

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes mellitus am
INSC94Y-Schweinemodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Simone Loy

aus
Prien am Chiemsee

Jahr
2026

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Sebastian Clauß

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Daphne Merkus

Drittes Gutachten: Prof. Dr. Andreas Parzefall

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2026

Für meine Oma Irm

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis	15
Hinweis zur geschlechtergerechten Sprache	16
1. Wissenschaftlicher Hintergrund.....	17
1.1 Vorhofflimmern.....	17
1.1.1 Epidemiologie des Vorhofflimmerns	17
1.1.2 Diagnostik und Einteilung	18
1.1.3 Ätiologie	20
1.1.4 Physiologie des kardialen Reizleitungssystems	21
1.1.5 Pathophysiologie von Vorhofflimmern	25
1.1.6 Therapie von Vorhofflimmern.....	28
1.2 Diabetes Mellitus.....	33
1.2.1 Ätiologie	33
1.2.2 Epidemiologie	34
1.2.3 Klinik.....	35
1.2.4 Screening und Diagnostik	35
1.2.5 Pathophysiologie.....	37
1.2.6 Therapie des Diabetes mellitus.....	42
1.3 Vorhofflimmern und Diabetes	48
1.4 Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes Mellitus.....	49
1.4.1 Strukturelles Remodeling.....	52
1.4.2 Elektrisches Remodeling	54
1.4.3 Immunologisches Remodeling	60
1.5 Tiermodelle des Diabetes mellitus	67
1.6 Hypothese	69
2. Material.....	70
2.1 <i>In vivo</i>	70
2.1.1 Medikamente.....	70
2.1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen.....	71
2.2 <i>In vitro</i>	73
2.2.1 Verbrauchsmaterialen	73
2.2.2 Antikörper	76
2.2.3 Geräte und Maschinen.....	78
2.3 Software	81
3. Methoden	82
3.1 Tiermodell	82
3.2 <i>In vivo</i>	84
3.2.1 Induzierbarkeit von Vorhofflimmern	84

3.3	<i>In vitro</i>	86
3.3.1	Mikrodissektion Schweineherz.....	86
3.3.2	Durchflusszytometrie	92
3.3.3	Histologie	97
3.3.4	Protein Isolation	100
3.3.5	Western Blot.....	103
3.3.6	Statistik.....	108
4.	Ergebnisse.....	109
4.1	Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes mellitus.....	109
4.1.1	<i>In vivo</i>	109
4.1.2	<i>In vitro</i>	111
4.2	Der Einfluss von Dapagliflozin auf das proarrhythmogene Remodeling bei Diabetes mellitus.....	136
4.2.1	<i>In vivo</i>	136
4.2.2	<i>In vitro</i>	138
5.	Diskussion	158
5.1	Das Schwein als Versuchstier	158
5.2	Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes mellitus.....	161
5.2.1	<i>In vivo</i>	161
5.2.2	<i>In vitro</i>	162
5.3	Der Einfluss von Dapagliflozin auf das proarrhythmogene Remodeling bei Diabetes mellitus.....	171
5.3.1	<i>In vivo</i>	171
5.3.2	<i>In vitro</i>	173
6.	Limitationen.....	177
7.	Zusammenfassung und Ausblick	178
	Abstract (Englisch)	180
	Danksagung	182
	Affidavit	183
	Übereinstimmungserklärung	184
	Lebenslauf	185
	Publikationsliste	186
	Literaturverzeichnis	187

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGEs	Advanced Glycation End Products
AREG	Amphiregulin
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	arbitrary units
AV-Knoten	Atrioventrikulknoten
AVN	Atrioventrikulknoten
BMI	Body-Mass-Index
bpm	beats-per-minute
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CAN	kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie
C-Peptid	Connecting-Peptid
CRP	C-reaktives Protein
Cx37	Connexin 37
Cx40	Connexin 40
Cx43	Connexin 43
Cx45	Connexin 45
DADS	Delayed After Depolarizations/Späte Nachdepolarisationen
DAPA	Dapagliflozin
dl	Deziliter
DM	Diabetes
EADS	Early Afterdepolarizations/ Frühe Nachdepolarisationen
EHRA	European Heart Rhythm Association
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ESC	European Society of Cardiology
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukose-Transporter
HbA1c	Hämoglobin-A1c-Wert/ Glykiertes Hämoglobin
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Horseradish peroxidase
Hz	Hertz
IL-1	Interleukin 1
IL-1 β	Interleukin 1-beta
IL-6	Interleukin 6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
INS-Gen	Insulin-Gen
IVS	Interventrikuläres Septum
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
LA	Linker Vorhof
LAA	Linkes Vorhofohr
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LV	Linker Ventrikel
mg	Milligram
MIDY	Mutant INS-gene-induced Diabetes of Youth
min	Minute
mm	Millimeter

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
ms	Millisekunde
Na	Natrium
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
nF- κ B	Nuklearer Faktor „kappa-light-chain-enhancer“ von aktivierten B-Zellen
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOAK	Neue orale Antikoagulantien
NOS	Stickstoffspezies
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
RA	Rechter Vorhof
RAA	Rechtes Vorhofohr
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per minute
RV	Rechter Ventrikel
SAN	Sinusknoten
SGLT	Sodium-dependent glucose transporter
SPP1	Gen das für Osteopontin kodiert
STZ	Streptozotocin
TGF- β 1	Transformierender Wachstumsfaktor 1 beta
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TLR2	Toll-like-Rezeptor 2
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
Vgl.	Vergleiche

VHF	Vorhofflimmern
Vs.	Versus
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. REGIONALE PRÄVALENZ VON VORHOFLIMMERN AUF FÄLLE/100.000 EINWOHNER	17
ABBILDUNG 2. DIE VIER PHASEN DES AKTIONSPOTENTIALS DES VENTRIKELMYOKARDS	22
ABBILDUNG 3. ERREGUNGSBILDUNGS- UND LEITUNGSGEWEBE DES HERZENS	23
ABBILDUNG 4. MECHANISMEN EKTOPER ERREGUNG	25
ABBILDUNG 5. DIAGNOSTIK DES DIABETES UND PRÄDIABETES	36
ABBILDUNG 6. ÜBERBLICK ÜBER DIE PATHOGENESE DES TYP-2-DIABETES	38
ABBILDUNG 7. PATHOPHYSIOLOGIE DES MIDY-DIABETES	40
ABBILDUNG 8. PATHOPHYSIOLOGIE ZWISCHEN GESUNDEM UND ERKRANKTEM INS-ALLEL BEI MIDY	41
ABBILDUNG 9. ÜBERBLICK ÜBER DEN WIRKMECHANISMUS AUSGEWÄHLTER ANTIDIABETIKA	42
ABBILDUNG 10. ÜBERBLICK ÜBER DIE VERSCHIEDENEN WIRKMECHANISMEN VON SGLT2-HEMMERN	47
ABBILDUNG 11. ÜBERBLICK ÜBER DIE VERSCHIEDENEN WEGE DES DIABETISCHEN REMODELINGS	49
ABBILDUNG 12. ÜBERBLICK ÜBER DEN AUFBAU VON CONNEXINEN, CONNEXONEN UND GAP JUNCTIONS	54
ABBILDUNG 13. ÜBERBLICK ÜBER DIE VERÄNDERUNGEN DER IONENKANÄLE BEI DIABETES	56
ABBILDUNG 14. ENTNAHME DER PROBEN, TEIL 1	87
ABBILDUNG 15. ENTNAHME DER PROBEN, TEIL 2	88
ABBILDUNG 16. ENTNAHME DER PROBEN, TEIL 3	89
ABBILDUNG 17. ENTNAHME DER PROBEN, TEIL 4	89
ABBILDUNG 18. ENTNAHME DER PROBEN, TEIL 5	90
ABBILDUNG 19. ENTNAHME DER PROBE, TEIL 6	91
ABBILDUNG 20. HÄMATOPOESE	95
ABBILDUNG 21. GATING STRATEGIE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	96
ABBILDUNG 22. INDUZIERBARKEIT VON VORHOFLIMMERN [%]	109
ABBILDUNG 23. DAUER DER VORHOFLIMMEREPISOSEN IN SEKUNDEN	110
ABBILDUNG 24. ANTEIL VON CD45 ⁺ LEUKOZYTEN IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI WILDTYP-SCHWEINEN	111
ABBILDUNG 25. ANTEIL VON CD45 ⁺ LEUKOZYTEN IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DIABETISCHEN SCHWEINEN	112
ABBILDUNG 26. ANTEIL CD45 ⁺ LEUKOZYTEN AN ALLEN ZELLEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYPEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN	113
ABBILDUNG 27. ANTEIL VON CD172A ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI WILDTYP-SCHWEINEN	114
ABBILDUNG 28. ANTEIL VON CD172A ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEIM DIABETISCHEN SCHWEIN	115
ABBILDUNG 29. ANTEIL VON CD172A ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYPEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN	115
ABBILDUNG 30. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI WILDTYP-SCHWEINEN	117
ABBILDUNG 31. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DIABETISCHEN SCHWEINEN	118
ABBILDUNG 32. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYPEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN	119
ABBILDUNG 33. ANTEIL VON CD163 ⁻ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEIM WILDTYP-SCHWEIN	120

ABILDUNG 34. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEIM DIABETISCHEN SCHWEIN	121
ABILDUNG 35. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYPEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN	122
ABILDUNG 36. IMMUNFLUORESZENZFÄRBUUNG FÜR CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AM BEISPIEL EINES WILDTYP-SCHWEINS	123
ABILDUNG 37. A) ANZAHL AN CD163 ⁺ MAKROPHAGEN/MM ³ IN DEN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DEN WILDTYP-SCHWEINEN.....	124
ABILDUNG 38. A) ANZAHL AN CD163 ⁺ MAKROPHAGEN/MM ³ IN DEN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DEN DIABETISCHEN SCHWEINEN.....	125
ABILDUNG 39. ANZAHL AN CD163 ⁺ MAKROPHAGEN IN DEN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYP UND DIABETISCHEN SCHWEINEN.....	126
ABILDUNG 40. DIE CONNEXIN 37-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYPEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN.....	127
ABILDUNG 41. DIE CONNEXIN 40-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYPEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN.....	129
ABILDUNG 42. DIE CONNEXIN 43-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYP UND DIABETISCHEN SCHWEINEN.....	131
ABILDUNG 43. DIE CONNEXIN 45-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN WILDTYPEN UND DIABETISCHE SCHWEINEN.....	132
ABILDUNG 44. DIE CONNEXIN 43-EXPRESSION IM VERGLEICH ZWISCHEN WILDTPYEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN.	134
ABILDUNG 45. ABILDUNG 45. INDUZIERBARKEIT VON VORHOFFLIMMERN [%] IM VERGLEICH ZWISCHEN DIABETIKERN (DM, N=6) UND DIABETIKERN MIT DAPAGLIFLOZIN-BEHANDLUNG (DM+DAPA, N=9).	136
ABILDUNG 46. DAUER DER VORHOFFLIMMEREPISOSEN IN SEKUNDEN. VERGLEICH ZWISCHEN DIABETIKERN (DM, N=6) SOWIE DIABETIKERN, DIE MIT DAPAGLIFLOZIN BEHANDELT WURDEN (DM+DAPA, N=9).	137
ABILDUNG 47. ANTEIL CD45 ⁺ LEUKOZYTEN AN ALLEN ZELLEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG	138
ABILDUNG 48. ANTEIL CD45 ⁺ LEUKOZYTEN AN ALLEN ZELLEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEINEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.	139
ABILDUNG 49. ANTEIL VON CD172A ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG..	140
ABILDUNG 50. ANTEIL VON CD172A ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEINEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.	141
ABILDUNG 51. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.	142
ABILDUNG 52. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEINEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.	143
ABILDUNG 53. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.	144
ABILDUNG 54. ANTEIL VON CD163 ⁺ MAKROPHAGEN AN CD45 ⁺ LEUKOZYTEN [%] IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEINEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.	145

ABBILDUNG 55. A) ANZAHL AN CD163 ⁺ MAKROPHAGEN/MM ³ IN DEN VERSCHIEDENEN REGIONEN BEI DEN MIT DAPAGLIFLOZIN BEHANDELten DIABETISCHEN SCHWEINEN.....	146
ABBILDUNG 56. ANZAHL AN CD163 ⁺ MAKROPHAGEN IN DEN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEINEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.....	147
ABBILDUNG 57. DIE CONNEXIN 37-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEINEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.....	148
ABBILDUNG 58. DIE CONNEXIN 40-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEIN UND DIABETISCHEN SCHWEIN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.....	150
ABBILDUNG 59. DIE CONNEXIN 43-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEINEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.....	152
ABBILDUNG 60. DIE CONNEXIN 45-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN REGIONEN, VERGLEICH ZWISCHEN DIABETISCHEN SCHWEINEN UND DIABETISCHEN SCHWEINEN MIT DAPAGLIFLOZINBEHANDLUNG.....	154
ABBILDUNG 61. DIE ROLLE VON DAPAGLIFLOZIN AUF DIE CONNEXIN 43 EXPRESSION BEI DIABETES MELLITUS	156
ABBILDUNG 62. VERGLEICH DES ATRIALEN UND VENTRIKULÄREN AKTIONSPOTENTIALS ZWISCHEN MENSCH, SCHWEIN UND MAUS	160

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1. EHRA-SCORE	18
TABELLE 2. ÜBERSICHT ÜBER DIE VERSCHIEDENEN FORMEN DES VORHOFFLIMMERNNS.....	19
TABELLE 3. AF-CARE-KONZEPT	28
TABELLE 4. CHA ₂ DS ₂ -VA-SCORE UND HAS-BLED-SCORE.....	30
TABELLE 5. ÜBERSICHT ÜBER DIE VERSCHIEDENEN DIABETESFORMEN UNTERTEILT NACH AUSLÖSER	34
TABELLE 6. ÜBERBLICK ÜBER DIE EKG-PARAMETER BEI MENSCH, SCHWEIN, HASE UND MAUS	159

Hinweis zur geschlechtergerechten Sprache

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation bei Personenbezeichnungen das generische Maskulinum verwendet. Diese Formulierung bezieht sich selbstverständlich auf Personen jeden Geschlechts gleichermaßen.

1. Wissenschaftlicher Hintergrund

1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern stellt die häufigste Form der kardialen Rhythmusstörung dar und ist aufgrund potenzieller schwerwiegender Komplikationen, wie Schlaganfall oder Herzinsuffizienz, mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität assoziiert (2-4). Aufgrund der globalen demografischen Alterung sind sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz des Vorhofflimmerns in den vergangenen zwei Jahrzehnten signifikant angestiegen (3). Dies stellt bereits heute und insbesondere in der Zukunft eine erhebliche sozioökonomische Herausforderung dar (3, 5).

1.1.1 Epidemiologie des Vorhofflimmerns

Das Risiko an Vorhofflimmern zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter kontinuierlich an (6). Weltweit haben sich Inzidenz und Prävalenz des Vorhofflimmerns in den letzten 50 Jahren verdreifacht (5). Derzeit sind in Europa etwa 9 Millionen Menschen über 55 Jahre von dieser Herzrhythmusstörung betroffen (5). Zudem ist ein anhaltender Anstieg der Prävalenz auch bei jüngeren Patienten zu beobachten (7). Die Geschlechterverteilung zeigt eine höhere Inzidenz und Prävalenz bei Männern, während Frauen eine höhere krankheitsbedingte Mortalitätsrate aufweisen (4). Darüber hinaus bestehen globale Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit, wobei Nordamerika und Europa die am stärksten betroffenen Regionen darstellen (*vgl. Abb. 1*) (6).

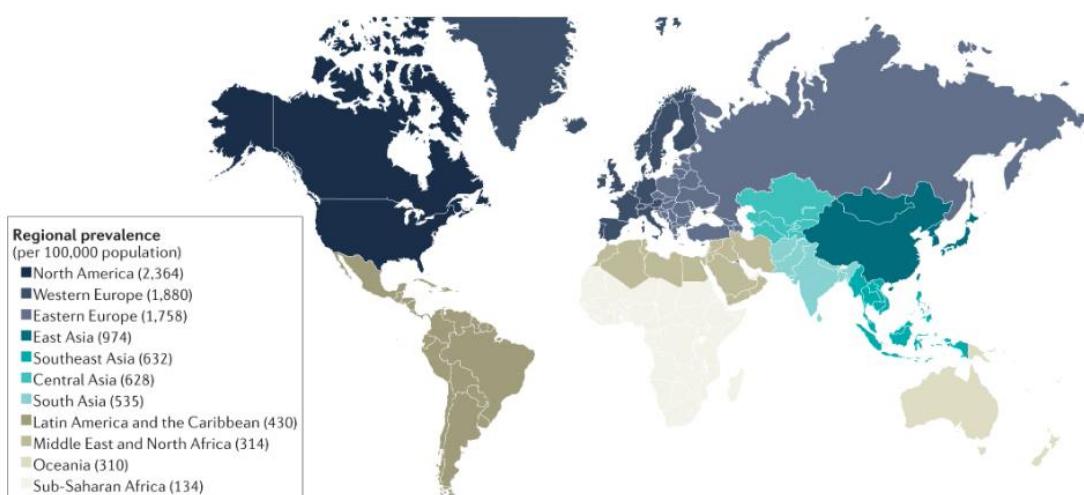


Abbildung 1. Regionale Prävalenz von Vorhofflimmern auf Fälle/100.000 Einwohner, Abbildung von Brundel et al. 2022 (6).

