.4.3 Aufrechterhaltung und Überwachung der Narkose

Zur Analgesie wurde Fentanyl (0,05-0,1 mg/kg KGW/30 min. i.v.) verabreicht. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch Allgemeinanästhesie mit Propofol (0,5 mg/kg KGW/min i.v.). Die Narkosetiefe wurde durch Testung des Afterklauenreflexes, Überprüfung der Bulbusstellung und des Lidreflex sowie durch Überwachung der Herzfrequenz überprüft. Die Tiere wurden im OP-Feld und im Bereich der Elektroden rasiert und EKG-Elektroden angebracht. Zur besseren Leitfähigkeit bei trockener Haut wurde jeweils eine kleine Menge Ultraschall-Gel unter den Elektroden platziert. Das Überwachungssystem und der Kauter wurden angeschlossen, die Vordergliedmaßen nach hinten ausgebunden, das OP-Feld desinfiziert und die Tiere mit sterilen Tüchern abgedeckt. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe auf die Hornhaut aufgetragen. Der Kreislauf wurde über Pulsoxymetrie,

Thermometrie (Rektalsonde), EKG und invasiver Blutdruckmessung überwacht. Für Puls und Sauerstoffsättigung wurde ein Pulsoxymeter nach vorsichtiger Rasur am Schwanz der Schweine angebracht. Die invasive Blutdruckmessung erfolgte permanent nach Anlage der arteriellen Schleuse mithilfe eines Druckwandlersystems, das auf Höhe des Herzens positioniert war. Der Nullabgleich wurde gegen den atmosphärischen Druck durchgeführt. Danach wurde zunächst sichergestellt, dass das verwendete Infusionssystem komplett luftleer und mit physiologischer Kochsalzlösung befüllt war, um eine mögliche Luftembolie in den arteriellen Blutkreislauf auszuschließen. Zur Aufzeichnung eines 12-Kanal-EKGs wurden zusätzliche Elektroden an allen vier Extremitäten, parasternal rechts auf Höhe des vierten Interkostalraums (Elektrode V1), parasternal links auf Höhe des vierten Interkostalraums (Elektrode V2), zwischen V2 und V4 (Elektrode V3), Schnittpunkt des fünften Interkostalraums und der Medioclavicularlinie links (Elektrode V4), vordere Axillarlinie links auf Höhe des fünften Interkostalraums (Elektrode V5), sowie mittlere Axillarlinie links auf Höhe des fünften Interkostalraums (Elektrode V6) angebracht. Das 12-Kanal-EKG wurde vor und während der EPU aufgezeichnet und im Falle des Ersteingriffs der IR30-Gruppe auch während des Infarkts. Es erfolgte intraoperativ mindestens eine arterielle Blutgasanalyse je nach Werten und Länge der Operation.

3.1.4.4 Schleusenanlage

Alle verwendeten Schleusen und Katheter wurden im Vorfeld mit heparinisierte, physiologischer Kochsalzlösung (5000 IE unfraktioniertes Heparin auf 500 ml NaCl 0.9%) gespült. Nach der ersten Fentanylverabreichung wurde eine Wartezeit von mindestens 5 Minuten eingehalten. Zur Lokalisation der korrekten Schnittstelle wurde der Musculus sternomastoideus palpirt, zusammen mit einer Hautfalte fixiert und mit dem Elektroauter eine ca. fünf cm lange Inzision etwas cranial der Drosselrinne median im Muskelverlauf gemacht. Mit einer gebogenen Klemme wurde das subkutane Gewebe stumpf präpariert, bis der Muskel freigelegt war. Um die *Vena jugularis externa* darzustellen, wurde lateral am Muskel weiterpräpariert, bis die Vene bläulich durchschimmerte. Die Vene wurde von der sie umgebenden Faszie befreit. Nun wurde die Vene weiter distal vom Herzen ligiert und der Faden mit einer Klemme an der Haut fixiert. Im Abstand von ca. 3 cm wurde mit einem weiteren Faden nun proximal zum Herzen eine Schlinge um das Gefäß gelegt, der Knoten aber noch nicht festgezogen, sondern nur unter Spannung gehalten, um eine Blutung bei Gefäßeröffnung zu

verhindern. Zwischen den beiden Fäden wurde die Vene zunächst mittels anatomischer Pinzetten von der Adventitia gesäubert und danach mit einer Irisschere auf ca. drei mm Länge eröffnet. Mithilfe eines Nervhakens wurde die venöse Katheterschleuse (9 F) in die *Vena jugularis externa* eingebracht, während gleichzeitig langsam die Spannung vom Faden genommen wurde. Mittels Führungsdraht wurde die widerstandslose und intravasale Einbringung kontrolliert. Die Einführhilfe sowie der Führungsdraht wurde entfernt und die Schleuse im Anschluss festgeknotet und an der Schleusenhalterung fixiert. Die Schleuse wurde nach Aspiration mit 0,9% NaCl gespült (**Abb. 8**).

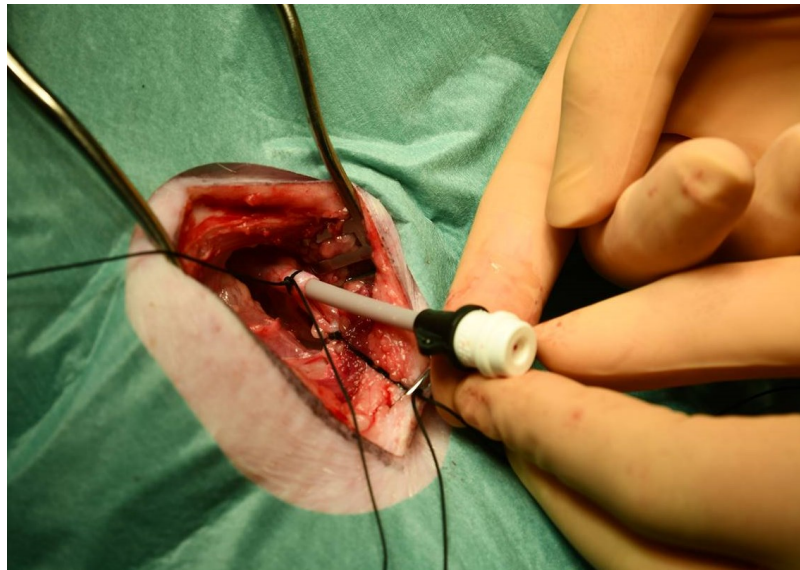


Abb. 8. Schleuse in *Vena jugularis externa dextra* mit entferntem Führungsdraht und Mandrin direkt vor Fixierung; aufgenommen von rostral.

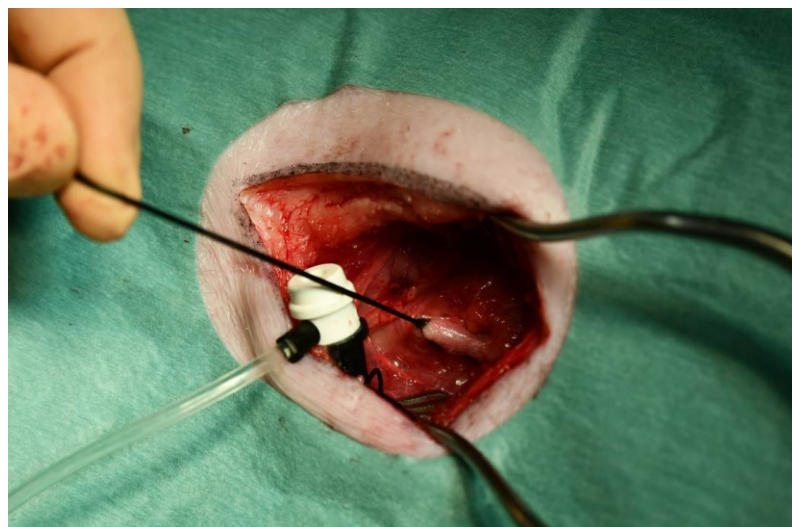


Abb. 9. *Arteria carotis dextra* mit distaler Ligatur vor Fixierung an der Haut; Ansicht von caudo-lateral.

Zur Anlage der arteriellen Schleuse (8 F) wurde nun die Karotisscheide medial des *Musculus sternomastoideus* stumpf seziiert. Um die korrekte Richtung zu bestimmen, wurde der Puls der *Arteria carotis* palpiert und diese unter Schonung der *Vena jugularis interna* und des *Nervus vagus* freipräpariert (**Abb. 9**). Die arterielle Schleuse wurde analog zur venösen Schleuse gelegt und nach Aspiration und Spülung 5.000 IE unfractioniertes Heparin systemisch zur Thrombenprophylaxe verabreicht. Danach wurde eine arterielle Blutprobe zur Blutgasmessung (BGA) entnommen. Die Beatmung wurde gegebenenfalls angepasst und bei Veränderung durch eine weitere BGA nach 20 Minuten überprüft. Außerdem wurde besonders auf den Kaliumwert geachtet. Werte zwischen 3,7 und 5,0 mmol/l wurden als normal bewertet. Bei einem Wert von $< 3,7$ mmol/l wurden zusätzlich 40 mmol/l K^+ über die Infusion gegeben und das Kalium im weiteren Verlauf engmaschig kontrolliert. Dadurch sollte einer Arrhythmie aufgrund einer Elektrolytentgleisung vorgebeugt werden.

Im Zweiteingriff der IR30-Gruppe erfolgte die Schleusenanlage entsprechend der Beschreibung auf der kontralateralen Halsseite.

3.1.4.5 Rechtsherzkatheter

Für die Messungen der Drücke im kleinen Kreislauf wurde ein Swan-Ganz-Katheter über die venöse Schleuse in die Pulmonalarterie eingeschwenkt. Hierfür wurde der Ballon an der Katheterspitze aufgeblasen, so dass der Katheter mit dem Blutfluss in die *Arteria pulmonalis* gespült wurde. Die korrekte Lage wurde durch Röntgenkontrolle sichergestellt. Mit aufgeblasenem Ballon wurde der pulmonalarterielle Verschlussdruck (Wedge-Druck oder PCWP) gemessen, der einer indirekten, linksatrialen Messung entspricht. Bei geöffneter Mitralklappe entsteht eine stehende Flüssigkeitssäule vom linken Vorhof bis zum Druckabnehmer des Katheters in der Pulmonalarterie, wodurch der linksarterielle Druck indirekt gemessen werden kann. Danach wurde der Ballon des Swan-Ganz Katheters wieder abgelassen und der Druck in der Pulmonalarterie (PA) bestimmt. Nun wurde der Katheter unter Überwachung der Druckkurven am Monitor langsam aus der Pulmonalarterie in den rechten Ventrikel (RV) und weiter in den rechten Vorhof (RA) zurückgezogen und dort jeweils die Drücke erfasst.

3.1.4.6 Messung der linksventrikulären Drücke (LVP und LVEDP)

Die linksventrikulären Drücke wurden unter der baseline Herzfrequenz sowie zur standardisierten Vergleichbarkeit bei einer RA Stimulation mit 130 bpm gemessen. Hierfür wurde zunächst ein Stimulationskatheter Sinusknoten-nah im hohen rechten Atrium platziert. Im Anschluss wurde ein Pigtailkatheter an das System der invasiven Blutdruckmessung angeschlossen und über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt. Nach Nullabgleich und Spülen wurden die linksventrikulären Drücke baseline und unter Stimulation über die EPU-Anlage bei 130/min gemessen. Es wurden jeweils der systolische linksventrikuläre Druck (LVP) der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) erfasst. Der Wert des LVEDPs entspricht dabei der Höhe einer kleinen Vorhofkontraktionswelle, die direkt vor dem systolischen Steilanstieg zu sehen ist (Spyridopoulos, 2006).

3.1.4.7 Bestimmung der Ejektionsfraktion

Für die Bestimmung der Ejektionsfraktion (EF) wurde über den linksventrikulär liegenden Pigtailkatheter zügig 20 ml Kontrastmittel mittels Druckspritze appliziert, und mehrere Herzaktionen vor, während und nach KM-Applikation angiografisch aufgezeichnet. Diese Darstellung erfolgte in jeweils zwei Ebenen (30° LAO und eine a.-p. Projektion) sowie bei baseline Herzfrequenz und unter Stimulation mit 130 bpm. . Mithilfe der Bildbearbeitungssoftware Image J wurde planimetrisch die Fläche des linken Ventrikels zum Ende der Systole (ESF) sowie zum Ende der Diastole (EDF) sowie die Länge des Ventrikels zum Ende der Systole (ESL) und der Diastole (EDL) bestimmt und daraus die EF nach folgenden Formeln berechnet:

$$EDV = \frac{8}{3} \times \pi \times \frac{ESF^2}{ESL^2} \times KO^3$$

$$ESV = \frac{8}{3} \times \pi \times \frac{EDF^2}{EDL^2} \times KO^3$$

$$EF = (EDV - ESV) / EDV \times 100$$

3.1.4.8 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Der bereits platzierte Stimulationskatheter wurde hierfür weiter im hohen rechten Atrium belassen. Zunächst wurde ein 12-Kanal-EKG aufgezeichnet. Danach wurde die

intrinsische Zykluslänge bestimmt. Sie entspricht dem RR-Intervall bzw. der Zeit zwischen zwei atrialen Signalen und wird über den Katheter ermittelt. Hierauf wurde die Reizschwelle bestimmt. Dafür stimulierte man ca. 20 bpm oberhalb der Ruheherzfrequenz und reduzierte von Impuls zu Impuls die Stimulationsspannung, bis im EKG keine Depolarisation mehr durch den Stimulationsimpuls ausgelöst wurde. Die Stimulationsreizschwelle entspricht der niedrigsten Impulsstärke, die zuletzt gerade noch eine Depolarisation auslöst. Danach wurden verschiedene Stimulationstest durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden. Diese wurden jeweils unter doppelter Reizschwelle durchgeführt.

3.1.4.9 Sinusknotenerholungszeit (SNRT)

Die SNRT entspricht dem Intervall zwischen der letzten stimulations-induzierten Vorhoferregung und der ersten vom Sinusknoten autonom induzierten Depolarisation. Dafür erfolgte jeweils die Stimulation mit Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms für die Dauer von 30 Sekunden, wonach die Zeit zwischen der letzten stimulationsinduzierten P-Welle und der ersten vom Sinusknoten induzierten Vorhoferregung gemessen wurde. Für jede Reizschwelle wurde zweimal gemessen und der Mittelwert bestimmt.

3.1.4.10 Refraktärzeiten (AERP und AVERP)

Die effektive atriale Refraktärzeit (AERP, engl. Atrial effective refractory period) entspricht dem längsten Intervall zweier Impulse, bei dem der zweite Impuls den Vorhof nicht mehr erregt. Bestimmt wird die effektive Refraktärzeit des AV-Knotens durch die Ankopplung eines vorzeitigen atrialen Extrastimulus an eine atriale, festfrequent stimulierte Sequenz, bestehend aus 7 Basisschlägen bei verschiedenen Basiszykluslängen (500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms). Die AERP ist am Ausbleiben der P-Welle nach dem letzten Stimulus erkennbar. Die effektive Refraktärperiode entspricht demzufolge der Zykluslänge des letzten vorzeitigen Stimulus, der gerade noch eine Erregung auslösen konnte. Für die atrioventrikuläre Refraktärzeit (AVERP) bedeutet es das längste Intervall zweier Impulse, bei dem der zweite Impuls den Ventrikel nicht mehr erreicht. Es wurden die atriale und die atrioventrikuläre effektive Refraktärzeit bestimmt.

3.1.4.11 Bestimmung des Wenckebach-Punkts (WP)

Es wurde zunächst mit einer etwas oberhalb des autonomen Herzschlags liegenden Stimulationsfrequenz stimuliert. Schrittweise erfolgt eine Verkürzung der Stimulationszykluslänge um 10 ms und der Wenckebach-Punkt identifiziert: Als Wenckebach-Punkt wird die Stimulations-Zykluslänge bezeichnet, bei der erstmalig das 1:1-Verhältnis der AV-Überleitung nicht mehr zustande kommt, erkennbar am Wegfallen eines Kammerkomplexes während der Stimulation.

3.1.4.12 Burststimulation

Die Burst-Stimulation ist eine Überstimulation mit rasch aufeinander folgenden Impulsen, deren Intervalle kürzer sind als die der Tachykardie. Hierfür wurde versucht, über den Stimulationskatheter im LA mit 6-sekündigen Stimuli von 1200 bpm Arrhythmien auszulösen. Die Stimulation wurde insgesamt 10x bei zweifacher Reizschwelle und 10x bei vierfacher Reizschwelle wiederholt. Zwischen den Stimulationen wurde 30 Sekunden bis zur nächsten Burst-Stimulation gewartet. Im Falle einer erfolgreichen VHF-Induktion wurde bis maximal 30 Minuten gewartet, ob eine spontane Konversion in den Sinusrhythmus erfolgt. Falls dies nicht der Fall war, wurde das VHF als persistierend erachtet und mithilfe des Defibrillators R-Zackensynchronisiert mit 200 Joule in den Sinusrhythmus kardiovertiert.

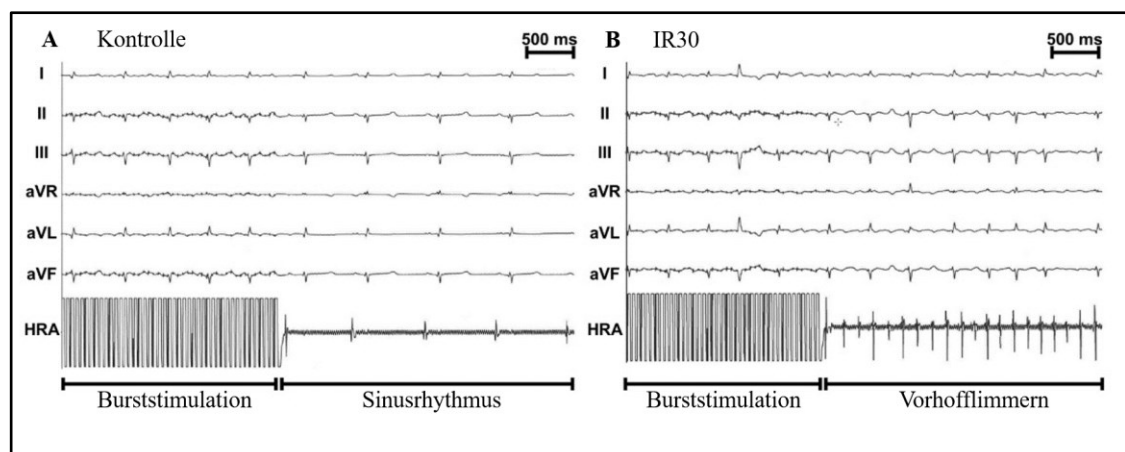


Abb. 10. Repräsentative Aufzeichnungen zweier Burststimulationen. A. Burststimulation gefolgt von einem stabilen Sinusrhythmus bei einem Tier der Kontrollgruppe; B. Burststimulation gefolgt von einem erfolgreich induzierten VHF bei einem Tier der IR30-Gruppe, die Aufzeichnungsgeschwindigkeit beträgt 50 mm/Sek., modifiziert nach Clauss et al. 2020.

3.1.4.13 Koronarangiographie und Infarzierung

Vor dem Setzen des Infarkts wurden Tieren der IR30-Gruppe zur Rhythmusstabilisierung 150 mg Amiodaron hydrochlorid i.v. verabreicht. Es wurde ein Judkins Katheter JL4 über den arteriellen Zugang in das Ostium der linken Koronararterie vorgeschoben. Unter Cine-Bildgebung und Kontrastmittelgabe wurde die linke Koronararterie mit allen Seitenästen angiographisch dargestellt. Das beste Bild der Serie wurde am Monitor des C-Bogens als Standbild gespeichert, um die geeignete Stelle für den Ballon zur Okklusion der LAD zu visualisieren. Über den Judkins Katheter wurde nun ein 0,014“-PTCA-Draht in die linke Koronararterie vorgeschoben und darüber der PTCA-Ballon eingebracht. Nach angiographischer Kontrolle der Positionierung distal des 1. Diagonalastes wurde der 3,0 x 12 mm Ballon mit 12 atm dilatiert und eine 90-minütige Ischämie induziert. Zu Beginn und zur Hälfte der Ischämiephase wurde jeweils mit Kontrastmittel kontrolliert, ob der Verschluss noch korrekt vorhanden war. Nach 90 Minuten wurde der Ballon schließlich wieder entfernt und die Reperfusion nochmal angiographisch kontrolliert.

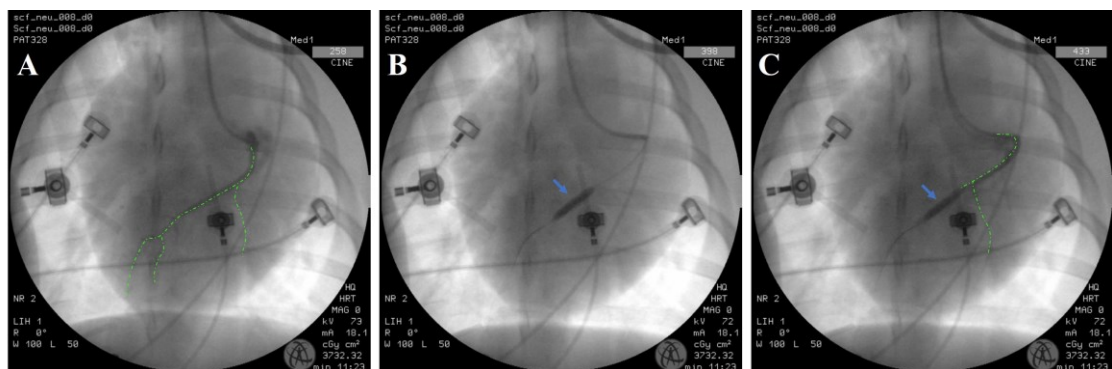


Abb. 11. Koronarangiographie. A. Darstellung der linken Koronararterie: LAD mit erstem Diagonalast grün gestrichelt. B. Okklusion der LAD distal des ersten Diagonalastes; blauer Pfeil zeigt insufflierten Ballon. C. Kontrolle des Perfusionsabbruch; noch vorhandene Perfusion grün gestrichelt dargestellt.

3.1.4.14 Ausleiten und Nachsorge der IR30-Gruppe

Im Anschluss an den Infarkt wurden die Schleusen am Hals entfernt, die Gefäße ligiert und die Muskelschichten schichtweise vernäht. Nach sorgfältiger Blutstillung wurde auch die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Nach erfolgter Hautnaht wurde die Wunde noch einmal desinfiziert, mit Kompressen abgedeckt und ein Pflasterverband mit festem Rollenpflaster angelegt. Währenddessen wurde bereits die Narkose ausgeleitet. Die Tiere erhielten prophylaktisch Amoxicillin als Single-Shot in einer

Dosierung von 15 mg/kg KGW i.m. und zur postoperativen Analgesie Carprofen i.v. in einer Dosierung von 4 mg/kg KGW. Sobald eine stabile Eigenatmung erreicht war, wurden die Tiere extubiert und die Zunge mittels Guedel-Tubus am Zurückrutschen gehindert. Die Tiere wurden hierauf unter fortlaufender Kontrolle der Vitalparameter in den Tierstall zurückgebracht. In einer Aufwachbox wurden die Schweine so lange überwacht, bis sie wieder selbstständig aufstehen konnten. Die Tiere wurden, sobald sie wieder fit waren, zu ihrer Gruppe gelassen. Sie erhielten die ersten beiden post-OP-Tage Carprofen Kautabletten in der Dosierung 4 mg/kg KGW und wurden zunächst täglich tierärztlich kontrolliert. Der Verband wurde entfernt, sobald er begann sich von selbst zu lösen, und die Wunde auf Infektionszeichen überprüft.

3.1.4.15 Herzentnahme im Endversuch

Im Anschluss an die Messungen im Endversuch 30 Tage nach Myokardinfarkt bzw. direkt bei den Schweinen der Kontrollgruppe wurde den Schweinen nochmal ein Bolus von 0,05-0,1 mg/kg KGW Fentanyl und 0,5 mg/kg KGW Midazolam i.v. verabreicht und nach ausreichender Wartezeit eine mediane Thorakotomie vorgenommen. Der Herzbeutel wurde eröffnet und die *Vena cava caudalis* aufgesucht. Diese wurde durchtrennt und die Tiere durch sofortiges Entbluten getötet. Nach der Herzentnahme wurden Gewebeproben aus sechs verschiedenen Regionen (rechter und linker Ventrikel sowie rechter und linker Vorhof) gesammelt und für nachfolgende histologische und molekularbiologische Untersuchungen asserviert. Dafür wurden die Proben in Histosetten gegeben und für ca. 24 Stunden in 4 %-iger Formalinlösung gelagert, bis sie anschließend bis zur Einbettung in 70 % Ethanol aufbewahrt wurden. Für die molekularbiologische Untersuchung wurden die Proben in Kryoröhrchen verbracht und in Flüssigstickstoff versenkt, bis sie im -80°C-Gefrierschrank gelagert wurden.

3.2 Ex vivo

3.2.1 Ex vivo Material

3.2.1.1 Geräte

COP 30 Cooling Plate, Medite GmbH, Deutschland
--

CryoCube F740hi, -80°C-Gefrierschrank, Eppendorf Deutschland GmbH
C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad, München
Digitales Forschungsmikroskop DM6 B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Eismaschine Ziegra, Isernhagen
FX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, München
Gelrunner Power Pac 3000, Bio-Rad, München
Gelviewer GelDoc 2000, Bio-Rad, München
Kühlschrank KT1530, Liebherr-International Deutschland GmbH
Magnetrührer IKAMAG-REO, IKA Labortechnik, Staufen
Mikrotom Microm HM 340E, Microm International GmbH, Deutschland
Milli-Q Lab Water Advantage 10, Merck Chemicals, Deutschland
Mini Rocker-Shaker PMR-30, Grant Instruments (Cambridge) Ltd, UK
MiniSpin plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
NanoDrop™ 2000 Photometer, Thermo Fisher Scientific, München
Paraffin-Streckbad 1052 GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland
pH-Meter pH538, Sigma-Aldrich Corp., USA
Präzisionswaage EWJ, Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Shandon Citadel 1000 Tissue Processor, Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Sterilbank Hera Safe, Heraeus Instruments, Hanau
Thermomixer®, Eppendorf, Hamburg
Tissue-Tek TEC 5 Embedding Console, Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande
Vortexgenie 2, Scientific industries, New York, USA
Waage Pioneer PA114C Ohaus, Pine Brook, USA

Zentrifuge 5430R, Eppendorf, Wesseling-Berzdor
--

3.2.1.2 cDNA und qPCR

10 mM dNTP Mix, PCR grade, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca

iTaq Universal SYBR® Green Supermix, Applied Biosystems, Darmstadt
--

Random Hexamers, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca

RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca
--

SuperScript IV Reverse Transcriptase, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Lithuania

3.2.1.3 Sonstiges

Deckgläschen 24 x 50 x 1,5 mm, Wagner & Munz GmbH, Deutschland
--

Färbekasten ROTILABO, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
--

Färbekammer StainTray, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

Gelkammer Bio-Rad, München

London Pinzette, angled, serrated, 16 cm, Fine Science Tools GmbH, Deutschland
--

Mikrotom Einmalklingen C35, PFM medical AG, Deutschland

Objektträgerhalter ROTILABO, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

Objektträger Super Frost Plus, 75 x 25 mm, Wagner & Munz GmbH, Deutschland
--

Pinsel mit Magnet, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
--

Pinsel Rotmader Gr. 4, Wagner & Munz GmbH, Deutschland
--

Pipetten Eppendorf Research Plus, verschiedene Volumina, Eppendorf Deutschland GmbH

Pipettenspitzen epT.I.P.S., verschiedene Volumina, Eppendorf Deutschland GmbH

Präparatmappen mit Klappdeckel für 24 OT, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
--

Super PAP Pen Liquid Blocker, Science Services, Deutschland

3.2.1.4 Chemikalien

Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Borsäure $\geq 99,8\%$, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Bovine Serum Albumin (A2153), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Chloroform $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
DAPI, Hoechst 33342, Trihydrochloride (H3570), Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D1408), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Emprove® essential 2-Propanol 1L, Merck Millipore, Darmstadt
Ethanol absolut, vergällt, 5 Liter, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Deutschland
Ethanol 96%, vergällt, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Deutschland
Ethanol 70%, vergällt, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium (S3023), Dako North America, Inc., USA
Formaldehyd-Lösung 4% neutralgepuffert, Mikrococ GmbH, Garching
GeneRuler 50 bp DANN Ladder, Thermo Fisher Scientific, Lithuania
Goldner Lösung I, 500 ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Goldner Lösung II, 500 ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Goldner Lösung III, 500 ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Hämatoxylinlösung A nach Weigert, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Hämatoxylinlösung B nach Weigert, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

Normal Goat Serum (S26), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Pertex, Medite GmbH, Deutschland
RNAse-free water 50 ml, Qiagen GmbH, Deutschland
Sodium citrate tribasic dihydrate (C8532), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Sybr [®] Safe DNA gel stain, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Kanada
TRIS Pufferan [®] ≥99,9%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Tri-Sodium citrate dihydrate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Triton-X100 (T8787), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
TRIzol [™] Reagenz, Invitrogen [™] , Thermo Scientific
TWEEN 20(P2287), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Xylol p.A., 2,5 Liter, Glasflasche, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Deutschland

3.2.1.5 Antikörper

Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (ab5694), Abcam, UK
Anti- α -Actinin (Sarkomer) antibody (A7811), Sigma-Aldrich, Germany
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Anti-mouse IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor [®] 488 Conjugate) (4408S), Cell Signalling Technology Europe B.V., Deutschland

3.2.1.6 Zubereitungen

3.2.1.6.1 Natrium-Citrat-Puffer

Sodium Citrat	2,94 g
---------------	--------

Destilliertes Wasser	1 Liter
Tween 20	0,5 ml

3.2.1.6.2 Waschpuffer

1 x PBS	1000 ml
Tween 20	1 ml
BSA	5 g

3.2.1.6.3 Blockierlösung

Waschpuffer (s.o.)	4,5 ml
Normal Goat Serum	0,5 ml

3.2.1.6.4 Gel für Elektrophorese

Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer (1x)	100 ml
Agarose	3 g
Sybr [®] Safe DNA gel stain	10 µl

3.2.1.7 Software

Adobe Photoshop CS3 Extended Version 9.0
Fiji ImageJ-win64, Wayne Rasband and contributors, nat. Institutes of Health, USA
GraphPad Prism Version 9.2.0.322, GraphPad Software Inc. La Jolla, USA
EndNote 20.0.1, Clarivate Analytics Deutschland GmbH
Microsoft Office Suite 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA

3.2.1.8 Oligonukleotidprimer für die RT-qPCR

ACTB forward	TCTGGCACCACACCTTCT
ACTB reverse	TGATCTGGGTCATCTTCTCAC

α -SMA forward	TGAGCTTCGTGTTGCCCA
α -SMA reverse	CAGCACCGCCTGAATAGCCA
CCN2 forward	GTCAGGCCTTGTGAAGCTGA
CCN2 reverse	GCCCCGGTATGTCTTCACACT
cJUN forward	CAAGGCGGAGAGGAAGCGTA
cJUN reverse	GTTCCCTGAGCATGTTGGCG
Collagen1 α 1 forward	ACCTCAAGATGTGCCACTCC
Collagen1 α 1 reverse	CCTGTCTCCATGTTGCAGAA
FN forward	TTCATGTCATCCCGTGGGCA
FN reverse	GACCCGTCAAGGTGGCACTA
FSP1 forward	GGTGTGACGCTGGTATTTGTTTGAA
FSP1 reverse	AGGGAGGAGAAAGCGGATGAAC
MAPK8 forward	ACCTGACAAGCAGTTGGATGA
MAPK8 reverse	CCTGTGCTAAAGGAGAGGGC
MMP2 forward	CTTTGATGGCAAGGACGGGC
MMP2 reverse	TCACACGCACCACTTGTCTCT
ROR1 forward	ACATTTCAAGTGAGCTCGACAAAGA
ROR1 reverse	TGCAATGCAGTTCTGCCGTC
ROR2 forward	CAGCAGGATGGGAATTCTGT
ROR2 reverse	GCTTGTGCTGGTTGATGAGA
TGF β forward	CTGGAAAGCGGCAACCAAAT
TGF β reverse	GCTCTGCCCGAGAGAGCAATA

3.2.2 *Ex vivo* Methoden

3.2.2.1 Masson Goldner Trichrom Färbung

Wie beschrieben wurde nach dem Endversuch das Herz entnommen und Gewebeproben aus sechs Herzregionen (rechter und linker Ventrikel sowie rechter und linker Vorhof) gesammelt und für nachfolgende histologische und molekularbiologische Untersuchungen asserviert. Für die Histologie wurden die Proben in Histosetten platziert, zunächst für ca. 24 Stunden in 4 % Formalinlösung bei Raumtemperatur fixiert und schließlich in 70 % Ethanol ebenfalls bei Raumtemperatur bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Entwässerung der Gewebeproben durch eine aufsteigende Alkoholreihe sowie durch Durchmischung mit Xylol wurde mittels eines Karussell-Gewebe-Einbett-Automaten durchgeführt. Im Anschluss wurden die Paraffinblöcke gegossen und dabei darauf geachtet, dass der Anschnitt durch alle Schichten des Herzens erfolgt. Die Gewebelöcke wurden im Mikrotom eingespannt und 5 µm dick geschnitten. Die Schnitte wurden sodann auf die Wasseroberfläche eines ca. 40 °C warmen Wasserbads verbracht, auf Glasträger gezogen und nach vollständiger Trocknung mit einer Fibrosefärbung nach Masson Goldner Trichrom (MT-Färbung) gefärbt. Hierfür wurden jeweils 12 Objektträger in einen Halter verbracht und die Chemikalien in beschriftete Färbekammern verteilt. Die Entparaffinierung zu Beginn wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

1. Xylol 1	10 Minuten
2. Xylol 2	10 Minuten
3. Ethanol (100 %) 1	5 Minuten
4. Ethanol (100 %) 2	5 Minuten
5. Ethanol (96 %)	5 Minuten
6. Ethanol (70 %)	5 Minuten
7. Destilliertes Wasser	5 Minuten

Die MT-Färbung erfolgte hierauf nach dem folgenden Protokoll:

1. Eisenhämatoxylin	2,5 Minuten
2. Bläuen in Leitungswasser	12 Minuten
3. Goldner I Lösung	9 Minuten
4. Spülen in Essigsäure 1 %	30 Sekunden
5. Goldner II Lösung	3 Minuten
6. Spülen in Essigsäure 1 %	30 Sekunden
7. Goldner III Lösung	3 Minuten
8. Waschen in Essigsäure 1 %	3 Minuten

Die Objektträger wurden für 2,5 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin (Lösung A und B, 1:1 vermischt) getaucht und danach 12 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden daraufhin in Goldner-Lösung I (Ponceau-Säurefuchsin) Minuten inkubiert. Hierauf folgte ein Waschschrift in einprozentiger Essigsäure für 30 Sekunden und die Inkubation in Goldner-Lösung II (Phosphorwolframsäure-Orange G) für drei Minuten. Die Schnitte wurden nochmals in Essigsäure gewaschen und verblieben anschließend für drei Minuten in Goldner-Lösung III (Lichtgrün SF). Auf einem Mini Rocker Shaker erfolgte der letzte Waschschrift in Essigsäure für weitere 3 Minuten. Hierauf wurden die Schnitte in der sogenannten Rückreihe wieder dehydriert:

1. Destilliertes Wasser	10 x tunken
2. Ethanol (70 %)	10 x tunken
3. Ethanol (96 %)	10 x tunken
4. Ethanol (100 %) 2	10 x tunken
5. Ethanol (100 %) 1	10 x tunken

6. Xylol 2	5 Minuten
7. Xylol 1	5 Minuten

Als Letztes wurde mit je einem Tropfen Pertex das Deckgläschen blasenfrei aufgebracht und unter dem Abzug über Nacht trocknen gelassen.

3.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung (IF)

Auch für die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit oben beschriebenen Paraffinblöcken und 5 µm dicken Schnitten gearbeitet. Für die Waschschrte wurde ein Wipp-Schüttler zur Hilfe genommen. Die Entparaffinierung zu Beginn erfolgte nach dem folgenden Schema:

1. Xylol 1	10 Minuten
2. Xylol 2	10 Minuten
3. Ethanol (100 %)	5 Minuten
4. Ethanol (96 %)	5 Minuten
5. Ethanol (70 %)	5 Minuten
6. 1 x PBS 1	5 Minuten
7. 1 x PBS 2	5 Minuten

Zunächst mussten die durch Formalin-Fixierung entstandenen Proteinquervernetzungen (Crosslinking) rückgängig gemacht werden. Hierzu gibt es verschiedene Verfahren. In dieser Arbeit wurde die Variante mittels Citrat-Lösung gewählt. Diese Lösung ist im Stande, das Crosslinking aufzubrechen, wodurch die Antigene und Epitope von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten demaskiert werden. Dadurch wird die Färbungsintensität von Antikörpern erhöht. Hierfür wurden die Schnitte 20 Minuten in auf 95°C erhitzten Natrium-Citrat-Puffer (pH 6,0) inkubiert.

Sodium-Citrat-Puffer 95°C, pH 6,0	20 Minuten
-----------------------------------	------------

In den nächsten 30 Minuten wurden die Schnitte wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Nun wurden die Proben mit Liquid Blocker Pen umschrieben. Zur Permeabilisierung wurde nach zwei Waschschritten Triton X-100 0,5% in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verwendet und darauffolgend nochmal mit 1x PBS gewaschen.

1. Waschpuffer 1	5 Minuten
------------------	-----------

2. Waschpuffer 2	5 Minuten
------------------	-----------

3. Triton X-100 in PBS	20 Minuten
------------------------	------------

4. 1 x PBS 1	5 Minuten
--------------	-----------

5. 1 x PBS 2	5 Minuten
--------------	-----------

6. 1 x PBS 3	5 Minuten
--------------	-----------

Um unspezifische Bindungen auf ein Minimum zu reduzieren, wurde mit Normal Goat Serum geblockt, da die sekundären Antikörper von der Ziege stammten.

1. Blockierlösung	80 Minuten
-------------------	------------

2. α -SMA Antikörper (1:500 in Blockierlösung) and α -Aktinin Antikörper (1:200 in Blockierlösung)	über Nacht
--	------------

3. Waschpuffer 1	5 Minuten
------------------	-----------

4. Waschpuffer 2	5 Minuten
------------------	-----------

5. Waschpuffer 3	5 Minuten
------------------	-----------

6. Goat anti-rabbit 2 nd Antikörper und Goat anti-Mouse Alex Fluor 488 2 nd Antikörper (1:100 in	1 Stunde
--	----------

Waschpuffer)

7. DAPI (1:1000 in 1 x PBS)	10 Minuten
8. Waschpuffer	5 Minuten
9. Waschpuffer	5 Minuten
10. Waschpuffer	5 Minuten

Die Schnitte wurden mit Blockierlösung komplett bedeckt und für 80 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Der Gewebebereich wurde bei Bedarf danach nochmal mit dem Liquid Pen umfahren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem primären α -SMA-Antikörper (1:500 verdünnt in Blockierlösung) oder dem primären α -Aktinin-Antikörper (1:200 in Blockierlösung) bei 4°C gekühlt über Nacht in der Feuchtigkeitsfärbekammer. Je nach Größe des Gewebes wurden hierfür 100-200 μ l Antikörperlösung in den Liquid Pen Ring pipettiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und überschüssige Flüssigkeit durch Aufsetzen auf ein saugstarkes Tuch entfernt. Nun wurden die sekundären Antikörper Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 647 und Goat anti-Mouse Alexa Fluor 488 (jeweils 1:100 verdünnt mit Waschpuffer) auf die Objektträger pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Hierzu wurde eine lichtundurchlässige Färbekammer verwendet. Von nun an wurde lichtgeschützt gearbeitet, um die Intensität der Fluoreszenz nicht durch Lichteinfall zu reduzieren. Es folgte eine Zellkernfärbung mittels DAPI (1:1000 verdünnt in 1x PBS). Danach wurde wieder drei Mal gewaschen und die Objektträger mit einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium und einem Menzel-Deckgläschen versiegelt. Bis zur Mikroskopie fand die Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C im Kühlschrank statt.

3.2.2.3 Mikroskopie

Nach der MT-Färbung bzw. der Immunfluoreszenzfärbung wurde zunächst am Leica DM6 B Mikroskop eine Übersichtsaufnahme in einer 5-fachen Vergrößerung bei den MT-Schnitten und in einer 10-fachen Vergrößerung bei den IF-Schnitten gemacht. Hierauf erfolgt bei beiden Färbungen jeweils die Gewinnung von repräsentativen Gesichtsfeldern in der 40-fachen Vergrößerung sowie deren digitalen Speicherung. Es

wurden jeweils 10 Aufnahmen pro Region und Tier bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Brightfield-Bilder der MT-Färbung wurden mittels Adobe Photoshop CS3 Extended verblindet ausgewertet. Hierfür wurden Fibroseareale für den Messvorgang markiert. Die Fibrose wurde als relativer Anteil an der Gesamtpixelzahl pro Bild gemessen und in Prozent angegeben. Große Lumina oder gegebenenfalls Risse wurden von der Gesamtpixelzahl abgezogen und Gefäßen und perivaskuläres Gewebe nicht mit bewertet. Die Werte wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Auswertung der IF-Bilder erfolgte mit Hilfe von Fiji ImageJ-win64 Software. Hierbei wurden zunächst alle DAPI-gefärbten Kardiomyozytenzellkerne gezählt und anschließend die α -SMA-positiven Zellkerne. Die Werte wurden wiederum in eine Excel-Tabelle eingefügt und in Verhältnis gesetzt bzw. der prozentuale Anteil der α -SMA-positiven Zellkerne und die jeweiligen Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet.

3.2.2.4 Genexpressionsanalyse

3.2.2.4.1 RNA-Isolation

Nach Entnahme der Herzen wurde Gewebe aus den Vorhöfen und Ventrikeln in Cryotubes verbracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die RNA-Isolation wurde das gefrorene Gewebe in einen festen Umschlag aus Alufolie gebettet, der von allen Seiten geschlossen war. Zwischen wiederholtem Eintauchen in flüssigen Stickstoff erfolgte die Zerkleinerung des Gewebes mit einem Hammer. Ein 50-100 mg großes Stück wurde entnommen, dieses weiter zerkleinert und im Anschluss in ein Reaktionsgefäß mit einem Milliliter Trizol gegeben und geschwenkt. Bei Raumtemperatur wurde nun für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt und geschüttelt bis sich eine rosa-trübe, homogene Flüssigkeit zeigte. Diese wurde für weitere drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße für 15 Minuten bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der RNA wurde daraufhin in ein neues Gefäß pipettiert und mit 0,5 ml Isopropanol gemischt. Nach weiteren zehn Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut für 10 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand hiervon wurde abpipettiert und das Pellet in einen ml 75 %-igen Ethanol vorsichtig resuspendiert. Dieses wurde erneut für 5 Minuten bei 7.500 x g und 4 °C

zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das RNA-Pellet für fünf bis zehn Minuten an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet mit 100 μ l RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei 55 °C für ca. 15 Minuten inkubiert. Die Menge der isolierten RNA wurde durch Messung des Verhältnisses der optischen Dichte 260/280 nm mittels NanoDrop™ bestimmt. Ein Extinktionsverhältnis von > 1,6 galt dabei als ausreichende Qualität. Die isolierte RNA wurde dann auf 50 ng/ μ l verdünnt und bei -80°C gelagert.

3.2.2.4.2 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Zur Synthese der cDNA aus der zuvor gewonnenen RNA wurde das SuperScript IV Reverse Transcriptase® Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Für ein Gesamtvolumen von 20 μ l/Probe wurde folgender Ansatz pipettiert:

50 μ M Random Hexamers	1 μ l
10 mM dNTP Mix	1 μ l
DNase-freies Wasser	1 μ l
RNA Template (50 ng/ μ l)	10 μ l

Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde vermischt und im Anschluss kurz zentrifugiert. Im Cycler wurde daraufhin bei 65°C für 5 Minuten inkubiert und die Proben danach für mindestens 1 Minute auf Eis gelegt.

In einem neuen Reaktionsgefäß wurden für einen Ansatz folgende Komponenten vermischt:

5 x SSIV Puffer	4 μ l
100 mM DTT	1 μ l
Ribonuclease Inhibitor	1 μ l

SuperScript™ IV Reverse Transcriptase 1 µl

Das Gefäß wurde gevortext und der Inhalt nochmal kurz zentrifugiert. Diese 7 Mikroliter wurden nun zur RNA hinzugegeben. Die Mischung wurde daraufhin im Cycler nochmal für 10 Minuten bei 23°C, danach für 10 Minuten bei 55°C und zur Inaktivierung für 10 Minuten bei 80°C inkubiert. Die nun generierte cDNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.2.4.3 Primertest

Die Primerpaare wurden mit Hilfe zweier Onlinetools designt, dem Primer3Plus von Bioinformatics (Untergasser et al., 2007) und Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Zur Testung wurde zunächst eine Temperaturgradienten-PCR mit SYBRGreen® durchgeführt. SYBRGreen® ist ein Cyanidfarbstoff und bindet an doppelsträngige DNA. Der Komplex aus Farbstoff und DNA wirft sodann grünes Licht (Wellenlänge 521 nm) ab. Nach jedem Zyklus der PCR wird die Emission des grünen Lichts direkt proportional zur synthetisierten Menge der DNA gesteigert und gemessen. Der Mastermix von Bio-Rad beinhaltet außerdem eine Taq-Polymerase mit 5'→3'-Polymeraseaktivität, alle erforderlichen Puffer, Stabilisatoren und qPCR geeignete dNTPs. Für jedes Primerpaar wurde folgender Mastermix vorbereitet:

	1x	10x
iTaq Universal SYBRGreen® Supermix	5µl	50µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	1µl	10µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	1µl	10µl
RNAse-free Water	2µl	20µl
cDNA Template (50 ng/µl)	1µl/Well	
Gesamt	10µl	

Die Komponenten wurden zunächst auf Eis langsam aufgetaut und schließlich

zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls auf Eis. Der Mastermix eines Primerpaares wurde mit einer ausreichend vorhandenen Test-cDNA mit einer No-Template-Kontrolle jeweils in eine Spalte der 96-Well Platte pipettiert, so dass auf einer Platte immer 12 Primerpaare getestet werden konnten. Die Platte wurde mit Folie versiegelt und nochmal kurz zentrifugiert. Nach folgendem Protokoll wurden die Proben am Thermocycler von Bio-Rad bearbeitet:

1 Polymerasenaktivierung	95 ° C	2 Min.	} 40 Zyklen
2 DNA-Denaturierung	95 ° C	15 Sek.	
3 Gradient 55° C/65° C		1 Min.	
4 Schmelzkurvenanalyse	65 ° C-95 ° C		

(Temperaturerhöhung um 0,5 °C für fünf Sekunden pro Schritt)

Bevor die Folie entfernt wurde, wurde die Platte nochmal zentrifugiert. Die Proben wurden mit jeweils 2 µl 6x Loading Dye vermischt, danach zusammen mit einer PCR-DNA-Ladder auf ein Agarosegel aufgetragen und bei 120 V für 60 Minuten aufgetrennt.

	1x
Ladder 50 bp	2 µl
6x Loading Dye	3 µl
DNase-freies Wasser	1 µl

Das Gel wurde im Anschluss unter UV-Licht fotografiert und die Bandenhöhe mit der zu erwartenden Amplikonlänge des Primerpaares verglichen. Es wurde kontrolliert, dass nur eine Bande auf der richtigen Höhe sichtbar war. Zusätzlich wurde anhand der Schmelzkurven für jedes Primerpaar die optimale (opt.) Annealing Temperatur ausgewählt. Als nächstes erfolgte eine Standardverdünnungsreihe jeder aus den Regionen stammenden cDNAs:

Standard 1	25 ng/ μ l
Standard 2	12,5 ng/ μ l
Standard 3	6,25 ng/ μ l
Standard 4	3,12 ng/ μ l
Standard 5	1,56 ng/ μ l
Standard 6	0,78 ng/ μ l
Standard 7	0,39 ng/ μ l

Anschließend wurde die qPCR in einer 96-Well Platte nach folgendem Ansatz in Triplikaten pipettiert:

	1x	10x
iTaq Universal SYBRGreen® Supermix	5 μ l	50 μ l
Vorwärtsprimer (10 μ M)	1 μ l	10 μ l
Rückwärtsprimer (10 μ M)	1 μ l	10 μ l
RNAse-free Water	2 μ l	20 μ l
cDNA	1 μ l	
Gesamt	10 μ l	

Die Platte wurde danach mit Folie versiegelt und abzentrifugiert, um im Thermocycler danach folgendes Programm zu durchlaufen:

1 Polymeraseaktivierung	95 ° C	2 min.	} 35 Zyklen
2 DNA-Denaturierung	95 ° C	15 sec.	
3 Annealing/Extension/Plate Read	Opt. Temp.	60 sec.	
4 Schmelzkurvenanalyse	65 ° C-95 ° C		

(Temperaturerhöhung um 0,5 °C für fünf Sekunden pro Schritt)

Die Annealing Temperatur wurde nach dem Ergebnis des Temperaturgradienten gewählt und nur Primerpaare mit gleichem Optimum auf eine Platte pipettiert. Bei einer optimalen qPCR-Reaktion weist die Schmelzkurve nur einen Peak auf. So ließen sich spezifische PCR-Produkte von anderen Produkten wie zum Beispiel Primer-Dimeren unterscheiden. Denn für gewöhnlich weisen Primer-Dimere einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als das gewollte PCR-Produkts, wohingegen für unspezifische Amplifikationen die Schmelzpunkte unter- oder oberhalb liegen können. Eine positive Analyse der Schmelzkurve zusammen mit einer Effizienz von 90-115%, einem Bestimmtheitsmaß von >90% und einem passenden Fragment in der Elektrophorese wurde in dieser Arbeit als hinreichender Beweis für die Funktion eines Primerpaares gewertet.

3.2.2.4.4 Realtime-qPCR

Die quantitative Realtime-PCR der Zielgene erfolgte auch hier mittels SYBRGreen® von Bio-Rad. Unter sterilen Bedingungen wurde folgender Ansatz für eine qPCR in Triplikaten in eine 96-Well- Platte pipettiert:

	1x	100x
iTaq Universal SYBRGreen® Supermix	5µl	500µl
Vorwärtsprimer (10 µm)	1µl	100µl
Rückwärtsprimer (10 µm)	1µl	100µl
RNase-free Water	2µl	200µl
cDNA Template (20 ng/µl)	1µl/Well	100µl
Gesamt	10µl	

Im Anschluss wurde die Platte mit Folie versiegelt und zentrifugiert. Die qPCR erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

1 Polymeraseaktivierung	95 ° C	2 min.	} 35 Zyklen
2 DNA-Denaturierung	95 ° C	15 sec.	
3 Annealing/Extension/Plate Read	Opt. Temp.	60 sec.	
4 Schmelzkurvenanalyse	65 ° C-95 ° C		

(Temperaturerhöhung um 0,5 °C für fünf Sekunden pro Schritt)

Die Ergebnisse der No-Template-Kontrollen waren sowohl für die Proben als auch für das Housekeeping-Gen negativ. Der Baseline Threshold wurde zum Schluss bei allen Platten angepasst und auf 175 festgelegt.

Als Auswertung wurde die relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet (Livak and Schmittgen, 2001). Die Expression der Zielgene wird bei dieser Methode mit der Expression eines nicht regulierten Housekeeping-Gens normalisiert (Rasmussen, 2001). Die Genexpression des Zielgens wird also auf ein weiteres, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen, das sogenannte Housekeeping-Gen bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der Zielgene auf die von Beta-Aktin (ACTB) bezogen, das für eines der 6 Aktinformen codiert, und ein etabliertes Housekeeping-Gen darstellt (Nygard et al., 2007). Zuerst wurde für jede Probe der Ct-Wert von ACTB vom Ct-Wert des Zielgens abgezogen ($\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ ACTB}$). Danach wurde der ΔCt -Wert aus der Kontrollgruppe vom ΔCt -Wert aus der Versuchsgruppe (IR30) subtrahiert ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ IR30} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$). Der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zwischen der Infarktgruppe und der Kontrolle, normalisiert zum Housekeeping-Gen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Da unter optimierten Bedingungen keine Verdoppelung der Kopien pro qPCR-Zyklus stattfindet, sondern die Effizienz in der Realität zwischen 1,7 und 1,9 liegt, muss eine Modifikation entsprechend der relativen Expression durchgeführt werden, wobei die Relative Expression = $(E^{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct \text{ Zielgen (Kontrolle - IR30)}}$ ist.

Der Cq Standard Deviation-Wert der Triplikate sollte $\leq 0,5$ sein. Expressionsunterschiede wurden relativ zum Mittelwert der Kontrollproben angegeben.

3.2.2.5 Statistik

Für die grafische Präsentation der Daten wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) verwendet. Die Standardabweichung der Stichprobe wird hierfür durch die Wurzel der Stichprobengröße n geteilt. Berechnet wurde mit Hilfe von Microsoft Excel und GraphPad Prism Version 9.2.0.322. Zum Vergleich zweier unpaarer Gruppen wurde ein Mann-Whitney durchgeführt. Für den Vergleich zweier kategorialer Variablen wurde ein Chi-Square Test verwendet. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen (* $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$).

3.2.2.6 Rassebestimmung

Nachdem bei der Analyse der Untersuchungsergebnisse aufgefallen war, dass einige Tiere trotz signifikanter ICM keine vermehrte Fibrose im Vorhof entwickelten, wurde vermutet, dass ein genetischer Einfluss auf das strukturelle Remodeling vorliegen könnte. Zudem waren bei einigen Tieren vereinzelt dunkle Flecken auf der Haut aufgefallen und Tiere aus zwei unterschiedlichen Haltungen bezogen. Ein gemischter genetischer Hintergrund mit Anteilen von Pietrain lag daher nahe. Zur Genotypisierung wurden -80°C -Gewebeproben aller Tiere in einem Kooperationsprojekt an PD Dr. Ivica Medugorac (Tierärztliche Fakultät der LMU, Arbeitsgruppe Populationsgenomik) gegeben. Die Genotypisierung erfolgte durch Bestimmung von >60.000 single nucleotide polymorphisms (SNP) mittels des Porcine SNP60 Genotyping BeadChips (Illumina). Die Ergebnisse wurden mit bereits vorhandenen SNP-Datensätzen von Schweinen der Deutschen Landrasse, von Pietrain, von Duroc und von Deutschen Edelschweinen mittels kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsstudien (cLDLA) ausgewertet und somit der genetische Hintergrund der verwendeten Tiere bestimmt. cLDLA beruhen auf informativen Rekombinationen innerhalb der genotypisierten Stammbäume und zusätzlich auf Informationen aus historischen Rekombinationen in den weiter zurückliegenden Generationen (Meuwissen et al., 2002). Die Kartierungsgenauigkeit wird erhöht, da auch unverwandte Individuen eingebunden werden können und falsch positive Ergebnisse durch den Einbezug von Kopplungs-Informationen vermieden (Farnir et al., 2002, Pérez-Enciso, 2003).

4 ERGEBNISSE

4.1 *In vivo* Ergebnisse

4.1.1 Hämodynamik

Zur Beurteilung der Hämodynamik sowie der Herzfunktion bzw. zur Bestätigung einer bei IR30 entstandenen Herzinsuffizienz erfolgten Rechts- und Linksherzkatheteruntersuchungen. Gemessen wurde jeweils in Ruhe (baseline; BL) sowie bei Schrittmacherstimulation mit 130/min. (beats per minute; bpm), um eine bessere Vergleichbarkeit unabhängig von der intrinsischen Herzfrequenz zu erreichen. Der linksventrikuläre systolische Druck zeigte hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der IR30-Gruppe (**LVP BL** Kontrolle: $110,10 \pm 6,46$ mmHg versus IR30: $117,12 \pm 3,13$ mmHg, $p=0,6620$; **LVP 130** Kontrolle: $117,99 \pm 7,02$ mmHg versus IR30: $122,83 \pm 4,16$ mmHg, $p=0,8154$; **Abb. 12**). Dagegen zeigte der linksventrikuläre enddiastolische Druck als Maß der Vordehnung der Ventrikel zur Aufrechterhaltung des Schlagvolumens eine signifikante Zunahme in der IR30-Gruppe in Ruhe, bei Stimulation mit 130/min. allerdings nur eine Tendenz (**LVEDP BL** Kontrolle: $11,46 \pm 1,07$ mmHg versus IR30: $14,49 \pm 1,20$ mmHg, $*p=0,0345$; **LVEDP 130** Kontrolle: $14,11 \pm 1,31$ mmHg versus IR30: $17,22 \pm 1,36$ mmHg, $p=0,0643$; **Abb. 12**).

Bei der Rechtsherzkatheteruntersuchung wurden die Drücke des rechten Vorhofs (RAP), der rechten Kammer (RVP), der Pulmonalarterie (PAP) und der Lungenkapillaren-Verschlußdruck (PCWP) als indirekter Parameter für den linksatrialen Druck gemessen. Der RAP zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der IR30-Gruppe (**RAP** Kontrolle: $13,40 \pm 0,79$ mmHg versus IR30: $14,06 \pm 2,08$ mmHg, $p=0,4828$; **Abb. 12**). Auch beim RVP ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (**RVP** Kontrolle: $31,23 \pm 2,34$ mmHg versus IR30: $28,77 \pm 3,06$ mmHg, $p=0,8570$; **Abb. 12**). Ebenso zeigte sich beim Pulmonalarteriendruck keine Signifikanz (**PAP** Kontrolle: $28,42 \pm 1,52$ mmHg versus IR30: $28,54 \pm 2,91$ mmHg, $p=0,9135$). Selbiges gilt auch für den Lungenkapillaren-Verschlußdruck (**PCWP** Kontrolle: $16,40 \pm 1,33$ mmHg versus IR30: $2,66 \pm 2,91$ mmHg, $p=0,1489$; **Abb. 12**).

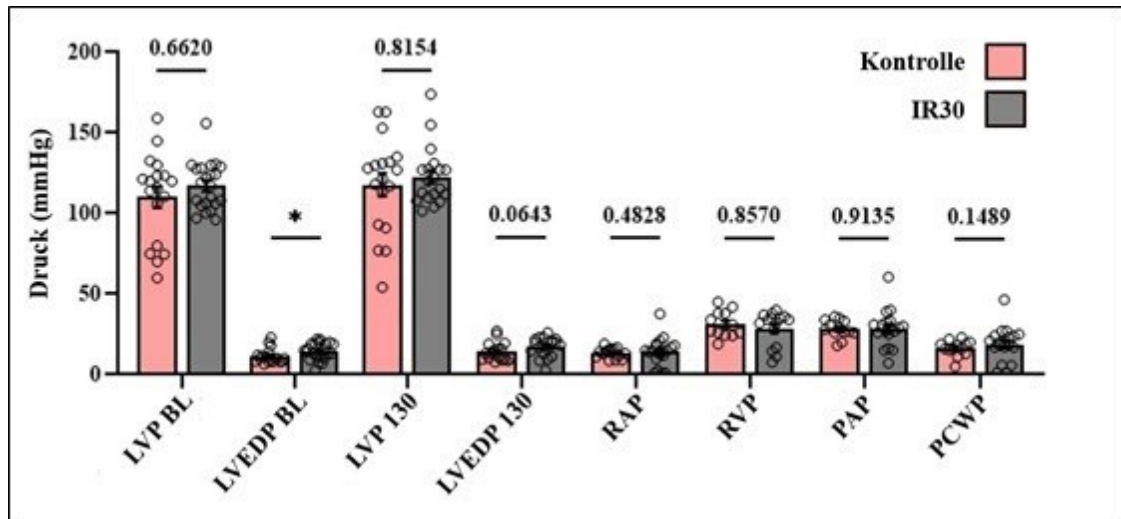


Abb. 12. Hämodynamik. Messungen im linken und rechten Herzen, Kontrollgruppe versus IR30-Gruppe, LVP=linksventrikulärer Druck, LVEDP=linksventrikulärer enddiastolischer Druck, RAP=rechtsatrialer Druck; RVP=rechtsventrikulärer Druck, PAP=pulmonalarterieller Druck; PCWP=Lungenkapillaren-Verschlussdruck, BL=baseline, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Die Pumpleistung bzw. die Ejektionsfraktion (EF) des Herzens wurde als Maß der Herzinsuffizienz mit Hilfe der Lävokardiographie in 2 Ebenen (AP 0° und RAO 30°) ermittelt. Es konnte eine signifikante Abnahme der Ejektionsfraktion der IR30-Gruppe gegenüber der Kontrolle sowohl in Ruhe als auch bei Stimulation mit 130/min. in beiden Projektionen festgestellt werden, womit eine signifikante Herzinsuffizienz bestätigt werden konnte (**EF AP 0° BL** Kontrolle: 60,85±0,90 % versus IR30: 32,08±3,23 %, *** $p=0,0007$; **EF AP 0° 130** Kontrolle: 58,99±1,05 % versus IR30: 27,31±3,63 %, *** $p=0,0007$, **Abb 13-A**; **EF RAO 30° BL** Kontrolle: 59,22±3,49 % versus IR30: 37,20±1,79 %, *** $p=0,0007$; **EF RAO 30° 130** Kontrolle: 62,05±2,15 % versus IR30: 33,64±3,27 %, **** $p < 0,0001$, **Abb. 13-B**).

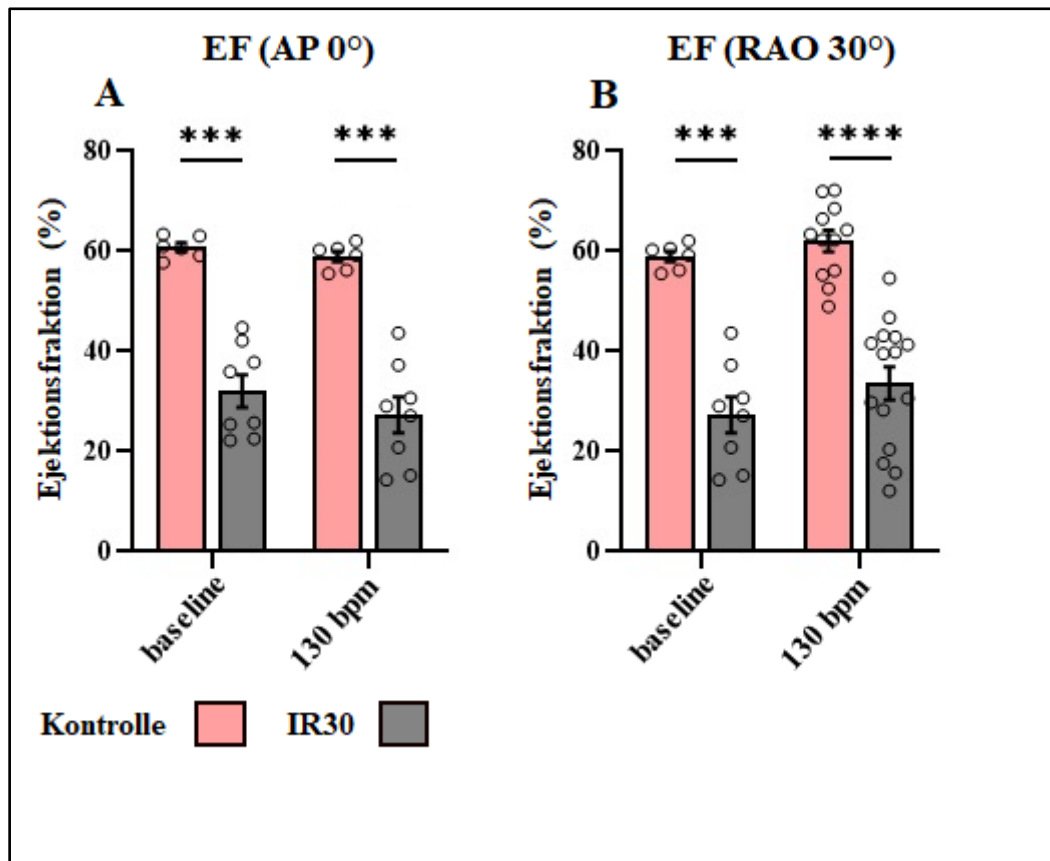


Abb. 13. Ejektionsfraktion. Messungen der Auswurfleistung baseline sowie bei 130 bpm in zwei Projektionen, **A.** Anterior-posteriore Projektion (AP 0°) und **B.** Right anterior oblique Projektion (RAO 30°), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

4.1.2 Elektrokardiogramm (EKG)

Es wurde ein 12-Kanal-EKG angelegt und aufgezeichnet. Die durchschnittliche Herzfrequenz unterschied sich zwischen den Gruppen nicht und betrug in der Kontrollgruppe $102,07 \pm 5,09$ bpm und in der IR30-Gruppe $90,67 \pm 4,96$ bpm ($p = 0,0936$; **Abb. 14-A**).

Man konnte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in den EKG-Parametern P-Wellen Dauer, PQ-Intervall, QRS-Dauer und frequenzkorrigierter QTc-Zeit feststellen (**Abb. 14-B**).

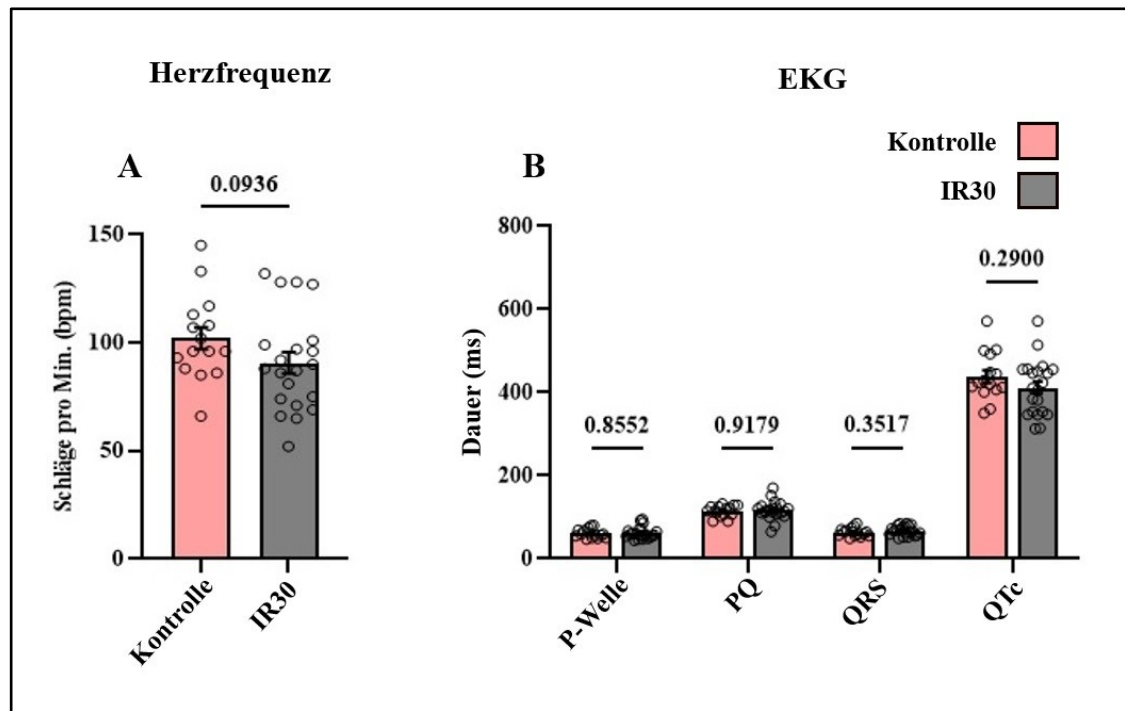


Abb. 14. Herzfrequenz und EKG. Messungen mittels 12-Kanal-EKG, **A.** Herzfrequenz; **B.** EKG-Parameter, jeweils Mann-Whitney-Test.

4.1.3 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Zur weiteren Charakterisierung erfolgte die invasive elektrophysiologische Untersuchung. Zunächst wurde die Sinusknotenerholungszeit (engl. Sinus Node Recovery Time, SNRT) bestimmt. Hierfür wurde jeweils zweimalig im Vorhof mit Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms und 400 ms für die Dauer von 30 Sekunden stimuliert und die Dauer vom letzten Stimulus bis zum Beginn der ersten intrinsischen P-Welle gemessen. Zur Normierung wurde das Verhältnis zwischen gemessener SNRT und intrinsischer Basiszykluslänge berechnet. Es konnte für keine der getesteten Basiszykluslängen ein Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden (**Abb. 15**).

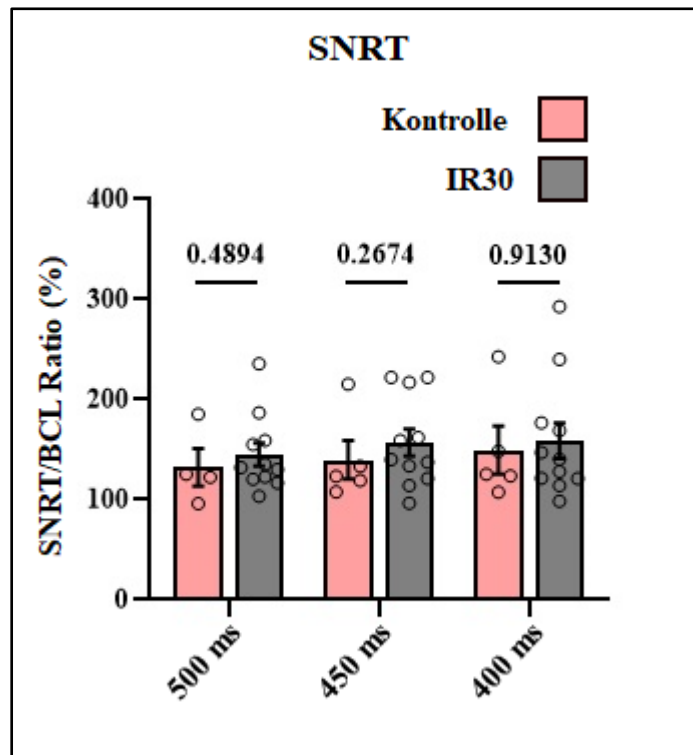


Abb. 15. Sinusknotenerholungszeit (SNRT). Messung bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms und 400 ms, jeweils Mann-Whitney-Test.

Bei der Bestimmung des Wenckebach-Punktes, ein Parameter für die AV-Knotenleitung, wurde mit immer kürzer werdenden Zykluslängen bis zum Verlust der 1:1-Überleitung stimuliert. Daraufhin wurde die Stimulation fortgesetzt, bis es zu einer stabilen 2:1-Überleitung kam. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden (**Abb. 16**).

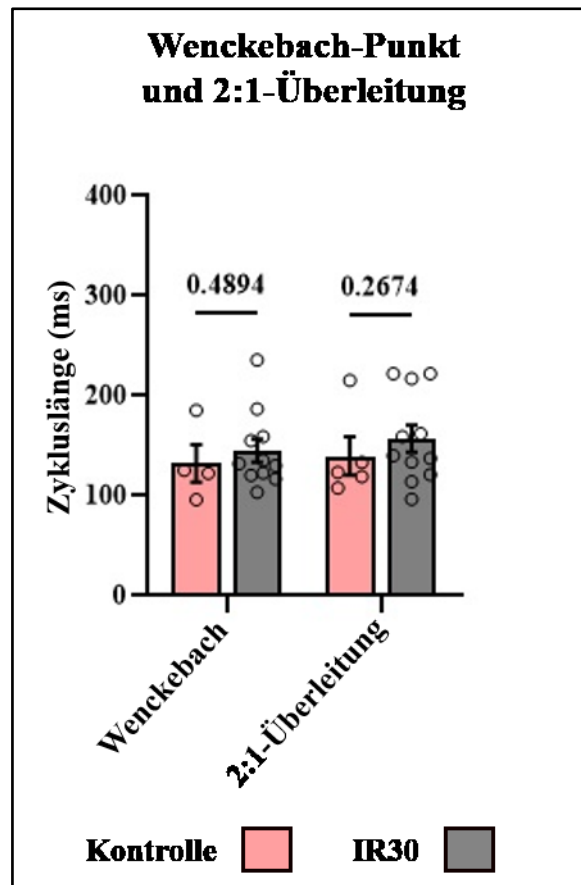


Abb. 16. Wenckebach-Punkt und 2:1-Überleitung. Kontrollgruppe versus IR30-Gruppe, jeweils Mann-Whitney-Test.