1.1.2 Diagnostik und Einteilung

Vorhofflimmern gehört zu den supraventrikulären Herzrhythmusstörungen und ist durch eine unkoordinierte atriale Erregung und eine daraus resultierende unzureichende Vorhofkontraktion gekennzeichnet (8). Diese unkoordinierte Erregung führt zu einer unregelmäßigen ventrikulären Aktivität (8). Im EKG zeigt sich Vorhofflimmern durch das Fehlen von P-Wellen sowie eine irreguläre RR-Intervallabfolge (8). Gemäß den ESC-Leitlinien von 2020 erfordert die Diagnose von Vorhofflimmern den Nachweis einer Flimmerepisode mit einer Mindestdauer von 30 Sekunden (9). Diese muss mittels eines 12-Kanal-Ruhe-EKGs oder eines 1-/3-Kanal-Langzeit-EKGs dokumentiert werden (7, 9).

Mindestens ein Drittel der Patienten mit Vorhofflimmern bleibt asymptomatisch (5). Treten Symptome auf, werden häufig Brustschmerzen, Leistungsminderung, Dyspnoe und Palpitationen beschrieben (10). Aufgrund der potenziell schwerwiegenden Folgen eines unbehandelten Vorhofflimmerns wird gemäß Evidenzgrad 1b ein Screening für alle Patienten über 65 Jahre empfohlen (9). Für Patienten über 75 Jahre oder mit einem erhöhten Risikoprofil wird ein Screening mit Evidenzgrad 2b empfohlen (9).

Anhand ihrer Symptome können Patienten mithilfe des EHRA-Scores in vier verschiedene Gruppen unterteilt werden (*vgl. Tabelle 1*) (11).

EHRA I	ohne Symptome
EHRA II	milde Symptome ohne Einschränkungen
EHRA III	alltägliche Aktivitäten sind mit Einschränkung noch möglich
EHRA IV	alltägliche Aktivitäten können aufgrund der Symptomschwere nicht mehr bewältigt werden

Tabelle 1. EHRA-Score, Tabelle modifiziert nach Romero et al. (11).

Basierend auf der Dauer der Rhythmusstörung können vier unterschiedliche Formen des Vorhofflimmerns voneinander abgegrenzt werden (*vgl. Tabelle 2*) (2).

Paroxysmales Vorhofflimmern	Terminiert spontan von selbst mit einer Dauer von weniger als sieben Tagen
Persistierendes Vorhofflimmern	Vorhofflimmern mit einer Dauer von mehr als sieben Tagen, kann Folge von wiederauftretendem paroxysmalem Vorhofflimmern sein. Terminiert nicht spontan.
Langanhaltendes, persistierendes Vorhofflimmern	Vorhofflimmern mit einer Dauer von mehr als 12 Monaten. Rhythmisierungsversuche waren bisher erfolglos.
Permanentes Vorhofflimmern	Vorhofflimmern ohne Ansprechen auf antiarrhythmische Therapie. Abbruch der aktuellen Therapie aufgrund von Ineffektivität.

Tabelle 2. Übersicht über die verschiedenen Formen des Vorhofflimmerns, Tabelle modifiziert nach Nesheiwat et al. (2).

1.1.3 Ätiologie

Als Auslöser von Vorhofflimmern sind primäre von sekundären Ursachen zu unterscheiden.

Primäres Vorhofflimmern betrifft ca. 1,6 % bis 30 % aller Patienten mit Vorhofflimmern (12). Primär auftretendes Vorhofflimmern bezeichnet das erstmalige Auftreten von Vorhofflimmern, insbesondere bei Patienten ohne vorbestehende strukturelle Herzerkrankung (13, 14). Als potenzielle Ursache des primären Vorhofflimmerns wird eine genetische Prädisposition diskutiert - eine positive Familienanamnese ist mit einem bis zu dreifach erhöhtem Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert (12, 13). Als Ursache der genetischen Prädisposition werden Mutationen in Genen die Ionenkanäle oder Zellverbindungen kodieren, ein verändertes Zytoskelett, sowie modulierte Transkriptionsfaktoren verantwortlich gemacht (6). Der Begriff idiopathisches Vorhofflimmern wird für über 60-jährige Patienten verwendet, bei denen keine Vorerkrankung als Ursache des Vorhofflimmerns bekannt ist (13).

Sekundäres Vorhofflimmern entsteht infolge kardialer oder extrakardialer Erkrankungen (12). Zu den häufigen kardialen Ursachen zählen ein akuter Myokardinfarkt, kardiale chirurgische Eingriffe, Peri- oder Myokarditis, arterielle Hypertonie sowie Kardiomyopathien (12). Extrakardiale Risikofaktoren sind beispielsweise eine Erkrankung der Schilddrüse oder ein bestehender Diabetes sowie Rauchen, ein höheres Lebensalter, Übergewicht oder Hypertonie (12, 15). Adipositas, definiert als ein Body-Mass-Index von über 30 kg/m², stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung von Vorhofflimmern dar (4). Zudem ist bei adipösen Patienten das Risiko für den Übergang von paroxysmalem zu permanentem Vorhofflimmern erhöht (4). Diabetes mellitus ist ein bedeutender Risikofaktor für das Auftreten von Vorhofflimmern (15). Männer mit Diabetes weisen ein um 40 % erhöhtes Erkrankungsrisiko auf, während das Risiko bei Frauen mit Diabetes um 60 % erhöht ist (15). Zudem steigt das Risiko, an Vorhofflimmern zu erkranken, pro Jahr der Diabetesdauer um weitere 3 % (15).

1.1.4 Physiologie des kardialen Reizleitungssystems

Das menschliche Herz verfügt über ein spezialisiertes Erregungsbildungs- und -leitungssystem, das die elektrische Erregung koordiniert und über das Myokard weiterleitet (16). Das gesamte Myokard besitzt prinzipiell die Fähigkeit zur autonomen Erregungsbildung (16). Die elektrische Erregungsbildung im Herzen resultiert aus dem spontanen intrazellulären Ein- und Ausstrom von Ionen in die Zelle, was zur Depolarisation und somit zur Auslösung des Aktionspotentials führt (17). Dieses wiederum führt zu einer Kontraktion der Kardiomyozyten (17). Die zeitliche und amplitudenmäßige Ausprägung des Aktionspotentials variiert in Abhängigkeit von Zelltyp und lokaler Position im Herzgewebe, wobei unterschiedliche Ionenkanäle und -ströme zu einer spezifischen Morphologie des Aktionspotentials führen (17).

Das Aktionspotential des Arbeitsmyokards lässt sich prinzipiell in fünf Phasen unterteilen (Phase 0 bis Phase 4) (18, 19). In Phase 0 erfolgt die Depolarisation, die durch die Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle und den damit verbundenen schnellen Einstrom von Natriumionen ausgelöst wird (18, 19). Phase 1 stellt die frühe Repolarisation dar, bei der die Natriumkanäle inaktiviert werden und gleichzeitig schnelle, auswärtsgerichtete Kaliumkanäle aktiviert werden, was zu einem raschen Kaliumausstrom führt (18, 19). In Phase 2, der Plateauphase, werden einwärtsgerichtete Calciumkanäle aktiviert und der Einstrom von Calciumionen stabilisiert das Aktionspotential (18, 19). Phase 3 beschreibt die Repolarisation, bei der die Calciumkanäle schließen und der Kaliumausstrom zur Rückkehr des Ruhemembranpotenzials beiträgt (18, 19). In Phase 4 wird das Ruhemembranpotenzial erreicht, wobei die Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle wieder in ihrem Gleichgewichtszustand ist (vgl. Abb. 2) (18-20).

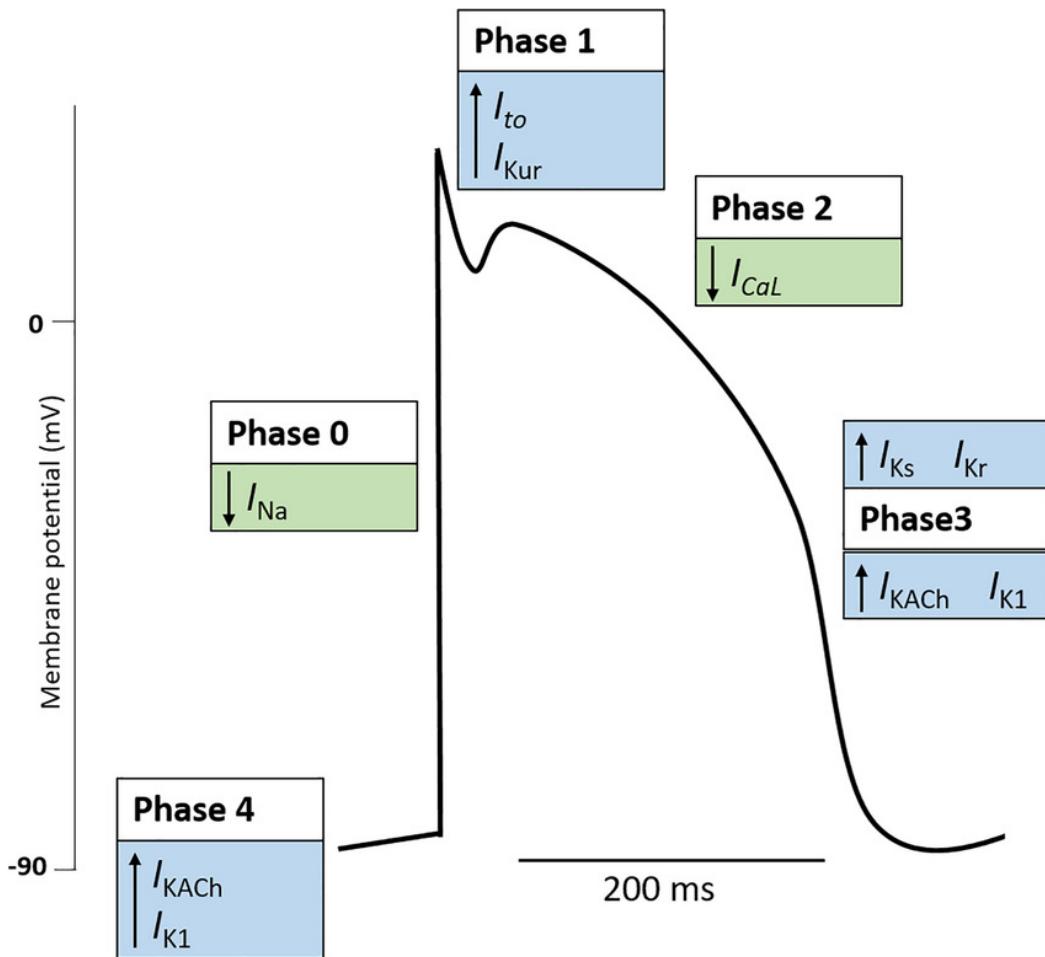


Abbildung 2. Die vier Phasen des Aktionspotentials des Ventrikelmyokards. Phase 0) Depolarisierung durch Öffnung von Natriumkanälen (I_{Na}). Phase 1) Aktivierung auswärtsgerichteter Kaliumkanäle (I_{to} , I_{Kur}). Phase 2) Aktivierung einwärtsgerichteter Calciumkanäle (I_{CaL}). Phase 3) Öffnung von Kaliumkanälen (I_{Ks} , I_{Kr} , I_{KACh} , I_{K1}) führt zum Kaliumausstrom. Phase 4) Ruhemembranpotential, das durch Kaliumkanäle (I_{KACh} , I_{K1}) aufrechterhalten wird. Abbildung von Njegic et al. (20).

Bei den Schrittmacherzellen des Herzens lassen sich drei Phasen des Aktionspotentials unterscheiden (17). Phase 0 ist durch die Depolarisation gekennzeichnet, die durch den Einstrom von Calciumionen in die Zelle ausgelöst wird (17). Die Phasen 1 und 2 sind bei den Schrittmacherzellen nicht vorhanden (17). In Phase 3, der Repolarisationsphase, kommt es zu einem Schließen der Calciumkanäle und Öffnen der Kaliumkanäle, was zu einem Ausstrom von Kaliumionen führt (17). In Phase 4 kommt es zu einem langsamen Natriumeinstrom (17). Die Morphologie von Phase 4 variiert je nach Zelltyp, wobei die Schrittmacherzellen des Sinusknotens den schnellsten Natriumeinstrom aufweisen (17). Über die Dauer des Natriumeinstroms wird die Herzfrequenz reguliert, da dieser das Depolarisationsmuster der Zellen beeinflusst (17).

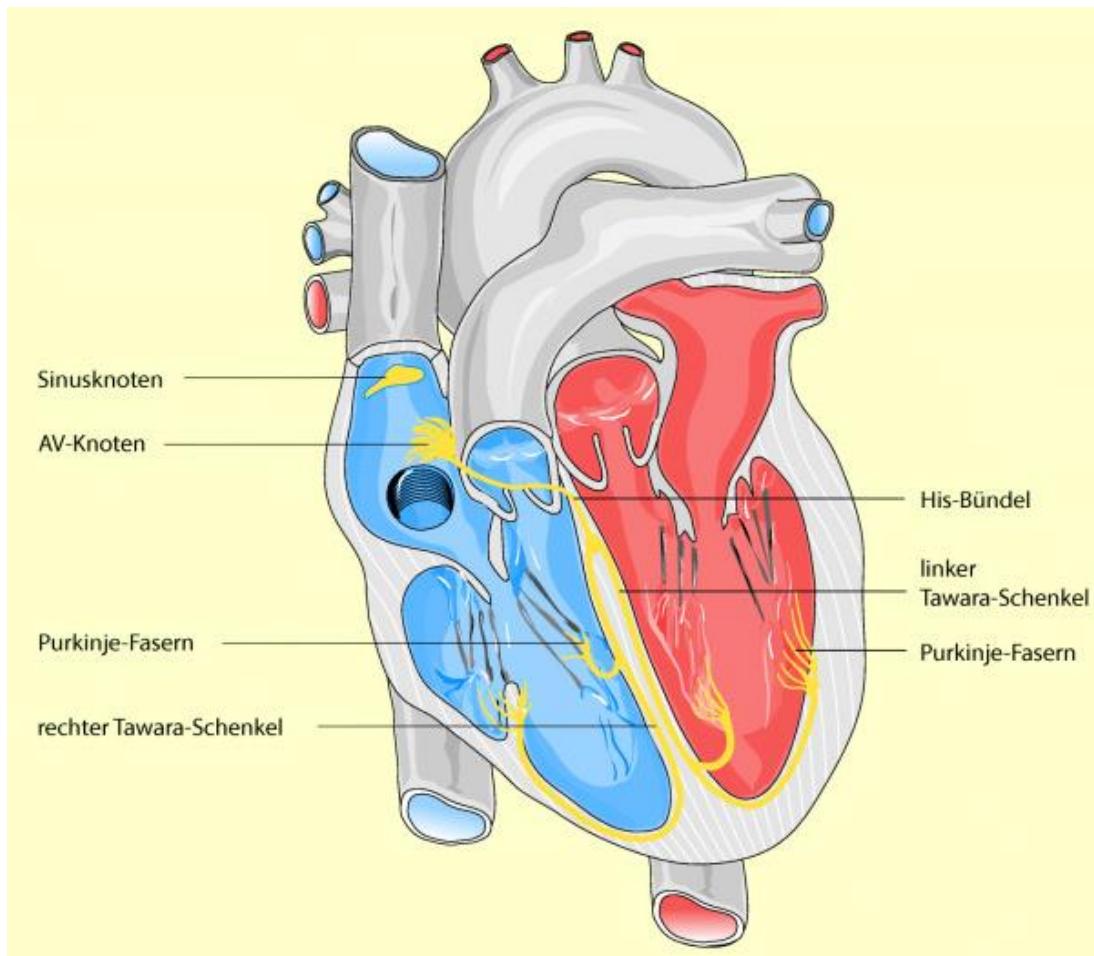


Abbildung 3. Erregungsbildungs- und Leitungsgewebe des Herzens. Die Erregung wird vom Sinusknoten zum AV-Knoten weitergeleitet. Von dort aus gelangt sie über das His-Bündel in das Ventrikel-Septum und über den linken und rechten Tawara-Schenkel zu den Ventrikeln. Die Purkinje-Fasern sorgen für eine Weiterleitung der Erregung in den Ventrikeln. Abbildung von Larsen R. (16).