Bei der Messung der atrioventrikulären effektiven Refraktärzeiten (AVERP) ergab sich bei keiner der gemessenen Zykluslängen ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der beiden Gruppen (**Abb. 17**). Die Messung erfolgte bei doppelter Reizschwelle und den Basiszykluslängen 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms. Es wurden jeweils 7 Basisschläge gefolgt von einem progredient schneller angekoppelten Extrastimulus bis zum Verlust der AV-Knotenüberleitung abgegeben. Die AVERP wurde definiert als das längste Kopplungsintervall zwischen Basis- und Extrastimulus, das bei Vorhofstimulation keine Erregung der Kammern mehr auslösen konnte, d.h. bei der keine AV-Knotenüberleitung mehr erfolgte. Danach wurde nach analogem Protokoll die atriale effektive Refraktärperiode (AERP) ermittelt. Die AERP wurde definiert als das längste Kopplungsintervall, das bei Vorhofstimulation keine Erregung des Vorhofs mehr auslösen konnte. Die Messungen ergaben auch hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und IR30-Gruppe (**Abb. 18**).

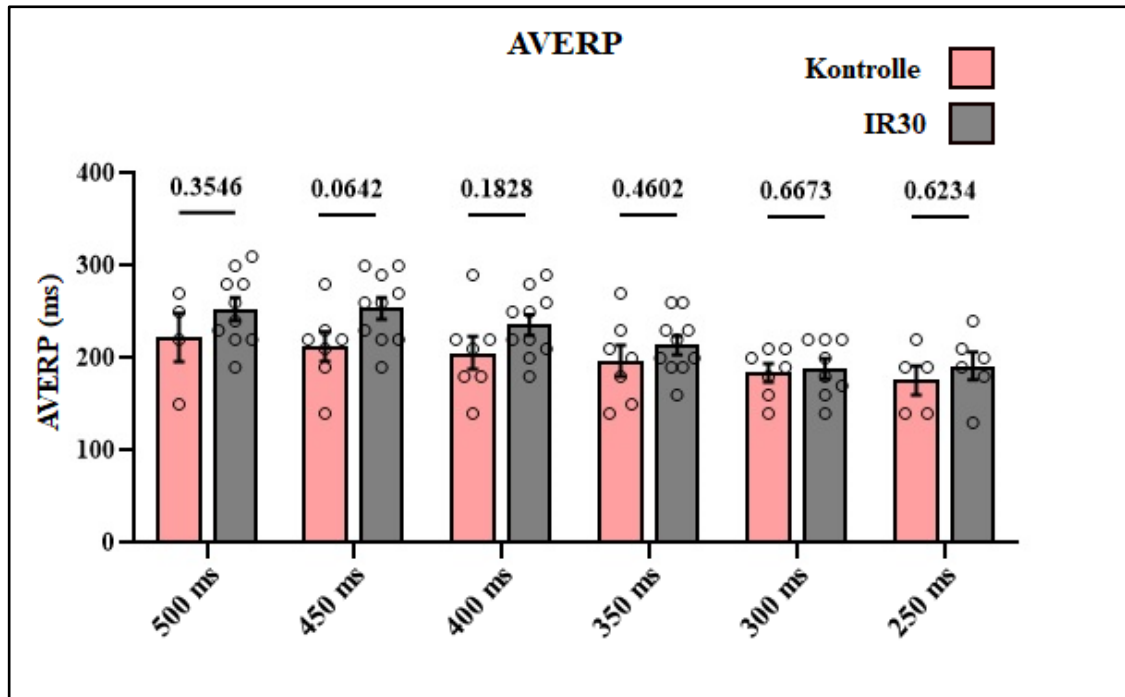


Abb. 17. Atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode (AVERP). Kontrollgruppe versus IR30-Gruppe bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms, jeweils Mann-Whitney-Test.

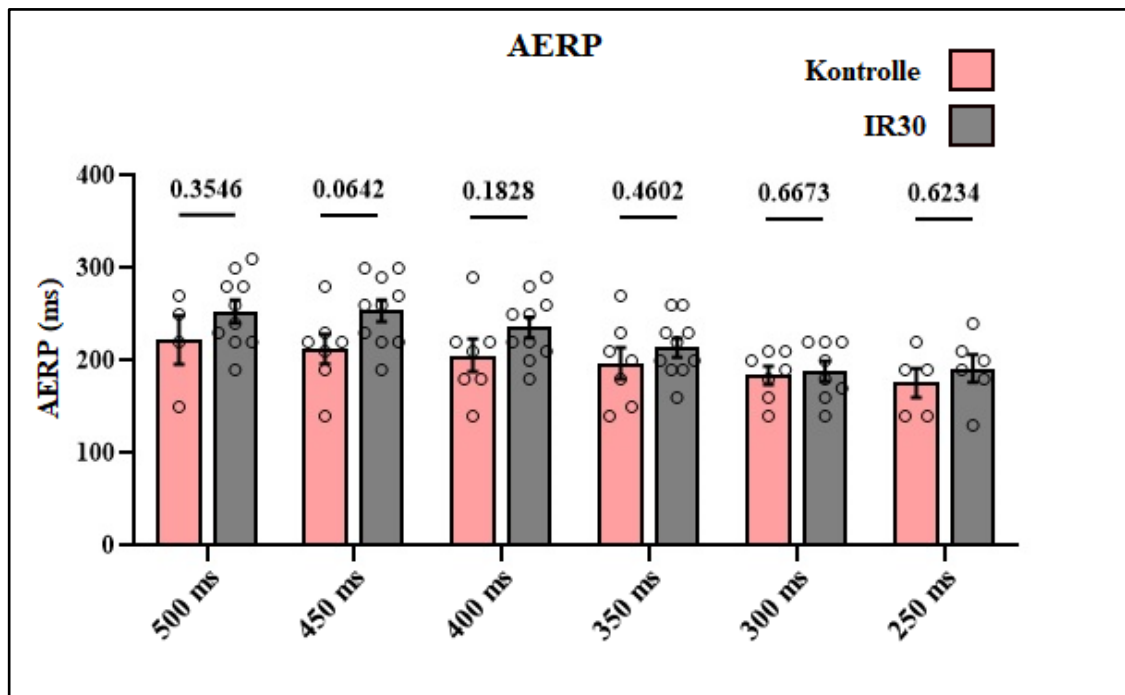


Abb. 18. Atriale effektive Refraktärperiode (AERP). Kontrollgruppe versus IR30-Gruppe bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms, jeweils Mann-Whitney-Test.

Zur Beurteilung der Vulnerabilität für Vorhoffarrhythmien wurden atriale Burststimulationen durchgeführt. Vorhofflimmern (VHF) war definiert als eine Vorhoffarrhythmie mit atrialer Tachykardie und unregelmäßigen RR-Intervallen mit einer Dauer von mindestens 10 Sekunden. VHF, das länger als 30 Minuten andauerte, wurde als persistierendes Vorhofflimmern gewertet und mittels elektrischer Kardioversion wieder in Sinusrhythmus konvertiert. Hinsichtlich der Arrhythmogenität zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der IR30-Gruppe (**Abb. 19**): der Anteil der Tiere in der IR30-Gruppe, bei denen mindestens eine Episode von Vorhofflimmern ausgelöst werden konnte, lag bei 40,95 %, wohingegen kein Tier der Kontrollgruppe Vorhofflimmern zeigte (** $p=0,0021$, **Abb. 19-A**). In der IR30-Gruppe konnte zudem pro Schwein häufiger VHF ausgelöst werden (** $p=0,0027$, **Abb. 19-B**), die durchschnittliche Episodendauer war länger (**Abb. 19-C**) und die gesamte Dauer aller Episoden (sog. kumulative VHF-Last) zeigte sich deutlich verlängert (**Abb. 19-D**).

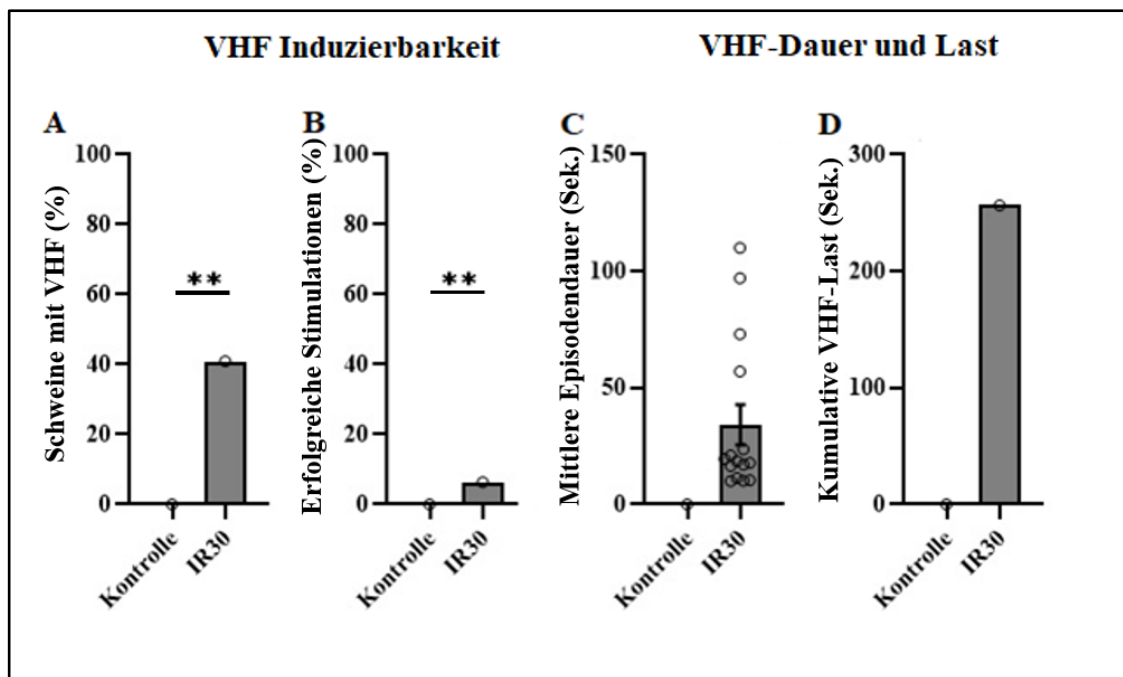


Abb. 19. Induzierbarkeit von VHF. A. Prozentsatz der Schweine mit mindestens einer VHF-Episode; B. Prozentsatz erfolgreicher Stimulationen; C. Durchschnittliche Episodendauer in Sekunden; D. VHF-Gesamtlast in Sekunden, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, A und B Chi-Square Test.

4.2 Ex vivo Ergebnisse

4.2.1 Infarktnachweis

Bei allen Tieren der IR30-Gruppe konnte nach Herzentnahme makroskopisch ein deutliches Infarktareal beobachtet werden, wodurch die erfolgreiche Okklusion der LAD und das Vorliegen eines transmuralen Infarktes bestätigt werden konnte (Abb. 20).

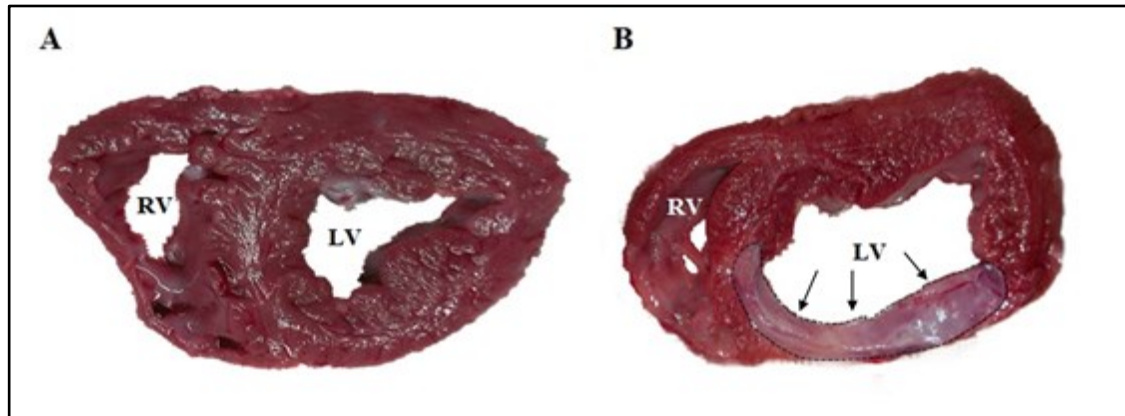


Abb. 20. Infarktnachweis. Querschnitt durch den rechten (RV) und linken (LV) Ventrikel **A.** Kontrolltier; **B.** IR30-Tier mit deutlich sichtbarem Myokardinfarkt (↓).

4.2.2 Evaluation der interstitiellen Fibrose

Die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose erfolgte im linken und rechten Atrium sowie im linken und rechten Ventrikel. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme der Fibrose in beiden Vorhöfen bei den Tieren der IR30-Gruppe gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe (**Fibrose LA** Kontrolle $6,04 \pm 0,01$ % versus IR30 $11,12 \pm 0,01$ %, $*p=0,0117$; **Fibrose RA** Kontrolle $6,38 \pm 0,72$ % versus IR30 $11,23 \pm 1,07$ %, $**p=0,0019$) (**Abb. 21-A und 21-B**). Im linken und rechten Ventrikel konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der IR30-Gruppe festgestellt werden (**Fibrose LV** Kontrolle $5,20 \pm 0,49$ % versus IR30 $4,74 \pm 0,42$ %, $p=0,5168$; **Fibrose RV** Kontrolle $5,68 \pm 0,48$ % versus IR30 $6,49 \pm 0,59$ %, $p=0,4305$) (**Abb. 21-C und 21-D**)

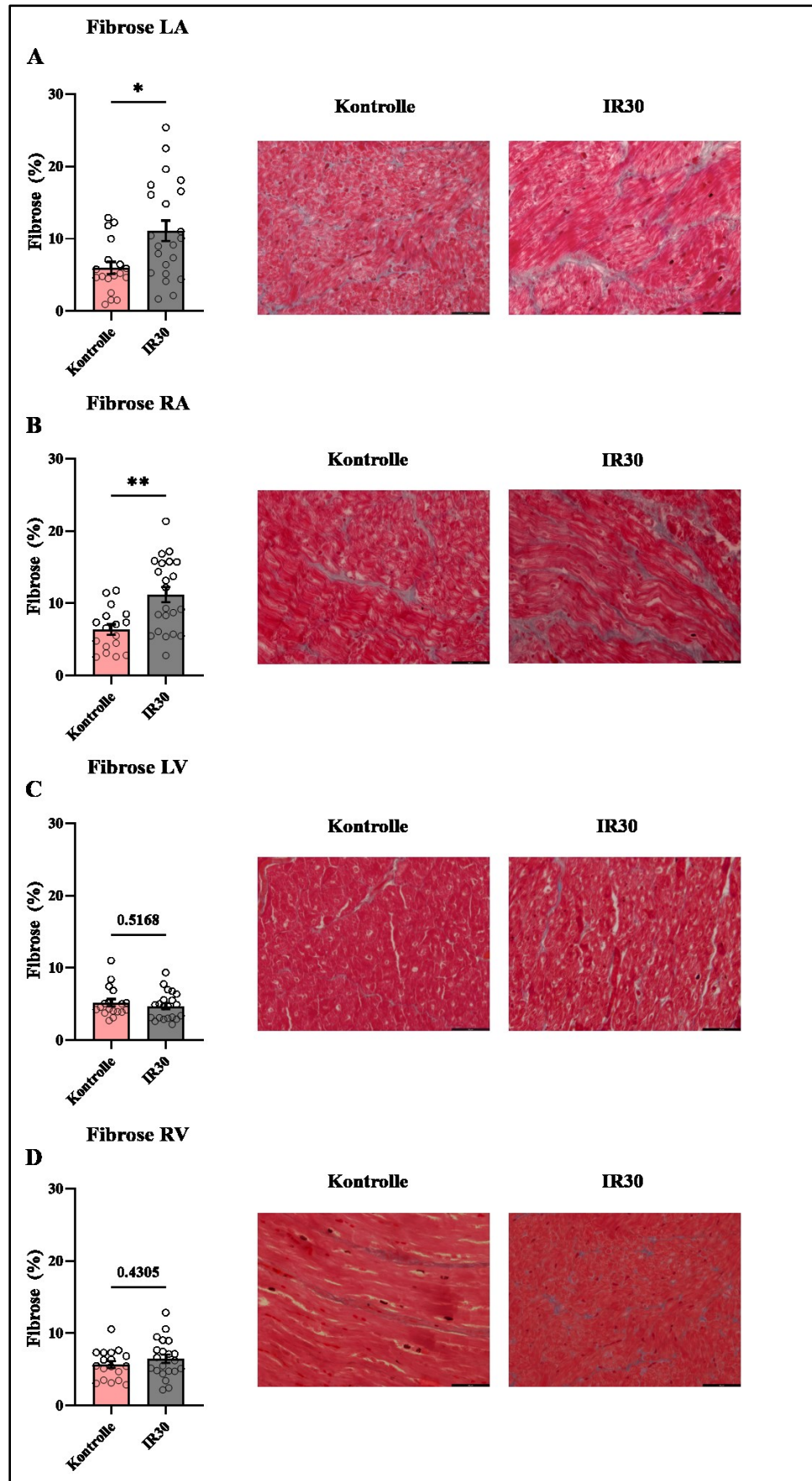


Abb. 21. Quantifizierung der Fibrose. Masson-Goldner-Trichrom-Färbung. A. Fibrose im linken Vorhof; B. Fibrose im rechten Vorhof; C. Fibrose im LV; D. Fibrose im RV, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

*** $p < 0.001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

4.2.3 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

Für die Bestimmung des Anteils an aktivierten Myofibroblasten wurde α -SMA histologisch angefärbt und die α -SMA-positiven Zellen prozentual zu der Gesamtzahl an Zellen evaluiert (Sun et al., 2016). Dabei fielen im linken sowie im rechten Vorhof bei der IR30-Gruppe signifikant vermehrte Myofibroblasten (**α -SMA-positive Zellen LA** Kontrolle $10,99 \pm 1,34$ % versus IR30 $11,23 \pm 1,07$ %, $*p = 0,0172$; **α -SMA-positive Zellen RA** Kontrolle $10,30 \pm 1,28$ % versus IR30 $14,46 \pm 0,59$ %, $*p = 0,0435$) (**Abb. 22-A und 22-B**). Im linken und rechten Ventrikel konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (**α -SMA-positive Zellen LV** Kontrolle $10,24 \pm 1,99$ % versus IR30 $12,42 \pm 1,67$ %, $p = 0,5288$; **α -SMA-positive Zellen RV** Kontrolle $9,34 \pm 0,90$ % versus IR30 $10,28 \pm 1,52$ %, $p = 0,3930$) (**Abb. 22-C und 22-D**).

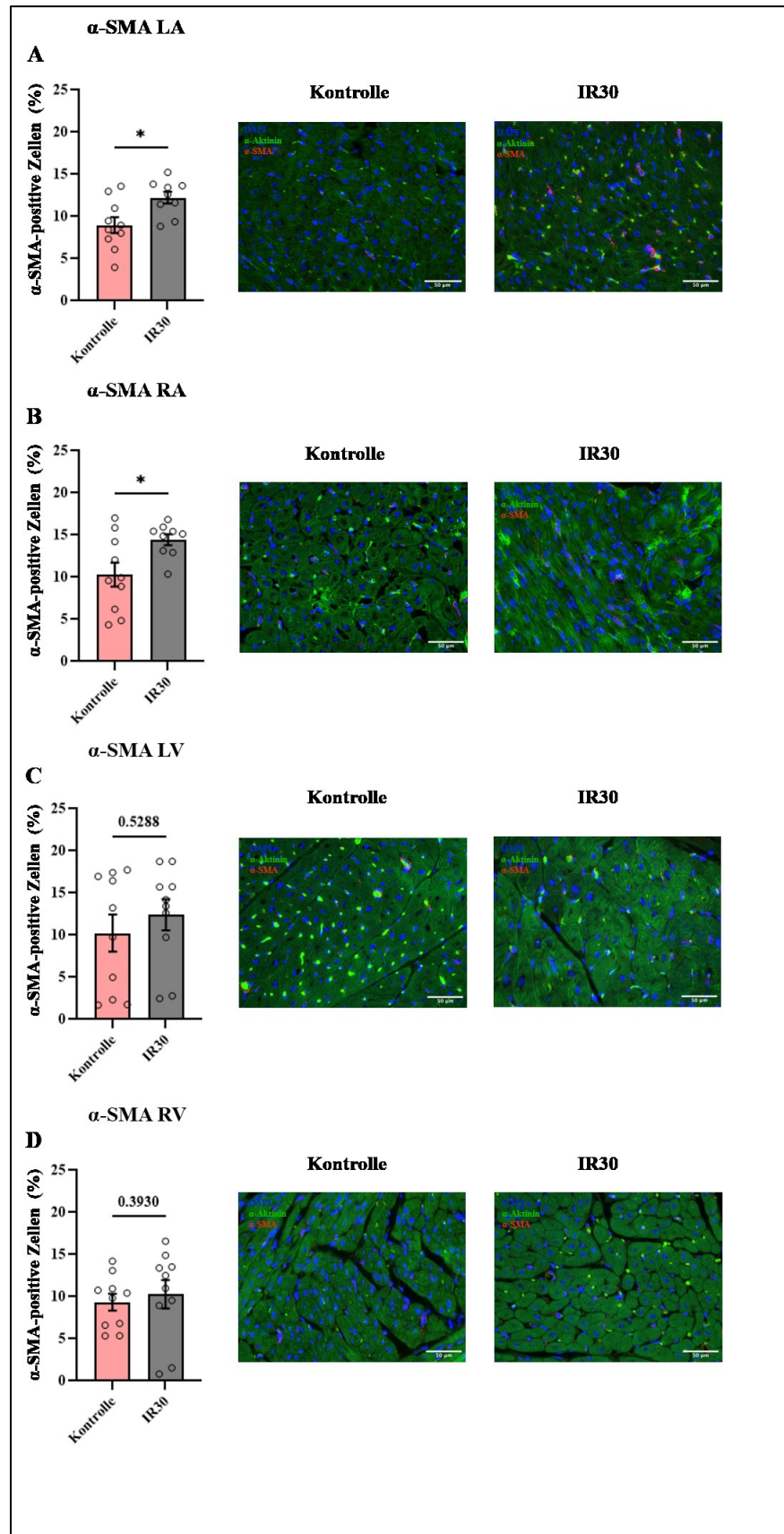


Abb. 22. Quantifizierung der Myofibroblasten (α -SMA-positive Zellen). A. Anteil der aktivierten Myofibroblasten im LA; B. Anteil der aktivierten Myofibroblasten im RA; C. Anteil der aktivierten Myofibroblasten im LV; D. Anteil der aktivierten Myofibroblasten im RV, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

4.2.4 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Aufgrund des beobachteten Phänotyps mit signifikanter Vorhofflimmerlast und des Nachweises interstitieller Fibrose ausschließlich in den Vorhöfen, wurde für die Genexpressionsanalyse auf die Untersuchung der beiden Vorhöfe fokussiert. Aus Gewebe des linken und rechten Vorhofs erfolgte die RNA-Isolation mit anschließender Analyse der Expression von Genen, die für extrazelluläre Matrix (ECM) bzw. profibrotische Mediatoren kodieren. Bei den untersuchten ECM-Genen Kollagen Typ 1 α 1 (*COL1A1*), Fibronektin (*FN*) und Matrix-Metalloproteinase 2 (*MMP2*) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und IR30-Gruppe festgestellt werden (**Abb. 23**).

Auch die Expression von α -Smooth-Muscle-Aktin (α -*SMA*) als Marker für aktivierte Myofibroblasten und Fibroblast Specific Protein 1 (*FSP1*) als Marker für kardiale Fibroblasten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (**Abb. 24**).

Bei der Analyse von Mediatoren profibrotischer Signalkaskaden konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und IR30-Gruppe detektiert werden (**Abb. 25**). Zytokine wie der Transforming Growth Faktor beta (*TGF- β*) fördern wie bereits erwähnt die Expression von Kollagen Typ I (z.B. *COL1A1*) und Fibronektin (*FN*). Über den *TGF- β* -Signalweg werden darüberhinaus Myofibroblasten aktiviert und der JNK-Signalweg induziert. Die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase MAPK8 (JNK1) führt ebenfalls zur Bildung myokardialer Fibrose. cJUN als Bestandteil eines Transkriptionsfaktors und MAPK8 initiieren außerdem die Differenzierung von Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten. Der profibrotische Wachstumsfaktor Connective tissue growth factor (*CCN2*) fördert die Produktion von ECM-Proteinen und aktiviert ebenfalls Myofibroblasten. Auch durch den nicht-kanonischen Signalweg über *WNT5A* und die Rezeptor-Tyrosinkinase 1 und 2 (*ROR1* und *ROR2*) kann es ebenfalls zur Aktivierung von kardialen Fibroblasten kommen, indem es wiederum den JNK/cJUN-Signalweg in Gang setzt.

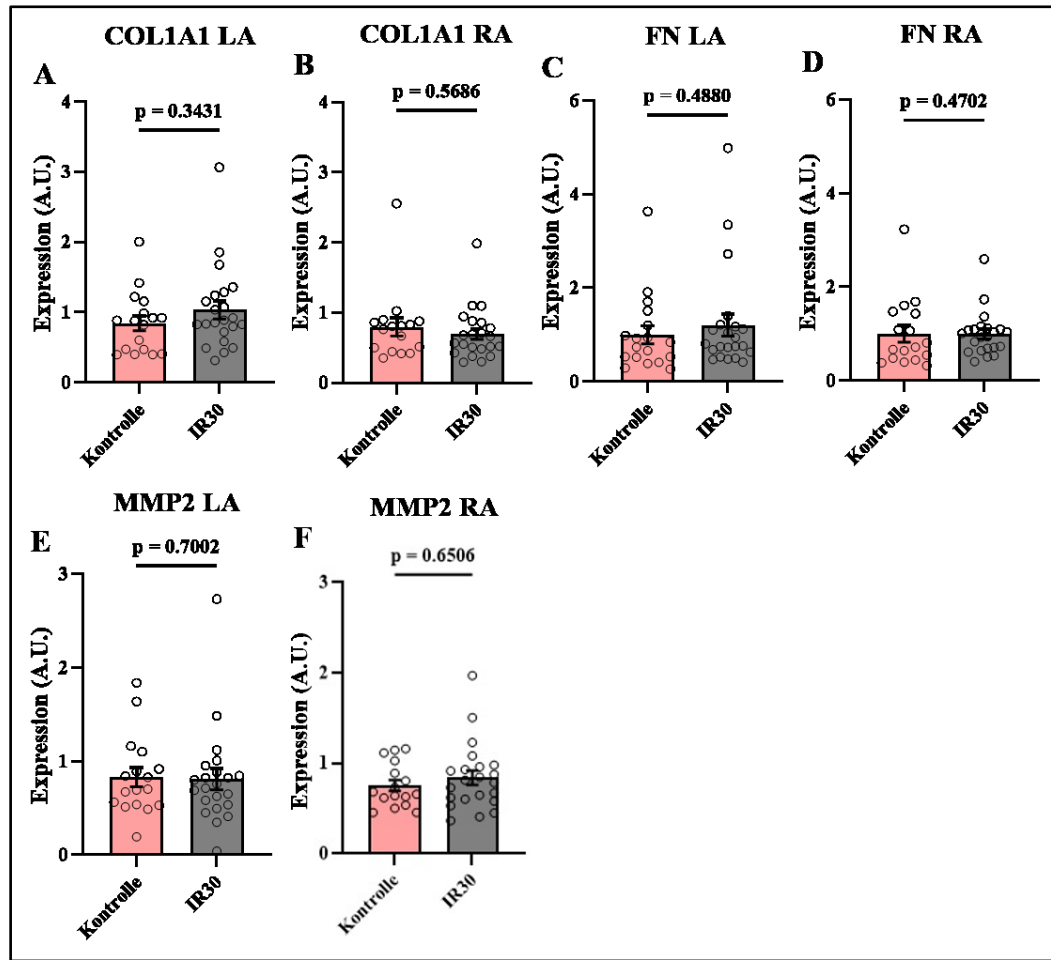


Abb. 23. Expressionsanalyse der ECM-Gene. **A.** Kollagen Typ 1 α 1 (*COL1A1*)-Expression im LA; **B.** Kollagen Typ 1 α 1 (*COL1A1*)-Expression im RA; **C.** Fibronectin (*FN*)-Expression im LA; **D.** Fibronectin (*FN*)-Expression im RA; **E.** Gelatinase (*MMP2*)-Expression im LA; **F.** Gelatinase (*MMP2*)-Expression im RA, jeweils Mann-Whitney-Test.

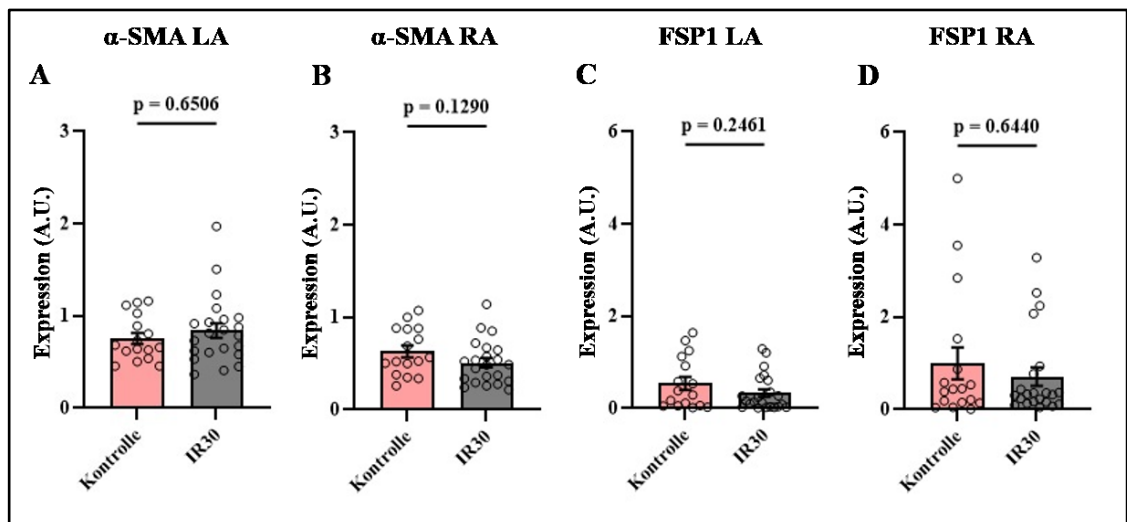


Abb. 24. Genexpressionsanalyse der Myofibroblasten- und Fibroblastenmarker. **A.** α -Smooth-Muscle-Aktin (α -SMA)-Expression im LA; **B.** α -Smooth-Muscle-Aktin (α -SMA)-Expression im RA; **C.** Fibroblast-specific protein 1 (*FSP1*)-Expression im LA, **D.** Fibroblast-specific protein 1(*FSP1*)-Expression im RA, jeweils Mann-Whitney-Test.

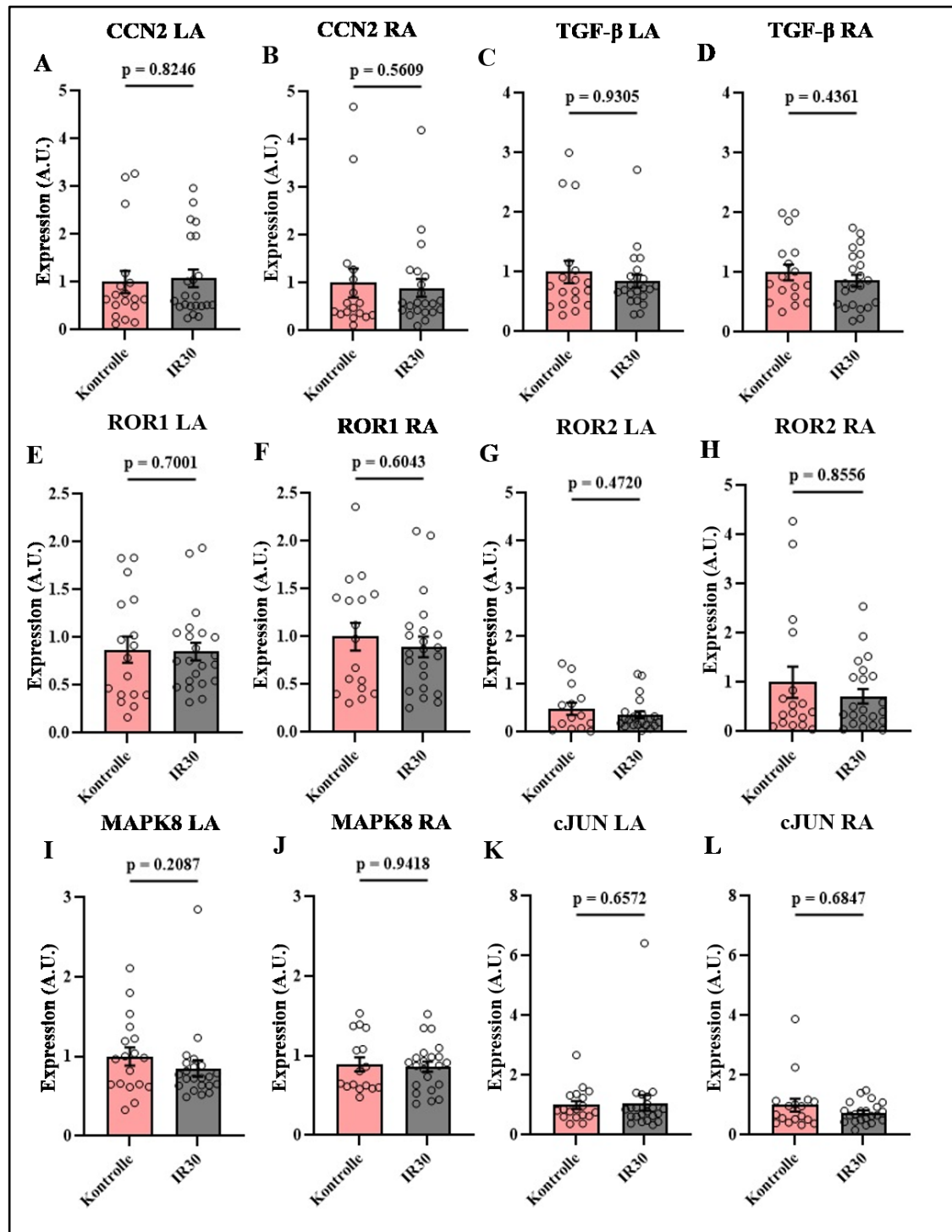


Abb. 25. Expressionsanalyse von Mediatoren profibrotischer Signalkaskaden. **A.** Connective Tissue Growth Factor (CCN2)-Expression im LA; **B.** Connective Tissue Growth Factor (CCN2)-Expression im RA; **C.** Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Expression im LA; **D.** Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Expression im RA; **E.** Rezeptor-Tyrosinkinase 1 (ROR1)-Expression im LA; **F.** Rezeptor-Tyrosinkinase 1 (ROR1)-Expression im RA; **G.** Rezeptor-Tyrosinkinase 2 (ROR2)-Expression im LA; **H.** Rezeptor-Tyrosinkinase 2 (ROR2)-Expression im RA; **I.** Mitogen-aktivierte Proteinkinase 8 (MAPK8)-Expression im LA; **J.** Mitogen-aktivierte Proteinkinase 8 (MAPK8)-Expression im RA; **K.** *cJUN*-Expression im LA; **L.** *cJUN*-Expression im RA, jeweils Mann-Whitney-Test.

4.3 Ergebnisse analysiert in Abhängigkeit der Rasse

4.3.1 Genotypisierung

Bei der Analyse der interstitiellen Fibrose zeigten sich große Inhomogenitäten in den jeweiligen Gruppen. Zwar wurden stets Schweine der Deutschen Landrasse bestellt, allerdings zeigten Tiere, die wir aus der Haltung Oberschleißheim (OSH) erhielten, im Mittel geringere Fibrose, als diejenigen Tiere, die wir aus der Haltung Thalhausen (TH) erhielten. Da zudem einige Tiere vereinzelte Flecken auf der Haut aufwiesen, ergab sich der Verdacht auf einen genetisch gemischten Hintergrund und damit einhergehend unterschiedliche Ausprägung des proarrhythmogenen Remodelings.

In Kooperation mit PD Dr. Medugorac wurde daher mittels Porcinen SNP60 Genotyping BeadChips (Illumina) eine Genotypisierung durchgeführt und anschließend mittels kombinierter Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsstudien (cLDLA) analysiert. Durch den Vergleich zu zwei Referenzkohorten (Pietrain und Landrasse) konnte nachgewiesen werden, dass unsere Kohorte aus nur wenigen reinrassigen Landrasse-Schweinen bestand, die Mehrheit der Tiere hingegen einen gemischten genetischen Hintergrund aufwies (**Abb. 26 und 27**).

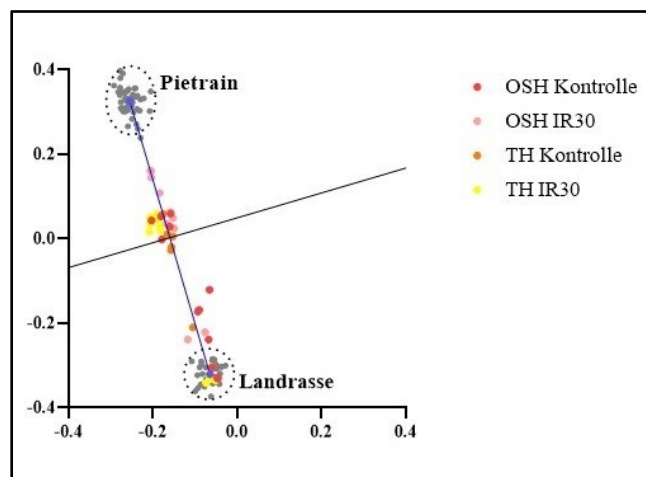


Abb. 26. Combined Linkage Disequilibrium Linkage Analysis (cLDLA). Anhand zweier Referenzkohorten erfolgte die Einteilung in Schweine mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund und solche mit mehrheitlich Deutsche Landrasse-Hintergrund.

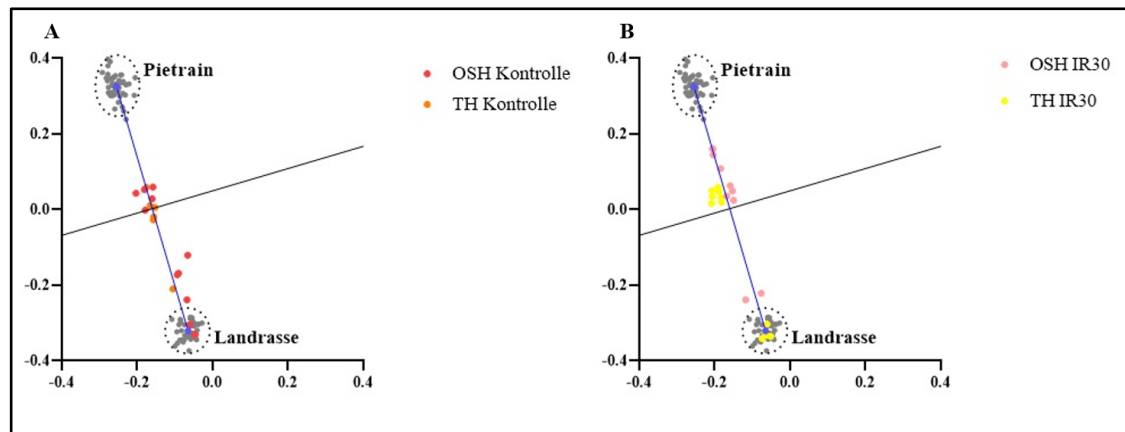


Abb. 27. Combined Linkage Disequilibrium Linkage Analysis (cLDLA). Anhand zweier Referenzkohorten erfolgte die Einteilung in Schweine mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund und solche mit mehrheitlich Deutsche Landrasse-Hintergrund. **A.** Kontrolltiere. **B.** IR30-Tiere.

Dementsprechend unterteilten wir unsere Kohorte in Schweine mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund (P) und Schweine mit mehrheitlich Deutsche Landrasse-Hintergrund (LR). Nach Einteilung in die Subgruppen Kontrolle-P, bzw. Kontrolle-LR sowie IR30-P bzw. IR30-LR wurden sämtliche bisherigen Untersuchungen in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds erneut analysiert und werden im Folgenden dargestellt.

4.3.2 Hämodynamik

Der linksventrikuläre systolische Druck (LVP) zeigte auch im Vergleich der vier Gruppen keinen signifikanten Unterschied sowohl in Ruhe als auch bei 130 bpm (**LVP BL** Kontrolle-P: $113,95 \pm 11,08$ mmHg; Kontrolle-LR: $107,02 \pm 7,94$ mmHg; IR30-P: $116,68 \pm 4,27$ mmHg; IR30-LR: $118,05 \pm 4,01$ mmHg; **LVP 130** Kontrolle-P: $120,55 \pm 12,73$ mmHg; Kontrolle-LR: $115,94 \pm 8,10$ mmHg; IR30-P: $123,47 \pm 5,49$ mmHg; IR30-LR: $121,04 \pm 4,62$ mmHg; **Abb. 28**).

Dagegen zeigte der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) eine signifikante Zunahme bei beiden IR30-Gruppen bei 130 bpm, nicht aber in Ruhe (**LVEDP BL** Kontrolle-P: $12,23 \pm 1,56$ mmHg; Kontrolle-LR: $10,83 \pm 1,50$ mmHg; IR30-P: $14,13 \pm 1,46$ mmHg; IR30-LR: $15,27 \pm 1,66$ mmHg; **LVEDP 130** Kontrolle-P: $15,47 \pm 1,97$ mmHg; Kontrolle-LR: $13,02 \pm 1,78$ mmHg, IR30-P: $15,82 \pm 1,59$ mmHg; IR30-LR: $21,14 \pm 1,88$ mmHg; Kontrolle-P vs. IR30-P: $*p=0,0192$; Kontrolle-LR vs. IR30-LR: $**p=0,0062$, **Abb. 28**).

Beim rechtsatrialen (RAP) sowie beim rechtsventrikulären Druck (RVP) zeigten sich auch nach Aufteilung entsprechend des genetischen Hintergrunds keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und den IR30-Gruppen (**RAP Kontrolle-P:** 14,68±0,58 mmHg; **Kontrolle-LR:** 11,94±1,42 mmHg; **IR30-P:** 12,76±3,04 mmHg; **IR30-LR:** 15,63±1,62 mmHg; **RVP Kontrolle-P:** 32,39±3,39 mmHg; **Kontrolle-LR:** 29,60±3,30 mmHg; **IR30-P:** 26,60±3,44 mmHg; **IR30-LR:** 34,75±2,56 mmHg; **Abb. 28**).

Ebenso zeigte sich beim Pulmonalarteriendruck (PAP) kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (**PAP Kontrolle-P:** 30,50±1,54 mmHg; **Kontrolle-LR:** 26,00±2,54 mmHg; **IR30-P:** 26,52±3,56 mmHg; **IR30-LR:** 33,80±2,60 mmHg; **Abb. 28**).

Beim Lungenkapillaren-Verschlussdruck (PCWP) zeigte sich nach Aufteilung entsprechend des genetischen Hintergrunds jeweils eine signifikante Zunahme bei den IR30-Gruppen beider Rassen (**PCWP Kontrolle-P:** 17,53±1,20 mmHg; **Kontrolle-LR:** 14,60±2,91 mmHg; **IR30-P:** 18,07±3,51 mmHg; **IR30-LR:** 20,75±1,19 mmHg; **Kontrolle-P vs. IR30-P:** *p=0,0336; **Kontrolle-LR vs. IR30-LR:** **p=0,0095; **Abb. 28**).

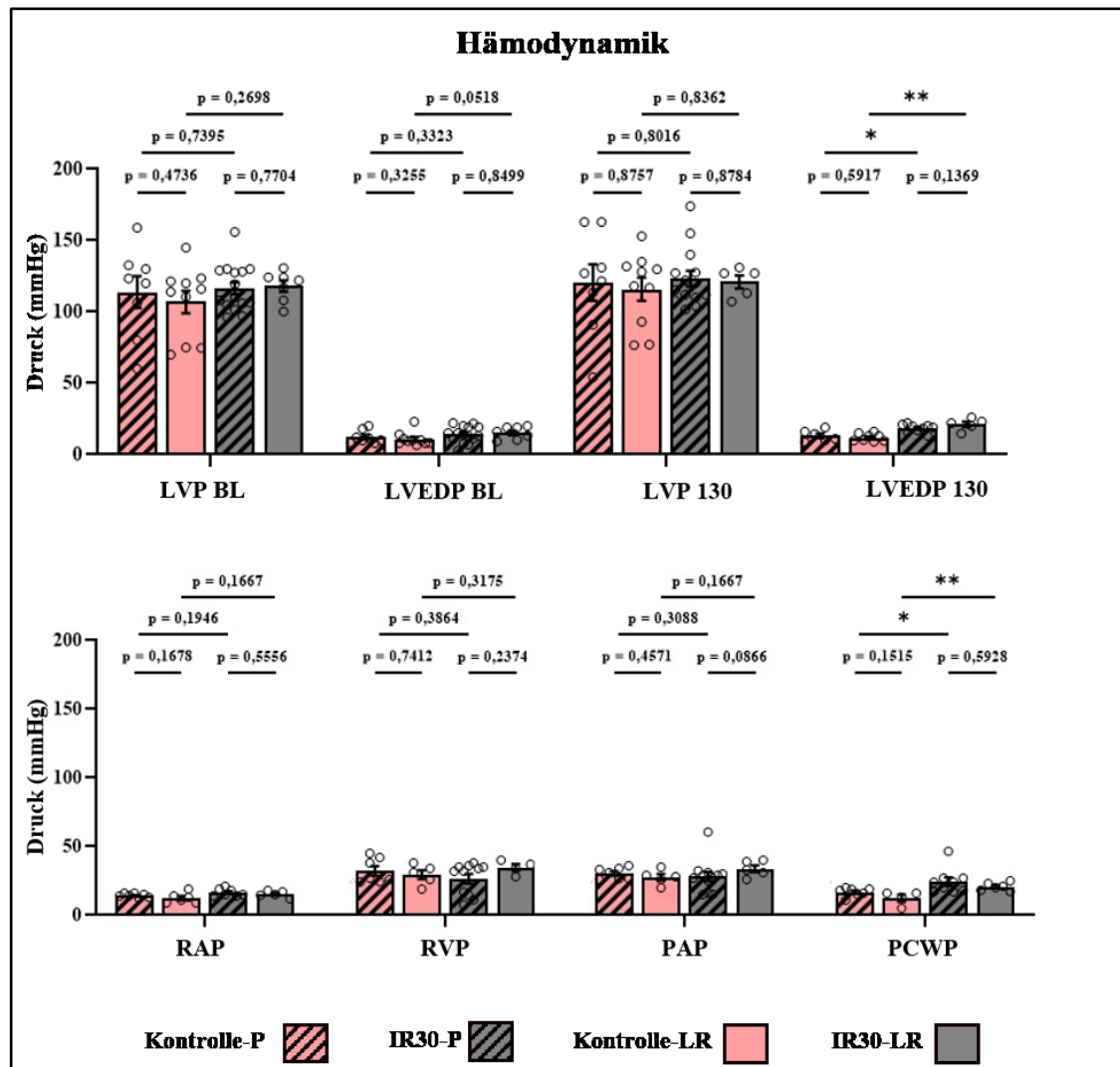


Abb. 28. Hämodynamik nach Rasse. Messungen im linken und rechten Herzen, Kontrollgruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) versus IR30-Gruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR), LVP=linksventrikulärer Druck, LVEDP=linksventrikulärer enddiastolischer Druck, RAP=rechtsatrialer Druck; RVP=rechtsventrikulärer Druck, PAP=pulmonalarterieller Druck; PCWP=Lungenkapillaren-Verschchlussdruck, BL=baseline, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Die Pumpleistung des Herzens zeigte sich bei den IR30-Tieren im Vergleich zu den Kontrollen jeweils reduziert, d.h. bei beiden Rassen lag eine relevante Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt vor. Statistisch signifikant waren die Unterschiede bei der AP 0°-Angulation jedoch nur bei 130 bpm zwischen der Kontrollgruppe und der IR30-Gruppe bei Schweinen, die mehrheitlich einen Pietrain-Hintergrund aufwiesen (**Abb. 29-B**). Bei RAO 30°-Angulation zeigten sich in Ruhe sowie bei 130 bpm jeweils zwischen den Kontroll- und den IR30-Gruppen beider Rassen eine signifikante Abnahme (**EF AP 0° BL** Kontrolle-P: $59,31 \pm 0,96$ %; Kontrolle-LR: $62,39 \pm 0,87$ %; IR30-P: $31,19 \pm 4,31$ %; IR30-LR: $33,57 \pm 5,79$ %; **EF AP 0° 130 bpm** Kontrolle-P: $59,03 \pm 1,39$ %; Kontrolle-LR: $58,95 \pm 1,89$ %; IR30-P: $27,55 \pm 4,84$ %; IR30-LR: $26,91 \pm 6,72$ %, Kontrolle-P vs.

IR30-P: * $p=0,0357$, **Abb 29-B**; EF RAO 30° BL Kontrolle-P: $57,32\pm 5,27$ %; Kontrolle-LR: $61,12\pm 5,02$ %; IR30-P: $36,83\pm 1,93$ %; IR30-LR: $38,57\pm 5,22$ %; Kontrolle-P vs. IR30-P: ** $p=0,0087$, **Abb 29-C**; Kontrolle-LR vs. IR30-LR: * $p=0,0357$; EF RAO 30° 130 bpm Kontrolle-P: $63,98\pm 2,35$ %; Kontrolle-LR: $60,12\pm 3,66$ %; IR30-P: $34,58\pm 3,81$ %; IR30-LR: $29,88\pm 6,85$ %, Kontrolle-P vs. IR30-P: *** $p=0,0001$, Kontrolle-LR vs. IR30-LR: * $p=0,0238$, **Abb. 29-D**).

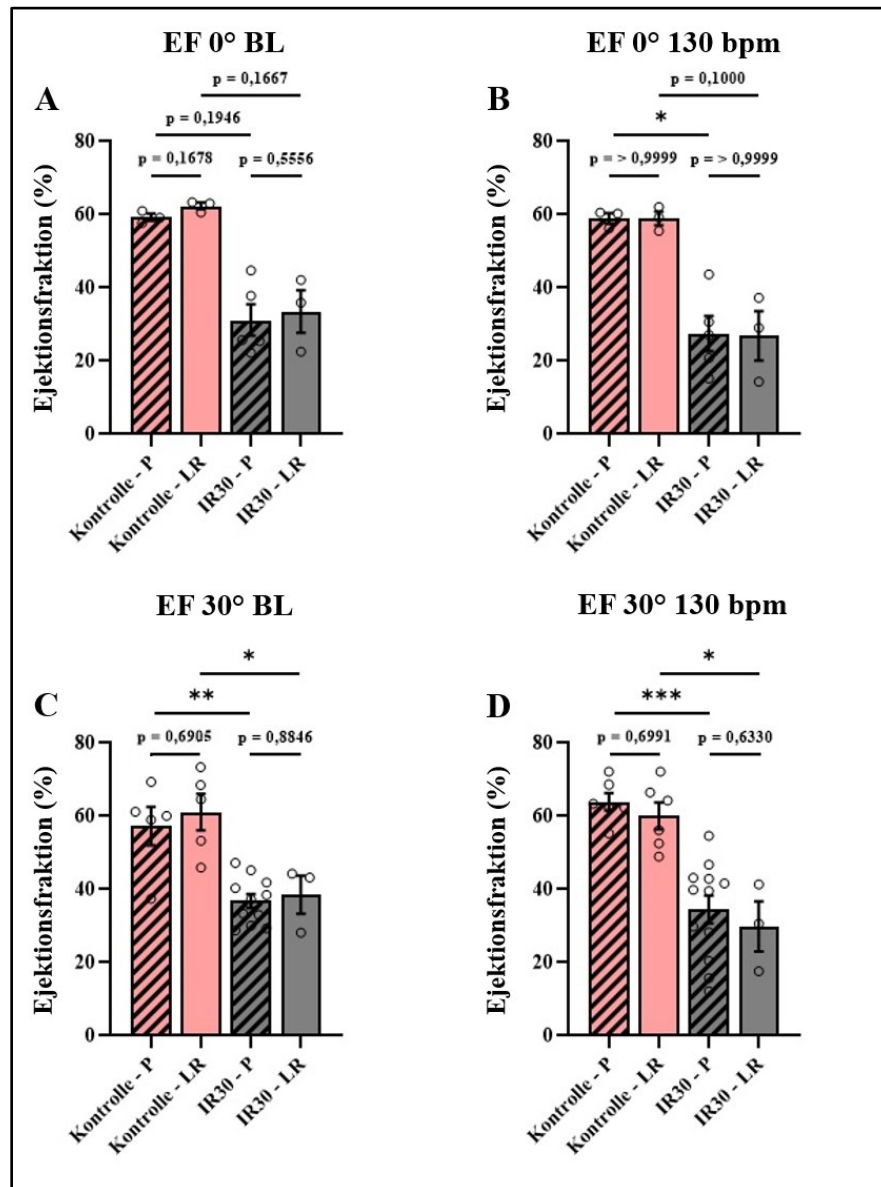


Abb. 29. Ejektionsfraktion nach genetischem Hintergrund. Messung der Auswurfleistung in Ruhe (baseline, BL, A) sowie bei 130 bpm (B) in anterior-posterior (AP 0°)-Angulation und in RAO 30°-Angulation (C-D), Kontrollgruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) versus IR30-Gruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR), * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

4.3.3 Elektrokardiogramm (EKG)

Die durchschnittliche Herzfrequenz zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Kontrolle-P: 108,6±9,9 bpm; Kontrolle-LR: 96,4±3,7 bpm; IR30-P: 86,3±6,4 bpm; IR30-LR: 101,7±5,3 bpm, **Abb. 30-A**). Auch bei den übrigen EKG-Parametern konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (**Abb. 30-B-E**).

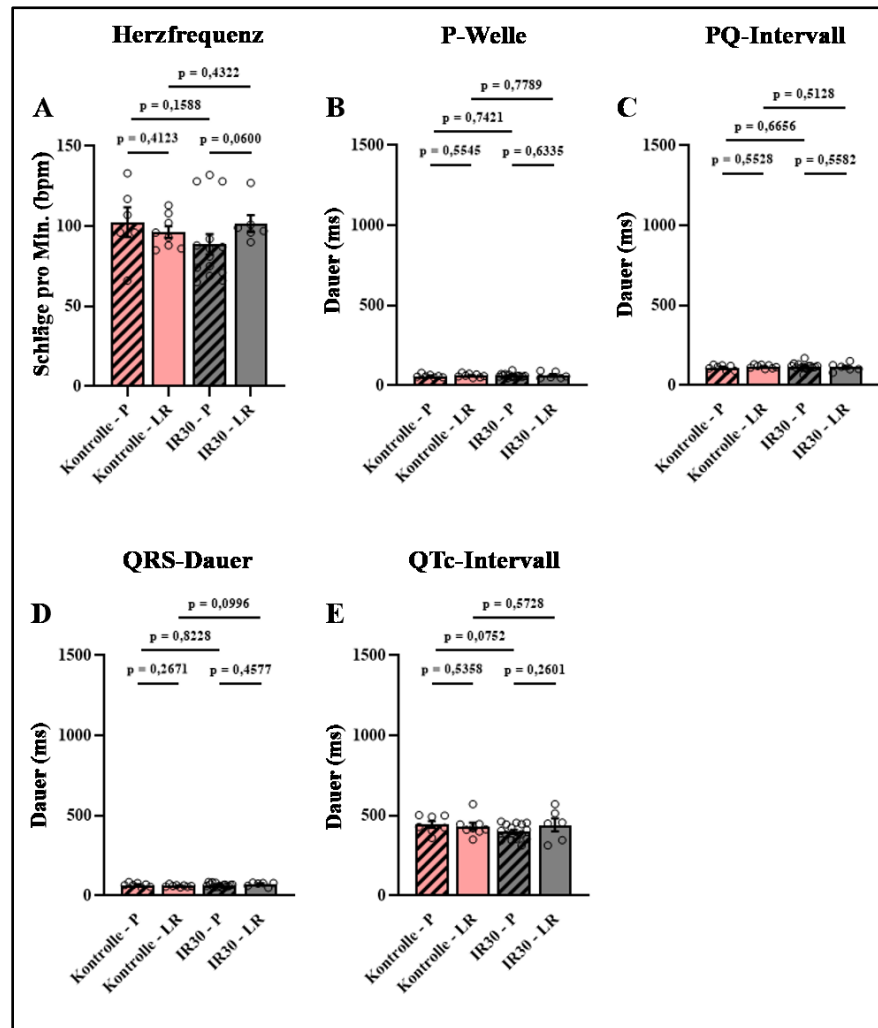


Abb. 30. Herzfrequenz und EKG nach Rasse. Messungen mittels 12-Kanal-EKG, **A**. Herzfrequenz; **B-E**. EKG-Parameter P-Wellen-Dauer (**B**), PQ-Intervall (**C**), QRS-Dauer (**D**) und QTc-Intervall (**E**), jeweils Mann-Whitney-Test.

4.3.4 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Beim Vergleich der Sinusknotenerholungszeit (SNRT) wurde bei allen Basiszykluslängen (500 ms, 450 ms und 400 ms) kein Unterschied zwischen den vier Gruppen ermittelt (**Abb. 31**).

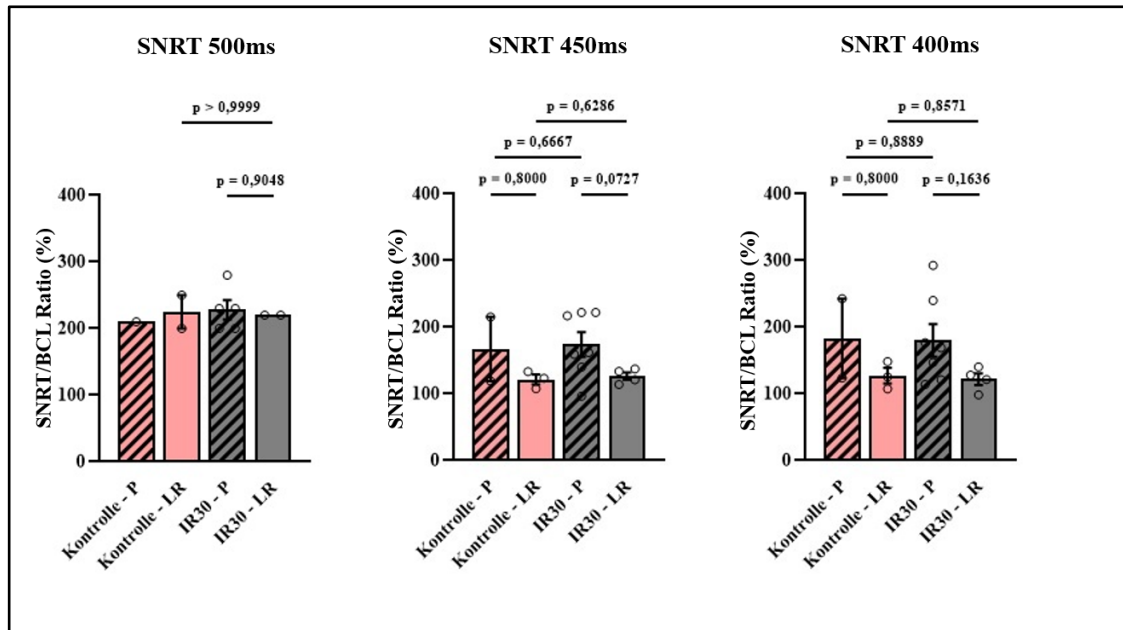


Abb. 31. Sinusknotenerholungszeit (SNRT) nach Rasse. Messung bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms und 400 ms, Kontrollgruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) versus IR30-Gruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR), jeweils Mann-Whitney-Test.

Auch beim Wenckebach-Punkt und der 2:1 AV-Überleitung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abb. 32**).

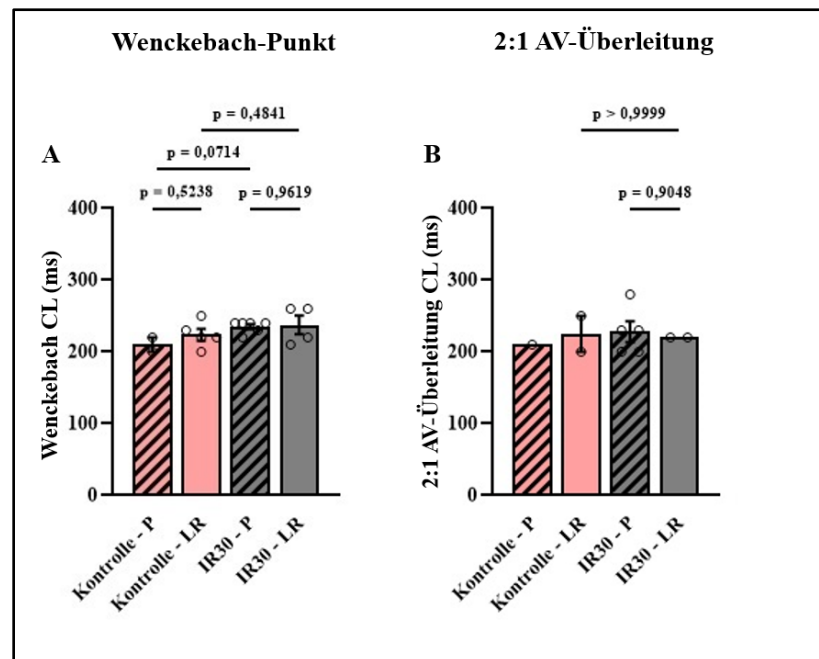


Abb. 32. Wenckebach-Punkt (A) und 2:1-Überleitung (B) nach Rasse. Kontrollgruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) versus IR30-Gruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR), jeweils Mann-Whitney-Test.

IR30-Tiere mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund zeigten verlängerte atrioventrikuläre effektive Refraktärzeiten (AVERP) im Vergleich zu den Kontrolltieren, wobei sich aufgrund der nur wenigen Messwerte pro Gruppe (insgesamt geringe Tierzahl sowie Unmöglichkeit bei einzelnen Tieren die AVERP aufgrund schnellerer intrinsischer Herzfrequenz bei allen Basiszykluslängen zu bestimmen) kein statistisch signifikanter Unterschied ergab. Bei den Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund war die AVERP im Wesentlichen unverändert, so dass sich aufgrund der verlängerten AVERP bei den Tieren mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund bei den Basiszykluslängen von 500 ms und 400 ms ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden IR30-Gruppen (** $p=0,0083$ bzw. ($*p=0,0500$) ergab (Abb. 33).

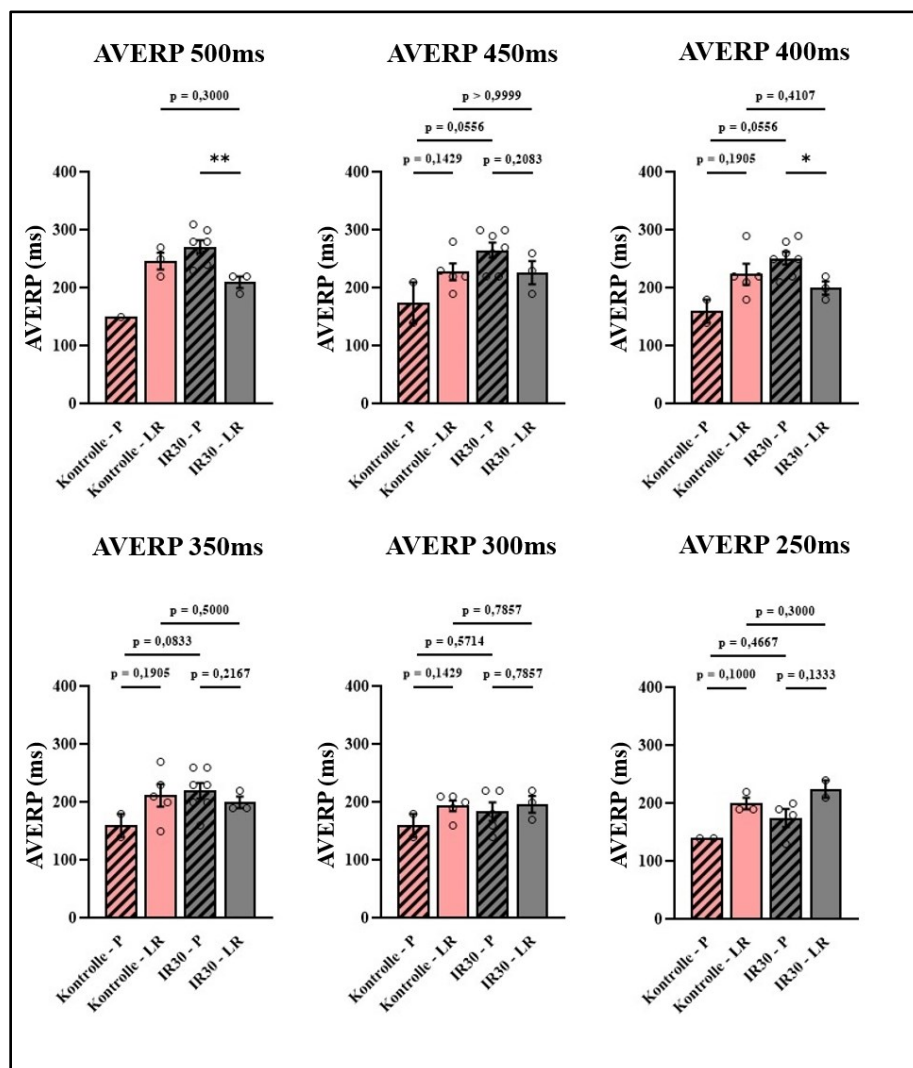


Abb. 33. Atrioventrikuläre effektive Refraktärzeit (AVERP) nach Rasse. Kontrollgruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) versus IR30-Gruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, jeweils

Mann-Whitney-Test.

Die atriale effektive Refraktärperiode (AERP) bei IR30-Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund war im Vergleich mit den Kontrollen verkürzt. Statistisch signifikant waren die Unterschiede bei den Basiszykluslängen 450 ms, 350 ms, und 300 ms (AERP 450 ms Kontrolle-LR versus IR30-LR * $p=0,0210$, AERP 350 ms Kontrolle-LR versus IR30-LR ** $p=0,0078$, AERP 300 ms Kontrolle-LR versus IR30-LR * $p=0,0314$, Abb. 34).

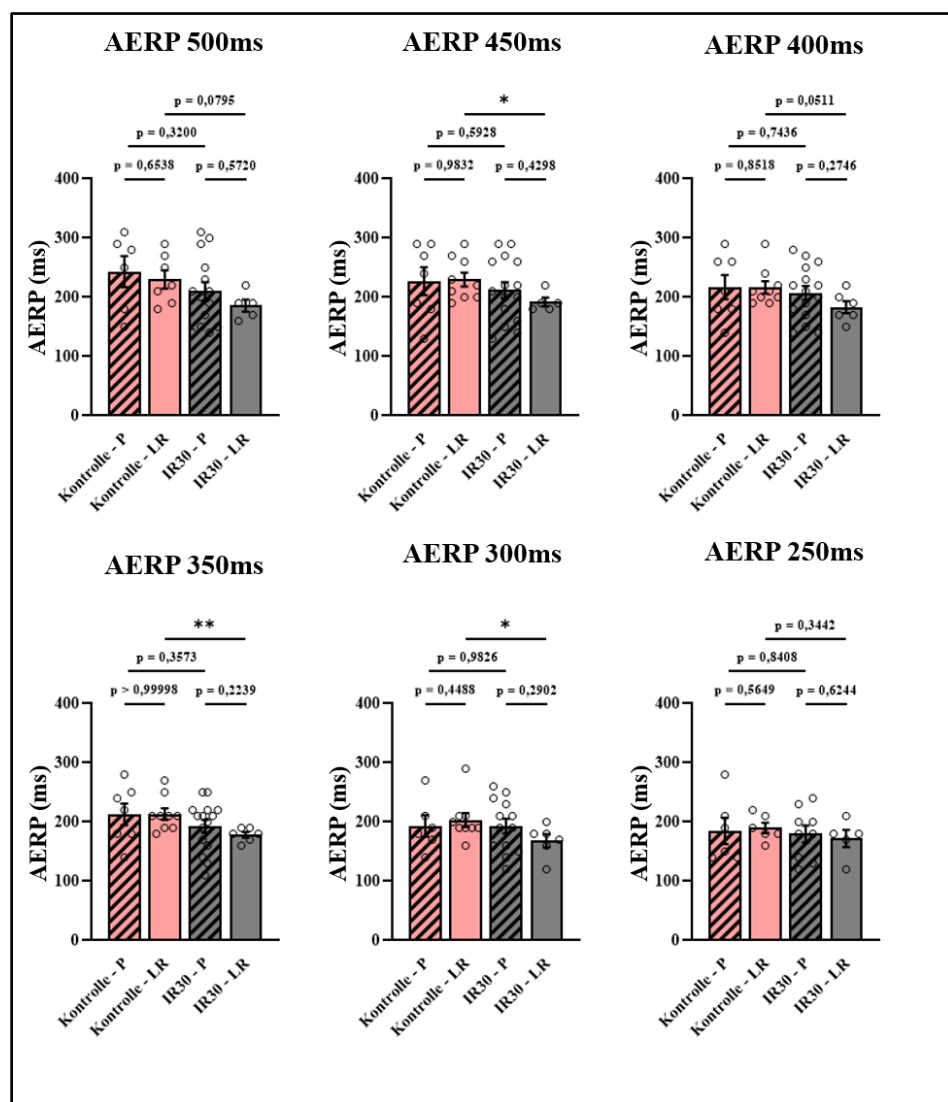


Abb. 34. Atriale effektive Refraktärzeit (AERP) nach Rasse. Kontrollgruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) versus IR30-Gruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Die Anfälligkeit für Vorhofflimmern zeigte sich auch nach Aufteilung in Subgruppen bei beiden IR30-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen signifikant gesteigert: der Anteil der Tiere in den beiden IR30-Gruppen, bei denen mindestens eine Episode von Vorhofflimmern ausgelöst werden konnte, lag bei Schweinen mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund bei 40% (Kontrolle-**P** versus IR30-**P**, * $p=0,0375$) und bei Schweinen mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund bei 42,86% (Kontrolle-**LR** versus IR30-**LR**, * $p=0,0225$), wohingegen kein Tier der Kontrollgruppen Vorhofflimmern zeigte (**Abb 35-A**). In den IR30-Gruppen konnte zudem pro Schwein häufiger VHF ausgelöst werden (Kontrolle-**P** versus IR30-**P**, ** $p=0,0086$, Kontrolle-**LR** versus IR30-**LR**, ** $p=0,0041$; **Abb. 35-B**), die durchschnittliche Episodendauer war länger (**Abb. 35-C**) und die gesamte Dauer aller Episoden (sog., die kumulative VHF-Last) war bei den IR30-Tieren deutlich verlängert (**Abb 35-D**).