Der primäre Schrittmacher des Herzens ist der Sinusknoten, der im Bereich des rechten Atriums nahe der Einmündung der Vena cava superior lokalisiert ist (16). Nachdem es über das Aktionspotential zur Depolarisation der Zelle gekommen ist, wird diese Erregung über das Herz weitergeleitet (16). Vom Sinusknoten aus erfolgt die Erregungsausbreitung über internodale Leitungsbahnen zum AV-Knoten (16). Der AV-Knoten befindet sich im Bereich des Koch-Dreiecks an der Grenze zwischen rechtem Vorhof und rechtem Ventrikel und fungiert als sekundärer Schrittmacher sowie als physiologischer Verzögerer der Erregungsleitung (16). Vom AV-Knoten aus erfolgt die Weiterleitung der Erregung über das His-Bündel in das Ventrikelseptum, wo es sich in den rechten und

linken Tawara-Schenkel aufspaltet (16). Über die Purkinje-Fasern gelangt die Erregung schließlich zu den Herzkammern, was zu einer koordinierten ventrikulären Kontraktion führt (*vgl. Abb. 3*) (16).

1.1.5 Pathophysiologie von Vorhofflimmern

Für die Entstehung und den Progress von Vorhofflimmern sind zwei wesentliche Faktoren entscheidend: Ektopie und Reentry (15).

Als Ektopie bezeichnet man Schrittmacherzellen außerhalb des physiologischen Erregungszentrums (4), deren abnormale elektrische Aktivität den physiologischen Herzrhythmus ersetzt und zu einer irregulären Kontraktion der Vorhöfe führt (6). Ursprung dieser irregulären Aktivität sind zu 95 % die Ostien der Pulmonalvenen im linken Vorhof oder (unter 5 %) Vena cava superior und inferior (6). In seltenen Fällen konnten auch im rechten Vorhofohr oder rechten Vorhof weitere ektope Foki identifiziert werden (21, 22).

Eine mögliche Ursache ektoper Erregungsbildung ist eine gesteigerte Spontanaktivität von Schrittmacherzellen, die zu einer vorzeitigen Auslösung eines Aktionspotenzials führt (23). Diese gesteigerte Spontanaktivität kann unter anderem durch eine Verminderung des auswärtsgerichteten Kaliumstroms (I_{K1}) oder eine Zunahme des I_f -Stroms („funny current“) bedingt sein (vgl. Abb. 4) (23).

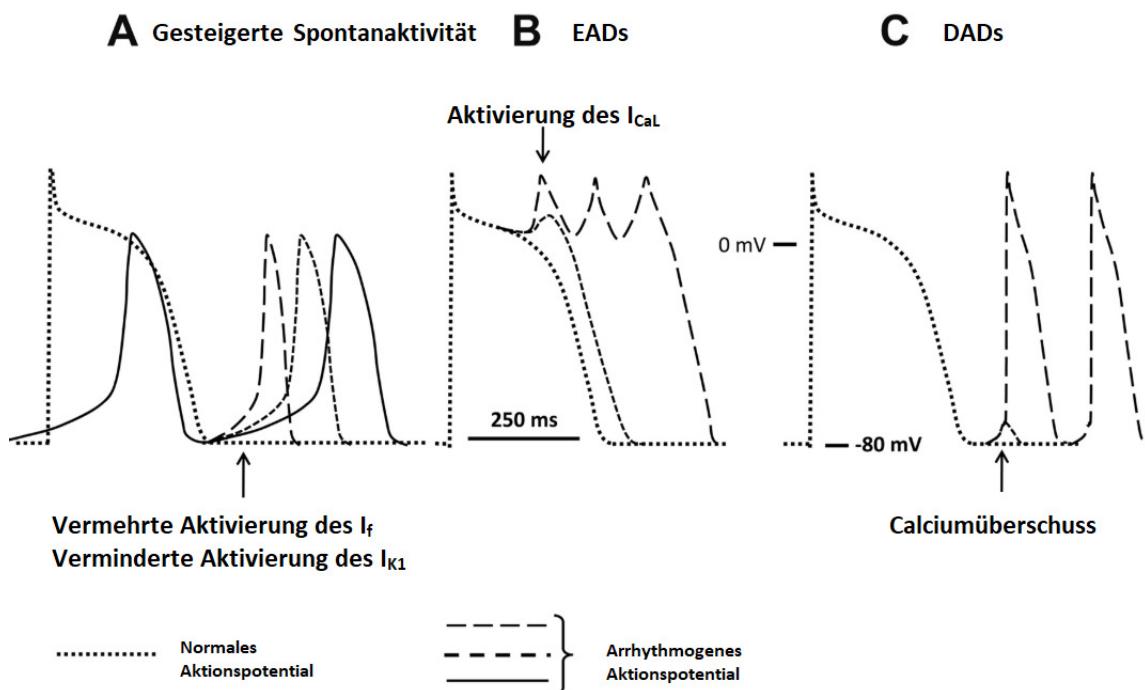


Abbildung 4. Mechanismen ektopter Erregung. A) Gesteigerte Spontanaktivität durch Vermehrte Aktivierung des „funny current“ -Stroms (I_f) und verminderte Aktivierung des Kaliumstroms (I_{K1}). B) Frühe Nachdepolarisation (EADs) durch Aktivierung von Calciumströmen (I_{CaL}). C) Späte Nachdepolarisation (DADs) durch Calciumüberschuss. Abbildung von Iwasaki et al. mit Modifikation (23).

Ein weiterer bedeutender Mechanismus, der zur Initiierung von Vorhofflimmern beiträgt, sind Nachdepolarisationen, welche in frühe Nachdepolarisationen (EADs) und späte Nachdepolarisationen (DADs) unterschieden werden (24). EADs treten während der Plateauphase oder der Repolarisationsphase des kardialen Aktionspotenzials auf und resultieren aus einer erneuten Depolarisation der Membran, die durch eine verlängerte Aktionspotenzialdauer begünstigt wird (24). EADs entstehen typischerweise infolge einer Reduktion auswärtsgerichteter Ionenströme oder durch eine Zunahme einwärtsgerichteter Ströme oder beidem (25). Diese Veränderungen der Ionenströme resultieren häufig aus einer Verlängerung des Aktionspotenzials, was durch eine verstärkte Aktivierung des L-Typ-Calciumkanals (I_{CaL}) zu einem vermehrten Calciumeinstrom führt (23). Diese Modifikation der Ionenströme kann zur Auslösung von vorzeitigen Aktionspotenzialen führen und somit die elektrische Stabilität des Myokards stören (vgl. Abb. 4) (24).

Im Gegensatz dazu entstehen DADs nach vollständiger oder fast vollständiger Repolarisation (Phase 4 des Aktionspotentials) und werden hauptsächlich durch intrazelluläre Kalziumüberladung verursacht (vgl. Abb. 4) (24, 26). Diese Kalziumüberschüsse führen zu oszillierenden Membranpotentialen, die, wenn sie einen bestimmten Schwellenwert erreichen, selbstständig Aktionspotenziale auslösen können (24). DADs können durch eine Vielzahl pathophysiologischer Zustände ausgelöst werden, darunter Herzinsuffizienz, Hypokaliämie sowie tachykarde Herzrhythmen (26). Eine mögliche Ursache für die Entstehung ektoper Erregungen ist ein pathologischer Calcium-Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (15). Dieser Prozess führt über die Aktivierung eines einwärtsgerichteten Natrium-Kanals zu einer spontanen Depolarisation der Kardiomyozyten und trägt somit zur Initiierung von Vorhofflimmern bei (15). Sowohl EADs als auch DADs tragen zur Entstehung von „triggered activity“ bei, welche als potenzielle Ursache für rhythmogene Ektopien und arrhythmogene Zustände, wie das Vorhofflimmern, gilt (24, 27).

Die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern wird unter anderem durch Remodeling-Prozesse geschaffen (4). Remodeling-Prozesse können sowohl als Auslöser von Rhythmusstörungen fungieren, als auch zur Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern beitragen (28). Dabei führt Vorhofflimmern selbst zu weiteren strukturellen und elektrischen Veränderungen im

Vorhofgewebe, wodurch die Persistenz der Arrhythmie begünstigt wird (28). Dieser selbstverstärkender Mechanismus wird als „Vorhofflimmern bedingt Vorhofflimmern“ bezeichnet (28). Als Reentry-Mechanismus bezeichnet man eine fortgesetzte Erregungsausbreitung im Myokard, wodurch es nach dem Ende der Refraktärzeit zu einer erneuten Aktivierung des Herzgewebes kommt (29). Die Ursachen von Reentry sind vielfältig (30). Unter anderem kann eine Modifikation kardialer Ionenkanäle sowie eine reduzierte Funktion und Expression von Gap Junctions, im Zuge eines elektrischen Remodelings, zur Ausbildung proarrhythmischer Reentry-Substrate beitragen (30). Ein vermehrter oxidativer Stress, zum Beispiel im Rahmen einer diabetischen Stoffwechsellage, kann sekundär über Veränderungen kardialer Ionenströme nicht nur die Entstehung früher Nachdepolarisationen begünstigen, sondern darüber hinaus auch die Ausbildung von Reentry-Mechanismen fördern (30). Bei Diabetes konnte beispielsweise eine vermehrte Akkumulation von Makrophagen in den Vorhöfen im Rahmen einer immunologischen Veränderung nachgewiesen werden (31). Diese Makrophagen hemmen durch die Freisetzung von IL-1 β die atrialen Calciumströme, was zur elektrischen Instabilität beiträgt (31). Auch strukturelle Veränderungen, wie eine Dilatation der Vorhöfe oder interstitielle Fibrose, werden mit der Ausbildung arrhythmogener Reentry-Mechanismen in Verbindung gebracht, da sie die die Bildung von Reentry-Kreisen fördern können (32).

Die zugrunde liegenden Mechanismen der einzelnen Subtypen des atrialen Remodelings werden im Kapitel 1.4 ausführlicher erläutert.

1.1.6 Therapie von Vorhofflimmern

Im Jahr 2024 wurden neue ESC-Leitlinien zur Therapie des Vorhofflimmerns veröffentlicht, in denen das AF-CARE-Konzept als strukturierter Ansatz für Diagnostik und Therapie herangezogen wird (*vgl. Tabelle 3*) (33).

I)	C – „Comorbidity“	Management von Komorbiditäten und Risikofaktoren
II)	A – „Avoid“	Vermeidung thromboembolischer Ereignisse
III)	R – „Reduce“	Reduktion von Symptomen durch Frequenz- und Rhythmuskontrolle
IV)	E – „Evaluation“	Evaluation und Neubewertung

Tabelle 3. AF-CARE-Konzept zur Behandlung von Vorhofflimmern, Tabelle modifiziert nach Wolfes et al. (33).

I) Komorbiditäten

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von Vorhofflimmern ist es entscheidend, relevante Komorbiditäten zu identifizieren und adäquat zu behandeln (8). Hierzu gehört insbesondere die korrekte Einstellung der arteriellen Hypertonie, die gezielte Therapie der Herzinsuffizienz sowie die Behandlung eines Diabetes mellitus (8).

II) Vermeidung thrombembolischer Ereignisse

Je nach Kombination bestimmter Risikofaktoren kann Vorhofflimmern das Risiko für einen Schlaganfall um das Fünffache erhöhen (6). Der modifizierte CHA₂DS₂-VA-Score (*vgl. Tabelle 4*) dient als Entscheidungsgrundlage zur Beurteilung der Notwendigkeit einer oralen Antikoagulation bei Patienten mit Vorhofflimmern (8). In den aktualisierten ESC-Leitlinien von 2024 wurde die Geschlechtskomponente aus der Bewertung entfernt (8). Zur Thrombembolieprophylaxe werden neue orale Antikoagulantien (NOAKS) und Faktor-10-Inhibitoren eingesetzt (34).

Zur Beurteilung des Blutungsrisikos unter Therapie mit oralen Antikoagulanzien wird der HAS-BLED-Score herangezogen (*vgl. Tabelle 4*) (6). Ein Score-Wert von über drei Punkten weist auf ein erhöhtes Blutungsrisiko hin und erfordert eine sorgfältige Abwägung der Antikoagulationstherapie sowie eine engmaschige Überwachung (35). Ab einem CHA₂DS₂-Va-Score von einem Punkt sollte eine orale Antikoagulation in Erwägung gezogen werden (34). Falls eine langfristige Antikoagulationstherapie nicht durchgeführt werden kann, stellt der invasive Verschluss des linken Vorhofohrs eine alternative Strategie zur Schlaganfallprävention dar (34). Dies ist insbesondere relevant, da sich Thromben bei Vorhofflimmern bevorzugt in diesem Bereich bilden (34).

CHA₂DS₂VA-Score	Punkt	HAS-BLED Score	Punkt
Herzinsuffizienz	1	Hypertonie (systolisch über 160 mmHg)	1
Hypertension	1	Abnormale Nieren-/Leberfunktion	Je 1
Alter über 75 Jahre	2	Schlaganfall	1
Diabetes mellitus	1	Blutung in der Anamnese	1
Schlaganfall/TIA	2	Labile INR-Einstellung	1

Vaskuläre Erkrankungen	1	Alter über 65 Jahre	1
Alter zwischen 65-74 Jahre	1	Medikamente, Alkohol	Je 1

Tabelle 4. CHA₂DS₂-VA-Score und Has-Bled-Score. Der CHA₂DS₂-VA-Score schätzt das Thrombembolierisiko ein und bietet eine Entscheidungshilfe zur Beurteilung der Notwendigkeit einer oralen Antikoagulation bei Vorhofflimmern. Über den Has-Bled-Score kann das Blutungsrisiko unter einer oralen Antikoagulation abgeschätzt werden (35). Tabelle modifiziert nach Lane et al. (35).

III) Frequenz und Rhythmuskontrolle

Vorhofflimmern verursacht einen unregelmäßigen und häufig beschleunigten Herzrhythmus, der potenziell zu einer hämodynamischen Beeinträchtigung der kardialen Funktion führen kann (11). Eine Frequenzkontrolle wird bei Patienten älter als 65 Jahre oder mit nur geringen Symptomen empfohlen (34). Hierbei sollte ein Ruhepuls von unter 110 Schlägen pro Minute erreicht werden (34). Bei unzureichender Wirksamkeit der medikamentösen frequenzkontrollierenden Therapie kann als *ultima ratio* eine Ablation des AV-Knotens mit anschließender Schrittmacherimplantation zur Frequenzkontrolle in Erwägung gezogen werden (11).

Eine Rhythmuskontrolle sollte individuell mit den Patienten diskutiert werden. Hierzu gehören Medikamente, eine Kardioversion, aber auch interventionelle oder chirurgische Verfahren (8).

Medikamente zur Rhythmuskontrolle mit Ziel der Wiederherstellung des Sinusrhythmus werden vor allem bei Patienten jünger als 65 Jahre oder bei neuauftretendem Vorhofflimmern empfohlen (34). Flecainid und Propafenon gehören zu den Klasse I Antiarrhythmika und sind bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern empfohlen (34). Da Klasse I Antiarrhythmika ventrikuläre Arrhythmien und Vorhofflimmern auslösen können, sind sie bei Patienten mit struktureller Herzkrankung kontraindiziert (34). Für Patienten mit strukturellen Herzkrankungen oder persistierendem Vorhofflimmern werden Klasse III Antiarrhythmika wie Amiodaron empfohlen, die über eine Blockade v.a. von Kaliumkanälen das Aktionspotential verlängern (34). Eine Kardioversion wird bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder hämodynamischer Instabilität durchgeführt, bei der eine bisherige

medikamentöse Therapie des Vorhofflimmerns erfolglos war (34). Allerdings ist eine Kardioversion meist nicht langanhaltend: nur 23 % der kardiovertierten Patienten befinden sich ein Jahr nach der Kardioversion noch im Sinusrhythmus (11).

Bei einer Katheterablation werden die Pulmonalvenen, die die ektopen Foci enthalten, elektrisch vom restlichen Myokard isoliert, um die Weiterleitung pathologischer Erregungen zu unterbinden (34). Ein Jahr nach Pulmonalvenenisolation sind noch ca. 40 % bis 50 % der Patienten im Sinusrhythmus (7). Es bleibt unklar, ob eine Katheterablation gegenüber einem medikamentösen Rhythmisierungsversuch bei Patientinnen und Patienten mit permanentem Vorhofflimmern einen therapeutischen Vorteil bietet (8). Bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern stellt sie jedoch eine Klasse-I-Indikation dar (8).

IV) Evaluation

In der langfristigen Therapie sollte eine permanente Reevaluierung der Behandlungsstrategie erfolgen (8). Patienten mit bekanntem Vorhofflimmern sollten regelmäßig hinsichtlich der korrekten medikamentösen Einstellung möglicher Komorbiditäten sowie ihrer Compliance überprüft werden (8). Zudem sollte das Auftreten möglicher Komplikationen wie struktureller Folgeerkrankungen regelmäßig mittels transthorakaler Echokardiographie untersucht werden (8). Eine erste Evaluation sollte sechs Monate nach Erstdiagnose erfolgen und im Verlauf mindestens einmal jährlich erfolgen (8).

Die aktuellen Therapiemöglichkeiten von Vorhofflimmern sind langfristig oft nicht ausreichend wirksam und gehen teilweise mit erheblichen Nebenwirkungen einher (6). Die medikamentöse Therapie ist limitiert durch seltene, aber teils schwerwiegenden Nebenwirkungen (11, 36): Antiarrhythmika können zu Herzinsuffizienz oder einer Verlängerung des QT-Intervalls führen und somit selbst Rhythmusstörungen wie ventrikuläre Arrhythmien hervorrufen (11). Die medikamentöse antiarrhythmische Therapie wird häufig durch Komorbiditäten eingeschränkt, da es bei vielen Patientinnen und Patienten Kontraindikationen für bestimmte Medikamente gibt (36). Bei bis zu einem Drittel der Patienten mit Vorhofflimmern sind die gängigen Medikamente aufgrund dieser Kontraindikationen

nicht anwendbar (36). Auch invasive Methoden in der Therapie des Vorhofflimmerns haben Limitationen: Die Katheterablation ist ein teures Verfahren, das nur von ausgebildeten Elektrophysiologen in spezialisierten Zentren durchgeführt werden kann und zudem teilweise keine langfristige Konversion in den Sinusrhythmus gewährleisten kann (28). Zudem ist bei fortgeschrittener Erkrankung mit strukturellen Veränderungen, wie beispielsweise einem dilatierten linken Atrium, eine erfolgreiche Rhythmisierung häufig nicht mehr möglich oder zielführend (8).

Angesichts der eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten kommt daher der Reduktion der Inzidenz sowie der vertieften Erforschung der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen eine besondere Bedeutung zu.

1.2 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus ist eine chronische metabolische Erkrankung, die durch eine persistierende Hyperglykämie infolge eines gestörten Insulinstoffwechsels gekennzeichnet ist (37, 38). Die Komplikationen des Diabetes mellitus sind vielfältig und schwerwiegend (39). Auf mikrovaskulärer Ebene kann die Erkrankung unter anderem zu einer diabetischen Nephropathie, einer diabetischen Retinopathie mit dem Risiko der Erblindung sowie zu peripheren Durchblutungsstörungen mit der Notwendigkeit von Amputationen führen (39). Auf makrovaskulärer Ebene ist Diabetes mit einer erhöhten Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen assoziiert (39). Eine bestehende Diabeteserkrankung zählt zu den größten kardiovaskulären Risikofaktoren und ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Vorhofflimmern, Herzinsuffizienz und koronarer Herzerkrankung im Krankheitsverlauf assoziiert (40, 41).

1.2.1 Ätiologie

Die American Diabetes Association unterscheidet vier verschiedene Formen des Diabetes mellitus, je nach Auslöser (*vgl. Tabelle 5*) (37).

Diabetes mellitus Typ 1	Betrifft 5 % bis 10 % aller Diabetiker. Eine autoimmunbedingte Zerstörung der Beta-Zellen im Pankreas bedingt einen absoluten Insulinmangel.
Diabetes mellitus Typ 2	90% bis 95 % aller diabetischen Patienten leiden unter dieser Unterform, die sowohl durch eine Insulinresistenz als auch eine verminderte Insulinproduktion gekennzeichnet ist (relativer Insulinmangel).
Gestationsdiabetes	3% bis 9 % aller Schwangerschaften sind von Gestationsdiabetes betroffen. Ursächlich ist zumeist der Mehrbedarf an Insulin in der Schwangerschaft mit unzureichender Hochregulierung der Insulinproduktion.

Andere Formen des Diabetes	Die Ursache dieser Unterform des Diabetes ist häufig genetische Defekte, die zu einer endokrinen Pankreaserkrankung und einem Funktionsverlust der Beta-Zellen führen (42). Zu dieser Gruppe gehört der Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) (43). Der MODY stellt eine seltene Form des Diabetes mellitus dar, bei der die Erstdiagnose üblicherweise vor dem 25. Lebensjahr gestellt wird (44). Bei dem Mutant INS-Gene-Induced Diabetes of Youth (MIDY-Diabetes) kommt es durch eine Mutation im INS-Gen zum Funktionsverlust der Beta-Zellen (45).
----------------------------	---

Tabelle 5. Übersicht über die verschiedenen Diabetesformen unterteilt nach Auslöser, Tabelle modifiziert nach Genuth et al. (25).

1.2.2 Epidemiologie

Derzeit sind weltweit über 8 % der erwachsenen Bevölkerung von Diabetes mellitus betroffen, wobei die Inzidenz weiterhin ansteigt (46).

Etwa 5 % bis 10 % der Menschen mit Diabetes mellitus sind von Typ-1-Diabetes betroffen, wobei die Inzidenz in den letzten Jahren um 2 % bis 5 % angestiegen ist (47). Weitaus häufiger ist der Typ-2-Diabetes mit mehr als 400 Millionen erkrankten Menschen weltweit (48). Schätzungen zufolge wird erwartet, dass in 10 Jahren etwa 10 % der Weltbevölkerung von dieser Form des Diabetes betroffen sein werden (37, 48). Dieser Gesundheitstrend stellt nicht nur eine Gefährdung für die Patienten dar, sondern ist auch eine zunehmende wirtschaftliche Belastung für das Gesundheitssystem (38, 49). Monogenetisch bedingte Formen des Diabetes mellitus, einschließlich MODY und MIDY, umfassen schätzungsweise 1 bis 5 % aller Diabetesfälle (50).

1.2.3 Klinik

Die klinische Manifestation von Diabetes mellitus ist breit gefächert und oft nicht eindeutig (42).

Diabetes mellitus Typ 1 manifestiert sich typischerweise im früheren Lebensalter und zeigt sich mit unspezifischen Symptomen wie übermäßigem Durst, vermehrtem Wasserlassen, Müdigkeit, Antriebslosigkeit, Gewichtsverlust, Sehminderung und erhöhter Infektanfälligkeit (37, 42).

Diabetes mellitus Typ 2 wird häufig im mittleren Lebensalter diagnostiziert, insbesondere bei Patienten mit familiärer Vorbelaistung und Übergewicht (42). Die Symptomatik ist oft mild, jedoch manifestieren sich die Erkrankung und ihre Folgen durch Insulinresistenz, die zu weiteren Komplikationen wie Adipositas, Nephropathie, Dyslipidämie, Bluthochdruck und systemischen Entzündungsreaktionen führt (37, 42).

Die klinische Ausprägung von MIDY reicht von einer schweren, häufig bereits im Neugeborenenalter auftretenden Form des insulinmangelbedingten Diabetes mellitus bis zu einer milderden Verlaufsform, die seltener erst im späteren Lebensalter in Erscheinung tritt (51-53).

1.2.4 Screening und Diagnostik

Zur Diagnose von Diabetes mellitus können erhöhte Plasmaglukosewerte, ein HbA1c-Wert über 6,5 % oder ein Nüchternblutzucker über 126 mg/dl herangezogen werden (*vgl. Abb. 5*) (54). Der HbA1c-Wert gibt den prozentualen Anteil des Hämoglobins an, an den Glukose dauerhaft gebunden ist (55). Er eignet sich sowohl zur Diagnostik als auch zur Therapieüberwachung des Diabetes mellitus und reflektiert die durchschnittlichen Plasmaglukosespiegel der vergangenen 8 bis 12 Wochen (55). Zur Bestätigung sollten diese Werte an mehreren Tagen überprüft werden (*vgl. Abb. 5*) (54). Zur Diagnosestellung eines Prädiabetes werden erhöhte Blutglukosekonzentrationen herangezogen, die jedoch noch nicht die diagnostischen Schwellenwerte für einen manifesten Diabetes mellitus erreichen (*vgl. Abb. 5*) (56).

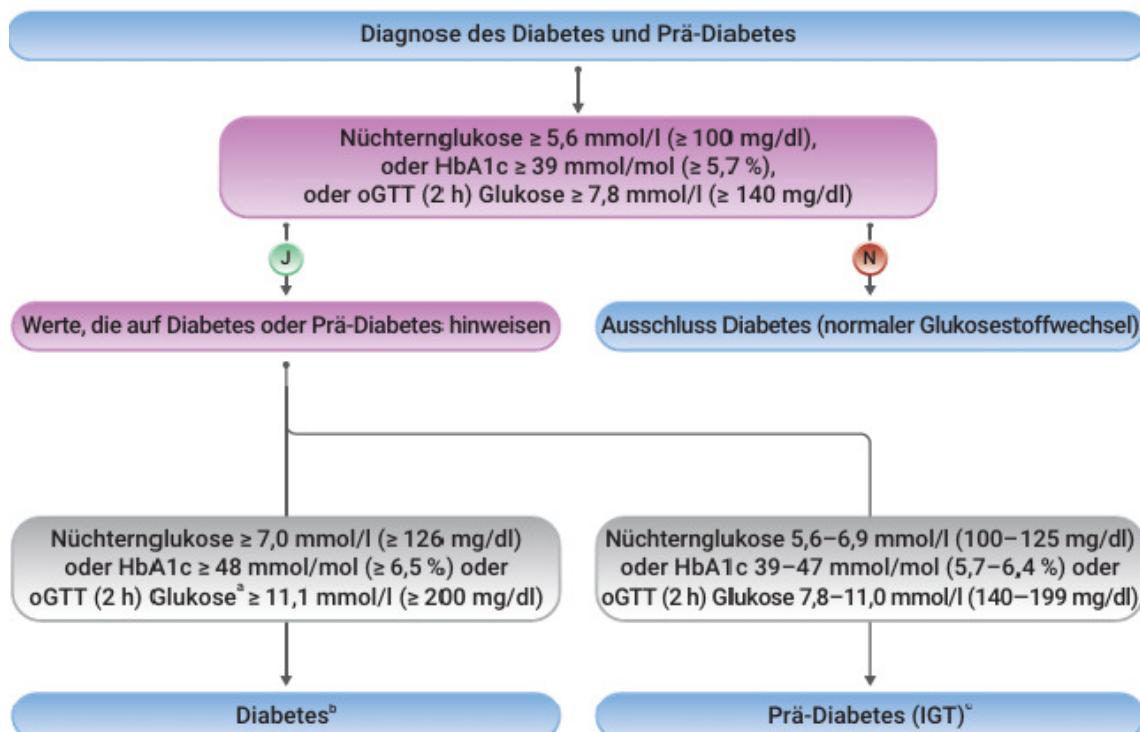


Abbildung 5. Diagnostik des Diabetes und Prädiabetes. Diabetes kann bei einer Nüchternnglukose $\geq 7,0 \text{ mmol/l}$, einem HbA1c $\geq 6,5 \%$ oder einen oralen Glukose-Toleranz-Test (oGTT) mit einem Anstieg der Glukose von $\geq 11,1 \text{ mmol/l}$ diagnostiziert werden (57). Abbildung aus der ESC-Guideline Diabetes 2023 (57).

Zur Unterscheidung von Typ-1- und Typ-2-Diabetes können unter anderem Autoantikörpertests durchgeführt werden und C-Peptid-Spiegel gemessen werden (54). Der MIDY-Diabetes ist nicht autoimmunbedingt und weist keine Autoantikörper auf (45). Bei familiärer Häufung von Diabetesfällen sollte eine genetisch bedingte Form wie MIDY in Erwägung gezogen werden, da etwa 20 % der MIDY-Fälle auf eine autosomal-dominante Vererbung zurückzuführen sind (45). In rund 80 % der Erkrankungen handelt es sich hingegen um De-novo-Mutationen im INS-Gen (45). Die Diagnose kann durch einen molekulargenetischen Nachweis einer Mutation im INS-Gen bestätigt werden (45).

1.2.5 Pathophysiologie

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Insulinproduktion in den Beta-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas als Präproinsulin (38). Das Präproinsulin wird im endoplasmatischen Retikulum zu Proinsulin und anschließend im Golgi-Apparat in C-Peptid und Insulin gespalten (38). Insulin wird dann in den Beta-Zellen des Pankreas gespeichert (38). Bei Anstieg des Blutzuckerspiegels wird Glukose über den GLUT-2 in die Beta-Zellen aufgenommen, was zur Freisetzung von Insulin führt (38). Die Insulinsekretion wird nicht ausschließlich durch erhöhte Blutglukosekonzentrationen reguliert, sondern kann auch durch verschiedene Hormone und freie Fettsäuren stimuliert werden (38). Insulin wirkt als anaboles Hormon, indem es die Glykogensynthese, Fettsäurereproduktion und Proteinsynthese fördert (58). Ein Insulinmangel hingegen führt über gesteigerte Lipolyse zu einem Anstieg freier Fettsäuren im Blut und über Proteolyse zu Muskelabbau, um nur einige Folgen zu nennen (58).

Typ-1-Diabetes wird durch eine autoimmune, T-Zell-vermittelte Zerstörung der Beta-Zellen im Pankreas ausgelöst (46). Ein charakteristisches Merkmal dieses Diabetes-Typs ist das Vorhandensein von Autoantikörpern im Serum, die gegen die Beta-Zellen gerichtet sind (59). Infolgedessen kommt es zu einem Defekt in der Insulinsekretion und somit zu einem absoluten Insulinmangel (37).

Die Pathophysiologie von Typ-2-Diabetes beruht auf zwei zentralen Mechanismen, die Gegenstand aktueller Forschung sind (*vgl. Abb. 6*) (46).

I) Einerseits führt eine Hyperinsulinämie in Kombination mit einer peripheren Insulinresistenz zu einem gestörten Glukosemetabolismus (37). Initial wurde als Grund für die permanenten erhöhten Insulinspiegel eine primäre Insulinresistenz angenommen (60). In neueren Entwicklungen wird jedoch davon ausgegangen, dass die Hyperinsulinämie häufiger Folge einer dauerhaft erhöhten Aufnahme von Kohlenhydraten ist (61). Die dauerhaft erhöhten Blutinsulinspiegel führen dann anschließend zu einer Insulinresistenz (62).

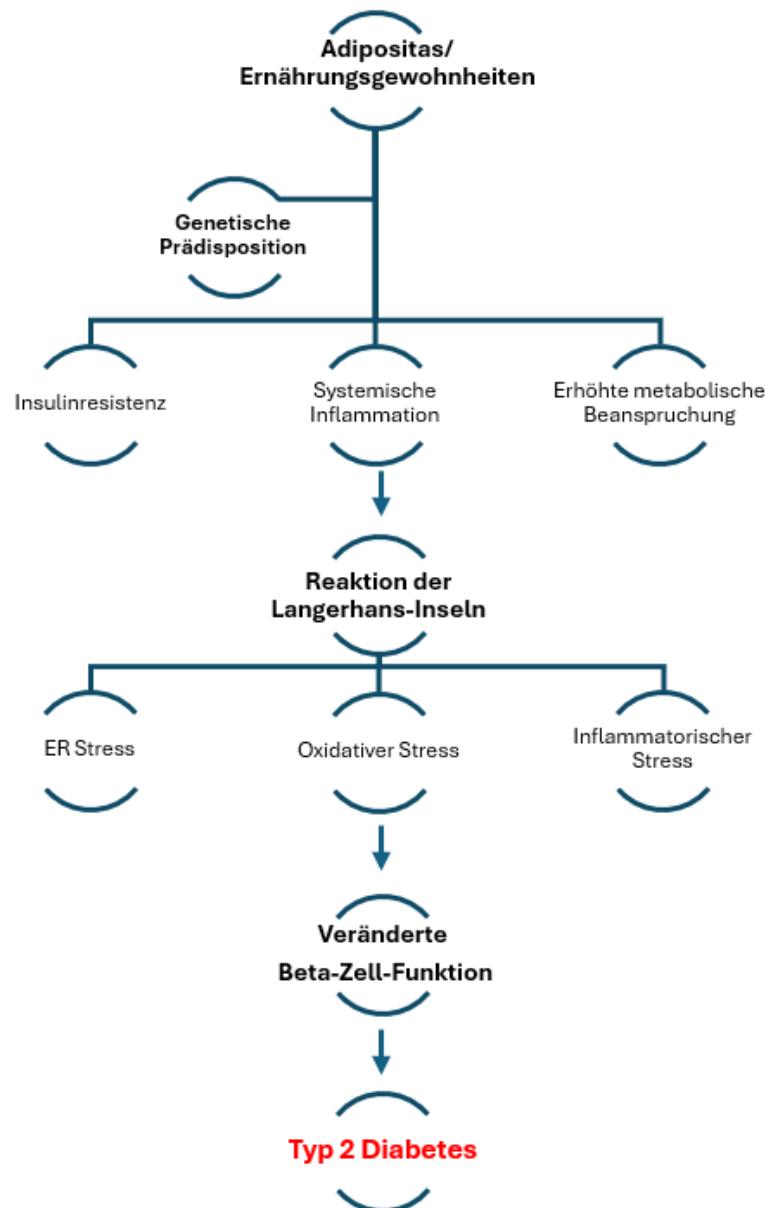


Abbildung 6. Überblick über die Pathogenese des Typ-2-Diabetes (46). Adipositas kann in Kombination mit einer genetischen Prädisposition zur Entwicklung einer Insulinresistenz, systemischen Inflammation sowie einer erhöhten metabolischen Belastung führen. In den Langerhans-Inseln des Pankreas resultiert dies in ER-Stress, oxidativem und inflammatorischem Stress. Diese multifaktorielle Belastung beeinträchtigt die Funktion der pankreatischen Beta-Zellen und kann letztlich zur Manifestation eines Typ-2-Diabetes mellitus führen (46).