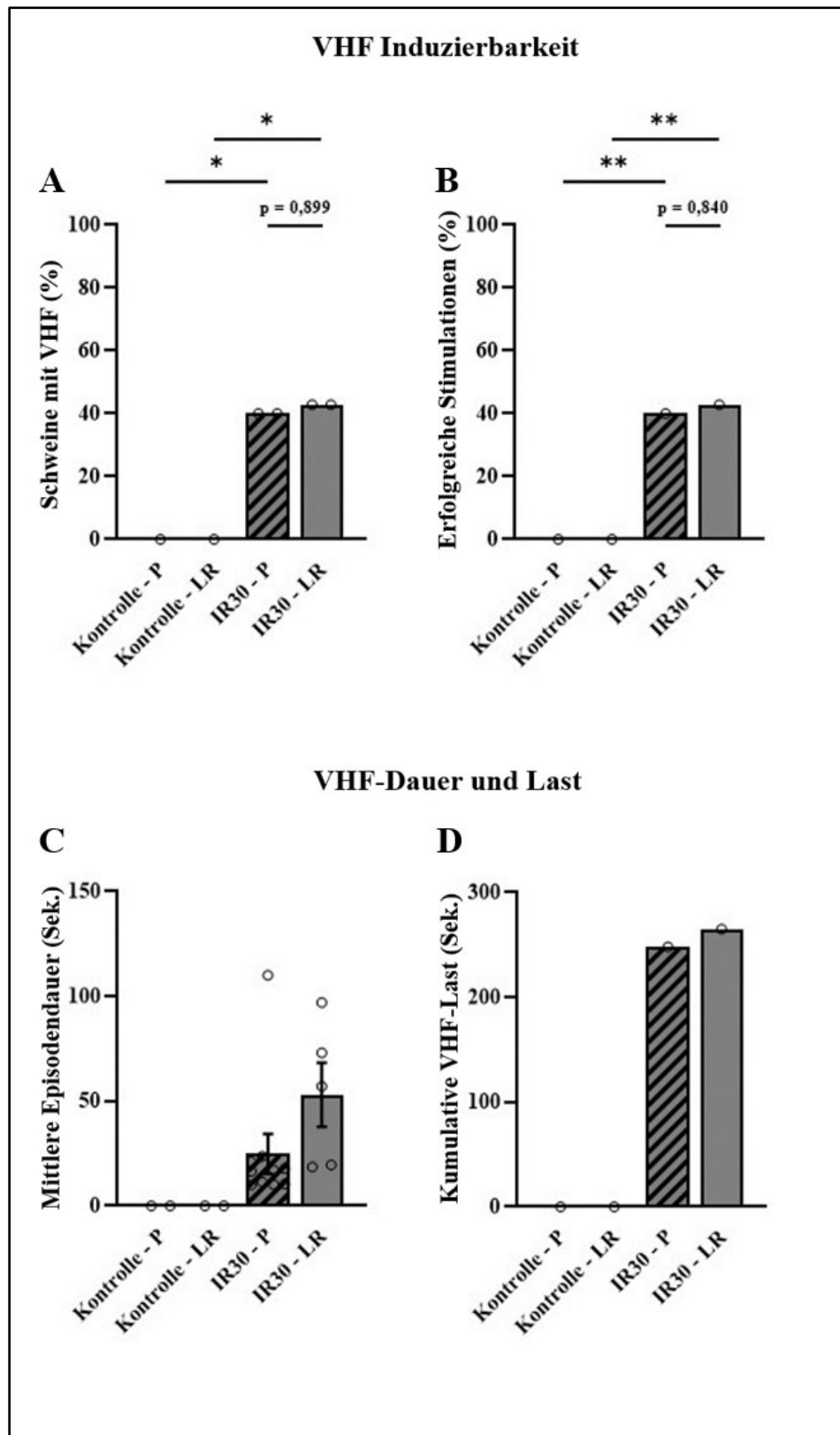


Abb. 35. Induzierbarkeit von VHF nach Rasse. A. Prozentsatz Schweine mit mindestens einer VHF-Episode; B. Prozentsatz erfolgreicher Stimulationen; C. Durchschnittliche Episodendauer in Sekunden; D. VHF-Gesamtlast in Sekunden; Kontrollgruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR) versus IR30-Gruppen Pietrain (-P) und Landrasse (-LR), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, A und B Chi-Square Test.

4.3.5 Evaluation der interstitiellen Fibrose

Bei der Quantifizierung der interstitiellen Fibrose im linken Atrium zeigte sich eine signifikant vermehrte Fibrose ausschließlich bei den IR30-Tieren mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund (**Fibrose LA Kontrolle-P:** $6,71 \pm 1,04$ % versus **IR30-P:** $12,82 \pm 1,92$ %, ****p=0,0060; Abb. 36-A**). IR30-Tiere mit überwiegend Landrasse-Hintergrund zeigten im linken Vorhof hingegen keine vermehrte Fibrose im Vergleich zu den Kontrollen (**Fibrose LA Kontrolle-LR:** $5,43 \pm 1,25$ % versus **IR30-LR:** $7,48 \pm 0,95$ %; **Abb. 36-A**). Im rechten Vorhof zeigten beide IR30-Gruppen eine Zunahme der interstitiellen Fibrose, wobei der Unterschied zu den Kontrollen lediglich bei denjenigen Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund statistisch signifikant war (**Fibrose RA Kontrolle-P:** $7,34 \pm 1,31$ %; **Kontrolle-LR:** $6,29 \pm 0,58$ %; **IR30-P:** $11,33 \pm 1,38$ %; **IR30-LR:** $9,16 \pm 1,82$ %; **Kontrolle-LR versus IR30-LR *p=0,0105; Abb. 36-B**). Im linken und rechten Ventrikel konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den IR30-Gruppen festgestellt werden (**Fibrose LV Kontrolle-P:** $4,96 \pm 0,47$ %, **Kontrolle-LR:** $4,78 \pm 0,55$ %, **IR30-P:** $4,87 \pm 0,54$ %, **IR30-LR:** $4,48 \pm 0,70$ %; **Fibrose RV Kontrolle-P:** $4,80 \pm 0,69$ %, **Kontrolle-LR:** $6,39 \pm 0,60$ %, **IR30-P:** $5,84 \pm 0,75$ %, **IR30-LR:** $6,96 \pm 1,21$ %) (**Abb. 36-C und D**).

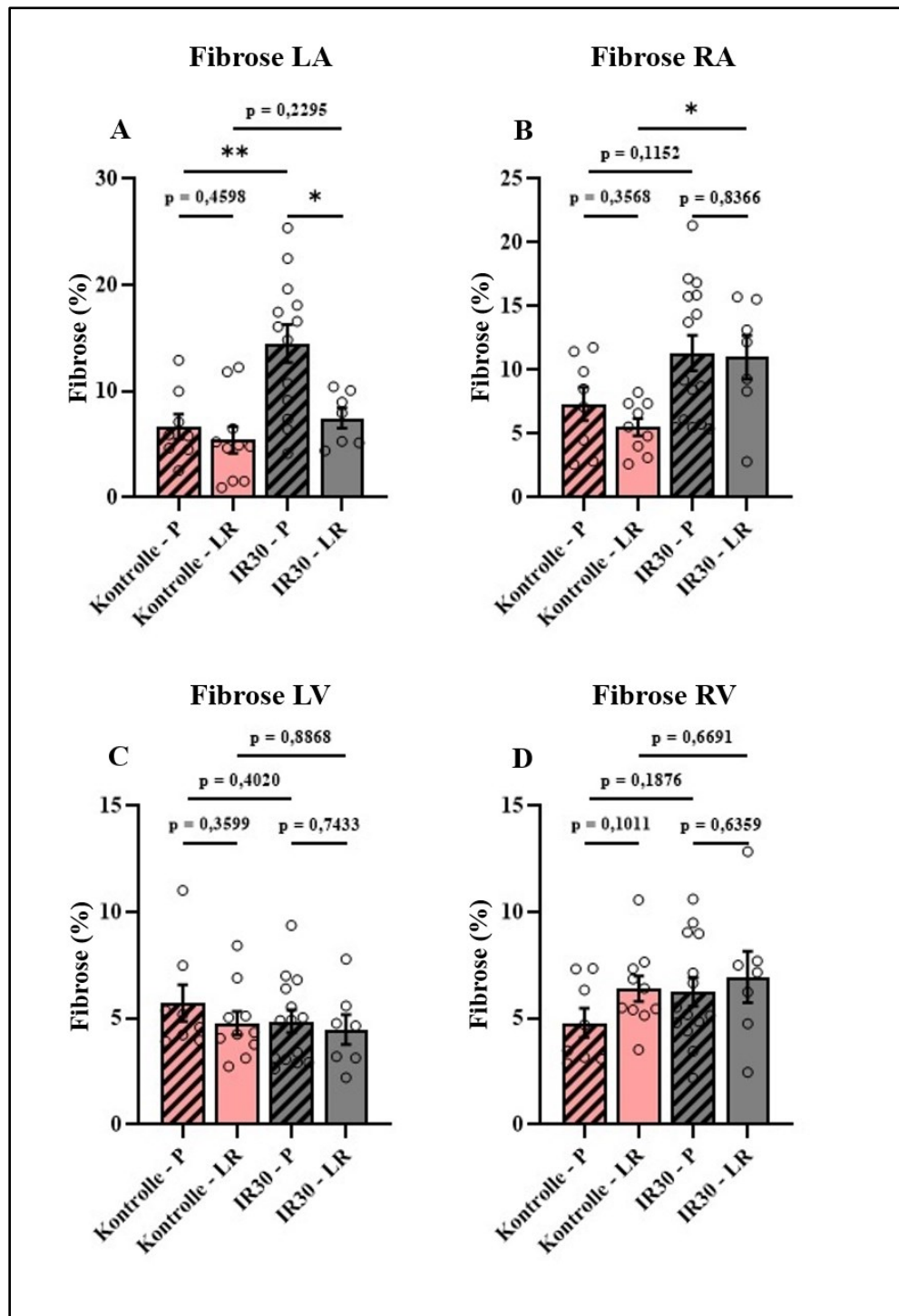


Abb. 36. Quantifizierung der Fibrose nach genetischem Hintergrund. Masson-Goldner-Trichrom-Färbung A. Fibrose im LA; B. Fibrose im RA; C. Fibrose im LV; D. Fibrose im RV, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

4.3.6 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Quantifizierung aktivierter Myofibroblasten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies galt sowohl für linken und rechten Vorhof (α -SMA-positive Zellen LA Kontrolle-P: $9,67 \pm 1,24$ %; Kontrolle-LR: $12,96 \pm 2,31$ %;

IR30-P: $11,10 \pm 1,64$ %; IR30-LR: $11,44 \pm 0,79$ %; **α -SMA-positive Zellen RA** Kontrolle-P: $10,54 \pm 1,63$ %; Kontrolle-LR: $9,94 \pm 1,82$ %; IR30-P: $13,86 \pm 0,81$ %; IR30-LR: $15,20 \pm 0,62$ %) als auch für linken und rechten Ventrikel (**α -SMA-positive Zellen LV** Kontrolle-P: $8,45 \pm 2,66$ %; Kontrolle-LR: $12,91 \pm 2,15$ %; IR30-P: $11,92 \pm 1,84$ %; IR30-LR: $13,17 \pm 2,82$ %; **α -SMA-positive Zellen RV** Kontrolle-P: $8,48 \pm 0,86$ %; Kontrolle-LR: $10,62 \pm 1,54$ %; IR30-P: $10,53 \pm 1,77$ %; IR30-LR: $9,90 \pm 2,47$ %) (Abb. 37).

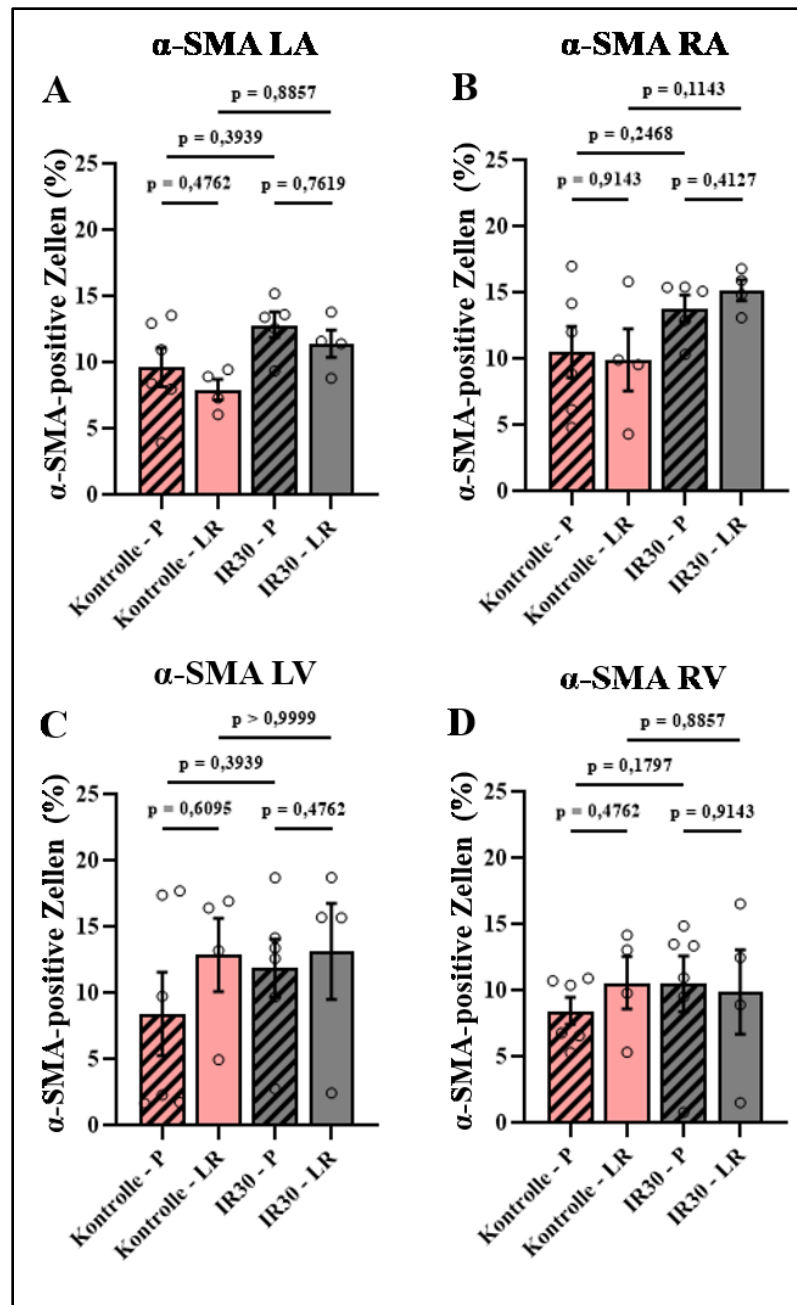


Abb. 37. Quantifizierung der Myofibroblasten (α -SMA-positive Zellen) nach Rasse. **A.** Anteil der aktivierten Myofibroblasten im LA; **B.** Anteil der aktivierten Myofibroblasten im RA; **C.** Anteil der aktivierten Myofibroblasten im LV; **D.** Anteil der aktivierten Myofibroblasten im RV, jeweils Mann-Whitney-Test.

4.3.7 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Bei den untersuchten ECM-kodierenden Genen zeigten sich bei Kollagen Typ 1 α 1 (*COL1A1*), Fibronektin (*FN*) und Matrix Metalloproteinase 2 (*MMP2*) signifikante Unterschiede: bei IR30-Schweinen mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund zeigte sich Fibronektin im linken Vorhof signifikant erhöht (*FN LA* Kontrolle-P versus IR30-P, *p=0,0352; Kontrolle-P versus Kontrolle-LR, *p=0,0360, **Abb. 38-C, Tab. 4**). Bei IR30-Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund zeigten sich hingegen *MMP2* im linken Vorhof (*MMP2 LA* Kontrolle-LR versus IR30-LR, *p=0,0360, **Abb. 38-E, Tab. 4**) sowie *COL1A1* im rechten Vorhof signifikant reduziert (*COL1A1 RA*: Kontrolle-LR versus IR30-LR, *p=0,0164, IR30-P versus IR30-LR, **p=0,0051, **Abb. 38-B, Tab. 4**).

Auch in den Subgruppen war die Expression von α -Smooth-Muscle-Aktin (α -*SMA*) bei den IR30-Tieren im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert. Fibroblast Specific Protein 1 (*FSP1*) zeigte hingegen im linken Vorhof bei IR30-Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund eine signifikant reduzierte Expression im Vergleich zu den Kontrollen (*FSP1 LA*: Kontrolle-LR versus IR30-LR *p=0,0330) (**Abb. 39, Tab. 4**).

Die Expressionsanalyse profibrotischer Signalkaskaden zeigte bei Kontroll-Schweinen mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund eine höhere Expression von Transforming Growth Factor- β (*TGF- β*) in beiden Vorhöfen, wobei der Unterschied im rechten Vorhof statistisch signifikant war (*TGF- β RA*: Kontrolle-P versus Kontrolle-LR, *p=0,0185, **Abb. 40-D**) und im linken Vorhof lediglich einen nicht-signifikanten Trend darstellte (p=0,0831, **Abb. 40-C**). Bei diesen Tieren war die Expression von Transforming Growth Factor- β nach Myokardischämie in beiden Vorhöfen deutlich herunterreguliert, auch hier ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied im rechten Vorhof (*TGF- β RA*: Kontrolle-LR versus IR30-LR, **p=0,0017, IR30-P versus IR30-LR, *p=0,0365, **Abb. 40-D, Tab. 4**) sowie ein nicht-signifikanter Trend im linken Vorhof (p=0,2281, **Abb. 40-C, Tab. 4**).

Zudem zeigte sich bei Schweinen mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund im rechten Vorhof eine signifikant reduzierte Expression von Mitogen-aktivierter Proteinkinase 8 (*MAPK8 LA* Kontrolle-P versus Kontrolle-LR, ***p=0,0006, Kontrolle-P versus IR30-P, *p=0,0194, Kontrolle-LR versus IR30-LR, **p=0,0016; *MAPK8 RA* Kontrolle-LR versus IR30-LR, *p=0,0256, IR30-P versus IR30-LR, *p=0,0365, **Abb. 40-I und J, Tab. 4**). ROR2 zeigte sich hingegen bei IR30-Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund im linken Vorhof signifikant geringer exprimiert (*ROR2 LA* Kontrolle-LR versus IR30-LR, *p=0,0402, IR30-P versus IR30-LR, **p=0,0063, **Abb.**

40-G, Tab. 4). Die Expression von ROR1 im linken Vorhof unterschied sich lediglich zwischen den beiden Kontrollgruppen und zeigte eine höhere Expression bei Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund, im Vergleich zu den jeweiligen IR30-Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (**ROR1 LA** Kontrolle-**P** versus Kontrolle-**LR**, * $p=0,0117$, **Abb. 40-E, Tab. 4).** Bei IR30-Tieren mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund konnte hingegen eine signifikante Hochregulation von MAPK8 im linken Vorhof nachgewiesen werden (**MAPK8 LA** Kontrolle-**P** versus Kontrolle-**LR**, *** $p=0,0006$, Kontrolle-**P** versus IR30-**P**, * $p=0,0194$, Kontrolle-**LR** versus IR30-**LR**, ** $p=0,0016$, **Abb. 40-I; MAPK8 RA** Kontrolle-**LR** versus IR30-**LR**, * $p=0,0256$, IR30-**P** versus IR30-**LR**, * $p=0,0365$, **Abb. 40-J, Tab. 4).** Bei *CCN2* und *cJUN* wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen IR30- und Kontrollgruppen festgestellt. Zur besseren Übersicht wurde eine Zusammenfassung der Genexpressionsanalyse in **Tab. 4** zusammengestellt.

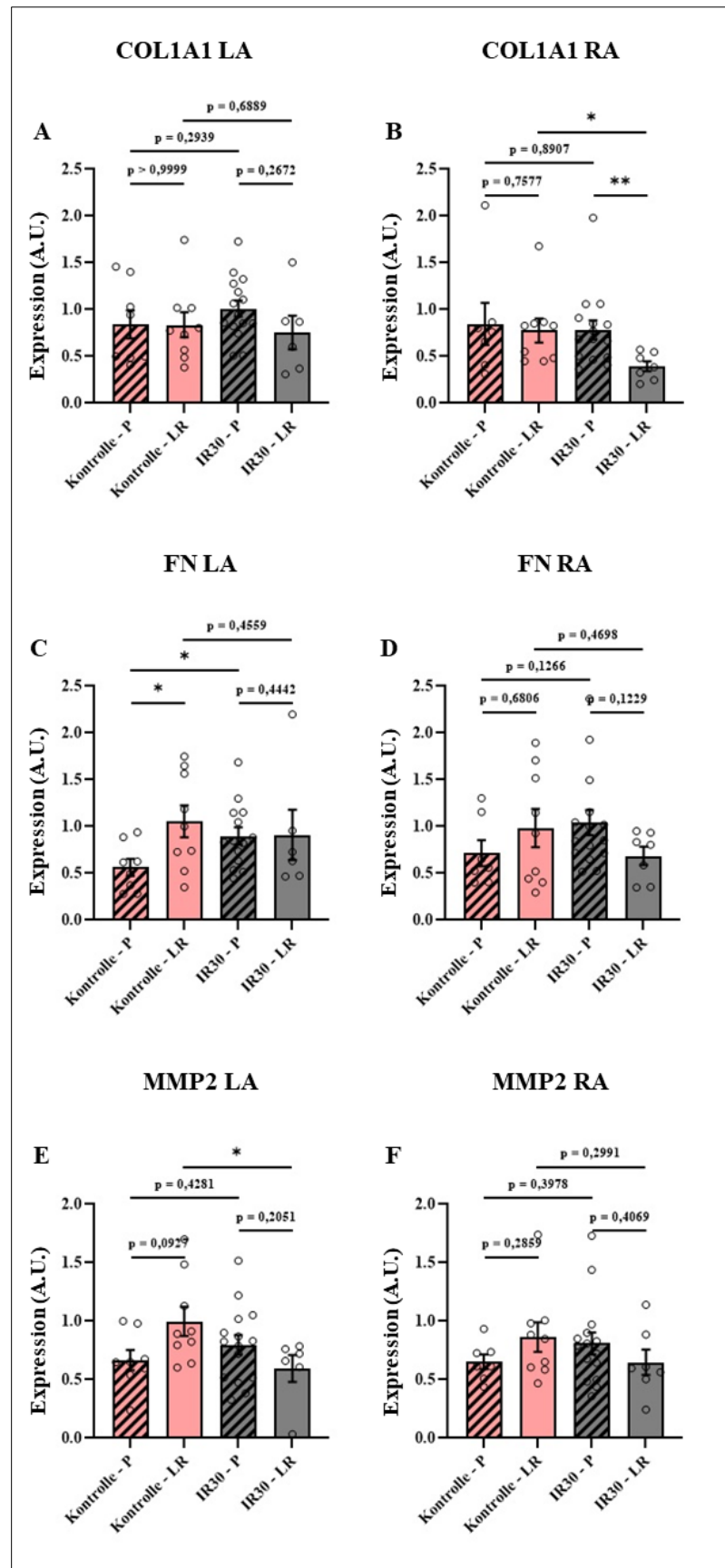


Abb. 38. Genexpressionsanalyse der ECM-Gene nach Rasse. A. Kollagen Typ 1 α 1 (*COL1A1*)-Expression im LA; **B.** Kollagen Typ 1 α 1 (*COL1A1*)-Expression im RA; **C.** Fibronektin (*FN*)-Expression im LA; **D.** Fibronektin (*FN*)-Expression im RA; **E.** Gelatinase (*MMP2*)-Expression im LA; **F.** Gelatinase (*MMP2*)-Expression im RA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

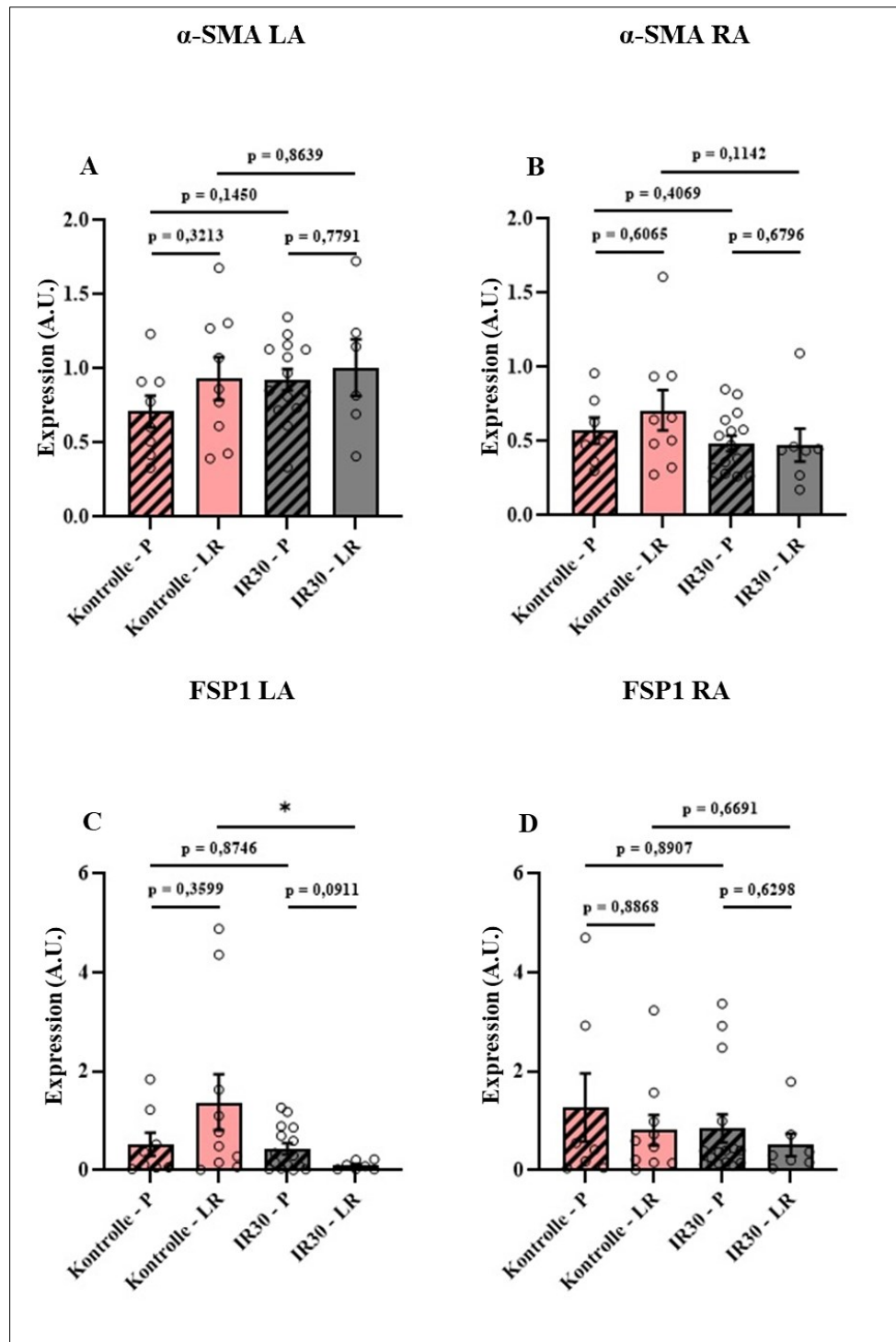


Abb. 39. Genexpressionsanalyse der Myofibroblasten- und Fibroblastenmarker nach Rasse. A. α -Smooth-Muscle-Aktin (α -SMA)-Expression im LA; **B.** α -Smooth-Muscle-Aktin (α -SMA)-Expression im RA; **C.** Fibroblast-specific protein 1 (*FSP1*)-Expression im LA, **D.** Fibroblast-specific protein 1(*FSP1*)-Expression im RA, jeweils Mann-Whitney-Test.

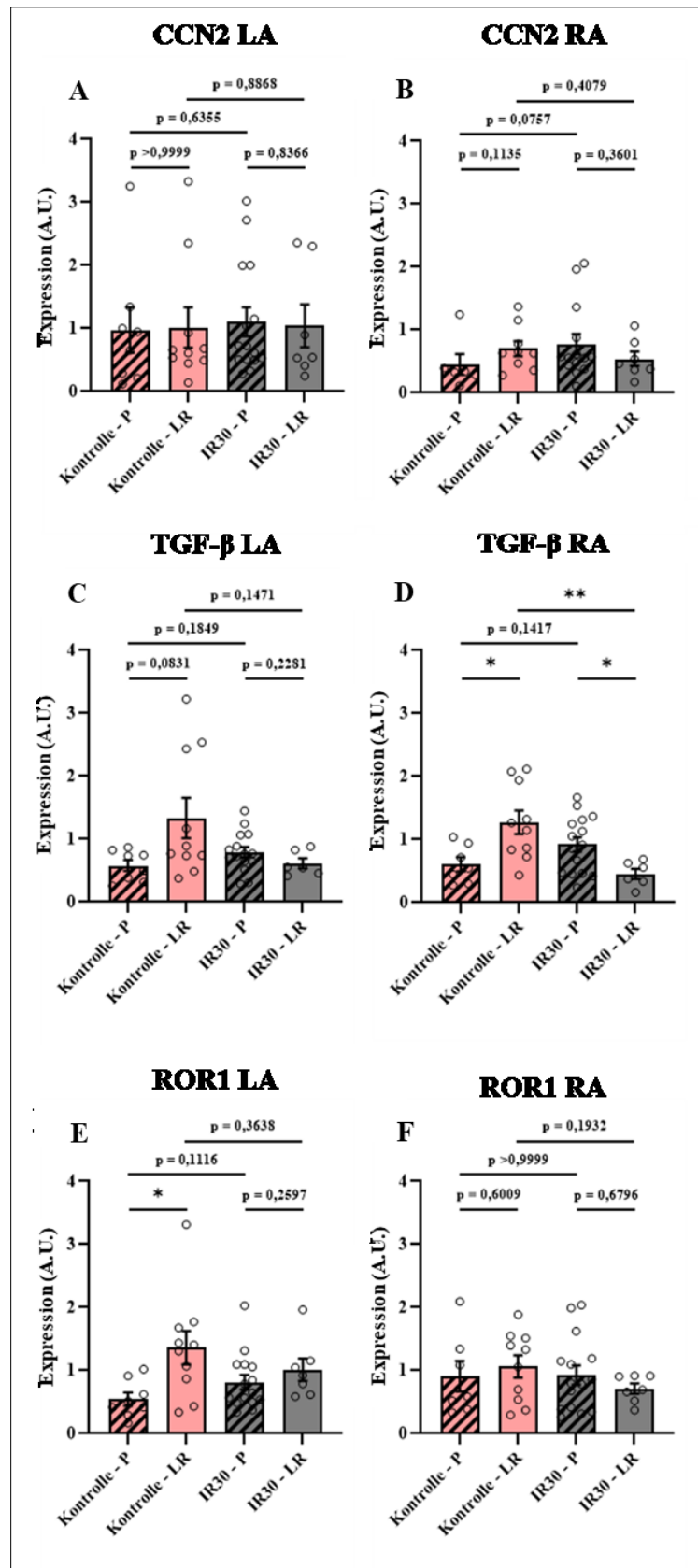


Abb. 40. Expressionsanalyse der Regulatorengene und Signalwege nach Rasse (Teil1).

A. Connective Tissue Growth Factor (*CCN2*)-Expression im LA; B. Connective Tissue Growth Factor (*CCN2*)-Expression im RA; C. Transforming Growth Factor- β (*TGF- β*) Expression im LA; D. Transforming Growth Factor- β (*TGF- β*)-Expression im RA; E. Rezeptor-Tyrosinkinase 1 (*ROR1*)-Expression im LA; F. Rezeptor-Tyrosinkinase 1 (*ROR1*)-Expression im RA, jeweils Mann-Whitney-Test.

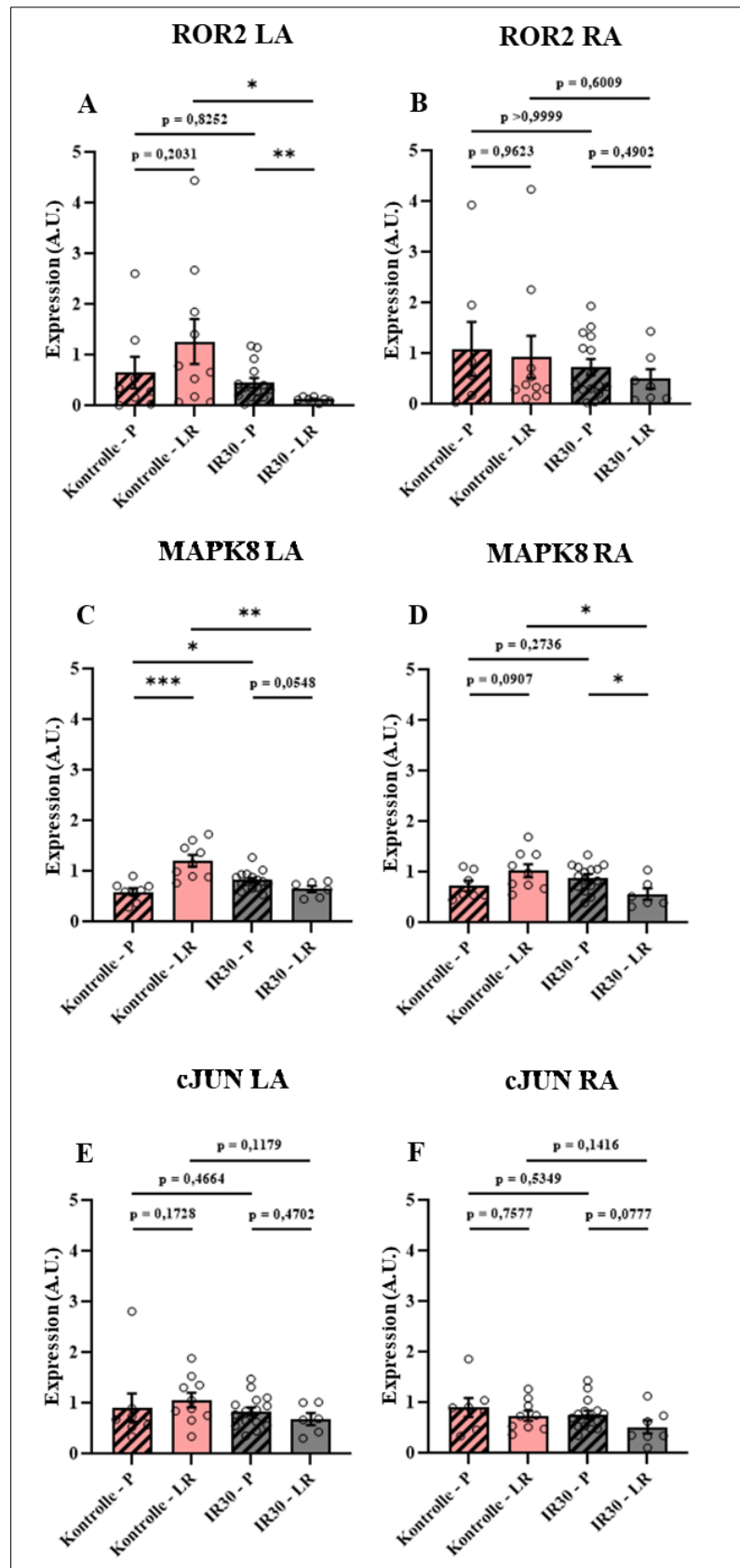


Abb. 41. Expressionsanalyse der Regulatorgene und Signalwege nach Rasse (Teil2).

A. Rezeptor-Tyrosinkinase 2 (*ROR2*)-Expression im LA; **B.** Rezeptor-Tyrosinkinase 2 (*ROR2*)-Expression im RA; **C.** Mitogen-aktivierte Proteinkinase 8 (*MAPK8*)-Expression im LA; **D.** Mitogen-aktivierte Proteinkinase 8 (*MAPK8*)-Expression im RA; **E.** *cJUN*-Expression im LA; **F.** *cJUN*-Expression im RA, jeweils Mann-Whitney-Test.