II) Andererseits trägt die durch chronische Hyperglykämie induzierte Dysfunktion der insulinproduzierenden Beta-Zellen des Pankreas zu einem progressiven Insulinmangel bei (46). Die genauen Mechanismen, die zum Untergang der Beta-Zellen führen, sind divers und teils nicht genau bekannt (vgl. Abb. 6) (46). Zudem wird auch eine genetische Komponente bei der Entwicklung des Typ-2-Diabetes diskutiert (38). Studien zeigen, dass sowohl erhöhte Blutzuckerwerte als auch

freie Fettsäuren toxische Effekte auf Beta-Zellen ausüben (60). Hyperglykämie führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die aufgrund der geringen antioxidativen Kapazität der Beta-Zellen Zellschäden verursachen können (60). Zudem erhöht die Hyperglykämie die Synthese von Präproinsulin, was zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum führt. Dies kann langfristig eine ER-Stress-Reaktion auslösen und zum Zelltod der Beta-Zellen beitragen (60). Zudem führen hohe Blutglukoselevel zu einer erhöhten Anzahl von Gewebemakrophagen in Beta-Zellen (61). Die Makrophagen reagieren auf die Hyperglykämie und Hyperlipidämie bei Diabetes mellitus mit einem veränderten Metabolismus und schütten proinflammatorische Zytokine aus, die wiederum zu einem Untergang von Beta-Zellen führen (61).

Im Gegensatz zu Typ-1- und Typ-2-Diabetes beruhen bestimmte seltene Diabetesformen auf einer monogenetischen Ätiologie, bei der Mutationen in einem einzelnen Gen für die Krankheitsentstehung verantwortlich sind (50).

Der MODY resultiert aus Mutationen in verschiedenen Genen, die eine zentrale Rolle im Glukosestoffwechsel spielen (44). Bislang sind 14 unterschiedliche Genmutationen bekannt, die mit dieser Erkrankung assoziiert sind (63). In der Regel wird der MODY-Diabetes autosomal dominant vererbt (44). Die zugrunde liegenden genetischen Defekte führen zu einer gestörten Insulinsekretion in den Beta-Zellen des Pankreas (44).

Der MIDY-Diabetes ist eine autosomal dominant vererbte Form des Diabetes mellitus, der durch einen Insulinmangel gekennzeichnet ist (45). Ein wichtiger Unterschied zum MODY-Diabetes ist hierbei, dass eine Genmutation im INS-Gen vorliegt (45). Beim MIDY-Diabetes kommt es entweder aufgrund einer Vererbung oder Neumutation zum heterozygoten Defekt eines INS-Gen-Allels und in der Folge zu einer verminderten Insulinproduktion (*vgl. Abb. 7*) (45).

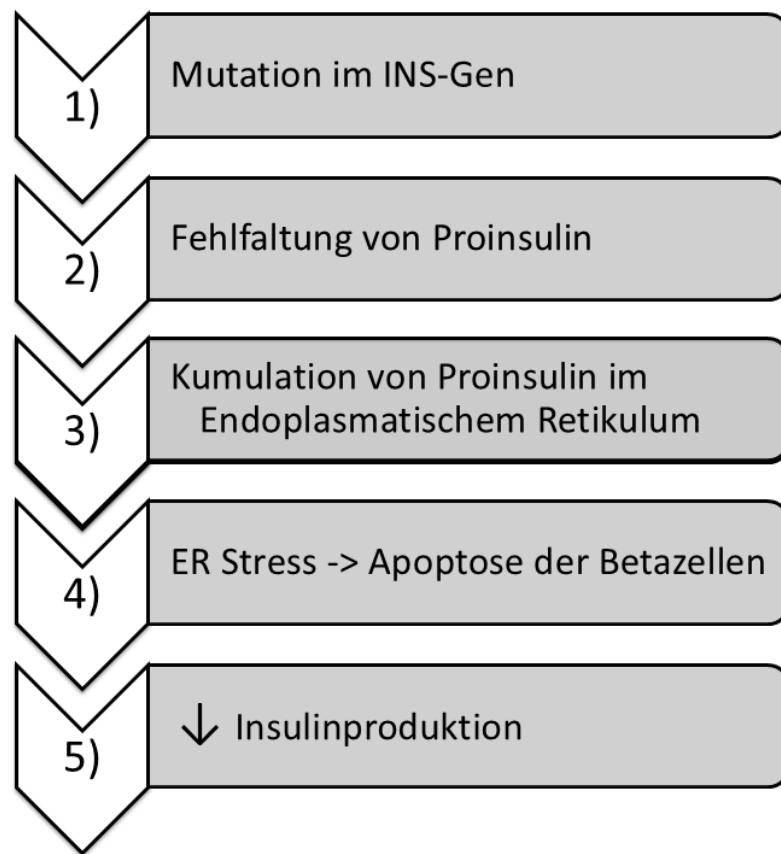


Abbildung 7. Pathophysiologie des MIDY-Diabetes. Durch die Mutation im INS-Gen kommt es zu einer Fehlfaltung im Proinsulin, welches im endoplasmatischen Retikulum kumuliert und über ER-Stress zu Apoptose der Insulin-produzierenden Betazellen im Pankreas und als Folge zu einer reduzierten Insulinproduktion führt (45).

Beim MIDY-Diabetes liegt eine heterozygote Mutation im INS-Gen vor, wodurch neben einem funktionellen Wildtyp-Allel auch ein mutiertes Allel exprimiert wird (45). Die genauen molekularen Mechanismen, durch welche eine heterozygote Mutation im INS-Gen bereits zu einem ausgeprägten Phänotyp führt, sind bislang nicht vollständig geklärt (45). Es wird jedoch folgende Hypothese diskutiert (vgl. Abb. 8). Obwohl das intakte Allel zunächst die Synthese von funktionellem Insulin ermöglicht, führt die dominant-negative Wirkung des mutierten Allels zu einer Fehlfaltung von Proinsulin (45). Diese Fehlfaltung bewirkt eine Retention der mutierten und teilweise auch der wildtypischen Proinsulinmoleküle im endoplasmatischen Retikulum, wodurch ein erheblicher ER-Stress induziert wird (45). Als Folge davon wird die Insulinproduktion kompensatorisch erhöht, was jedoch zu einer weiteren Anhäufung von fehlgefaltetem Proinsulin führt (45). Der anhaltende ER-Stress aktiviert proapoptotische Signalwege, die letztlich zum Beta-

Zelluntergang führen (45). Die konsekutive Abnahme der Insulin produzierenden Beta-Zellmasse verursacht den klinischen Insulinmangel, der für die Manifestation des Diabetes charakteristisch ist (45). Als zusätzlicher Mechanismus wird diskutiert, dass das fehlgefaltete Proinsulin auch zu einem vermindernden Export des gesunden WT-Proinsulins führt (51).

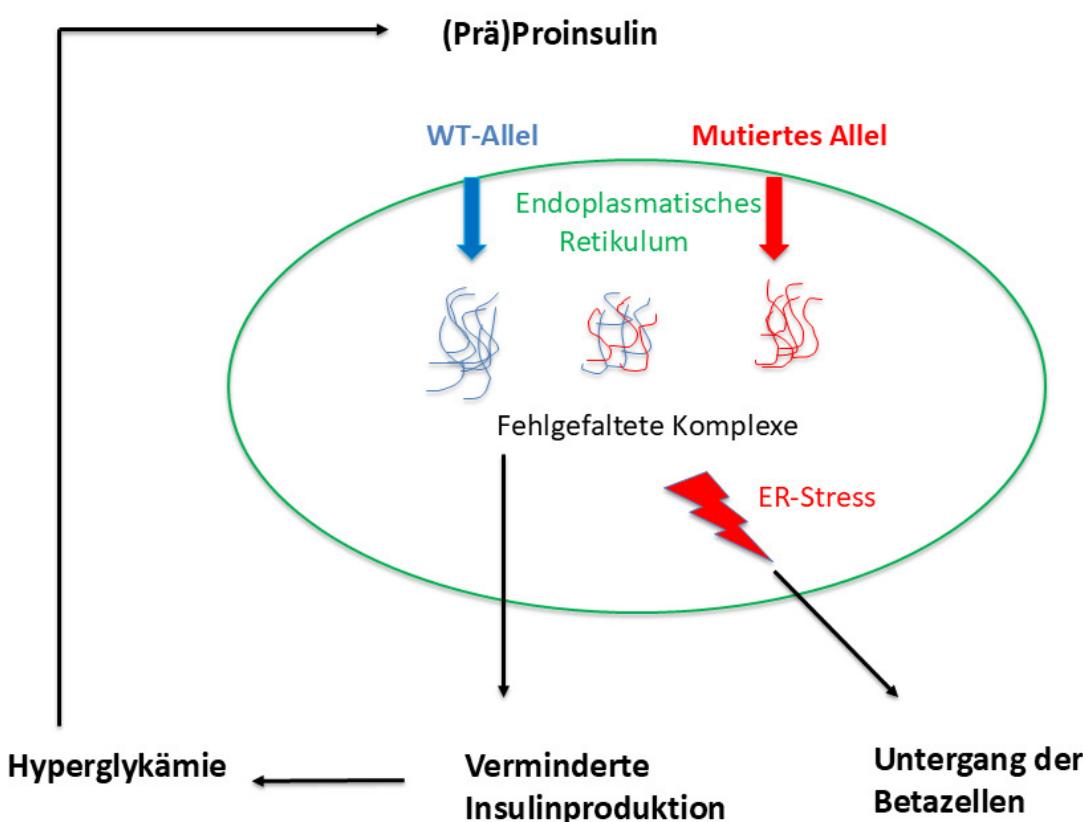


Abbildung 8. Pathophysiologie zwischen gesundem und erkranktem INS-Allel bei MIDY. Die Akkumulation fehlgefalteter Insulinkomplexe, die durch das mutierte INS-Allel entstehen, führen einerseits zu einem Untergang der Beta-Zellen, andererseits gibt es durch die Funktion von nur einem gesunden INS-Allel eine geringere Menge funktionsfähigen Insulins (45). Abbildung von Liu et al. mit Modifikationen (45).

1.2.6 Therapie des Diabetes mellitus

Der HbA1c-Wert bei Patienten mit Typ-1-Diabetes sollte bei unter 7,0 % liegen, wobei die externe Insulinzufuhr aufgrund der fehlenden Insulinproduktion für die Aufrechterhaltung der Blutzuckerkontrolle unerlässlich ist (64).

Typ-2-Diabetes kann sowohl medikamentös als auch durch Anpassungen des Lebensstils behandelt werden, wobei beide Ansätze als gleichwertig gelten (65). Zur Vermeidung von Komplikationen ist bei Bedarf eine langfristige Blutzuckerkontrolle mit Metformin sowie ggf. ein Ausbau der Therapie erforderlich (64). Je nach individuellem Risikoprofil kann die antidiabetische Therapie durch eine Bandbreite von oralen antidiabetischen Medikamenten wie GLP-1-Rezeptoragonisten, Gliniden, Sulfonylharnstoffen oder über eine intramuskuläre Therapie mit Insulin ausgebaut werden (57). Abbildung 9 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Wirkmechanismen ausgewählter Antidiabetika.

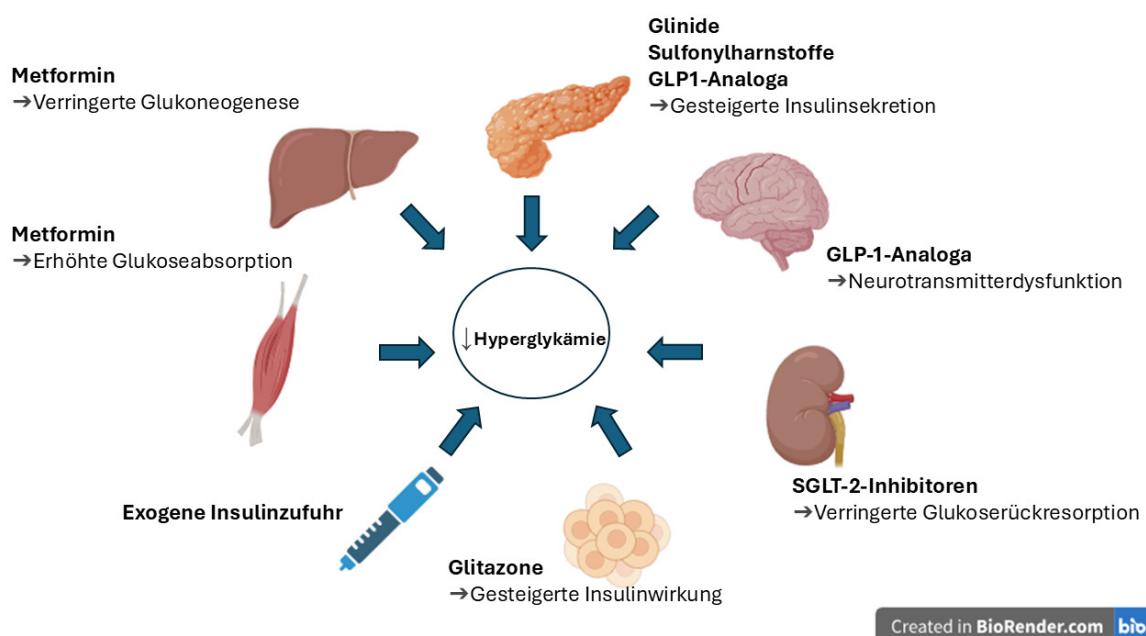


Abbildung 9. Überblick über den Wirkmechanismus ausgewählter Antidiabetika. GLP1-Analoga führen zu einem erhöhten Inkretineffekt und beeinflussen somit die Neurotransmitterdysfunktion. Glitazone wie Metformin führen zu einer verringerten Glukoneogenese und erhöhten Glukoseaufnahme. Glitazone steigern die Insulinwirkung. Glinide, Sulfonylharnstoffe und GLP1-Analoga führen zu einer gesteigerten Insulinsekretion. Über diese Mechanismen kann die Hyperglykämie gesenkt werden. Sollten die oralen Antidiabetika zur Glukosesenkung nicht ausreichen, ist alternativ eine zusätzliche oder – bei Typ 1 Diabetes – alleinige externe Insulinzufuhr notwendig (66). Abbildung modifiziert nach Oetjen et al. (66). Abbildung erstellt über <https://www.biorender.com/>.

Bei Vorliegen von Herz-Kreislauferkrankungen sollte die antihyperglykämische Therapie mit SGLT2-Inhibitoren wie Dapagliflozin erfolgen, da diese in klinischen Studien das Sterberisiko aufgrund von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Diabetikern verringern können (64). Das Ziel der antidiabetischen Therapie besteht darin, hyper- sowie hypoglykämische Stoffwechselentgleisungen zu vermeiden (57). Ein HbA1c-Wert von unter 7 % sollte angestrebt werden, um mikrovaskuläre Komplikationen zu verhindern (57). Das HbA1c-Ziel ist jedoch individuell anzupassen (57).

Die adäquate Therapie des MIDY-Diabetes ist Gegenstand laufender Forschung (67). Aufgrund des zugrunde liegenden Insulinmangels erfolgt überwiegend eine Insulinersatztherapie (67). In milderen Krankheitsverläufen wurden zudem Sulfonylharnstoffe als therapeutische Option eingesetzt (67).

1.2.6.1 Limitationen der antidiabetischen Therapie

Es gibt evidenzbasierte Hinweise darauf, dass bestimmte Antidiabetika nicht nur therapeutische Effekte entfalten, sondern auch selbst zur Entstehung unerwünschter kardiovaskulärer Ereignisse beitragen können (68-71). Da sich diese Arbeit mit durch Diabetes mellitus begünstigten arrhythmogenen Komplikationen befasst, wird im Folgenden der potenzielle Einfluss antidiabetischer Medikamente auf die Entwicklung kardialer Rhythmusstörungen dargestellt.

Es gibt Hinweise, dass eine Insulinüberdosierung zu einer Verlängerung der kardialen Repolarisationszeit führt, die sich im EKG als verlängertes QTc-Intervall zeigt und Arrhythmien begünstigen kann (68, 72). Der zugrunde liegende Mechanismus der proarrhythmogenen Wirkung von Insulin wird derzeit intensiv untersucht. Es bestehen Hinweise darauf, dass sowohl die durch Insulin vermittelte Hypokaliämie als auch direkte Effekte auf kardiale Ionenströme zur Entstehung von Arrhythmien beitragen können (68, 69). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der proarrhythmogene Effekt durch die gezielte pharmakologische Blockade von β -Adrenozeptoren therapeutisch beeinflusst werden kann (72). In einer Kohortenstudie zeigte sich, dass die Behandlung mit GLP-1-Rezeptoragonisten im Vergleich zu Gliptinen bei Patienten mit Diabetes mellitus mit einem signifikant geringeren Risiko für die Entwicklung von Vorhofflimmern assoziiert ist (71). Im Vergleich zu Metformin weisen Sulfonylharnstoffe ein höheres arrhythmogenes Potenzial auf, was vor allem auf das gesteigerte Risiko für Hypoglykämien und deren elektrophysiologische Folgen zurückgeführt wird (70, 73). Eine Monotherapie mit Metformin konnte jedoch im Vergleich mit Sulfonylharnstoffen oder Gliptinen das Risiko der Entwicklung von Herzrhythmusstörungen reduzieren (73).

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Erkenntnisse, dass einige antidiabetische Wirkstoffe potenziell zur Entstehung kardialer Rhythmusstörungen beitragen können (68-71).

SGLT2-Inhibitoren, eine relativ neue Klasse antidiabetischer Wirkstoffe, konnten hingegen kardioprotektive Wirkungen nachgewiesen werden (74). Im Folgenden wird diese Substanzgruppe mit ihren therapeutischen Vorteilen näher erläutert.

1.2.6.2 Kardioprotektive Effekte von SGLT2-Inhibitoren.

Die pharmakologische Substanzklasse der SGLT2-Inhibitoren rückte in den letzten Jahren aufgrund ihrer potenziell kardioprotektiven Effekte zunehmend in den Fokus der kardiovaskulären Forschung (75). SGLT2-Inhibitoren beeinflussen den renalen Stoffwechsel, indem sie die Glukose- und Natriumrückresorption im proximalen Tubulus hemmen (76). Unter physiologischen Bedingungen wird die über die Glomeruli filtrierte Glukose über die Niere vollständig rückresorbiert (77). Im menschlichen Körper gibt es sechs Isoformen des Natrium-Glukose-Cotransporters (SGLT), von denen insbesondere der SGLT2-Rezeptor eine zentrale Rolle spielt (78). Dieser ist überwiegend im proximalen Tubulus der Niere lokalisiert und verantwortlich für mehr als 90 % der renalen Glukose-Reabsorption. Die verbleibenden 10 % der Glukose werden im distalen Teil des proximalen Tubulus über den SGLT1-Rezeptor resorbiert (78).

Dapagliflozin ist ein kompetitiver Inhibitor des SGLT2-Rezeptors (79). SGLT2-Inhibitoren blockieren die Glukose-Rückresorption im proximalen Tubulus, was zu einer erhöhten Ausscheidung von Glukose im Urin führt (78). Dies resultiert in einer Reduktion der Blutglukosekonzentration und einem Abfall des Langzeitblutzuckermarkers HbA1c um bis zu 1 % (77, 78). Es ist bekannt, dass bei diabetischen Patienten die renale SGLT2-Expression hochreguliert ist, somit resorbieren diabetische Patienten trotz Hyperglykämie zusätzlich noch mehr Glukose (77).

Erst kürzlich konnte in Studien überraschend eine kardioprotektive Wirkung von SGLT2-Inhibitoren beschrieben werden (79): In der DECLARE-TIMI-58-Studie, einer randomisierten Doppelblindstudie, die über mehr als 4 Jahre hinweg 17.000 Patienten einbezog, konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Typ-2-Diabetes und Risikofaktoren für atherosklerotische Erkrankungen oder bereits manifesten atherosklerotischen Erkrankungen, die mit Dapagliflozin behandelt wurden, ein signifikant niedrigeres Hospitalisierungsrisiko aufgrund kardialer Komplikationen wie akutem Herzversagen aufwiesen (79). Zusätzlich wurde beobachtet, dass SGLT2-Hemmer einen positiven Effekt auf weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren ausüben (77). Die Medikamente führen zu einer Gewichtsreduktion und haben zudem einen günstigen Einfluss auf den systolischen sowie diastolischen Blutdruck, indem sie diesen auf ein physiologisches Niveau senken (77). Darüber

hinaus konnte gezeigt werden, dass Dapagliflozin auch zu einer Reduzierung der Inzidenz von Vorhofflimmern bei Patienten mit Typ-2-Diabetes und KHK führt (80). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz führte Dapagliflozin nicht nur zu einer subjektiven Verbesserung der Symptome, sondern auch zu einem verminderten Risiko für kardiovaskulär bedingten Tod und einer weiteren Aggravation der Herzinsuffizienz (81). Allerdings konnte in diesem Patientenklientel Dapagliflozin nicht das Risiko von neu auftretendem Vorhofflimmern verhindern (81).

Ein antiarrhythmogener Effekt von Dapagliflozin konnte kürzlich auch in einer Patch-Clamp-Untersuchung nachgewiesen werden (82). Dabei wurden Herzmuskelzellen aus den Vorhöfen von Menschen und Schweinen isoliert und anschließend 100 µmol/l Dapagliflozin zu den Zellen gegeben (82). Unter Dapagliflozin-Gabe wurde eine signifikante Änderung im Aktionspotential beobachtet, wie eine Verkürzung des Aktionspotentials und eine verminderten Induzierbarkeit kardialer Erregung (82). Darüber hinaus wurden Veränderungen in den Ionenströmen festgestellt: Dapagliflozin bindet direkt an den $\text{Na}_v1.5$ -Kanal, was zu einer Blockade des I_{Na} -Stroms führt (82). Im Großtiermodell eines Schweins, bei dem durch atriales Pacing Vorhofflimmern ausgelöst wurde, konnte durch die Gabe eines Bolus Dapagliflozin die Flimmerepisode erfolgreich beendet werden (82). Dies unterstreicht den rhythmusstabilisierenden Effekt des SGLT-2-Hemmers (82).

Somit kann geschlussfolgert werden, dass Dapagliflozin in den durchgeführten Studien einen positiven Effekt auf kardiale Komplikationen hat, die eine der häufigsten Begleiterscheinungen einer Diabeteserkrankung darstellen (80-82). Die genauen Mechanismen hinter dem positiven kardiovaskulären Outcome von SGLT2-Inhibitoren sind divers und Gegenstand aktueller Forschung und wurden auch in der vorliegenden Arbeit untersucht (77). Einen Überblick über die verschiedenen Mechanismen, die zur kardioprotektiven Funktion von SGLT2-Inhibitoren beitragen, werden in *Abbildung 10* dargestellt.

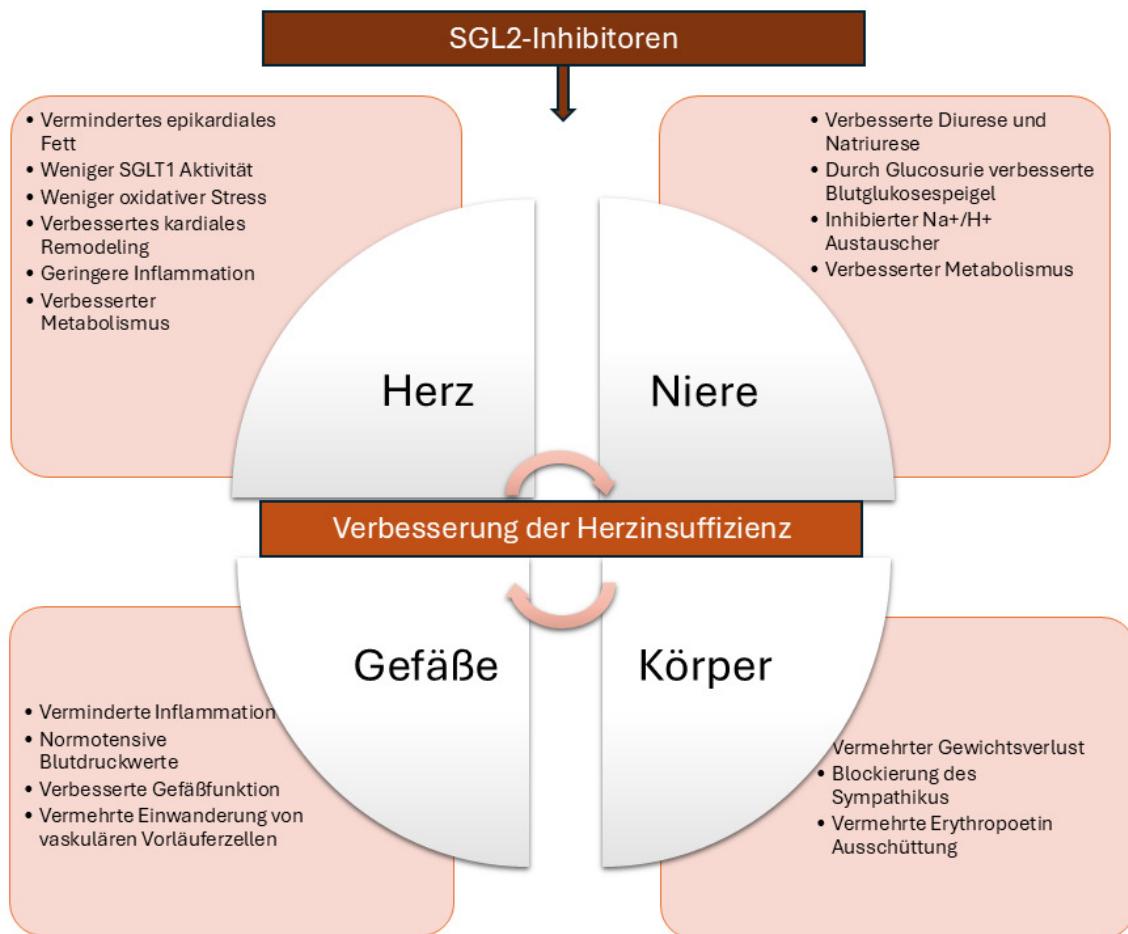


Abbildung 10. Überblick über die verschiedenen Wirkmechanismen von SGLT2-Hemmern. SGLT2-Inhibitoren verbessern die Herzinsuffizienz über multiple Wirkmechanismen, die an Herz, Nieren, Gefäßen sowie im Rahmen der systemischen Homöostase ansetzen (83). Die zugrunde liegenden molekularen und physiologischen Prozesse sind Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen (83). Abbildung modifiziert nach Lopaschuk et al. (83).

1.3 Vorhofflimmern und Diabetes

Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen sind durch gemeinsame Risikofaktoren eng miteinander verknüpft, wobei kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache bei Diabetikern darstellen (49). Patienten mit Diabetes weisen ein um 15 % erhöhtes Mortalitätsrisiko im Vergleich zu Nicht-Diabetikern auf (38). Insgesamt sind etwa 30 % der Patienten mit Diabetes zusätzlich von Vorhofflimmern betroffen (84).

Die zusätzliche Erkrankung an Vorhofflimmern ist auch prognostisch relevant: In mehreren unabhängigen Studien wurde beobachtet, dass Diabetes mellitus nicht nur ein Risikofaktor für die Entwicklung von Vorhofflimmern ist, sondern dass die Mortalität sowie das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse steigen, sobald ein Diabetiker zusätzlich an dieser Rhythmusstörung erkrankt (85). Darüber hinaus korreliert die Dauer der Diabeteserkrankung mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Vorhofflimmern (86). In einer groß angelegten Kohortenstudie, der Framingham Heart Study, konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Vorhofflimmern bei bestehendem Diabetes nachgewiesen werden (87). Bluthochdruck, Diabetes, systolische Herzinsuffizienz und Herzklappenerkrankungen stellen unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung von Vorhofflimmern dar und erhöhen ihrerseits das Risiko, an dieser Rhythmusstörung zu erkranken, zusätzlich (87). In der Swiss-AF-Studie wurden die Komorbiditäten von Patienten mit Vorhofflimmern untersucht (88). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Diabetes und Vorhofflimmern eine schlechtere Lebensqualität und mehr kardiale Nebenwirkungen im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes aufwiesen, obwohl sie die typischen Symptome von Vorhofflimmern weniger häufig wahrnehmen konnten (88).

1.4 Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes Mellitus

Ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen und insbesondere Arrhythmien wie Vorhofflimmern ist bekannt, jedoch sind die genauen zugrunde liegenden Mechanismen bislang nur unzureichend verstanden (85, 89).

Es gibt Hinweise darauf, dass die metabolischen Veränderungen bei Diabetes mellitus über verschiedene Mechanismen strukturelle, elektrische und immunologische Veränderungen induzieren, die letztlich eine proarrhythmogene Umgebung begünstigen (vgl. Abb. 11) (90). Arrhythmogenes Remodeling beschreibt dabei Umbauprozesse des Herzgewebes, die die Entstehung und Persistenz kardialer Rhythmusstörungen begünstigen (23).

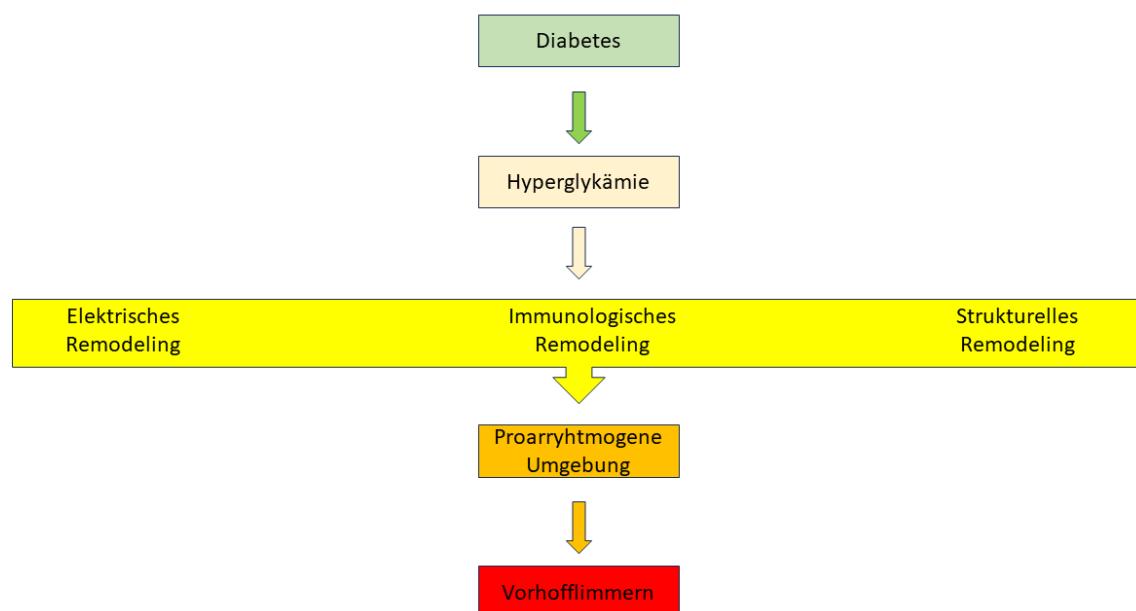


Abbildung 11. Überblick über die verschiedenen Wege des diabetischen Remodelings. Die bei Diabetes mellitus bestehende Hyperglykämie kann über verschiedene pathophysiologische Mechanismen zu Remodelling-Prozessen führen, die sich in elektrische, immunologische und strukturelle Veränderungen untergliedern lassen. Diese Veränderungen schaffen ein proarrhythmogenes Milieu, das die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern begünstigen kann (90).