Gen	mehrheitlich Pietrain		mehrheitlich Deutsche Landrasse	
	Expression	Effekt	Expression	Effekt
Linker Vorhof				
ECM-Gene	<i>COL1A1</i>	–	–	–
	<i>FN</i>	↑	profibrotisch	–
	<i>MMP2</i>	–	–	↓ antifibrotisch
(Myo-) Fibroblasten	<i>α-SMA</i>	–	–	–
	<i>FSP1</i>	–	–	↓ antifibrotisch
Profibrotische Signalkaskade	<i>CCN2</i>	–	–	–
	<i>TGF-β</i>	(↑)	(profibrotisch)	↓ antifibrotisch
	<i>ROR1</i>	(↑)	(profibrotisch)	(↓) (antifibrotisch)
	<i>ROR2</i>	–	–	(↓) (antifibrotisch)
	<i>MAPK8</i>	↑	(profibrotisch)	↓ antifibrotisch
	<i>cJUN</i>	–	–	(↓) (antifibrotisch)
Rechter Vorhof				
ECM-Gene	<i>COL1A1</i>	–	–	↓ antifibrotisch
	<i>FN</i>	↑	profibrotisch	(↓) (antifibrotisch)
	<i>MMP2</i>	–	–	–
(Myo-) Fibroblasten	<i>α-SMA</i>	–	–	–
	<i>FSP1</i>	–	–	–
Profibrotische Signalkaskade	<i>CCN2</i>	(↑)	profibrotisch	(↓) (antifibrotisch)
	<i>TGF-β</i>	(↑)	profibrotisch	↓ antifibrotisch
	<i>ROR1</i>	–	–	(↓) (antifibrotisch)
	<i>ROR2</i>	–	–	–
	<i>MAPK8</i>	(↑)	profibrotisch	↓ antifibrotisch
	<i>cJUN</i>	–	–	(↓) (antifibrotisch)

Tab. 4. Zusammenfassung der Genexpressionsanalyse. Signifikante Hochregulation (↑) und Runterregulation (↓), bzw. Trends in Klammern.

5 DISKUSSION

5.1 Wahl der Tierart

Das Schwein als Modellorganismus hat in der kardiovaskulären Forschung in den letzten Jahrzehnten weiter an Bedeutung gewonnen (Swindle et al., 2012, Clauss et al., 2019, Schüttler et al., 2020). In puncto Elektrophysiologie ist es hinsichtlich translationaler Aspekte Nagetiermodellen überlegen. So unterscheiden sich die elektrophysiologischen Eigenschaften und Mechanismen der Arrhythmogenese bei Mäusen wesentlich von denen beim Menschen, nicht nur aufgrund von anatomischen Unterschieden in der Herzgröße und gravierenden Unterschieden in der Ruheherzfrequenz (Clauss et al., 2019). Auch die Ionenkanalexpression ist markant anders, wodurch es zu einer veränderten Form und Dauer des Aktionspotentials kommt (Kaese and Verheule, 2012). Für elektrophysiologische Untersuchungen braucht man im Kleintiermodell spezielles Equipment, denn die für die menschliche EPU verwendeten Multielektrodenkatheter, Herzschrittmacher oder ähnliches können für Mausstudien nicht angewandt werden (Schüttler et al., 2020, Clauss et al., 2019). Eine hochauflösende intrakardiale Kartierung (High Density Mapping), die bei elektrophysiologischen Studien und Ablationen in der Humanmedizin zur Routine gehören, sind im Nagetiermodell nicht durchführbar (Schüttler et al., 2020). Schweine sind hinsichtlich der elektrophysiologischen Eigenschaften dem Menschen sehr ähnlich (Schüttler et al., 2020). Vorteile des Schweins sind zusätzlich ihre dem Menschen ähnliche Herz- und Koronaranatomie. Hierbei sind sie dem Hund überlegen, der ein ausgeprägtes Kollateralsystem zwischen den Versorgungsbereichen der einzelnen Koronararterien aufweist (Swindle et al., 2012). Das EKG und auch die Aktionspotentiale haben große Ähnlichkeit zum Menschen, da Schweine fast alle menschlichen Ionenkanäle exprimieren (Schüttler et al., 2020, Clauss et al., 2019), wodurch auch die Untersuchung der Pathophysiologie von Rhythmusstörungen im Schweinmodell eine verlässliche Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus bietet. Auch die Durchführung von Experimenten bei Schweinen erfordert wenig spezielles Equipment, da aufgrund der Größe und Anatomie mit humanmedizinischer Standardausrüstung gearbeitet werden kann (Clauss et al., 2019). In den letzten Jahren konnten zudem durch Fortschritte im „*genome editing*“ auch zuverlässig genetisch veränderte Schweine generiert werden (Wolf et al., 2019, Aigner et al., 2010), wodurch

nun auch spezielle Arrhythmie-Modelle möglich werden (Park et al., 2015). Hinzu kommt, dass in den meisten Ländern die Verwendung von Schweinen für Forschungszwecke im Vergleich zu anderen Großtieren ethisch und gesellschaftlich besser akzeptiert ist (Clauss et al., 2019, Schüttler et al., 2020). Das Schwein bietet sich speziell für das in dieser Arbeit verwendete Modell der Ischämischen Herzinsuffizienz im Besonderen an, da die Anatomie der Koronargefäße ähnlich wie beim Menschen ist (Swindle et al., 2012). Hinzu kommt, dass sich die kardialen und systemischen metabolischen Eigenschaften von Menschen und Schweinen ähneln. Zwar ist es im ICM-Modell beim Schwein von Nachteil, dass Schweine eine etwas geringere koronare Kollateralisierung aufweisen, wodurch sie während des Koronarverschlusses einem erhöhten Risiko für Kammerflimmern ausgesetzt sind (Clauss et al., 2019), was die notwendigen Versuchstierzahlen durch vermehrte Todesfälle beim Erzeugen der ICM erhöhen kann (Schüttler et al., 2020). Allerdings überwiegen die hervorragenden anatomischen, hämodynamischen und elektrophysiologischen Eigenschaften. Zusammenfassend erscheint das Schwein daher der ideale Modellorganismus für die Untersuchung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit zu sein.

5.2 Wahl des Tiermodells

Da die Pathophysiologie von VHF ein multifaktorielles Geschehen darstellt, wurden dementsprechend viele verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Ansätzen bzw. Triggern für VHF entwickelt (Clauss et al., 2020). Die Mehrheit der VHF-Modelle verwendet atriales Tachypacing mit speziell angefertigten Schrittmachern, um ein Substrat für VHF hervorzurufen. Schon 1995 zeigten Wijffels et al. bei der Ziege, dass Tachykardie-induziertes Remodeling ein zugrunde liegender Mechanismus für VHF ist (Wijffels et al., 1995). Bisher wurden Tachypacing-Modelle bei Ziegen, Schafen, Kaninchen, Hunden und Schweinen etabliert, in denen erfolgreich VHF induziert werden konnte (Clauss et al., 2019). Nichtsdestotrotz haben diese atrialen Tachypacing-Modelle Einschränkungen, wie etwa die Notwendigkeit, die AV-Überleitung interventionell oder medizinisch zu verlangsamen, um das Einsetzen einer Tachymyopathie als möglichen Störauslöser zu verhindern (Clauss et al., 2020). Daneben gibt es auch ventrikuläre Tachypacingmodelle, die über die ventrikuläre tachykarde Stimulation eine Herzinsuffizienz auslösen und darüber zu sekundärem atrialen Remodelling mit Auftreten von VHF führen. Im Menschen ist eine primäre atriale Tachykardie jedoch eher selten der Auslöser für VHF, so dass die Forschungsergebnisse aus den atrialen Tachypacing-Modellen nur mit Vorsicht auf die

Mehrheit der Patienten mit VHF übertragbar sind. Dagegen gehört im Menschen die Myokardischämie zu den häufigsten Ursachen für VHF (Benjamin et al., 1994). Bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie können typischerweise morphologische Veränderungen wie eine linksatriale Dilatation beobachtet werden (Meris et al., 2009). Diese atrialen Veränderungen treten sekundär aufgrund einer gestörten Hämodynamik in ischämischen Ventrikeln unabhängig von atrialer Ischämie auf (Asanin et al., 2006). Eine natürliche Folge des akuten Myokardinfarkts ist die Infiltration von Leukozyten, die das Gebiet von abgestorbenen Zellen befreien und entzündungshemmende Mediatoren freisetzen. Die anschließende Unterdrückung der Entzündungsreaktion ist mit der Aktivierung von reparativen Zellen verbunden. Fibroblasten proliferieren, unterliegen einer Myofibroblasten-Transdifferenzierung und produzieren große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Es kommt zur interstitiellen Fibrose, die aber wiederum die elektrische Leitfähigkeit der Herzmuskelzellen beeinträchtigt und somit zur Arrhythmogenese beiträgt (Saffitz, 2000). Da die ischämische Kardiomyopathie daher stark mit VHF assoziiert ist, wurde das Modell der ischämischen Kardiomyopathie im Schwein auch vor dem Hintergrund einer möglichst guten und breiten Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen auf den Menschen gewählt.

5.3 Phänotypisierung des Modells

Bei dem hier verwendeten Modell der ischämischen Kardiomyopathie (ICM) entwickeln die Schweine nach einem induzierten Myokardinfarkt eine ICM, die charakteristische und dem Menschen ähnliche Veränderungen der hämodynamischen Parameter erwarten lässt (Clauss et al., 2020). Diese Veränderungen basieren auf Kompensationsmechanismen des Körpers, um den Kreislauf weiter stabil zu halten und ein ausreichendes Herzzeitvolumen zu ermöglichen. Normalerweise erreicht das Herz über eine Zunahme der (diastolischen) Dehnung des Muskels z.B. durch mehr Volumen, über den Frank-Starling-Mechanismus eine kräftigere, systolische Kontraktion. Das insuffiziente Herz zeigt eine Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurve mit Abnahme der Compliance, vermindertem Schlagvolumen, erhöhten enddiastolischen Drücken und ineffektivem Frank-Starling-Mechanismus. Eine Steigerung der Druckentwicklung wird hier nur durch eine überproportionale Zunahme der Vorlast (Druck bzw. Volumen zur Enddiastole) erreicht, was zu einer weiteren Dilatation des

Ventrikels beiträgt. Bei der IR30-Gruppe konnte folglich mit einer verminderten Auswurfsleistung (EF) und einer Zunahme des LVEDP gerechnet werden (Claus et al., 2020). Beides zeigte sich im Vergleich zwischen Kontroll- und IR30-Gruppe sowohl in der Gesamtkohorte als auch nach Einteilung entsprechend des genetischen Hintergrunds signifikant verändert. Bei den weiteren hämodynamischen Messungen beobachteten wir ausschließlich beim Lungenkapillaren-Verschlussdruck (PCWP) noch eine signifikante Zunahme beim Vergleich von IR30-Tieren mit Kontrollen beider Rassen als Indikator der linksventrikulären Vorlast bzw. des linksatrialen Drucks (van Daele et al., 1990). Dieser Druck spiegelt den Druck im linken Vorhof indirekt wider und zeigt somit eine Druckbelastung des linken Vorhofs bei den ICM-Schweinen an.

Für die Untersuchung proarrhythmischer Mechanismen ist es entscheidend, dass das gewählte Modell auch einen arrhythmischen Phänotyp aufweist. Sowohl in der Gesamtkohorte wie auch nach der Einteilung entsprechend des genetischen Hintergrunds war bei IR30-Tieren beider Gruppen (mehrheitlich Pietrain und mehrheitlich Landrasse) die Induzierbarkeit von VHF pro Schwein im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Zusätzlich führte eine signifikant höhere Anzahl von Bursts zu VHF bei den IR30-Tieren. Zudem waren die durchschnittliche Dauer der einzelnen Episoden und die VHF-Gesamtlast bei diesen Tieren deutlich erhöht, so dass in der Summe ein relevanter arrhythmischer Phänotyp vorlag.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Okklusion der LAD bei den IR30-Gruppen eine relevante ICM erfolgreich induziert werden konnte, wodurch paroxysmales VHF ausgelöst werden konnte. Das Modell spiegelt somit die Erkrankung im Menschen gut wider, so dass man annehmen darf, dass auch die proarrhythmogenen Mechanismen im Schwein und Menschen ähnlich sind. Untersucht wurde im Weiteren, welche Mechanismen für die Entstehung dieses Phänotyps verantwortlich sein könnten.

5.4 Elektrisches Remodeling

„Atrial fibrillation begets atrial fibrillation“ ist eine plakative Zusammenfassung einer Studie an Ziegen, in der Wijffels et al. zeigen konnten, dass VHF selbst Veränderungen in der Elektrophysiologie des Vorhofmyokards bedingt und dadurch zur erneuten Entstehung bzw. weiteren Aufrechterhaltung von VHF beiträgt (Wijffels et al., 1995). In diesem Modell führt das durch atriales Tachypacing aufrechterhaltene VHF zu einer

Verkürzung der atrialen Refraktärperiode. Ursächlich sind hier induzierte Änderungen in der Ionenkanal-Expression beschrieben. Insbesondere Calcium spielt eine grundlegende Rolle sowohl bei der Induktion als auch bei der Aufrechterhaltung von VHF (Allessie et al., 2002). Die ausgelösten Störungen der Calciumhomöostase tragen dabei zur Entstehung ektooper Foci bei (Nattel et al., 2008). Durch einen zellulären Ca^{2+} -Overload und die gesteigerte Aktivität des Natrium-Calcium-Austauschers werden verspätete Nachdepolarisationen erzeugt, die zur Entstehung dieser hochfrequenten ektooper Foci führen (Nattel et al., 2008). Bei der elektrophysiologischen Untersuchung unserer Gesamtkohorte zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der atrialen effektiven Refraktärperiode (AERP) zwischen Kontroll- und IR30-Gruppe. Eine Verkürzung der AERP, wie sie beim erwähnten atrialen Tachypacingmodell nachweisbar war, ließe ein elektrisches Remodeling vermuten und wäre eine Erklärung für die Induzierbarkeit von VHF, scheint allerdings im verwendeten Modell kein wesentlicher Mechanismus zu sein, auch wenn dies mit letzter Sicherheit nur durch aufwändige zelluläre Untersuchungen wie z.B. Patch-Clamp-Untersuchungen abschließend beurteilbar ist. Da die EPU keine Hinweise auf elektrisches Remodeling lieferte, wurde das strukturelle Remodeling näher untersucht.

5.5 Strukturelles Remodeling

Die Ausbildung einer Fibrose ist die Hauptfolge des sog. strukturellen Remodelings, welches eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie von VHF spielt (Clauss et al., 2020, Burstein and Nattel, 2008b, Yamaguchi et al., 2022). Vorhoffibrose resultiert aus einer Dysregulation der extrazellulären Matrix (ECM) mit übermäßiger Ablagerung von fibrillärem Kollagen, beispielsweise als Reaktion auf einen Herzinfarkt bei der Ratte (Cleutjens et al., 1995). In einem Tachypacingmodell für VHF beim Hund konnte ebenfalls ein strukturelles Remodelling festgestellt werden (Weber et al., 1990), wobei beim Hund die Vorhöfe empfindlicher mit Fibroseentwicklung reagierten als die Ventrikel (Hanna et al., 2004). Vorhoffibrose produziert durch die Unterbrechung der Faserbündelkontinuität ein vulnerables Substrat, das die Entstehung von VHF begünstigt, verursacht lokale Überleitungsstörungen und fördert eine ungleichmäßige anisotrope Überleitung (Nattel and Harada, 2014). Heutzutage wird in der Humanmedizin ein bipolares Voltage Mapping eingesetzt, um das Substrat im linken Vorhof zu definieren (Yamaguchi et al., 2022) und schon im Vorfeld eine Einschätzung

des Erfolgs einer Katheterablation geben zu können (Marrouche et al., 2014). Die vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix im Herzen ist assoziiert mit fast allen Arten von Herzkrankheiten, einschließlich der ICM, Hypertension, Diabetes mellitus und Herzklappenerkrankungen (Cowling et al., 2019). Trotz der klaren Assoziation von Fibrose mit Herzerkrankungen und der pathologischen Auswirkungen auf die Herzphysiologie, ist es immer noch nicht klar, wann Kollagenablagerungen konkret als pathologisch zu erachten sind und zu Krankheitssymptomen führen. Im Gegensatz zur reparativen Fibrose ist die reaktive Fibrose durch diffuse Ablagerungen von Kollagen im gesamten Myokard gekennzeichnet (Cowling et al., 2019). Sie tritt unabhängig von abgestorbenen Zellen auf und kann durch profibrotische Mediatoren stimuliert werden. Die zwei Formen der Fibrose treten wahrscheinlich auch bei vielen Patienten gleichzeitig auf. Ein Beispiel dafür ist das Herz nach akutem Myokardinfarkt, wo zusätzlich zur reparativen Fibrose auch eine diffuse reaktive Fibrose in Segmenten des Myokards auftritt, die weit von der Infarktzone entfernt sind (Beltrami et al., 1994). Die Ablagerung von ECM im gesamten Herzen kann dann eine Prädisposition für Arrhythmien liefern, beispielsweise durch eine Erleichterung von Reentry-Kreisläufen (Gaborit et al., 2010). Insbesondere Fibrose im Bereich der Vorhofwand ist klar an der Entwicklung von Vorhofflimmern beteiligt (Lau et al., 2017, Nattel, 2017, Dawson et al., 2013).

Unsere histologischen Analysen zeigten eine erhöhte Fibrose im linken Vorhof als ein strukturelles Korrelat der Leitungsheterogenität, das höchstwahrscheinlich die Entstehung von Arrhythmien erleichtert. Da wir keine elektrischen Veränderungen fanden, scheint der strukturelle Umbau, der mutmaßlich sekundär aufgrund einer veränderten Hämodynamik mit erhöhtem Vorhofdruck (PCWP erhöht) und einer daraus resultierenden Vorhoffibrose entsteht, eine Schlüsselrolle bei der Erzeugung eines frühen arrhythmogenen Vorhofsubstrats für VHF nach einem selektiven, ventrikulären Myokardinfarkt zu spielen. Dies könnte beispielsweise durch den Mechanosensor YAP vermittelt werden. Dieser ist bei Mäusen mit Infarkt hochreguliert und fördert die Transkription von Myokardin-related Transcription actor A, wodurch die Myofibroblasten-Differenzierung und Expression der extrazellulären Matrix-Gene verstärkt werden (Francisco et al., 2020). Der erhöhte enddiastolische Druck bei den IR30-Tieren könnte diesen Mechanosensor aktiviert haben und somit zur Entstehung der Fibrose beigetragen haben. Allerdings sind weitere funktionelle Untersuchungen hierzu nötig, um diesen möglichen Mechanismus zu bestätigen.

Aktivierte Myofibroblasten spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der interstitiellen Fibrose, indem sie ECM-Proteine produzieren (Frangogiannis, 2021, Calderone et al., 2006, Takahashi et al., 2012). Das Ergebnis der Histologie sollte daher mittels Immunfluoreszenzfärbung des Myofibroblastenmarkers α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) bekräftigt werden (Wang et al., 2017). Hierfür wurde die Expression von α -SMA-positiven Zellen beurteilt, um die Anzahl der aktivierten Myofibroblasten zu bestimmen. In beiden Vorhöfen war der Anteil der α -SMA-positiven Zellen signifikant erhöht. Dieses Resultat geht einher mit erhöhter Fibrose, unterstützt die These des strukturellen Remodeling als vorherrschenden Mechanismus in diesem Modell und legt nahe, dass aktivierte Myofibroblasten an der Entstehung des fibrotischen Substrats beteiligt sind.

Um diese Ergebnisse weiter zu analysieren, wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die für Matrixproteine und profibrotische Mediatoren kodieren und bisher im Zusammenhang mit Fibrosebildung beschrieben wurden und schließlich mit Hilfe von Real-Time-qPCRs untersucht.

Vorhoffibrose ist gekennzeichnet durch eine reichliche Ansammlung von Matrixproteinen im extrazellulären Raum, erhöhte Expression von profibrotischen Zytokinen (z. B. Transforming Growth Factor, TGF- β) und α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) und gleichzeitig stärker ausgeprägter Expression von Kollagen I und III (COL1A und COL3A) (Burstein and Nattel, 2008a, Duprez et al., 2018). Den weitaus größten Anteil der ECM-Komponenten machen Kollagen Typ I und III aus (Cowling et al., 2019, Speiser et al., 1991). Fibronectin (FN) wird für die Ablagerung der Kollagenmatrix benötigt und ist ein Schlüsselfaktor für die gesteigerte Anzahl an aktivierten Myofibroblasten nach einer kardialen Verletzung (Valiente-Alandi et al., 2018). Bei Herzinsuffizienzpatienten mit und ohne VHF wurde gleichfalls festgestellt, dass FN in der Gruppe mit VHF signifikant hochreguliert war (Molina et al., 2018). FN war ebenfalls in den Vorhöfen von Patienten mit VHF hochreguliert (Rücker-Martin et al., 2002). Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind hauptsächlich für den Abbau der ECM zuständig (Woessner, 1991). Es gibt jedoch MMPs, die sowohl anti- als auch profibrotisch wirksam sein können. Die Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) zum Beispiel setzt den Transforming Growth Factor beta (TGF- β) frei und induziert dadurch über verschiedene Kaskaden die Kollagensynthese (Fan et al., 2012). Auch Kardiomyozyten sind eine wichtige Quelle für fibrotische Regulatoren wie TGF- β , die als Reaktion auf einen spezifischen Umweltstress exprimiert werden (Hu et al., 2007).

Erhöhte Werte von TGF- β gelten als Biomarker für das VHF-Risiko (Tsioufis et al., 2019). TGF- β reguliert auch den Connective Tissue Growth Factor 2 (CCN2) hoch, der ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung profibrotischer Reaktionen spielt (Tejeras-Muñoz et al., 2021), die Produktion von ECM-Proteinen fördert und MyoFB aktiviert (Lipson et al., 2012). Durch TGF- β wird außerdem der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK8)-Signalweg aktiviert, der wiederum den myokardialen Umbau der ECM induziert (Petrich et al., 2004). cJUN ist ein nachgeschalteter Effektor im MAPK8-Signalweg (Wang et al., 2021) und trägt zusammen mit MAPK8 ebenfalls zur Differenzierung von Fibroblasten zu MyoFB bei (Leppä and Bohmann, 1999). Xu et al. konnte zeigen, dass MAPK8 bei Herzerkrankungen wie Arrhythmien und Myokardverletzung erhöht exprimiert ist (Xu et al., 2020). Die Rezeptor-Tyrosinkinase ROR2 ist Bestandteil eines weiteren Signalwegs, über den cJUN/MAPK8 aktiviert werden kann (Edwards et al., 2020). ROR2 kann wie ROR1 dazu beitragen, kardiale Fibroblasten zu aktivieren (Chavkin et al., 2021). In dieser Arbeit wurden all diese Komponenten der ECM, Regulatoren und Mediatoren genauer untersucht.

Bei der Genexpressionsanalyse konnten im Vergleich der Kontroll- und IR30-Gruppe keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Dieses Ergebnis überrascht, da eine vermehrte Fibrose wie beschrieben auf einer Umstrukturierung der extrazellulären Matrix beruht. Mögliche Erklärung könnte sein, dass die Genregulation vielleicht bereits abgeschlossen war und der richtige Zeitpunkt verpasst worden ist. Dazu wäre es interessant, Untersuchungen auf Proteinebene durchzuführen, um dort potentielle Veränderungen aufzudecken. Möglich wäre auch, dass die Regulationen zellspezifisch ablaufen und durch den Umstand, dass eine Mischpopulation an Zellen untersucht wurde, die Unterschiede nicht ermittelt werden konnten. Trotzdem überrascht es, dass man bei keinem der Komponenten einen Unterschied feststellen konnte. Bei genauerer Analyse der Fibrose fiel jedoch auf, dass es auch in der IR30-Gruppe Tiere gab, bei denen trotz signifikanter ICM keine vermehrte Fibrose im Vorhof zu sehen war, obwohl sie in Infarktgröße und Hämodynamik ähnliche Befunde hatten. Dies und die Beobachtung der dunklen Flecken auf der Haut mancher Tiere ließ einen genetischen Einfluss auf das strukturelle Remodeling vermuten, der durch eine Genotypisierung der Gesamtkohorte untersucht werden sollte.

5.6 Genetische Einflüsse

In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Studien ein genetischer Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Genese von VHF nachgewiesen. Dass eine familiäre Häufung von VHF besteht, konnte bereits vor einigen Jahren nachgewiesen werden (Fox et al., 2004, Arnar et al., 2006). Aber auch häufige genetische Varianten, sog. Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) wurden mit VHF in Verbindung gebracht (Sinner et al., 2011). Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) haben es ermöglicht, in großen Kollektiven mit tausenden Patienten SNPs zu identifizieren, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von VHF assoziiert sind. Gudbjartsson und Mitarbeiter fanden 2007 beispielsweise SNPs in der Nähe des Gens *PITX2*, die in europäischen Bevölkerungsgruppen stark mit VHF assoziiert sind (Gudbjartsson et al., 2007). Dies konnte durch Lubitz und Kollegen bestätigt werden, die zudem einen weiteren Locus in *ZFH3* nachweisen konnten (Benjamin et al., 2009, Lubitz et al., 2014). In den letzten Jahren konnten durch immer größere Patientenkollektive weitere Loci identifiziert werden (Ellinor et al., 2012), so dass bis heute bereits knapp 100 Risiko-Loci ermittelt werden konnten, die mit der Entstehung von VHF zusammenhängen (Roselli et al., 2018, Christophersen et al., 2017, Ellinor et al., 2012). Trotz dieser starken statistischen Assoziation zwischen diesen Risiko-Loci und dem Auftreten von Vorhofflimmern, konnten die zugrundeliegenden Mechanismen, wie diese SNPs zu VHF führen, noch nicht wesentlich geklärt werden. Zwar zeigte sich ein murines *PITX2*-Knockout-Modell anfällig für stimulationsinduziertes VHF (Zhang et al., 2019), die weiteren Risiko-Loci sind jedoch weiterhin im Wesentlichen unerforscht. Trotz des Wissens, dass VHF auch durch genetische Faktoren beeinflusst ist, erklären bekannte genetische Faktoren die Vererbbarkeit von VHF nur teilweise, große Teile bleiben unklar (Clauss et al., 2017, Sinner et al., 2018), vor allem sind die genetisch-bedingten, funktionellen Mechanismen, die dem Vorhofflimmern zugrunde liegen, weiterhin unbekannt.

Bei der Auswertung der Analysen fiel auf, dass es auch in der IR30-Gruppe Tiere gab, die trotz signifikanter ICM keine vermehrte Fibrose im Vorhof zeigten. Auch fiel auf, dass manche Tiere vereinzelt dunkel pigmentierte Flecken auf der Haut aufwiesen. Dies, sowie die Tatsache, dass die Tiere von zwei unterschiedlichen Versuchstierhaltungen bezogen wurden, ließ den Verdacht aufkeimen, dass womöglich bei manchen Tieren kein reinrassiger Hintergrund vorliegen könnte.

Daraufhin wurde die Gesamtkohorte durch Bestimmung von >60.000 SNPs mittels des Porcine SNP60 Genotyping BeadChips (Illumina) genotypisiert. Die Ergebnisse wurden mit bereits vorhandenen SNP-Datensätzen von Schweinen der Deutschen Landrasse und von Pietrain, mittels kombinierte Kopplungs-ungleichgewichts- und Kopplungsstudien (cLDLA) ausgewertet. Es konnte nachgewiesen werden, dass unsere Kohorte aus nur wenigen reinrassigen Landrasse-Schweine bestand, die Mehrheit der Tiere hingegen einen gemischten genetischen Hintergrund aufwies. Entsprechend den Ergebnissen unterteilten wir unsere Kohorte in Schweine mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund (**P**) und Schweine mit mehrheitlich Deutsche Landrasse-Hintergrund (**LR**). Nach Einteilung in die Subgruppen Kontrolle-**P**, bzw. Kontrolle-**LR** sowie IR30-**P** bzw. IR30-**LR** wurden sämtliche, bisherigen Untersuchungen in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds erneut analysiert. Hier fiel auf, dass die signifikante Erhöhung der interstitiellen Fibrose im linken Vorhof ausschließlich bei Tieren mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund zu finden war. Dieser signifikante Unterschied war auch im Vergleich der beiden IR30-Gruppen erkennbar. Die Infarkttiere der Pietrain-dominanten Tiere zeigten auch hier eine signifikant vermehrte Fibrose gegenüber den Deutsche Landrasse-dominanten IR30-Tieren.

Interessanterweise gingen die Ergebnisse der Fibrosequantifizierung in den Subgruppen nicht mit einer Erhöhung von α -Smooth-Muscle-Aktin-positiven Zellen einher, was am ehesten auf die nach Aufteilung in Subgruppen geringeren Gruppengrößen zurückgeführt werden kann.

Bei der Genexpressionsanalyse zeigten sich in den Subgruppen hingegen signifikante Unterschiede: So zeigten die Matrixgene *COL1A1* im rechten sowie *MMP2* im linken Atrium eine signifikante Runterregulation bei der Deutsche Landrasse-dominanten IR30-Gruppe (**Tab. 4**), wohingegen *FN* im linken Vorhof der Pietrain-dominanten Tiere einen signifikanten Anstieg bei der IR30-Gruppe zeigte (**Tab. 4**). In den anderen Regionen und Genen konnte bei diesen Tieren nur ein Aufwärtstrend zwischen der Kontroll- und der IR30-Gruppe beobachtet werden.

Bei der Analyse der Fibroblasten-assoziierten Gene fiel im Vergleich der Kontroll- und der IR30-Gruppe der Deutsche Landrasse-dominanten Tiere ein signifikanter Abfall der *FSPI*-Expression bei der IR30-Gruppe im linken Atrium auf (**Tab. 4**).

Auch bei der Analyse der Regulatorgene und Signalwege konnte eine signifikante Runterregulierung von *TGF- β* im rechten Atrium dieser Gruppe festgestellt werden, bei

ROR2 im linken Atrium sowie bei *MAPK8* im linken und rechten Atrium (**Tab. 4**). Bei der Gruppe der Pietrain-dominanten Tiere konnte nur ein Aufwärtstrend in der Expression der fibrotisch wirksamen Gene beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung für die nicht-signifikanten Ergebnisse der Genexpressionsanalyse könnte die geringe Tierzahl sein. Auch hier gab es zum Teil große Varianzen innerhalb der Gruppen, die vielleicht mit der fehlenden Reinrassigkeit zusammenhängen könnten. Untersuchungen an einer größeren Anzahl reinrassiger Tiere könnten dies ggf. aufklären. Gerade bei *TGF- β* , einem „Master-Regulator“ (Meng et al., 2016), könnten zudem bereits kleine Änderungen große Effekte haben, da vieles von ihnen abhängt und sie mehrere Signalkaskaden aktivieren, die dann in der Summe zur Ausbildung einer relevanten Fibrose führen könnten. Einschränkend muss zudem festgehalten werden, dass bislang nur die Genexpression untersucht wurde, nicht jedoch die Proteinexpression. Zur weiteren Abklärung wären daher auch Analysen der Proteinexpression mittels Western Blot interessant.

Auffallend ist dennoch eines: Dass bei Pietrain-dominanten Tieren in der Summe ein deutliches profibrotisches Signaling nachweisbar ist, was sich mit den Ergebnissen der Histologie deckt und eine Erklärung für die Entstehung des Phänotyps sein könnte. Bei Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund zeigt sich dagegen in der Summe ein eher antifibrotisches Signaling, was erklären könnte, warum hier keine Fibrose beobachtet werden konnte. Allerdings konnte auch bei der IR30-Gruppe der Deutsche Landrasse-dominanten Tiere ein VHF-Phänotyp erzeugt werden. Dies legt nahe, dass bei diesen Tieren ein anderer Mechanismus zu VHF führt. Deswegen wurden auch die Daten der elektrophysiologischen Untersuchung neu und gruppenspezifisch analysiert, um Hinweise auf mögliches elektrisches Remodeling zu erhalten.

Die Analyse der atrioventrikulären effektiven Refraktärzeiten (AVERP) zeigte einen signifikanten Unterschied der AVERP zwischen den beiden IR30-Gruppen. Bisher konnte bei verschiedenen Ischämie-Tiermodellen keine Verkürzung der AVERP festgestellt werden (Korte et al., 2002). Auch in dieser Studie demaskierte sich erst nach der Rasseinteilung eine Verkürzung der AVERP zwischen Kontroll- und Infarktgruppe. Da sich dies nur bei Schweinen mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund zeigte, legt dies einen rassebedingten Effekt nahe. Auch die atriale effektive Refraktärzeit (AERP) zeigte sich bei drei von sechs Basiszykluslängen signifikant verkürzt, bei zwei weiteren Basiszykluslängen zeigte sich eine Tendenz zu verkürzter AERP. Auch die verkürzte AERP konnte in dieser Studie nur bei Tieren mit

mehrheitlich Landrasse-Hintergrund festgestellt werden. Bei Tieren mit mehrheitlich Landrasse-Hintergrund scheint somit weniger ein strukturelles, sondern vielmehr ein elektrisches Remodeling zu VHF zu führen.

Die Beobachtungen legen nahe, dass der genetische Hintergrund einen entscheidenden Einfluss darauf haben könnte, mit welchen Remodelingprozessen Schweine auf ein und denselben VHF-Trigger reagieren.

5.7 Ausblick und Relevanz

Die Entstehung atrialer Fibrose ist einer der Schlüsselprozesse des strukturellen Remodelings, das schließlich zur Entstehung eines arrhythmogenen Substrats und damit zu Vorhofflimmern führt. Tiere mit ischämischer Kardiomyopathie und erhöhter Induzierbarkeit von Vorhofflimmern zeigten signifikant mehr atriale Fibrose als gesunde Kontrollen ohne Arrhythmien. Bei IR30-Schweinen mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund ist die Vorhoffibrose verstärkt, was auf ein vulnerables, strukturelles Substrat hinweist, während bei Schweinen mit mehrheitlich Deutsche Landrasse-Hintergrund keine signifikante atriale Fibrose, sondern eine AERP-Verkürzung beobachtet werden kann, die auf ein elektrisches Substrat hindeutet. Da beide Rassen eine erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern zeigen, legen unsere Erkenntnisse nahe, dass der genetische Hintergrund einen entscheidenden Einfluss auf die Art des atrialen Remodelings nach einem Infarkt spielen könnte. Um den Einfluss der Genetik näher zu untersuchen und die Mechanismen besser verstehen zu können, sind jedoch weitere umfassende genetische Analysen notwendig. Untersuchungen an reinrassigen Tieren, seien es nun Pietrain- oder Deutsche Landrasse Schweine, könnten helfen, die genetisch-bedingten Effekte noch besser zu verstehen und ggf. genetische Loci zu identifizieren, die mit unterschiedlichem Risiko für die Bildung atrialer Fibrose einhergehen bzw. sogar protektive Effekte bedingen könnten. Gelingt die Identifikation solcher Risiko-Loci im Schwein und lassen sich diese Loci auch im Menschen bestätigen, so könnten darauf aufbauend neue Strategien für verbesserte individualisierte Risikoabschätzung, Prävention und Therapie entwickelt werden. Außerdem wäre es sinnvoll, möglichst an reinrassigen Tieren der Deutschen Landrasse elektrisches Remodeling näher zu untersuchen, zum Beispiel mittels Patch Clamp-Studien. Auch der potentiell protektive Einfluss einer Herzinsuffizienzmedikation könnte interessant sein. Die Frage wäre, ob durch Reduktion der Druckbelastung als

wahrscheinlichstem Trigger der angestoßenen Remodelingprozesse die Bildung von Fibrose reduziert werden kann. Außerdem wäre es interessant, ob andere Trigger neben der Ischämie ähnliche oder andere Remodelingprozesse in den jeweiligen Rassen auslösen.