Mehrere Mechanismen, die durch die hyperglykämische Stoffwechsellsage bei Diabetes induziert werden, werden mit der Entstehung von Vorhofflimmern in Verbindung gebracht (49). Die andauernde Hyperglykämie bei Diabetes sowie die Insulinresistenz bei Diabetes Mellitus Typ 2 führen unter anderem zu einer vermehrten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und IL-6 und somit zu einer konstanten Entzündungsreaktion (49). Vorhofflimmern wird häufig mit einer proinflammatorischen Umgebung in Verbindung gebracht (91, 92). Zahlreiche Studien zeigen, dass erhöhte Spiegel des Entzündungsmarkers (CRP) mit einem vermehrten Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert sind (91). Auch auf Transkriptionsebene können bei Diabetes Veränderungen betrachtet werden: Durch Hyperglykämie wird in den Blutgefäßen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies produziert sowie mehr Stickstoffmonoxid verbraucht, was als Folge zu einer Hochregulierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt - dadurch entstehen vermehrt pro-inflammatorische Gene, die wiederum als Folge der veränderten kardialen Reizleitung zu vermehrten Reentry-Mechanismen und somit zur Arrhythmieneigung führen können (93). Auch in Tiermodellen, beispielsweise bei Akita-Mäusen, konnte gezeigt werden, dass strukturelle und funktionelle Veränderungen in der elektrischen Reizleitung zu einer erhöhten Anfälligkeit für Vorhofflimmern führen (94). Bei Akita-Mäusen resultiert eine heterozygote Mutation in einem Allel des INS2-Gens zu einer Fehlfaltung des Proinsulins, das sich im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert (95). Dies führt zu einer Dysfunktion der pankreatischen Beta-Zellen und letztendlich zu einer Hyperglykämie mit einem diabetischen Phänotyp (96, 97). Diabetische Akita-Mäuse zeigen eine veränderte atriale Aktionspotentialmorphologie sowie eine verlängerte Aktionspotentialdauer (96). Eine Insulinbehandlung kann jedoch die Inzidenz von Rhythmusstörungen reduzieren, was darauf hindeutet, dass der Insulinmangel bei Typ-1-Diabetes eine zentrale Rolle in der Arrhythmieneigung spielen könnte (94).

Eine veränderte zelluläre Energiegewinnung unter diabetischen Stoffwechselbedingungen stellt einen potenziellen Mechanismus des proarrhythmischen Remodelings dar: Die ATP-Generierung erfolgt unter physiologischen Stoffwechselbedingungen hauptsächlich über die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien, wobei Kohlenhydrate und Fette als Energiequellen dienen (98). Im diabetischen Stoffwechselzustand kommt es zu einer vermehrten Nutzung freier

Fettsäuren als primärer Substratquelle für die ATP-Synthese, was zu einer metabolischen Umstellung führt (98). Diese vermehrte Fettsäureoxidation bewirkt eine gesteigerte Produktion lipotoxischer Metabolite, die zelluläre Funktionsstörungen und Schädigungen hervorrufen können (98). Darüber hinaus steigt die Produktion von ROS und NOS signifikant an, was einen Zustand erhöhten oxidativen und nitrosativen Stresses verursacht (98). Dieser metabolische Stress fördert Entzündungsprozesse und schädigt mitochondriale Strukturen, was die Effizienz der ATP-Produktion weiter beeinträchtigt (98). Die reaktiven Sauerstoffspezies aktivieren zudem die NADPH-Oxidase, ein Enzym, das seinerseits ROS generiert, wodurch eine selbstverstärkende Feedbackschleife entsteht (98). Diese anhaltend erhöhte ROS-Produktion ist mit atrialem Remodeling assoziiert (98).

Die genaue Pathophysiologie, die erklärt, warum Patienten mit Diabetes mellitus häufiger an Vorhofflimmern erkranken, ist bislang noch nicht vollständig geklärt (99). Es bestehen Hinweise darauf, dass die metabolische Dysfunktion bei Diabetes mellitus über entzündliche Mechanismen Remodeling-Prozesse induziert, welche arrhythmogene Veränderungen fördern können (98). Die oben beschriebenen Mechanismen stellen nur einige exemplarische Veränderungen dar, die im Rahmen einer diabetischen Stoffwechsellsage auftreten können. Sie lassen sich unter dem Begriff des oxidativen Stresses zusammenfassen, der infolge einer diabetischen Stoffwechsellsage entsteht (100). Dieser oxidative Stress wird als zentraler Mechanismus diskutiert, der zahlreiche molekulare und strukturelle Veränderungen auslösen kann, welche unter dem Konzept des diabetogenen Remodelings zusammengefasst werden (100). Die Einteilung in strukturelles, immunologisches und elektrisches Remodeling basiert auf theoretischen Konzepten sowie experimentellen und klinischen Beobachtungen und liefert mögliche Erklärungsansätze für die erhöhte Inzidenz von Arrhythmien bei Diabetes mellitus (98, 100).

Da sich die vorliegende Arbeit experimentell mit dem immunologischen und elektrischen Remodeling beschäftigt, wird im Folgenden insbesondere auf diese beiden Aspekte detaillierter eingegangen.

1.4.1 Strukturelles Remodeling

In verschiedenen Tiermodellen konnten auf struktureller Ebene beim Diabetes signifikante Veränderungen im Herzgewebe beobachtet werden (98). Die zwei Hauptmechanismen stellen dabei einerseits eine Dilatation der Atrien, andererseits eine vermehrte atriale Fibrosierung dar (100):

So konnte in einem Mausmodell nachgewiesen werden, dass Tiere mit Typ-2-Diabetes eine vermehrte interstitielle Fibrose in den Vorhöfen entwickeln, was zu einer asynchronen und verlangsamten Erregungsleitung im Atrium führt (101). Diese vermehrte Fibrosierung wird unter anderem durch eine gesteigerte Kollagensynthese kardialer Fibroblasten bei Patienten mit Typ-2-Diabetes vermittelt (102). Die dadurch entstehende strukturelle Umgestaltung der Vorhöfe schafft eine proarrhythmogene Substratbasis, die das Auftreten von Reentry-Arrhythmien begünstigt und somit die Anfälligkeit für Vorhofflimmern erhöht (99). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine dauerhafte Insulintherapie bei Akita-Mäusen die fortschreitende Fibrose aufhalten kann (99). Auch eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte bei den verwendeten transgenen diabetischen INS^{C94Y}-Schweinen eine erhöhte Fibrosierung im linken Atrium im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nachweisen (103).

Neben der Fibrosierung trägt auch eine Zunahme des epikardialen Fettgewebes zur proarrhythmogenen Umgebung bei (102). Übergewicht, das häufig mit Typ-2-Diabetes assoziiert ist, führt zu einer Zunahme des epikardialen Fettgewebes, welches das Myokard infiltrieren kann (102). Da Fettgewebe eine geringere elektrische Leitfähigkeit als Kardiomyozyten aufweist, kann es die elektrische Signalweiterleitung stören und somit ebenfalls das Risiko für Vorhofflimmern erhöhen (102).

Darüber hinaus verursacht Diabetes strukturelle Veränderungen im Herzen, wie beispielsweise eine Vergrößerung der Atrien, die echokardiographisch bei Patienten mit Diabetes nachgewiesen werden konnte (104). Diese Dilatation der Atrien bei Diabetes wird mit einer erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern in Verbindung gebracht (104-106).

Schließlich kann eine diabetische Kardiomyopathie unter anderem sowohl diastolische als auch systolische Funktionsstörungen des linken Ventrikels bedingen (107). Diese werden unter anderem durch eine erhöhte Konzentration frei zirkulierender Fettsäuren gefördert (107). Die diastolische Dysfunktion äußert sich durch eine verminderte Relaxation und eine verlängerte Füllungszeit des linken Ventrikels (107). Eine weitere Folge der Diabeteserkrankung ist eine kardiale Hypertrophie, die sich durch eine Verdickung des linken Ventrikels manifestiert (107). Zudem kommt es zu Veränderungen der Durchblutung der Herzkranzgefäße, die sich unter anderem durch eine verringerte koronare Flussreserve und ein vermindertes myokardiales Blutvolumen äußern (107).

1.4.2 Elektrisches Remodeling

1.4.2.1 Connexine

Die Weiterleitung des Aktionspotentials zwischen den Herzmuskelzellen wird über Connexine ermöglicht (108).

Connexine gehören zur Gruppe der Transmembranproteine mit mehreren Isoformen, die alle nach ihrem Molekulargewicht im kDa benannt werden (108). Sechs Connexine formen ein Connexon, in großen Ansammlungen bilden zwei dieser Connexone schließlich Gap Junctions (vgl. Abb. 12) (109). Gap Junctions sind in den Kardiomyozyten an den Glanzstreifen lokalisiert (108). Durch diese Gap Junctions erfolgt ein Austausch zwischen benachbarten Kardiomyozyten (108). Man kann homotypische von heterotypischen Connexonen unterscheiden, bei denen entweder jedes Connexon aus der gleichen oder aus verschiedenen Connexin Isoformen aufgebaut ist (108). Eine Modifikation im strukturellen Aufbau der Connexone wird mit einer veränderten Signalweiterleitung über die Gap Junctions in Verbindung gebracht (108).

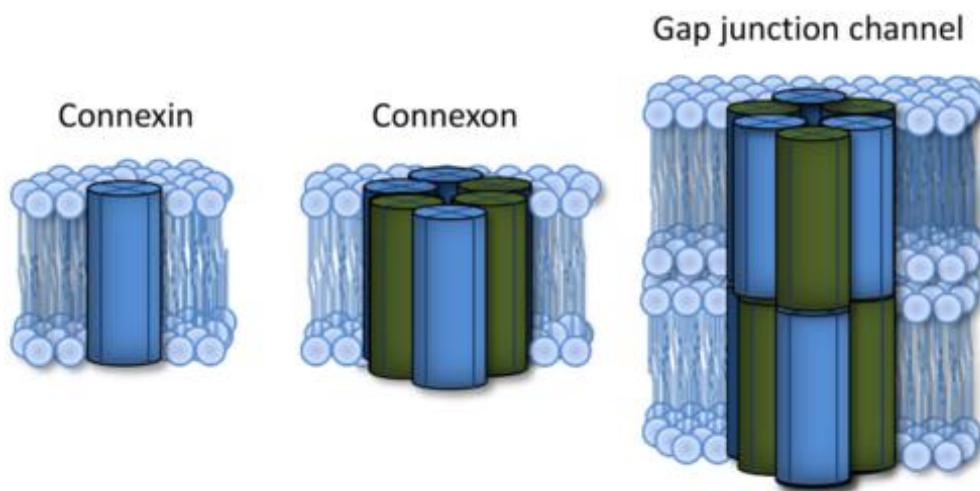


Abbildung 12. Überblick über den Aufbau von Connexinen, Connexonen und Gap junctions. Ein Connexon besteht aus sechs Connexin-Untereinheiten. Zwei gegenüberliegende Connexone verbinden sich, um eine Gap Junction zu bilden. Abbildung von Totland et al. (1).

Im menschlichen Herzen werden vier Isoformen der Connexine, namentlich Connexin 37, Connexin 40, Connexin 43 und Connexin 45, in unterschiedlichen anatomischen Regionen exprimiert (110).

Connexin 37 befindet sich vor allem in den endothelialen Gap Junctions von Gefäßen (110). Connexin 40 wird in den Atrien, im atrioventrikulären Knoten sowie im His-Purkinje-System exprimiert (108). Es gilt als das bedeutendste Connexin für die atriale Signalweiterleitung (108). Connexin 43 stellt das häufigste Connexin im menschlichen Herzen dar und wird im ventrikulären Myokard, in den Atrien sowie in bestimmten Bereichen des Reizleitungssystems exprimiert (108, 110). Connexin 45 wird vor allem von Schrittmacherzellen und im Reizleitungssystem exprimiert (108). Zu geringen Anteilen findet sich Connexin 45 auch im atrialen und ventrikulären Myokard (110).

1.4.2.2 Pathophysiologie des elektrischen Remodelings

Elektrisches Remodeling umfasst unter anderem Veränderungen in der Expression und Funktion von Ionenkanälen, welche die elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards beeinflussen und zur Arrhythmogenese beitragen können (23). Das kardiale Aktionspotential resultiert aus der komplexen Interaktion spezifischer transmembranärer Ionenflüsse (18). Diabetes wird mit einer Vielzahl von Veränderungen in den Ionenkanälen in Verbindung gebracht (101, 111):

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es bei diabetischen Akita-Mäusen zu einer Abnahme des spannungsabhängigen Natriumstroms (I_{NA}) kommt, was mit einer verringerten atrialen Leitungsgeschwindigkeit sowie verlängerten P-Wellen-Dauer einhergeht und damit die Arrhythmogenität erhöht (111). Auch Veränderungen in der Expression und Funktion von Kaliumkanälen (I_{to} , I_{KUR}) konnten im Zusammenhang mit Diabetes mellitus nachgewiesen werden (101, 111). Abgesehen von Veränderungen in der Expression von Ionenkanälen wurde im STZ-induzierten Diabetesrattenmodell zudem eine Hochregulation des Natrium-Calcium-Austauschers nachgewiesen (111). Zusammenfassend zeigen Tiermodelle des Diabetes vielfältige Veränderungen in der Expression und

Funktion von Ionenkanälen, die signifikanten Einfluss auf die kardiale Elektrophysiologie haben (vgl. Abb. 13) (111).

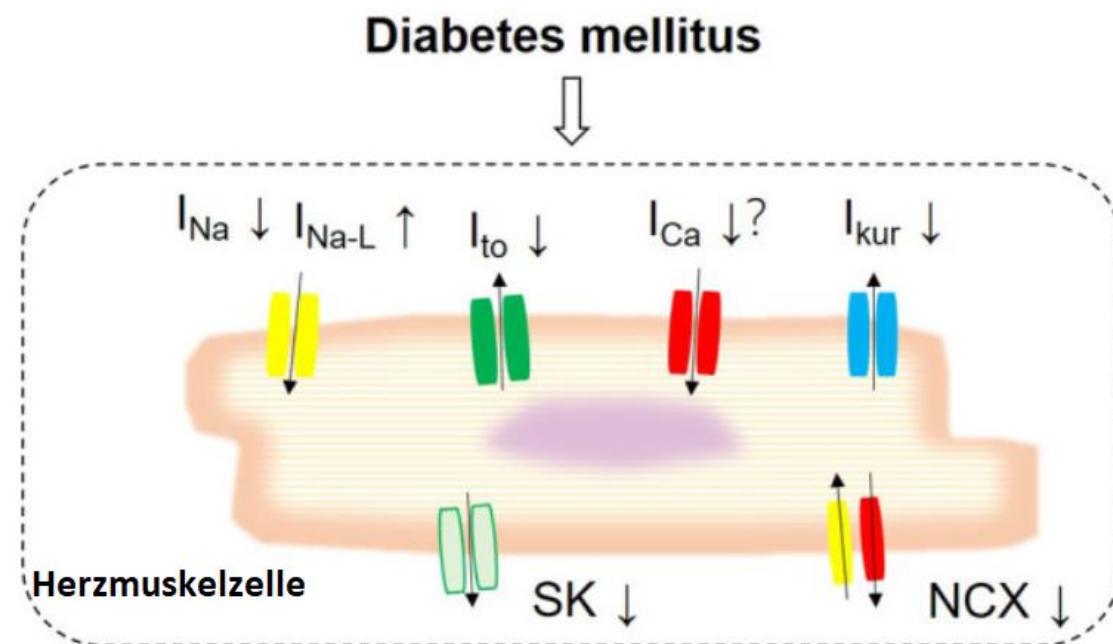


Abbildung 13. Überblick über die Veränderungen der Ionenkanäle bei Diabetes. Bei Diabetes wurden Veränderungen in Natriumströmen (I_{Na} , I_{Na-L}), Kaliumströmen (I_{to} , I_{kur}), Calciumströmen (I_{Ca} , SK) sowie des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) beschrieben. Abbildung modifiziert nach Qian et al. (111).

Da sich die vorliegende Arbeit mit kardialen Connexinen beschäftigt, wird im Folgenden das elektrische Remodeling mit besonderem Fokus auf die Rolle der Connexine näher betrachtet. Connexine koppeln Kardiomyozyten elektrisch miteinander und ermöglichen so erst die Fortleitung des kardialen Aktionspotentials (108). Somit kann vermutet werden, dass eine veränderte Connexin-Expression die Reizleitung des Herzens beeinflusst, was Vorhofflimmern wiederum begünstigen kann und somit einen weiteren Teil des elektrischen Remodelings darstellt (108, 112).