Denn auch beim Menschen gibt es Patienten mit VHF, die strukturell aber unveränderte Vorhöfe haben (Marrouche et al., 2014). Wie berichtet spielt die Genetik auch beim Menschen eine Rolle. Eventuell aber nicht nur in dem Sinne, eine Prädisposition für VHF zu haben, sondern dass diese vielleicht auch bestimmt, wie das Herz auf einen Trigger wie Ischämie reagiert. Dies wiederum lässt hoffen, dass in der Zukunft kausale Gene identifiziert werden können, um eine individuelle Risikostratifizierung durchführen und passgenaue Therapien entwickeln zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste Arrhythmie des Menschen. Die Therapien sind limitiert und mit zum Teil deutlichen Nebenwirkungen insbesondere im Bereich der medikamentösen Therapie behaftet. Zwar konnten grundlegende pathophysiologische Mechanismen identifiziert werden, allerdings sind diese noch nicht vollständig verstanden. Pathophysiologische Hauptmerkmale von VHF sind strukturelle und elektrische Umbauprozesse, die ein proarrhythmisches atriales Substrat schaffen. Fibrose gilt als einer der Schlüsselprozesse des strukturellen Remodelings, das letzten Endes zur Genese und Aufrechterhaltung von VHF führt. Daher war es Ziel dieser Arbeit, einen besseren Einblick in die zugrundeliegenden profibrotischen Mechanismen zu erlangen. Da die ischämische Kardiomyopathie eine der Hauptursachen für VHF bei Patienten ist, wurde ein Schweinmodell der ischämischen Kardiomyopathie verwendet, das mit einer erhöhten Anfälligkeit für paroxysmalem Vorhofflimmern und proarrhythmogem Remodeling einhergeht. Bei diesem Modell wird eine ischämische Kardiomyopathie (ICM) durch einen Myokardinfarkt erzeugt, die zu einer signifikant erhöhten VHF-Last führt. Insgesamt wurden 40 Schweine untersucht. Bei 22 dieser Tiere wurde mittels 90-minütiger Okklusion der linken Vorderwandarterie distal des ersten Diagonalasts mit anschließender 30-tägiger Reperusionszeit ein proarrhythmogenes, atriales Substrat erzeugt (IR30-Gruppe). Als Kontrolltiergruppe dienten Tiere ohne Myokardinfarkt. Bei allen Tieren wurden 12-Kanal-EKGs, Rechts- und Linksherzkatheter-Untersuchung sowie eine invasive elektrophysiologische Untersuchung (EPU) mit Induktionsmanövern für atriale Arrhythmien mittels atrialer Burststimulation durchgeführt. Im Anschluss erfolgten histologische Untersuchungen und Expressionsstudien von Kandidatengenen. Transkripte von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und profibrotische Mediatoren wurden mittels qPCR quantifiziert. Die interstitielle Fibrose wurde histologisch durch eine Masson Goldner Trichrom Färbung evaluiert und die Expression von α -smooth-muscle-Actin (α -SMA) als Marker für aktivierte Myofibroblasten (MyoFB) wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Tiere der IR30-Gruppe eine signifikant erhöhte Fibrose in beiden Vorhöfen entwickelten. Im Rahmen der Analysen fiel allerdings auf, dass es auch in der IR30-Gruppe Tiere gab, bei denen trotz signifikanter ICM keine vermehrte Fibrose im Vorhof zu sehen war. Daher wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ein genetischer Einfluss auf

das strukturelle Remodeling in diesem Schweinmodell bestehen könnte. Wir genotypisierten daher die Tiere mit einer genomweiten SNP-Analyse und konnten sie mittels cLDLA schließlich zwei Gruppen zuordnen (mehrheitlich Pietrain-Hintergrund und mehrheitlich Landrasse-Hintergrund), die dann separat analysiert wurden. Es zeigte sich, dass die ischämische Herzinsuffizienz unabhängig vom genetischen Hintergrund zu vermehrtem Vorhofflimmern führt, eine signifikante atriale Fibrose als Marker für strukturellen Umbau jedoch nur bei Schweinen mit mehrheitlich Pietrain-Hintergrund zu beobachten war, während bei Schweinen mit mehrheitlich Deutsche Landrasse-Hintergrund eine Verkürzung der atrialen effektiven Refraktärzeit (AERP) als Surrogat für elektrisches Remodeling beobachtet wurde. Diese Befunde legen nahe, dass der genetische Hintergrund einen wichtigen Einfluss auf die atriale Reaktion auf einen proarrhythmischen Auslöser wie Ischämie ausübt. Weitergehende Studien sind jedoch nötig, um den Einfluss der Genetik auf weitere Remodelingprozesse im Detail zu untersuchen. Ein besseres Verständnis des genetischen Einflusses auf das proarrhythmogene Remodeling könnte wiederum helfen, innovative Ansatzpunkte für neue Strategien zur Risikostratifizierung, Prävention oder Therapie zu entwickeln und damit die Versorgung von Patienten zu verbessern. Zudem legen unsere Daten nahe, dass beim Modellorganismus Schwein der genetische Hintergrund berücksichtigt und gegebenenfalls auch entsprechend der Fragestellung ausgewählt werden sollte.

7 SUMMARY

Evaluation of structural remodeling processes in a porcine model of ischemic cardiomyopathy

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia in humans. Currently available therapies are limited and can be accompanied with severe side effects, especially regarding drug therapy. Although basic pathophysiological mechanisms could be identified, these are not yet fully understood. Major pathophysiological characteristics of AF are structural and electrical remodeling processes that lead to the creation of a proarrhythmic atrial substrate. Fibrosis is considered as one of the key processes of this structural remodeling, which eventually leads to the development and maintenance of AF.

Therefore, the aim of this study was to gain better insights into the underlying profibrotic mechanisms. As ischemic cardiomyopathy is one of the main causes of AF in patients, a porcine model of ischemic cardiomyopathy, which is associated with an increased vulnerability to paroxysmal atrial fibrillation and to proarrhythmogenic remodeling, was used. In this model, ischemic cardiomyopathy (ICM) is induced by a myocardial infarction resulting in a significant AF burden. In total, 40 pigs were examined. In 22 of these animals, a proarrhythmogenic atrial remodeling was induced by a 90-minute occlusion of the left anterior descending artery distal to the first diagonal branch followed by a 30-day reperfusion period (IR30 group). Animals without myocardial infarction served as a control group. All animals were characterized by a 12-lead ECG, a right and a left heart catheter examination and an invasive electrophysiological study (EPS) with induction maneuvers for atrial arrhythmias by atrial burst stimulation.

Next, histological analyses and expression studies of candidate genes were performed. Transcript levels of extracellular matrix (ECM) components and profibrotic mediators were quantified by qPCR. Interstitial fibrosis was evaluated histologically using Masson Goldner trichrome staining and the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) as a marker for activated myofibroblasts (MyoFB) was analyzed using immunofluorescence staining. It could be shown that IR30 pigs developed a significantly increased fibrosis in both atria. However, it was noticeable that some of the IR30 animals showed no increased fibrosis despite significant ICM.

Therefore, it was examined whether a genetic influence on the structural remodeling in

the porcine model could exist. Animals were genotyped by genome-wide SNP analysis and analyzed by cLDLA which allowed to assign them to either one of two groups (mostly Pietrain background and mostly Landrace background), which were then analyzed separately. It could be shown that independent of the genetic background ischemic cardiomyopathy leads to AF. However, significant atrial fibrosis as a marker for structural remodeling was observed only in pigs with a Pietrain-dominant background, while a reduction in the atrial effective refractory period (AERP) as a surrogate for electrical remodeling was observed in pigs with a German landrace-dominant background. These findings suggest that the genetic background exerts an important influence on the atrial response to a proarrhythmic trigger such as ischemia. However, subsequent studies are required to examine the influence of genetics and their influence on further remodeling processes in detail. In turn, a better understanding of the genetic influences on proarrhythmogenic remodeling could help to develop new and innovative strategies for risk stratification, prevention or therapy and may thus help to improve patient care. In addition, the data suggests that the genetic background of pigs should be considered in future studies.

8 LITERATURVERZEICHNIS

AIGNER, B., RENNER, S., KESSLER, B., KLYMIUK, N., KUROME, M., WÜNSCH, A. & WOLF, E. 2010. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)*, 88, 653-64.

ALBAN, S. 2017. Neue Optionen mit NOAK. *Pharmakologische Zeitung*, 22, 46-53.

ALFUDHILI, K. M., HASSAN, H. H., ABDULLAH, H. & SHERBINY, M. 2017. Pulmonary vein occlusion and lung infarction complicating non-treated moderate single pulmonary vein stenosis after radiofrequency ablation of atrial fibrillation. *BJR Case Rep*, 3, 20160091.

ALLESSIE, M., AUSMA, J. & SCHOTTEN, U. 2002. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*, 54, 230-46.

ALLESSIE, M. A., BOYDEN, P. A., CAMM, A. J., KLÉBER, A. G., LAB, M. J., LEGATO, M. J., ROSEN, M. R., SCHWARTZ, P. J., SPOONER, P. M., WAGONER, D. R. V. & WALDO, A. L. 2001. Pathophysiology and Prevention of Atrial Fibrillation. *Circulation*, 103, 769-777.

ANSELMINO, M., MATTA, M., CASTAGNO, D., GIUSTETTO, C. & GAITA, F. 2016. Catheter ablation of atrial fibrillation in chronic heart failure: state-of-the-art and future perspectives. *Europace*, 18, 638-47.

ARENZT, T., WEBER, R., BÜRKLE, G., HERRERA, C., BLUM, T., STOCKINGER, J., MINNERS, J., NEUMANN, F. J. & KALUSCHE, D. 2007. Small or large isolation areas around the pulmonary veins for the treatment of atrial fibrillation? Results from a prospective randomized study. *Circulation*, 115, 3057-63.

ARNAR, D. O., THORVALDSSON, S., MANOLIO, T. A., THORGEIRSSON, G., KRISTJANSSON, K., HAKONARSON, H. & STEFANSSON, K. 2006. Familial

aggregation of atrial fibrillation in Iceland. *Eur Heart J*, 27, 708-12.

ARORA, R., NG, J., ULPHANI, J., MYLONAS, I., SUBACIUS, H., SHADE, G., GORDON, D., MORRIS, A., HE, X., LU, Y., BELIN, R., GOLDBERGER, J. J. & KADISH, A. H. 2007. Unique autonomic profile of the pulmonary veins and posterior left atrium. *J Am Coll Cardiol*, 49, 1340-8.

ASANIN, M., PERUNICIC, J., MRDOVIC, I., MATIC, M., VUJISIC-TESIC, B., ARANDJELOVIC, A., VOJVODIC, A., MARINKOVIC, J., OSTOJIC, M. & VASILJEVIC, Z. 2006. Significance of recurrences of new atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 109, 235-40.

AUSMA, J., WIJFFELS, M., THONÉ, F., WOUTERS, L., ALLESSIE, M. & BORGERS, M. 1997. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation*, 96, 3157-63.

BARUSCOTTI, M., BUCCHI, A. & DIFRANCESCO, D. 2005. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacology & Therapeutics*, 107, 59-79.

BELTRAMI, C. A., FINATO, N., ROCCO, M., FERUGLIO, G. A., PURICELLI, C., CIGOLA, E., QUAINI, F., SONNENBLICK, E. H., OLIVETTI, G. & ANVERSA, P. 1994. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation*, 89, 151-163.

BENJAMIN, E. J., LEVY, D., VAZIRI, S. M., D'AGOSTINO, R. B., BELANGER, A. J. & WOLF, P. A. 1994. Independent Risk Factors for Atrial Fibrillation in a Population-Based Cohort: The Framingham Heart Study. *JAMA*, 271, 840-844.

BENJAMIN, E. J., RICE, K. M., ARKING, D. E., PFEUFER, A., VAN NOORD, C., SMITH, A. V., SCHNABEL, R. B., BIS, J. C., BOERWINKLE, E., SINNER, M. F., DEGHAN, A., LUBITZ, S. A., D'AGOSTINO, R. B., SR., LUMLEY, T., EHRET, G. B., HEERINGA, J., ASPELUND, T., NEWTON-CHEH, C., LARSON, M. G., MARCIANTE, K. D., SOLIMAN, E. Z., RIVADENEIRA, F., WANG, T. J.,

EIRÍKSDOTTIR, G., LEVY, D., PSATY, B. M., LI, M., CHAMBERLAIN, A. M., HOFMAN, A., VASAN, R. S., HARRIS, T. B., ROTTER, J. I., KAO, W. H., AGARWAL, S. K., STRICKER, B. H., WANG, K., LAUNER, L. J., SMITH, N. L., CHAKRAVARTI, A., UITTERLINDEN, A. G., WOLF, P. A., SOTOODEHNIA, N., KÖTTGEN, A., VAN DUIJN, C. M., MEITINGER, T., MUELLER, M., PERZ, S., STEINBECK, G., WICHMANN, H. E., LUNETTA, K. L., HECKBERT, S. R., GUDNASON, V., ALONSO, A., KÄÄB, S., ELLINOR, P. T. & WITTEMAN, J. C. 2009. Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nat Genet*, 41, 879-81.

BENJAMIN, E. J., WOLF, P. A., D'AGOSTINO, R. B., SILBERSHATZ, H., KANNEL, W. B. & LEVY, D. 1998. Impact of Atrial Fibrillation on the Risk of Death. *Circulation*, 98, 946-952.

BHATT, H. V. & FISCHER, G. W. 2015. Atrial Fibrillation: Pathophysiology and Therapeutic Options. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 29, 1333-1340.

BOIXEL, C., FONTAINE, V., RÜCKER-MARTIN, C., MILLIEZ, P., LOUEDEC, L., MICHEL, J. B., JACOB, M. P. & HATEM, S. N. 2003. Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat. *J Am Coll Cardiol*, 42, 336-44.

BOSCH, R., ECKART, L., GRAMLICH, M., HINDRICKS, G., HOFFMANN, E. & SOMMER, P. 2020. *ESC Pocket Guidelines. Diagnose und Behandlung von Vorhofflimmern, Version 2020*, Björn Bruckmeier Verlag GmbH.

BUNCH, T. J. 2020. Atrial Fibrillation and Dementia. *Circulation*, 142, 618-620.

BURLEW, B. S. & WEBER, K. T. 2002. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz*, 27, 92-8.

BURSTEIN, B. & NATTEL, S. 2008a. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*, 51, 802-9.

BURSTEIN, B. & NATTEL, S. 2008b. Atrial structural remodeling as an antiarrhythmic target. *J Cardiovasc Pharmacol*, 52, 4-10.

CALDERONE, A., BEL-HADJ, S., DRAPEAU, J., EL-HELOU, V., GOSSELIN, H., CLEMENT, R. & VILLENEUVE, L. 2006. Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J Cell Physiol*, 207, 165-73.

CALKINS, H., KUCK, K. H., CAPPATO, R., BRUGADA, J., CAMM, A. J., CHEN, S. A., CRIJNS, H. J., DAMIANO, R. J., JR., DAVIES, D. W., DIMARCO, J., EDGERTON, J., ELLENBOGEN, K., EZEKOWITZ, M. D., HAINES, D. E., HAISSAGUERRE, M., HINDRICKS, G., IESAKA, Y., JACKMAN, W., JALIFE, J., JAIS, P., KALMAN, J., KEANE, D., KIM, Y. H., KIRCHHOF, P., KLEIN, G., KOTTKAMP, H., KUMAGAI, K., LINDSAY, B. D., MANSOUR, M., MARCHLINSKI, F. E., MCCARTHY, P. M., MONT, J. L., MORADY, F., NADEMANEE, K., NAKAGAWA, H., NATALE, A., NATTEL, S., PACKER, D. L., PAPPONE, C., PRYSTOWSKY, E., RAVIELE, A., REDDY, V., RUSKIN, J. N., SHEMIN, R. J., TSAO, H. M. & WILBER, D. 2012. 2012 HRS/EHRA/ECAS expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: recommendations for patient selection, procedural techniques, patient management and follow-up, definitions, endpoints, and research trial design. *J Interv Card Electrophysiol*, 33, 171-257.

CAMM, A. J., KIRCHHOF, P., LIP, G. Y., SCHOTTEN, U., SABELIEVA, I., ERNST, S., VAN GELDER, I. C., AL-ATTAR, N., HINDRICKS, G., PRENDERGAST, B., HEIDBUCHEL, H., ALFIERI, O., ANGELINI, A., ATAR, D., COLONNA, P., DE CATERINA, R., DE SUTTER, J., GOETTE, A., GORENEK, B., HELDAL, M., HOHLOSER, S. H., KOLH, P., LE HEUZEY, J.-Y., PONIKOWSKI, P. & RUTTEN, F. H. 2010a. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 31, 2369-429.

CAMM, A. J., KIRCHHOF, P., LIP, G. Y., SCHOTTEN, U., SABELIEVA, I., ERNST, S., VAN GELDER, I. C., AL-ATTAR, N., HINDRICKS, G., PRENDERGAST, B., HEIDBUCHEL, H., ALFIERI, O., ANGELINI, A., ATAR, D., COLONNA, P., DE

CATERINA, R., DE SUTTER, J., GOETTE, A., GORENEK, B., HELDAL, M., HOHLOSER, S. H., KOLH, P., LE HEUZEY, J. Y., PONIKOWSKI, P. & RUTTEN, F. H. 2010b. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 31, 2369-429.

CAMM, A. J., LIP, G. Y., DE CATERINA, R., SABELIEVA, I., ATAR, D., HOHNLOSER, S. H., 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, 2719-47.

CHAN, Y. H., CHANG, G. J., LAI, Y. J., CHEN, W. J., CHANG, S. H., HUNG, L. M., KUO, C. T. & YEH, Y. H. 2019. Atrial fibrillation and its arrhythmogenesis associated with insulin resistance. *Cardiovasc Diabetol*, 18, 125.

CHARD, M. & TABRIZCHI, R. 2009. The role of pulmonary veins in atrial fibrillation: A complex yet simple story. *Pharmacology & Therapeutics*, 124, 207-218.

CHATTERJEE, S., SARDAR, P., LICHSTEIN, E., MUKHERJEE, D. & AIKAT, S. 2013. Pharmacologic rate versus rhythm-control strategies in atrial fibrillation: an updated comprehensive review and meta-analysis. *Pacing Clin Electrophysiol*, 36, 122-33.

CHAVKIN, N. W., SANO, S., WANG, Y., OSHIMA, K., OGAWA, H., HORITANI, K., SANO, M., MACLAUHLAN, S., NELSON, A., SETIA, K., VIPPA, T., WATANABE, Y., SAUCERMAN, J. J., HIRSCHI, K. K., GOKCE, N. & WALSH, K. 2021. The Cell Surface Receptors Ror1/2 Control Cardiac Myofibroblast Differentiation. *Journal of the American Heart Association*, 10, e019904.

CHEN, P. S., JOUNG, B., SHINOHARA, T., DAS, M., CHEN, Z. & LIN, S. F. 2010. The initiation of the heart beat. *Circ J*, 74, 221-5.

CHRIST, B. 2018. Binde- und Stützgewebe. *Taschenlehrbuch Biochemie*. Stuttgart:

Thieme Verlag.

CHRISTOPHERSEN, I. E., RIENSTRA, M., ROSELLI, C., YIN, X., GEELHOED, B., BARNARD, J., LIN, H., ARKING, D. E., SMITH, A. V., ALBERT, C. M., CHAFFIN, M., TUCKER, N. R., LI, M., KLARIN, D., BIHLMEYER, N. A., LOW, S. K., WEEKE, P. E., MULLER-NURASYID, M., SMITH, J. G., BRODY, J. A., NIEMEIJER, M. N., DORR, M., TROMPET, S., HUFFMAN, J., GUSTAFSSON, S., SCHURMANN, C., KLEBER, M. E., LYYTIKAINEN, L. P., SEPPALA, I., MALIK, R., HORIMOTO, A., PEREZ, M., SINISALO, J., AESCHBACHER, S., THERIAULT, S., YAO, J., RADMANESH, F., WEISS, S., TEUMER, A., CHOI, S. H., WENG, L. C., CLAUSS, S., DEO, R., RADER, D. J., SHAH, S. H., SUN, A., HOPEWELL, J. C., DEBETTE, S., CHAUHAN, G., YANG, Q., WORRALL, B. B., PARE, G., KAMATANI, Y., HAGEMEIJER, Y. P., VERWEIJ, N., SILAND, J. E., KUBO, M., SMITH, J. D., VAN WAGONER, D. R., BIS, J. C., PERZ, S., PSATY, B. M., RIDKER, P. M., MAGNANI, J. W., HARRIS, T. B., LAUNER, L. J., SHOEMAKER, M. B., PADMANABHAN, S., HAESSLER, J., BARTZ, T. M., WALDENBERGER, M., LICHTNER, P., ARENDT, M., KRIEGER, J. E., KAHONEN, M., RISCH, L., MANSUR, A. J., PETERS, A., SMITH, B. H., LIND, L., SCOTT, S. A., LU, Y., BOTTINGER, E. B., HERNESNIEMI, J., LINDGREN, C. M., WONG, J. A., HUANG, J., ESKOLA, M., MORRIS, A. P., FORD, I., REINER, A. P., DELGADO, G., CHEN, L. Y., CHEN, Y. I., SANDHU, R. K., LI, M., BOERWINKLE, E., EISELE, L., LANNFELT, L., ROST, N., et al. 2017. Large-scale analyses of common and rare variants identify 12 new loci associated with atrial fibrillation. *Nat Genet*, 49, 946-952.

CLAUSS, S., BLEYER, C., SCHÜTTLER, D., TOMSITS, P., RENNER, S., KLYMIUK, N., WAKILI, R., MASSBERG, S., WOLF, E. & KAAB, S. 2019. Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals. *Nat Rev Cardiol*, 16, 457-475.

CLAUSS, S., SCHÜTTLER, D., BLEYER, C., VLCEK, J., SHAKARAMI, M., TOMSITS, P., SCHNEIDER, S., MADERSPACHER, F., CHATAUT, K., TREBO, A., WANG, C., KLEEGERGER, J., XIA, R., BALOCH, E., HILDEBRAND, B., MASSBERG, S., WAKILI, R. & KÄÄB, S. 2020. Characterization of a porcine model of atrial arrhythmogenicity in the context of ischaemic heart failure. *PLoS one*, 15,

e0232374-e0232374.

CLAUSS, S., SINNER, M. F. & KAAB, S. 2017. Genome-Wide Association Studies Revealing the Heritability of Common Atrial Fibrillation: Is Bigger Always Better? *Circ Cardiovasc Genet*, 10.

CLAUSS, S., SINNER, M. F., KÄÄB, S. & WAKILI, R. 2015. The Role of MicroRNAs in Antiarrhythmic Therapy for Atrial Fibrillation. *Arrhythmia & electrophysiology review*, 4, 146-155.

CLEUTJENS, J. P., VERLUYTEN, M. J., SMITHS, J. F. & DAEMEN, M. J. 1995. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*, 147, 325-38.

COSTANTINI, M. & CREMA, A. 2000. [The electrocardiology of atrial fibrillation]. *Ital Heart J Suppl*, 1, 632-40.

COWLING, R. T., KUPSKY, D., KAHN, A. M., DANIELS, L. B. & GREENBERG, B. H. 2019. Mechanisms of cardiac collagen deposition in experimental models and human disease. *Transl Res*, 209, 138-155.

DAWSON, K., WAKILI, R., ORDÖG, B., CLAUSS, S., CHEN, Y., IWASAKI, Y., VOIGT, N., QI, X. Y., SINNER, M. F., DOBREV, D., KÄÄB, S. & NATTEL, S. 2013. MicroRNA29: a mechanistic contributor and potential biomarker in atrial fibrillation. *Circulation*, 127, 1466-75, 1475e1-28.

DE WITH, R. R., RIENSTRA, M., SMIT, M. D., WEIJS, B., ZWARTKRUIS, V. W., HOBBELT, A. H., ALINGS, M., TIJSSEN, J. G. P., BRÜGEMANN, J., GEELHOED, B., HILLEGE, H. L., TUKKIE, R., HEMELS, M. E., TIELEMAN, R. G., RANCHOR, A. V., VAN VELDHUISEN, D. J., CRIJNS, H. & VAN GELDER, I. C. 2019. Targeted therapy of underlying conditions improves quality of life in patients with persistent atrial fibrillation: results of the RACE 3 study. *Europace*, 21, 563-571.

DENHAM, N. C., PEARMAN, C. M., CALDWELL, J. L., MADDERS, G. W. P., EISNER, D. A., TRAFFORD, A. W. & DIBB, K. M. 2018. Calcium in the Pathophysiology of Atrial Fibrillation and Heart Failure. *Front Physiol*, 9, 1380.

DOBREV, D. 2006. Electrical remodeling in atrial fibrillation. *Herz*, 31, 108-12; quiz 142-3.

DOBREV, D., VOIGT, N. & WEHRENS, X. H. 2011. The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: pathophysiological and therapeutic implications. *Cardiovasc Res*, 89, 734-43.

DONNAN, G. A., DEWEY, H. M. & CHAMBERS, B. R. 2004. Warfarin for atrial fibrillation: the end of an era? *Lancet Neurol*, 3, 305-8.

DUPREZ, D. A., HECKBERT, S. R., ALONSO, A., GROSS, M. D., IX, J. H., KIZER, J. R., TRACY, R. P., KRONMAL, R. & JACOBS, D. R. 2018. Collagen Biomarkers and Incidence of New Onset of Atrial Fibrillation in Subjects With No Overt Cardiovascular Disease at Baseline. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 11, e006557.

EDWARDS, J. J., BRANDIMARTO, J., HU, D.-Q., JEONG, S., YUCEL, N., LI, L., BEDI, K. C., WADA, S., MURASHIGE, D., HWANG, H. T. V., ZHAO, M., MARGULIES, K. B., BERNSTEIN, D., REDDY, S. & ARANY, Z. 2020. Noncanonical WNT Activation in Human Right Ventricular Heart Failure. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7.

EHRlich, J. R. & GÖTTE, A. 2011. Remodeling durch Vorhofflimmern und klinische Implikationen für die Kardioversion. *Dtsch Med Wochenschr*, 136, 2212-2216.

ELLINOR, P. T., LUNETTA, K. L., ALBERT, C. M., GLAZER, N. L., RITCHIE, M. D., SMITH, A. V., ARKING, D. E., MÜLLER-NURASYID, M., KRIJTHE, B. P., LUBITZ, S. A., BIS, J. C., CHUNG, M. K., DÖRR, M., OZAKI, K., ROBERTS, J. D., SMITH, J. G., PFEUFER, A., SINNER, M. F., LOHMAN, K., DING, J., SMITH, N. L., SMITH, J. D., RIENSTRA, M., RICE, K. M., VAN WAGONER, D. R.,

MAGNANI, J. W., WAKILI, R., CLAUSS, S., ROTTER, J. I., STEINBECK, G., LAUNER, L. J., DAVIES, R. W., BORKOVICH, M., HARRIS, T. B., LIN, H., VÖLKER, U., VÖLZKE, H., MILAN, D. J., HOFMAN, A., BOERWINKLE, E., CHEN, L. Y., SOLIMAN, E. Z., VOIGHT, B. F., LI, G., CHAKRAVARTI, A., KUBO, M., TEDROW, U. B., ROSE, L. M., RIDKER, P. M., CONEN, D., TSUNODA, T., FURUKAWA, T., SOTOODEHNIA, N., XU, S., KAMATANI, N., LEVY, D., NAKAMURA, Y., PARVEZ, B., MAHIDA, S., FURIE, K. L., ROSAND, J., MUHAMMAD, R., PSATY, B. M., MEITINGER, T., PERZ, S., WICHMANN, H. E., WITTEMAN, J. C., KAO, W. H., KATHIRESAN, S., RODEN, D. M., UITTERLINDEN, A. G., RIVADENEIRA, F., MCKNIGHT, B., SJÖGREN, M., NEWMAN, A. B., LIU, Y., GOLLOB, M. H., MELANDER, O., TANAKA, T., STRICKER, B. H., FELIX, S. B., ALONSO, A., DARBAR, D., BARNARD, J., CHASMAN, D. I., HECKBERT, S. R., BENJAMIN, E. J., GUDNASON, V. & KÄÄB, S. 2012. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nat Genet*, 44, 670-5.

FAN, D., TAKAWALE, A., LEE, J. & KASSIRI, Z. 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5, 15.

FAN, K., LEE, K. L., CHIU, C. S. W., LEE, J. W. T., HE, G.-W., CHEUNG, D., SUN, M. P. & LAU, C.-P. 2000. Effects of Biatial Pacing in Prevention of Postoperative Atrial Fibrillation After Coronary Artery Bypass Surgery. *Circulation*, 102, 755-760.

FARNIR, F., GRISART, B., COPPIETERS, W., RIQUET, J., BERZI, P., CAMBISANO, N., KARIM, L., MNI, M., MOISIO, S., SIMON, P., WAGENAAR, D., VILKKI, J. & GEORGES, M. 2002. Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revisiting the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14. *Genetics*, 161, 275-87.

FOX, C. S., PARISE, H., D'AGOSTINO, R. B., SR., LLOYD-JONES, D. M., VASAN, R. S., WANG, T. J., LEVY, D., WOLF, P. A. & BENJAMIN, E. J. 2004. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *Jama*, 291, 2851-5.

FRANGOIANNIS, N. G. 2019. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circulation Research*, 125, 117-146.

FRANGOIANNIS, N. G. 2021. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res*, 117, 1450-1488.

FRANTZ, C., STEWART, K. M. & WEAVER, V. M. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123, 4195-200.

FUSTER, V., RYDÉN, L. E., CANNOM, D. S., CRIJNS, H. J., CURTIS, A. B., ELLENBOGEN, K. A., HALPERIN, J. L., LE HEUZEY, J. Y., KAY, G. N., LOWE, J. E., OLSSON, S. B., PRYSTOWSKY, E. N., TAMARGO, J. L., WANN, S., SMITH, S. C., JR., JACOBS, A. K., ADAMS, C. D., ANDERSON, J. L., ANTMAN, E. M., HALPERIN, J. L., HUNT, S. A., NISHIMURA, R., ORNATO, J. P., PAGE, R. L., RIEGEL, B., PRIORI, S. G., BLANC, J. J., BUDAJ, A., CAMM, A. J., DEAN, V., DECKERS, J. W., DESPRES, C., DICKSTEIN, K., LEKAKIS, J., MCGREGOR, K., METRA, M., MORAIS, J., OSTERSPEY, A., TAMARGO, J. L. & ZAMORANO, J. L. 2006. 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): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation*, 114, e257-354.

GABORIT, N., VARRO, A., LE BOUTER, S., SZUTS, V., ESCANDE, D., NATTEL, S. & DEMOLOMBE, S. 2010. Gender-related differences in ion-channel and transporter subunit expression in non-diseased human hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 639-46.

GEHRMANN, J., FRANTZ, S., MAGUIRE, C. T., VARGAS, M., DUCHARME, A., WAKIMOTO, H., LEE, R. T. & BERUL, C. I. 2001. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol*, 96, 237-50.

GO, A. S., HYLEK, E. M., PHILLIPS, K. A., CHANG, Y., HENAULT, L. E., SELBY, J. V. & SINGER, D. E. 2001. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *Jama*, 285, 2370-5.

GOYAL, A., SCIAMMARELLA, J., CHHABRA, L. & SINGHAL, M. 2021. *Synchronized Electrical Cardioversion* [Online]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482173/>: StatPearls Publishing. [Accessed].

GRABMAIER, U., KANIA, G., KREINER, J., GRABMEIER, J., UHL, A., HUBER, B. C., LACKERMAIR, K., HERBACH, N., TODICA, A., ERIKSSON, U., WECKBACH, L. T. & BRUNNER, S. 2016. Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) as a Biomarker in the Mouse Model of Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM). *PLoS One*, 11, e0158299.

GUDBJARTSSON, D. F., ARNAR, D. O., HELGADOTTIR, A., GRETARSDOTTIR, S., HOLM, H., SIGURDSSON, A., JONASDOTTIR, A., BAKER, A., THORLEIFSSON, G., KRISTJANSSON, K., PALSSON, A., BLONDAL, T., SULEM, P., BACKMAN, V. M., HARDARSON, G. A., PALSDOTTIR, E., HELGASON, A., SIGURJONSDOTTIR, R., SVERRISSON, J. T., KOSTULAS, K., NG, M. C., BAUM, L., SO, W. Y., WONG, K. S., CHAN, J. C., FURIE, K. L., GREENBERG, S. M., SALE, M., KELLY, P., MACRAE, C. A., SMITH, E. E., ROSAND, J., HILLERT, J., MA, R. C., ELLINOR, P. T., THORGEIRSSON, G., GULCHER, J. R., KONG, A., THORSTEINSDOTTIR, U. & STEFANSSON, K. 2007. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature*, 448, 353-7.

HAÏSSAGUERRE, M., JAÏS, P., SHAH, D. C., TAKAHASHI, A., HOCINI, M., QUINIOU, G., GARRIGUE, S., LE MOUROUX, A., LE MÉTAYER, P. & CLÉMENTY, J. 1998. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*, 339, 659-66.

HANNA, N., CARDIN, S., LEUNG, T. K. & NATTEL, S. 2004. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive

heart failure. *Cardiovasc Res*, 63, 236-44.

HANNON, J. P., BOSSONE, C. A. & WADE, C. 1990. Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Laboratory animal science*, 40, 293-8.

HEIDINGER, M., KOLB, H., KRELL, H.-W., JOCHUM, M. & RIES, C. 2006. Modulation of autocrine TNF- α -stimulated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression by mitogen-activated protein kinases in THP-1 monocytic cells. 387, 69-78.

HEIST, E. K. & RUSKIN, J. N. 2006. Atrial fibrillation and congestive heart failure: risk factors, mechanisms, and treatment. *Prog Cardiovasc Dis*, 48, 256-69.

HERVÉ, J. C. & SARROUILHE, D. 2006. Protein phosphatase modulation of the intercellular junctional communication: importance in cardiac myocytes. *Prog Biophys Mol Biol*, 90, 225-48.

HINDRICKS, G., POTPARA, T., DAGRES, N., ARBELO, E., BAX, J. J., BLOMSTRÖM-LUNDQVIST, C., BORIANI, G., CASTELLA, M., DAN, G. A., DILAVERIS, P. E., FAUCHIER, L., FILIPPATOS, G., KALMAN, J. M., LA MEIR, M., LANE, D. A., LEBEAU, J. P., LETTINO, M., LIP, G. Y. H., PINTO, F. J., THOMAS, G. N., VALGIMIGLI, M., VAN GELDER, I. C., VAN PUTTE, B. P. & WATKINS, C. L. 2021. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J*, 42, 373-498.

HOLMES, D. R., JR., MONAHAN, K. H. & PACKER, D. 2009. Pulmonary vein stenosis complicating ablation for atrial fibrillation: clinical spectrum and interventional considerations. *JACC Cardiovasc Interv*, 2, 267-76.

HU, C. P., DANDAPAT, A., LIU, Y., HERMONAT, P. L. & MEHTA, J. L. 2007. Blockade of hypoxia-reoxygenation-mediated collagen type I expression and MMP

activity by overexpression of TGF-beta1 delivered by AAV in mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, H1833-8.

HUPPELSBERG, J. & WALTER, K. 2005. *Kurzlehrbuch der Physiologie*, Stuttgart, Thieme.

IGNOTZ, R. A. & MASSAGUÉ, J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 261, 4337-45.

ISRAEL, C. W., GRÖNEFELD, G., EHRLICH, J. R., LI, Y. G. & HOHNLOSER, S. H. 2004. Long-term risk of recurrent atrial fibrillation as documented by an implantable monitoring device: implications for optimal patient care. *J Am Coll Cardiol*, 43, 47-52.

IWASAKI, Y.-K., NISHIDA, K., KATO, T. & NATTEL, S. 2011. Atrial Fibrillation Pathophysiology. *Circulation*, 124, 2264-2274.

JAGADISH, P. S. & KABRA, R. 2019. Stroke Risk in Atrial Fibrillation: Beyond the CHA(2)DS(2)-VASc Score. *Curr Cardiol Rep*, 21, 95.

JANUARY, C. T., WANN, L. S., CALKINS, H., CHEN, L. Y., CIGARROA, J. E., CLEVELAND, J. C., JR., ELLINOR, P. T., EZEKOWITZ, M. D., FIELD, M. E., FURIE, K. L., HEIDENREICH, P. A., MURRAY, K. T., SHEA, J. B., TRACY, C. M. & YANCY, C. W. 2019. 2019 AHA/ACC/HRS focused update of the 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Heart Rhythm*, 16, e66-e93.

JIA, X., ZHENG, S., XIE, X., ZHANG, Y., WANG, W., WANG, Z., ZHANG, Y., WANG, J., GAO, M. & HOU, Y. 2013. MicroRNA-1 accelerates the shortening of atrial effective refractory period by regulating KCNE1 and KCNB2 expression: an atrial tachypacing rabbit model. *PLoS One*, 8, e85639.

KAESE, S. & VERHEULE, S. 2012. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol*, 3, 345.

KAWASHIMA, T. 2005. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. *Anat Embryol (Berl)*, 209, 425-38.

KEATING, M. T. & SANGUINETTI, M. C. 2001. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*, 104, 569-80.

KERR, C. R., BOONE, J., CONNOLLY, S. J., DORIAN, P., GREEN, M., KLEIN, G., NEWMAN, D., SHELDON, R. & TALAJIC, M. 1998. The Canadian Registry of Atrial Fibrillation: a noninterventional follow-up of patients after the first diagnosis of atrial fibrillation. *Am J Cardiol*, 82, 82n-85n.

KIM, K. B., RODEFELD, M. D., SCHUESSLER, R. B., COX, J. L. & BOINEAU, J. P. 1996. Relationship between local atrial fibrillation interval and refractory period in the isolated canine atrium. *Circulation*, 94, 2961-7.

KNUIMAN, M., BRIFFA, T., DIVITINI, M., CHEW, D., EIKELBOOM, J., MCQUILLAN, B. & HUNG, J. 2014. A cohort study examination of established and emerging risk factors for atrial fibrillation: the Busselton Health Study. *Eur J Epidemiol*, 29, 181-90.

KRIJTHE, B. P., KUNST, A., BENJAMIN, E. J., LIP, G. Y., FRANCO, O. H., HOFMAN, A., WITTEMAN, J. C., STRICKER, B. H. & HEERINGA, J. 2013. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J*, 34, 2746-51.

LAFUENTE-LAFUENTE, C., MAHE, I. & EXTRAMIANA, F. 2009. Management of atrial fibrillation. *Bmj*, 339, b5216.

LAI, L. P., SU, M. J., LIN, J. L., TSAI, C. H., LIN, F. Y., CHEN, Y. S., HWANG, J. J.,

HUANG, S. K., TSENG, Y. Z. & LIEN, W. P. 1999. Measurement of funny current (I_f) channel mRNA in human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10, 947-53.

LANDMESSER, U., TONDO, C., CAMM, J., DIENER, H. C., PAUL, V., SCHMIDT, B., SETTERGREN, M., TEIGER, E., NIELSEN-KUDSK, J. E. & HILDICK-SMITH, D. 2018. Left atrial appendage occlusion with the AMPLATZER Amulet device: one-year follow-up from the prospective global Amulet observational registry. *EuroIntervention*, 14, e590-e597.

LASCH, H. G. 1986. [Principles of drug prevention of thrombosis]. *Langenbecks Arch Chir*, 369, 451-7.

LAU, D. H., LINZ, D., SCHOTTEN, U., MAHAJAN, R., SANDERS, P. & KALMAN, J. M. 2017. Pathophysiology of Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation: Rotors, Foci and Fibrosis. *Heart Lung Circ*, 26, 887-893.

LAU, D. H., MACKENZIE, L., KELLY, D. J., PSALTIS, P. J., BROOKS, A. G., WORTHINGTON, M., RAJENDRAM, A., KELLY, D. R., ZHANG, Y., KUKLIK, P., NELSON, A. J., WONG, C. X., WORTHLEY, S. G., RAO, M., FAULL, R. J., EDWARDS, J., SAINT, D. A. & SANDERS, P. 2010. Hypertension and atrial fibrillation: evidence of progressive atrial remodeling with electrostructural correlate in a conscious chronically instrumented ovine model. *Heart Rhythm*, 7, 1282-90.

LEPPÄ, S. & BOHMANN, D. 1999. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene*, 18, 6158-6162.

LEWALTER, T. & JILEK, C. 2016. [How to do: Cardioversion]. *Dtsch Med Wochenschr*, 141, 706-8.

LEWALTER, T. & JUNG, W. 2017. Der Vorhofohrkluder. *Herzschrittmachertherapie + Elektrophysiologie*, 28, 345-346.

LI, D., FAREH, S., LEUNG, T. K. & NATTEL, S. 1999. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation*, 100, 87-95.

LI, L., ZHAO, Q. & KONG, W. 2018. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biology*, 68-69, 490-506.

LIJNEN, P. & PETROV, V. 2002. Transforming growth factor-beta 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 24, 333-44.

LIPSON, K. E., WONG, C., TENG, Y. & SPONG, S. 2012. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 5, S24.

LIU, L. & NATTEL, S. 1997. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol*, 273, H805-16.

LIU, X. K., JAHANGIR, A., TERZIC, A., GERSH, B. J., HAMMILL, S. C. & SHEN, W. K. 2004. Age- and sex-related atrial electrophysiologic and structural changes. *Am J Cardiol*, 94, 373-5.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.

LOUSBERG, P., MÉLON, P., WALEFFE, A. & PIÉRARD, L. A. 2004. [Paroxysmal atrial fibrillation]. *Rev Med Liege*, 59, 301-6.

LUBITZ, S. A., LUNETTA, K. L., LIN, H., ARKING, D. E., TROMPET, S., LI, G., KRIJTHE, B. P., CHASMAN, D. I., BARNARD, J., KLEBER, M. E., DÖRR, M., OZAKI, K., SMITH, A. V., MÜLLER-NURASYID, M., WALTER, S., AGARWAL, S. K., BIS, J. C., BRODY, J. A., CHEN, L. Y., EVERETT, B. M., FORD, I., FRANCO, O. H., HARRIS, T. B., HOFMAN, A., KÄÄB, S., MAHIDA, S., KATHIRESAN, S.,

KUBO, M., LAUNER, L. J., MACFARLANE, P. W., MAGNANI, J. W., MCKNIGHT, B., MCMANUS, D. D., PETERS, A., PSATY, B. M., ROSE, L. M., ROTTER, J. I., SILBERNAGEL, G., SMITH, J. D., SOTOODEHNIA, N., STOTT, D. J., TAYLOR, K. D., TOMASCHITZ, A., TSUNODA, T., UITTERLINDEN, A. G., VAN WAGONER, D. R., VÖLKER, U., VÖLZKE, H., MURABITO, J. M., SINNER, M. F., GUDNASON, V., FELIX, S. B., MÄRZ, W., CHUNG, M., ALBERT, C. M., STRICKER, B. H., TANAKA, T., HECKBERT, S. R., JUKEMA, J. W., ALONSO, A., BENJAMIN, E. J. & ELLINOR, P. T. 2014. Novel genetic markers associate with atrial fibrillation risk in Europeans and Japanese. *J Am Coll Cardiol*, 63, 1200-1210.

MACKENNA, D., OMENS, J., MCCULLOCH, A. & COVELL, J. 1994. Contribution of collagen matrix to passive left ventricular mechanics in isolated rat hearts. *The American journal of physiology*, 266, H1007-18.

MAHIDA, S. & ELLINOR, P. T. 2012. New advances in the genetic basis of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 23, 1400-6.

MARIONNEAU, C., BRUNET, S., FLAGG, T. P., PILGRAM, T. K., DEMOLOMBE, S. & NERBONNE, J. M. 2008. Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K⁺ currents with left ventricular hypertrophy. *Circ Res*, 102, 1406-15.

MARROUCHE, N. F., WILBER, D., HINDRICKS, G., JAIS, P., AKOUM, N., MARCHLINSKI, F., KHOLMOVSKI, E., BURGON, N., HU, N., MONT, L., DENEKE, T., DUYSCHAEVER, M., NEUMANN, T., MANSOUR, M., MAHNKOPF, C., HERWEG, B., DAOUD, E., WISSNER, E., BANSMANN, P. & BRACHMANN, J. 2014. Association of atrial tissue fibrosis identified by delayed enhancement MRI and atrial fibrillation catheter ablation: the DECAAF study. *Jama*, 311, 498-506.

MENG, X. M., NIKOLIC-PATERSON, D. J. & LAN, H. Y. 2016. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 12, 325-38.

MERIS, A., AMIGONI, M., UNO, H., THUNE, J. J., VERMA, A., KØBER, L.,

BOURGOUN, M., MCMURRAY, J. J., VELAZQUEZ, E. J., MAGGIONI, A. P., GHALI, J., ARNOLD, J. M., ZELENKOFKSKE, S., PFEFFER, M. A. & SOLOMON, S. D. 2009. Left atrial remodelling in patients with myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both: the VALIANT Echo study. *Eur Heart J*, 30, 56-65.

MEUWISSEN, T. H. E., KARLSEN, A., LIEN, S., OLSAKER, I. & GODDARD, M. E. 2002. Fine Mapping of a Quantitative Trait Locus for Twinning Rate Using Combined Linkage and Linkage Disequilibrium Mapping. *Genetics*, 161, 373-379.

MOE, G. K. & ABILDSKOV, J. A. 1959. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am Heart J*, 58, 59-70.

MOORMAN, A. F., DE JONG, F. & LAMERS, W. H. 1997. Development of the conduction system of the heart. *Pacing Clin Electrophysiol*, 20, 2087-92.

MURPHY, C. & LAZZARA, R. 2016. Current concepts of anatomy and electrophysiology of the sinus node. *J Interv Card Electrophysiol*, 46, 9-18.

NATTEL, S. 2002. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*, 415, 219-26.

NATTEL, S. 2017. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol*, 3, 425-435.

NATTEL, S., BURSTEIN, B. & DOBREV, D. 2008. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 1, 62-73.

NATTEL, S. & HARADA, M. 2014. Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives. *J Am Coll Cardiol*, 63, 2335-45.

NATTEL, S., MAGUY, A., LE BOUTER, S. & YEH, Y. H. 2007. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev*, 87, 425-56.

NERBONNE, J. M. & GUO, W. 2002. Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 13, 406-9.

NG, J., VILLUENDAS, R., COKIC, I., SCHLIAMSER, J. E., GORDON, D., KODURI, H., BENEFIELD, B., SIMON, J., MURTHY, S. N., LOMASNEY, J. W., WASSERSTROM, J. A., GOLDBERGER, J. J., AISTRUP, G. L. & ARORA, R. 2011. Autonomic remodeling in the left atrium and pulmonary veins in heart failure: creation of a dynamic substrate for atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 4, 388-96.

NISHIDA, K., MICHAEL, G., DOBREV, D. & NATTEL, S. 2010. Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities. *Europace*, 12, 160-72.

NYGARD, A.-B., JØRGENSEN, C. B., CIRERA, S. & FREDHOLM, M. 2007. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC molecular biology*, 8, 67-67.

OLADIRAN, O. & NWOSU, I. 2019. Stroke risk stratification in atrial fibrillation: a review of common risk factors. *J Community Hosp Intern Med Perspect*, 9, 113-120.

OROS, A., BEEKMAN, J. D. & VOS, M. A. 2008. The canine model with chronic, complete atrio-ventricular block. *Pharmacol Ther*, 119, 168-78.

PAGE, R. L., WILKINSON, W. E., CLAIR, W. K., MCCARTHY, E. A. & PRITCHETT, E. L. 1994. Asymptomatic arrhythmias in patients with symptomatic paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation*, 89, 224-7.

PAN, K. L., SINGER, D. E., OVBIAGELE, B., WU, Y. L., AHMED, M. A. & LEE, M. 2017. Effects of Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants Versus Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation and Valvular Heart Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*, 6.

PARK, D. S., CERRONE, M., MORLEY, G., VASQUEZ, C., FOWLER, S., LIU, N., BERNSTEIN, S. A., LIU, F. Y., ZHANG, J., ROGERS, C. S., PRIORI, S. G., CHINITZ, L. A. & FISHMAN, G. I. 2015. Genetically engineered SCN5A mutant pig hearts exhibit conduction defects and arrhythmias. *J Clin Invest*, 125, 403-12.

PÉREZ-ENCISO, M. 2003. Fine mapping of complex trait genes combining pedigree and linkage disequilibrium information: a Bayesian unified framework. *Genetics*, 163, 1497-510.

PETRICH, B. G., ELOFF, B. C., LERNER, D. L., KOVACS, A., SAFFITZ, J. E., ROSENBAUM, D. S. & WANG, Y. 2004. Targeted Activation of c-Jun N-terminal Kinase *in Vivo* Induces Restrictive Cardiomyopathy and Conduction Defects * [boxes]. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 15330-15338.

PRABHU, S. D. & FRANGOIANNIS, N. G. 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119, 91-112.

RASMUSSEN, R. 2001. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S., WITTEWER, C. & NAKAGAWARA, K.-I. (eds.) *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

RAVENS, U. & CERBAI, E. 2008. Role of potassium currents in cardiac arrhythmias. *EP Europace*, 10, 1133-1137.

REMES, J., VAN BRAKEL, T. J., BOLOTIN, G., GARBER, C., DE JONG, M. M., VAN DER VEEN, F. H. & MAESSEN, J. G. 2008. Persistent atrial fibrillation in a goat model of chronic left atrial overload. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 136, 1005-11.

RODEN, D. M., BALSER, J. R., GEORGE JR., A. L. & E., A. M. 2002. Cardiac Ion Channels. *Annual Review of Physiology*, 64, 431-475.

ROLF, S., MOTZ, W. & HORSTKOTTE, D. 2011. Neue Daten zur häufigsten

- Herzrhythmusstörung – Epidemiologie des Vorhofflimmerns. *Der Klinikarzt*, 40, 7-12.
- ROSELLI, C., CHAFFIN, M. D., WENG, L. C., AESCHBACHER, S., AHLBERG, G., ALBERT, C. M., ALMGREN, P., ALONSO, A., ANDERSON, C. D., ARAGAM, K. G., ARKING, D. E., BARNARD, J., BARTZ, T. M., BENJAMIN, E. J., BIHLMEYER, N. A., BIS, J. C., BLOOM, H. L., BOERWINKLE, E., BOTTINGER, E. B., BRODY, J. A., CALKINS, H., CAMPBELL, A., CAPPOLA, T. P., CARLQUIST, J., CHASMAN, D. I., CHEN, L. Y., CHEN, Y. I., CHOI, E. K., CHOI, S. H., CHRISTOPHERSEN, I. E., CHUNG, M. K., COLE, J. W., CONEN, D., COOK, J., CRIJNS, H. J., CUTLER, M. J., DAMRAUER, S. M., DANIELS, B. R., DARBAR, D., DELGADO, G., DENNY, J. C., DICHGANS, M., DÖRR, M., DUDINK, E. A., DUDLEY, S. C., ESA, N., ESKO, T., ESKOLA, M., FATKIN, D., FELIX, S. B., FORD, I., FRANCO, O. H., GEELHOED, B., GREWAL, R. P., GUDNASON, V., GUO, X., GUPTA, N., GUSTAFSSON, S., GUTMANN, R., HAMSTEN, A., HARRIS, T. B., HAYWARD, C., HECKBERT, S. R., HERNESNIEMI, J., HOCKING, L. J., HOFMAN, A., HORIMOTO, A., HUANG, J., HUANG, P. L., HUFFMAN, J., INGELSSON, E., IPEK, E. G., ITO, K., JIMENEZ-CONDE, J., JOHNSON, R., JUKEMA, J. W., KÄÄB, S., KÄHÖNEN, M., KAMATANI, Y., KANE, J. P., KASTRATI, A., KATHIRESAN, S., KATSCHNIG-WINTER, P., KAVOUSI, M., KESSLER, T., KIETSELAER, B. L., KIRCHHOF, P., KLEBER, M. E., KNIGHT, S., KRIEGER, J. E., KUBO, M., LAUNER, L. J., LAURIKKA, J., LEHTIMÄKI, T., LEINEWEBER, K., LEMAITRE, R. N., LI, M., LIM, H. E., LIN, H. J., LIN, H., et al. 2018. Multi-ethnic genome-wide association study for atrial fibrillation. *Nat Genet*, 50, 1225-1233.
- RÜCKER-MARTIN, C., PECKER, F., GODREAU, D. & HATEM, S. N. 2002. Dedifferentiation of atrial myocytes during atrial fibrillation: role of fibroblast proliferation in vitro. *Cardiovascular Research*, 55, 38-52.
- SAFFITZ, J. E. 2000. Regulation of intercellular coupling in acute and chronic heart disease. *Braz J Med Biol Res*, 33, 407-13.
- SCHAUERTE, P., SCHERLAG, B. J., PATTERSON, E., SCHERLAG, M. A., MATSUDARIA, K., NAKAGAWA, H., LAZZARA, R. & JACKMAN, W. M. 2001.

Focal atrial fibrillation: experimental evidence for a pathophysiologic role of the autonomic nervous system. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 12, 592-9.

SCHOTTEN, U., VERHEULE, S., KIRCHHOF, P. & GOETTE, A. 2011. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev*, 91, 265-325.

SCHÜTTLER, D., BAPAT, A., KÄÄB, S., LEE, K., TOMSITS, P., CLAUSS, S. & HUCKER, W. J. 2020. Animal Models of Atrial Fibrillation. *Circulation Research*, 127, 91-110.

SCOTT, L., JR., LI, N. & DOBREV, D. 2019. Role of inflammatory signaling in atrial fibrillation. *Int J Cardiol*, 287, 195-200.

SHEN, M. J., CHOI, E. K., TAN, A. Y., HAN, S., SHINOHARA, T., MARUYAMA, M., CHEN, L. S., SHEN, C., HWANG, C., LIN, S. F. & CHEN, P. S. 2011. Patterns of baseline autonomic nerve activity and the development of pacing-induced sustained atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 8, 583-9.

SINNER, M. F., CLAUSS, S. & KÄÄB, S. 2018. Genetik von Vorhofflimmern. *Aktuelle Kardiologie*, 7, 204-210.

SINNER, M. F., CLAUSS, S., WAKILI, R., MEITINGER, T., ESTNER, H. & KÄÄB, S. 2011. Recent Advances in the Genetics of Atrial Fibrillation: From Rare and Common Genetic Variants to microRNA Signaling. *Cardiogenetics*, 1, e7.

SINNO, H., DERAKHCHAN, K., LIBERSAN, D., MERHI, Y., LEUNG, T. K. & NATTEL, S. 2003. Atrial Ischemia Promotes Atrial Fibrillation in Dogs. *Circulation*, 107, 1930-1936.

SPEISER, B., RIESS, C. F. & SCHAPER, J. 1991. The extracellular matrix in human myocardium: Part I: Collagens I, III, IV, and VI. *Cardioscience*, 2, 225-32.

SPEISER, B., WEIHRAUCH, D., RIESS, C. F. & SCHAPER, J. 1992. The extracellular matrix in human cardiac tissue. Part II: Vimentin, laminin, and fibronectin. *Cardioscience*, 3, 41-9.

SPYRIDOPOULOS, I. 2006. Herzkatheteruntersuchung. *Kardiologie compact*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

SUN, K. H., CHANG, Y., REED, N. I. & SHEPPARD, D. 2016. α -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF β activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 310, L824-36.

SUN, Y. & HU, D. 2010. The link between diabetes and atrial fibrillation: cause or correlation? *J Cardiovasc Dis Res*, 1, 10-1.

SURAWICZ, B. 1992. Role of potassium channels in cycle length dependent regulation of action potential duration in mammalian cardiac Purkinje and ventricular muscle fibres. *Cardiovasc Res*, 26, 1021-9.

SWINDLE, M. M., MAKIN, A., HERRON, A. J., CLUBB, F. J., JR. & FRAZIER, K. S. 2012. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol*, 49, 344-56.

TAKAHASHI, N., KUME, O., WAKISAKA, O., TESHIMA, Y., HARA, M. & SAIKAWA, T. 2012. New therapeutic target for the non-electrophysiological signaling in atrial fibrosis and fibrillation such as inflammation. *Journal of Arrhythmia*, 28, 145-154.

TAKEMOTO, Y., RAMIREZ, R. J., KAUR, K., SALVADOR-MONTAÑÉS, O., PONCE-BALBUENA, D., RAMOS-MONDRAGÓN, R., ENNIS, S. R., GUERRERO-SERNA, G., BERENFELD, O. & JALIFE, J. 2017. Eplerenone Reduces Atrial Fibrillation Burden Without Preventing Atrial Electrical Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 70, 2893-2905.

TEJERA-MUÑOZ, A., MARQUEZ-EXPOSITO, L., TEJEDOR-SANTAMARÍA, L., RAYEGO-MATEOS, S., OREJUDO, M., SUAREZ-ÁLVAREZ, B., LÓPEZ-LARREA, C., RUÍZ-ORTEGA, M. & RODRIGUES-DÍEZ, R. R. 2021. CCN2 Increases TGF- β Receptor Type II Expression in Vascular Smooth Muscle Cells: Essential Role of CCN2 in the TGF- β Pathway Regulation. *Int J Mol Sci*, 23.

THIJSEN, V. L., AUSMA, J., LIU, G. S., ALLESSIE, M. A., VAN EYS, G. J. & BORGERS, M. 2000. Structural changes of atrial myocardium during chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Pathol*, 9, 17-28.

TOSO, E., PEYRACCHIA, M., MATTA, M., D'ASCENZO, F., GAITA, F., KORNEJ, J., HINDRICKS, G., JARED BUNCH, T. & SALIBA, W. 2018. Incidence of thromboembolic events following atrial fibrillation catheter ablation and rate control strategies according to the kind of oral anticoagulation: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*, 270, 172-179.

TSIOUFIS, C., KONSTANTINIDIS, D., NIKOLAKOPOULOS, I., VEMMOU, E., KALOS, T., GEORGIOPOULOS, G., VOGIATZAKIS, N., IFANTIS, A., KONSTANTINOY, K., GENNIMATA, V. & TOUSOULIS, D. 2019. Biomarkers of Atrial Fibrillation in Hypertension. *Curr Med Chem*, 26, 888-897.

UMBARKAR, P., EJANTKAR, S., TOUSIF, S. & LAL, H. 2021. Mechanisms of Fibroblast Activation and Myocardial Fibrosis: Lessons Learned from FB-Specific Conditional Mouse Models. *Cells*, 10.

UNTERGASSER, A., NIJVEEN, H., RAO, X., BISSELING, T., GEURTS, R. & LEUNISSEN, J. A. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*, 35, W71-4.

VALIENTE-ALANDI, I., POTTER, S. J., SALVADOR, A. M., SCHAFER, A. E., SCHIPS, T., CARRILLO-SALINAS, F., GIBSON, A. M., NIEMAN, M. L., PERKINS, C., SARGENT, M. A., HUO, J., LORENZ, J. N., DEFALCO, T., MOLKENTIN, J. D., ALCAIDE, P. & BLAXALL, B. C. 2018. Inhibiting Fibronectin Attenuates Fibrosis and Improves Cardiac Function in a Model of Heart Failure. *Circulation*, 138, 1236-

1252.

VERHEULE, S., WILSON, E., EVERETT, T. T., SHANBHAG, S., GOLDEN, C. & OLGIN, J. 2003. Alterations in atrial electrophysiology and tissue structure in a canine model of chronic atrial dilatation due to mitral regurgitation. *Circulation*, 107, 2615-22.

VOIGT, N., LI, N., WANG, Q., WANG, W., TRAFFORD, A. W., ABU-TAHA, I., SUN, Q., WIELAND, T., RAVENS, U., NATTEL, S., WEHRENS, X. H. & DOBREV, D. 2012. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*, 125, 2059-70.

WAKILI, R., CLAUSS, S. & KAAB, S. 2012. [Molecular mechanisms of atrial fibrillation: potential role of microRNAs as new therapeutic targets and potential biomarkers]. *Herz*, 37, 166-71.

WAKILI, R., VOIGT, N., KÄÄB, S., DOBREV, D. & NATTEL, S. 2011a. The Molecular Pathophysiology of Atrial Fibrillation. *The Journal of clinical investigation*, 121, 2955-68.

WAKILI, R., VOIGT, N., KÄÄB, S., DOBREV, D. & NATTEL, S. 2011b. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest*, 121, 2955-68.

WALMA, D. & YAMADA, K. 2020. The extracellular matrix in development. *Development (Cambridge, England)*, 147.

WANG, L., YANG, Y.-F., CHEN, L., HE, Z.-Q., BI, D.-Y., ZHANG, L., XU, Y.-W. & HE, J.-C. 2021. Compound Dihuang Granule Inhibits Nigrostriatal Pathway Apoptosis in Parkinson's Disease by Suppressing the JNK/AP-1 Pathway. *Frontiers in pharmacology*, 12, 621359-621359.

WANG, T. J., LARSON, M. G., LEVY, D., VASAN, R. S., LEIP, E. P., WOLF, P. A.,

D'AGOSTINO, R. B., MURABITO, J. M., KANNEL, W. B. & BENJAMIN, E. J. 2003. Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 107, 2920-5.

WANG, Y. Y., JIANG, H., PAN, J., HUANG, X. R., WANG, Y. C., HUANG, H. F., TO, K. F., NIKOLIC-PATERSON, D. J., LAN, H. Y. & CHEN, J. H. 2017. Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *J Am Soc Nephrol*, 28, 2053-2067.

WEBER, K. T., PICK, R., SILVER, M. A., MOE, G. W., JANICKI, J. S., ZUCKER, I. H. & ARMSTRONG, P. W. 1990. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation*, 82, 1387-401.

WIJFFELS, M. C., KIRCHHOF, C. J., DORLAND, R. & ALLESSIE, M. A. 1995. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*, 92, 1954-68.

WOESSNER, J. F., JR. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb j*, 5, 2145-54.

WOLF, E., KEMTER, E., KLYMIUK, N. & REICHART, B. 2019. Genetically modified pigs as donors of cells, tissues, and organs for xenotransplantation. *Animal Frontiers*, 9, 13-20.

WORKMAN, A. J. 2010. Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 381, 235-49.

WYNDHAM, C. R. 2000. Atrial fibrillation: the most common arrhythmia. *Tex Heart Inst J*, 27, 257-67.

WYNN, G. J., TODD, D. M., WEBBER, M., BONNETT, L., MCSHANE, J., KIRCHHOF, P. & GUPTA, D. 2014. The European Heart Rhythm Association symptom classification for atrial fibrillation: validation and improvement through a

simple modification. *Europace*, 16, 965-72.

XU, F., GAO, J., MUNKHSAIKHAN, U., LI, N., GU, Q., PIERRE, J. F., STARLARD-DAVENPORT, A., TOWBIN, J. A., CUI, Y., PUREVJAV, E. & LU, L. 2020. The Genetic Dissection of Ace2 Expression Variation in the Heart of Murine Genetic Reference Population. *Front Cardiovasc Med*, 7, 582949.

YAMAGUCHI, T., OTSUBO, T., TAKAHASHI, Y., NAKASHIMA, K., FUKUI, A., HIROTA, K., ISHII, Y., SHINZATO, K., OSAKO, R., TAHARA, M., KAWANO, Y., KAWAGUCHI, A., AISHIMA, S., TAKAHASHI, N. & NODE, K. 2022. Atrial Structural Remodeling in Patients With Atrial Fibrillation Is a Diffuse Fibrotic Process: Evidence From High-Density Voltage Mapping and Atrial Biopsy. *J Am Heart Assoc*, 11, e024521.

YE, J., COULOURIS, G., ZARETSKAYA, I., CUTCUTACHE, I., ROZEN, S. & MADDEN, T. L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.

YEH, Y.-H., WAKILI, R., QI, X.-Y., CHARTIER, D., BOKNIK, P., KÄÄB, S., RAVENS, U., COUTU, P., DOBREV, D. & NATTEL, S. 2008. Calcium-Handling Abnormalities Underlying Atrial Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Dogs With Congestive Heart Failure. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 1, 93-102.

YU, G., YU, Y., LI, Y. N. & SHU, R. 2010. Effect of periodontitis on susceptibility to atrial fibrillation in an animal model. *J Electrocardiol*, 43, 359-66.

ZHANG, M., HILL, M. C., KADOW, Z. A., SUH, J. H., TUCKER, N. R., HALL, A. W., TRAN, T. T., SWINTON, P. S., LEACH, J. P., MARGULIES, K. B., ELLINOR, P. T., LI, N. & MARTIN, J. F. 2019. Long-range Pitx2c enhancer-promoter interactions prevent predisposition to atrial fibrillation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116, 22692-22698.

ZHAO, W., WANG, X., SUN, K. H. & ZHOU, L. 2018. α -smooth muscle actin is not a marker of fibrogenic cell activity in skeletal muscle fibrosis. *PLoS One*, 13, e0191031.

ZONI-BERISSO, M., LERCARI, F., CARAZZA, T. & DOMENICUCCI, S. 2014. Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol*, 6, 213-20.

ZULKIFLY, H., LIP, G. Y. H. & LANE, D. A. 2018. Epidemiology of atrial fibrillation. *Int J Clin Pract*, 72, e13070.

9 ANHANG

9.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1. Prognostizierter Anstieg der Prävalenz von VHF</i>	4
<i>Abbildung 2. Zusammenfassung von Risikofaktoren und Pathomechanismen</i>	5
<i>Abbildung 3. EKG-Dokumentation eines repräsentativen Beispiels für VHF</i>	7
<i>Abbildung 4. Schematisierte linke und rechte, obere und untere Pulmonalvene</i>	11
<i>Abbildung 5. Normale Erregungsausbreitung</i>	14
<i>Abbildung 6. Grundlegende Mechanismen von VHF</i>	15
<i>Abbildung 7. Multiple Reentry-Kreise</i>	17
<i>Abbildung 8. Schleuse in Vena jugularis externa dextra</i>	36
<i>Abbildung 9. Arteria carotis dextra</i>	36
<i>Abbildung 10. Repräsentative Aufzeichnungen zweier Burststimulationen</i>	40
<i>Abbildung 11. Koronarangiographie</i>	41
<i>Abbildung 12. Hämodynamik</i>	63
<i>Abbildung 13. Ejektionsfraktion</i>	64
<i>Abbildung 14. Herzfrequenz und EKG</i>	65
<i>Abbildung 15. Sinusknotenerholungszeit (SNRT).</i>	66
<i>Abbildung 16. Wenckebach-Punkt und 2:1-Überleitung</i>	67
<i>Abbildung 17. Atrioventrikuläre effektive Refraktärzeit (AVERP)</i>	68
<i>Abbildung 18. Atriale effektive Refraktärzeit (AERP)</i>	68
<i>Abbildung 19. Induzierbarkeit von VHF</i>	69
<i>Abbildung 20. Infarktnachweis</i>	70
<i>Abbildung 21. Quantifizierung der Fibrose. Masson-Goldner-Trichrom-Färbung</i>	71

<i>Abbildung 22. Quantifizierung der α-SMA-positive Zellen, Immunfluoreszenzfärbung</i>	73
<i>Abbildung 23. Expressionsanalyse der ECM-Gene</i>	75
<i>Abbildung 24. Genexpressionsanalyse der Myofibroblasten- und Fibroblastenmarker</i>	75
<i>Abbildung 25. Expressionsanalyse von Mediatoren profibrotischer Signalkaskaden</i>	76
<i>Abbildung 26. Combined Linkage Disequilibrium Linkage Analysis (cLDLA)</i>	77
<i>Abbildung 27. Combined Linkage Disequilibrium Linkage Analysis (cLDLA) nach Aufteilung</i>	78
<i>Abbildung 28. Hämodynamik nach Rasse</i>	80
<i>Abbildung 29. Ejektionsfraktion nach genetischem Hintergrund</i>	81
<i>Abbildung 30. Herzfrequenz und EKG nach Rasse</i>	82
<i>Abbildung 31. Sinusknotenerholungszeit (SNRT) nach Rasse</i>	83
<i>Abbildung 32. Wenckebach-Punkt (A) und 2:1-Überleitung (B) nach Rasse</i>	83
<i>Abbildung 33. Atrioventrikuläre effektive Refraktärzeit (AVERP) nach Rasse</i>	84
<i>Abbildung 34. Atriale effektive Refraktärzeit (AERP) nach Rasse</i>	85
<i>Abbildung 35. Induzierbarkeit von VHF nach Rasse</i>	87
<i>Abbildung 36. Quantifizierung der Fibrose nach genetischem Hintergrund. Masson-Goldner-Trichrom-Färbung</i>	89
<i>Abbildung 37. Quantifizierung der Myofibroblasten (α-SMA-positive Zellen) nach Rasse</i>	90
<i>Abbildung 38. Genexpressionsanalyse der ECM-Gene nach Rasse</i>	93
<i>Abbildung 39. Genexpressionsanalyse der Myofibroblasten- und Fibroblastenmarker nach Rasse</i>	94

<i>Abbildung 40. Expressionsanalyse der Regulatoren gene und Signalwege nach Rasse (Teil1)</i>	95
<i>Abbildung 41. Expressionsanalyse der Regulatoren gene und Signalwege nach Rasse (Teil2)</i>	96

9.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1. EHRA Klassifizierung von Symptomen bei Vorhofflimmern</i>	6
<i>Tabelle 2. CHA2DS2-VASc-Score</i>	8
<i>Tabelle 3. Die Phasen des kardialen Aktionspotentials im Überblick</i>	13
<i>Tabelle 4. Zusammenfassung der Genexpressionsanalyse</i>	97

9.3 Danksagung

Danken möchte ich besonders den Herren PD. Dr. med. Sebastian Clauß und Prof. Dr. med. Stefan Käab für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und natürlich auch für die Überlassung dieser interessanten Themenstellung. Mein herzlicher Dank gilt dabei Herrn PD. Dr. Sebastian Clauß für seine unermüdliche Unterstützung, die aufbauenden und pushenden Worte und seine stetige Ansprechbarkeit.

Bedanken möchte ich mich zudem herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf für die Übernahme des Dissertationsvorhabens, die Durchsicht der Arbeit, für seine Geduld sowie für die Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Außerdem möchte ich Herrn PD Dr. Ivica Medugorac für seine Hilfe bei der Genotypisierung meiner Versuchstiere danken und auch Frau Renate Damian für die technische Durchführung im Rahmen der Kooperation.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. vet. Christina Bleyer und Herrn Dr. med. Dominik Schüttler bedanken, die trotz der langen Zeit im OP stets gute Laune hatten und bei der Gewinnung der Daten und Proben geholfen haben. Tausend Dank auch Herrn Dr. med. Schüttler für die Unterstützung beim Finalisieren dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Bianca Hildebrand für die Hilfe im Labor. Sie half mir die Versuche zu planen und präzise und sauber zu arbeiten. Die Arbeit bei ihr im Labor hat mir viel Spaß gemacht.

Auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich meinen Dank aussprechen für die Unterstützung und den guten Zuspruch. Insbesondere zu erwähnen sind hierbei Herr Zhihao Zhang und Frau Valerie Pauly, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Dankbar bin ich auch den Mitarbeitern der AG Massberg/Schulz, AG Merkus und AG Deindl, die mir im Klinikum sowie auch im Wbex stets hilfsbereit und freundschaftlich begegnet sind.

Mein herzlichster Dank geht nicht zuletzt an meine Familie, die mich jederzeit unterstützt hat, ganz besonders an meinen Mann, der die Kinder so oft alleine betreuen musste, und an meine Kinder, die in letzter Zeit ganz oft auf die Mama verzichten mussten. Auch meine Eltern haben die Kinder oft übernommen und mich unterstützt, wo sie konnten. Vielen lieben Dank für das Rückenstärken und eure Nachsicht!

Zuletzt gilt mein Dank auch meinen Kommilitoninnen, ohne die ich das Studium

vielleicht nicht durchgezogen hätte, und besonders Frau PD. Dr. med. vet. Marlene Reithmair für ihr stets offenes Ohr und ihre Freundschaft.