Vorhofflimmern wird oft mit einer veränderten Expression von Connexin 40 assoziiert, welches das am meisten exprimierte Connexin im Atrium darstellt (108). Eine humane Studie zeigt, dass Patienten mit Vorhofflimmern eine erhöhte Expression von Connexin 40 im linken Vorhof aufweisen, während die Connexin 43-Expression unverändert bleibt (113). Bei Patienten mit Vorhofflimmern und begleitender Mitralklappenerkrankung waren sowohl Connexin 40 als auch

Connexin 43 hochreguliert (113). Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien an humanen Gewebeproben eine signifikante Reduktion der Connexin-40-Expression in atrialen Proben von Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (68). Weitere Untersuchungen berichteten hingegen entweder keine Veränderungen oder eine erhöhte Expression von Connexin 40 (108).

Auch im Mausmodell wurde das elektrische Remodeling untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von Connexin 40 mit einer Verlängerung der PQ-Zeit einhergeht, während eine alleinige Veränderung von Connexin 45 keine signifikante Auswirkung auf die atrioventrikuläre Überleitung hatte (108). Es wird jedoch vermutet, dass eine Wechselwirkung zwischen Connexin 40 und Connexin 45 besteht, da das gleichzeitige Fehlen von Connexin 40 in Verbindung mit einer Reduktion von Connexin 45 zu einer Verschlechterung der atrioventrikulären Überleitung führt (108).

In einer Studie von Bikou et al. konnte gezeigt werden, dass bei Schweinen mit Vorhofflimmern eine verminderte Expression von Connexin 43 beobachtet wurde (109).

Sowohl eine veränderte Expression der Connexine als auch eine veränderte zelluläre Lokalisation konnten im Rahmen von Vorhofflimmern beobachtet werden (114). Unter physiologischen Bedingungen sind Gap Junctions, die aus Clustern von Connexinen bestehen, an den Glanzstreifen lokalisiert (114). Diese Strukturen bilden die Kontaktstellen zwischen benachbarten Kardiomyozyten und ermöglichen die elektrische Kopplung sowie die mechanische Verbindung der Herzmuskelzellen (114). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Vorhofflimmern mit einer sogenannten Lateralisierung der Connexine einhergeht (115). Dabei kommt es zu einer Fehlverlagerung der Connexine, die vermehrt lateral entlang der Zellmembran anstatt an den Glanzstreifen lokalisiert sind (115). Eine verstärkte Lateralisierung von Connexin 43 bei Vorhofflimmern konnte sowohl bei Mäusen, als auch Schweinen beobachtet werden (116). Bei Schweinen konnte durch adenoviralen Gen-Transfer die Connexin 43-Spiegel erhöht werden, was die Tiere zudem weniger anfällig für Vorhofflimmern machte (109, 116).

Diabetes wird mit einer veränderten Expression kardialer Connexine assoziiert, die möglicherweise die Ursache für verschiedene Herzrhythmusstörungen sind (117-121). Tierversuche zeigen, dass Diabetes unter anderem die Leitungsgeschwindigkeit der elektrischen Impulse zwischen den Vorhöfen verzögert, die Unterschiede in der effektiven Refraktärzeit der Vorhofmuskulatur verstärkt und die Dauer des Aktionspotentials verlängert (100). Diese elektrophysiologischen Veränderungen erhöhen die Anfälligkeit für das Auftreten von Vorhofflimmern (100).

Zudem scheint Diabetes einen Einfluss auf die lokale Connexinverteilung zu haben: Bei diabetischen Ratten wurde eine vermehrte Lateralisierung von Connexin 43 beobachtet (121, 122). Eine vermehrte Lateralisierung der Connexine wird in diesem Zusammenhang als proarrhythmogener Faktor betrachtet, da sie die homogene Erregungsweiterleitung im Myokard beeinträchtigt und die Entstehung von Reentry-Kreisen begünstigen kann (121, 123).

Ein gestörter Fettstoffwechsel bei Diabetes wird in einer Studie mit einer verminderten Expression von Connexin 37 in den Endothelzellen der Blutgefäße in Zusammenhang gebracht, was auf eine Beeinträchtigung der interzellulären Koppelung in der vaskulären Endothelschicht hinweist (124).

Für Connexin 40 zeigen verschiedene Studien ein uneinheitliches Bild. So wird bei einem gestörtem Fettstoffwechsel eine Reduktion der Connexin 40-Expression in den Endothelzellen beschrieben (124). In einem STZ-induzierten Diabetesmodell konnte dagegen eine deutliche Hochregulierung von Connexin 40 im Sinusknoten nachgewiesen werden, was als möglicher Mechanismus für die erhöhte Inzidenz von Sinusarrhythmien bei Diabetes diskutiert wird (125). Gleichzeitig wurden in dieser Studie jedoch keine Veränderungen der Connexin 40-Expression in den Vorhöfen oder Ventrikeln festgestellt (125). Andere Untersuchungen berichten hingegen über eine erhöhte Connexin 40-Expression im Vorhofmyokard diabetischer Tiere (126), während weitere Daten auch eine erniedrigte Connexin 40-Expression im Vorhofgewebe beobachteten, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für Vorhofflimmern assoziiert sein könnte (127). Im linken Ventrikel wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Tieren gefunden (128).

Ein gestörter Fettstoffwechsel bewirkt eine verstärkte Expression von Connexin 43 in Endothel- und Gefäßmuskelzellen (124). Hohe Glukosespiegel führen

zudem über eine vermehrte Phosphorylierung von Connexin 43 zu einer gestörten elektrischen Erregungsleitung in den Herzkammern (119). Im STZ-Rattenmodell wurde zudem eine Hochregulierung von Connexin 43 im Sinusknoten nachgewiesen, was eine Erklärung für die vermehrte Häufigkeit von Sinusarrhythmien bei Diabetes darstellen könnte (125). Diabetes wird zudem mit einer Verlängerung der QT-Zeit in Verbindung gebracht, was mit einer erhöhten Gesamtmenge sowie einer stärkeren Phosphorylierung von Connexin 43 im Ventrikelmuskel diabetischer Tiere einhergeht (118). Diabetes wird wiederum mit einer Hochregulierung der Connexin 43 Expression im linken Ventrikel in Verbindung gebracht (128). Verschiedene Studien beschreiben widersprüchliche Befunde zu der Situation in den Vorhöfen: Während manche Studien eine Abnahme der Gesamtmenge bei gleichzeitiger Zunahme des phosphorylierten Anteils beschreiben (129), berichten andere von einer erhöhten Connexin 43-Expression bei gleichzeitig verminderter Phosphorylierung (117).

Zusätzlich wurde im Sinusknoten diabetischer Ratten eine deutliche Hochregulierung von Connexin 45 beobachtet (125). Diese könnte ebenfalls zur Entstehung von Sinusarrhythmien beitragen (125).

Auch wenn die aktuelle Studienlage noch nicht vollständig einheitlich bezüglich der genauen elektrischen Remodeling-Prozesse ist, lässt sich zusammenfassend feststellen, dass Connexine eine zentrale Rolle bei der Regulierung der elektrischen Kommunikation im Herzgewebe spielen (100). Ihre Dysregulation stellt einen wichtigen Faktor für die Entstehung von Vorhofflimmern dar (108).

1.4.3 Immunologisches Remodeling

1.4.3.1 Kardiale Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des Immunsystems, die in nahezu allen Geweben und Organen des Körpers vorkommen (130, 131). Kardiale Makrophagen sind im gesamten Herzen vorhanden und kommen insbesondere im Reizleitungssystem in erhöhter Dichte vor (132). Makrophagen erfüllen eine Vielzahl von Funktionen: Sie sind unter anderem an entzündlichen Prozessen, Gewebe-Remodeling, der Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase sowie der Gewebereparatur beteiligt (133). Die genaue Rolle kardialer Makrophagen ist Bestandteil aktueller Forschung.

Kardiale Makrophagen lassen sich basierend auf ihrer Herkunft in zwei Hauptpopulationen einteilen: Residente Makrophagen, die während der embryonalen Entwicklung aus dem Dottersack oder der fetalen Leber stammen und dauerhaft im Gewebe verbleiben, sowie rekrutierte Makrophagen, die in entzündlichen Situationen aus zirkulierenden Monozyten entstehen und in das Herzgewebe einwandern (134). Unter physiologischen Bedingungen überwiegen antiinflammatorische residente Makrophagen, wohingegen in pathologischen Zuständen wie Myokardinfarkt oder Myokarditis vermehrt proinflammatorische, rekrutierte Makrophagen auftreten (134). Die Aufrechterhaltung der Makrophagenpopulation erfolgt vor allem über lokale Proliferation (135).

Kardiale Makrophagen übernehmen unterschiedliche Aufgaben, die abhängig von ihrer Herkunft und ihrem Aktivierungsstatus variieren (136, 137). Residente Makrophagen sind maßgeblich an der Gewebereparatur, der Phagozytose apoptotischer Zellen sowie der Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren beteiligt und tragen somit zur Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase bei (137, 138). Im Gegensatz dazu fördern rekrutierte Makrophagen vor allem die Initiierung und Aufrechterhaltung einer inflammatorischen Umgebung, insbesondere bei Gewebeschädigung oder pathologischen Reizen (137).

Neben ihren immunologischen Funktionen rückt zunehmend auch die Rolle kardialer Makrophagen in der elektrophysiologischen Regulation des Herzens in den Fokus (139-142). Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen auf ihrer Oberfläche Connexin 43 exprimieren, was zur elektrischen Kopplung von Zellen

notwendig ist (141). In einer experimentellen Studie an Mausmodellen wurde gezeigt, dass insbesondere residente Makrophagen im Bereich des AV-Knotens vorkommen und dort über Connexin 43-vermittelte Gap Junctions funktionell mit Kardiomyozyten gekoppelt sind (139). Diese elektrotonische Kopplung ermöglicht eine Beeinflussung des Aktionspotentials benachbarter Kardiomyozyten (139): Makrophagen können dabei das Ruhemembranpotenzial depolarisieren sowie die Dauer des Aktionspotentials verändern (139). In Knockout-Modellen, bei denen Makrophagen selektiv entfernt wurden, kam es infolgedessen zu AV-Blockaden sowie zu einer gestörten Reizweiterleitung (142).

Weitere Studien verdeutlichen das komplexe Zusammenspiel zwischen Makrophagen und dem kardialen Erregungssystem: In einem Mausmodell nach Myokardinfarkt wurde eine Anreicherung proinflammatorischer Makrophagen in der Grenzzone des Infarkts beobachtet, wo diese über Connexin 43 mit Kardiomyozyten gekoppelt waren (143). Dies führte über einen verstärkten Calciumeinstrom zu einer Verlängerung des Aktionspotenzials und einem erhöhten Arrhythmierisiko (143). Nach Myokardinfarkt zeigt sich zudem ein zeitlich dynamisches Infiltrationsmuster der Makrophagen (135): In der akuten Phase dominieren proinflammatorische, rekrutierte Makrophagen, die durch Phagozytose von nekrotischem Gewebe zur ersten Immunantwort beitragen (135). Etwa sieben Tage nach dem Infarkt übernehmen zunehmend antiinflammatorische Makrophagen die Kontrolle, welche profibrotische Mediatoren freisetzen und damit an der Gewebeheilung und Narbenbildung beteiligt sind (135).

Makrophagen spielen bei diversen kardialen Erkrankungen eine wichtige Rolle, da sie maßgeblich an Entzündungsprozessen und Gewebsumbau beteiligt sind (144-147). In einem Rattenmodell mit präklinischer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (prä-HFpEF) zeigte sich eine vermehrte myokardiale Fibrosierung (145). Diese war zum einen mit einer Steifheit der Herzkammer und der daraus resultierenden diastolischen Dysfunktion assoziiert, zum anderen mit weiteren Folgeerkrankungen wie beispielsweise Vorhofflimmern (145). In den entzündlichen Arealen des Myokards der prä-HFpEF-Ratten war neben der ausgeprägten Fibrose auch eine erhöhte Infiltration von CD68⁺ Makrophagen nachweisbar, die mit gesteigerten Konzentrationen inflammatorischer Zytokine einhergingen (145).

In einem Modell der hypertensiven Herzerkrankung zeigte sich nach Induktion der Hypertonie durch eine transversale Aortenverengung ein dreifacher Anstieg der Anzahl an Makrophagen im Myokard (144). Interessanterweise führte eine gezielte Depletion von Makrophagen einerseits zu einer signifikanten Reduktion der kardialen Fibrosierung und andererseits dazu, dass sich keine linksventrikuläre Hypertrophie entwickelt (144).

Gleichzeitig wurden auch protektive Effekte der Makrophagen beschrieben (148): So produzieren Makrophagen Amphiregulin (AREG), das die Phosphorylierung von Connexin 43 fördert und somit die elektrische Kopplung sowie die Reizweiterleitung zwischen Kardiomyozyten stabilisiert (148). AREG-defiziente Mäuse zeigten eine verstärkte Lateralisierung von Connexin 43, eine veränderte elektrische Leitfähigkeit und eine erhöhte Arrhythmieneigung (148).

Makrophagen spielen auch bei entzündlichen Herzerkrankungen wie der Myokarditis eine zentrale Rolle (138). In der initialen Phase dominieren proinflammatorische Makrophagen, die zur Viruselimination beitragen (138). In späteren Phasen übernehmen vorwiegend residente Makrophagen die Kontrolle über den Prozess, wobei sie zur Fibrosierung des Myokards beitragen (138).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Makrophagen aufgrund ihrer funktionellen Vielfalt an zahlreichen Prozessen in der Entstehung und dem Verlauf kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind (138, 144, 145, 148).

1.4.3.1 Pathophysiologie des Immunologischen Remodelings

Klinische Beobachtungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen inflammatorischen Erkrankung, wie Diabetes, und einer erhöhten Inzidenz von Vorhofflimmern hin (149).

Ein dauerhaft erhöhter Blutzuckerspiegel bei Diabetes begünstigt die Ansammlung von Makrophagen im Gewebe, welche proinflammatorische Botenstoffe wie TNF- α , IL-6, und IL-1 β freisetzen (147). Diese Mediatoren tragen auf unterschiedlichen Wegen zur Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen, zur Ausbildung von Fibrose und zur Schädigung des Gewebes bei (147).

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass Zellen des Immunsystems möglicherweise eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns spielen (146, 150, 151). So konnte in humanen Gewebeproben eine signifikante Akkumulation von CD3 $^{+}$ T-Lymphozyten im linken Atrium bei Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu solchen mit Sinusrhythmus nachgewiesen werden (150). Eine weitere Untersuchung belegte zudem eine erhöhte Infiltration von CD45 $^{+}$ Immunzellen im rechten Vorhof von Patienten mit Vorhofflimmern (151). In humanen Gewebeproben aus dem linken Vorhofohr von Patienten mit paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern wurde neben einer verstärkten fibrotischen Umgestaltung im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus auch eine vermehrte Infiltration von Immunzellen beobachtet (146). Dabei handelt es sich insbesondere um CD45 $^{+}$ Leukozyten und CD68 $^{+}$ Makrophagen, die bevorzugt endo- und subendomyokardial lokalisiert sind und bei Patienten mit Vorhofflimmern signifikant häufiger auftreten (146). Diese Befunde deuten auf eine mögliche immunvermittelte Beteiligung an der Pathogenese des Vorhofflimmerns hin (146).

Es wird angenommen, dass Diabetes durch die Induktion einer proinflammatorischen Mikroumgebung ein immunologisches Remodeling des kardialen Gewebes begünstigt (152, 153). Dieser Prozess könnte zur Akkumulation von Immunzellen, zur Förderung inflammatorischer Signalwege und letztlich zu strukturellen sowie funktionellen Veränderungen im Myokard beitragen (138).

Die bei Diabetes persistierende Hyperglykämie induziert eine verstärkte Expression des Toll-like-Rezeptors 2 in Makrophagen, was wiederum eine erhöhte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β zur Folge hat (154). In Studien

mit diabetischen Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte IL-1 β -Spiegel zu einer Verlängerung des kardialen Aktionspotentials, einem gesteigerten Calcium-Fluss sowie einer Reduktion des Kaliumstroms führen (154).

Die systemische Inflammation bei Diabetes führt neben erhöhten Entzündungsparametern darüber hinaus zu einem Anstieg von bestimmten Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B sowie zu einer vermehrten Rekrutierung von Immunzellen wie Monozyten, Neutrophilen und auch von proinflammatorischen Makrophagen (107, 155): Unter inflammatorischen Bedingungen werden zirkulierende Monozyten aus dem Blut in das Gewebe rekrutiert, wo sie zu Makrophagen differenzieren können (156). Diese infiltrierenden Makrophagen übernehmen vielfältige immunologische Funktionen, darunter Phagozytose, die Modulation der Immunantwort durch Zytokinsekretion sowie die Antigenpräsentation (156). Abhängig von ihrem Aktivierungszustand können Makrophagen sowohl zur Aufrechterhaltung als auch zur Resolution inflammatorischer Prozesse beitragen (156).

Makrophagen können auch strukturelle Veränderungen im Herzen beeinflussen: Durch die Ausschüttung von TGF- β oder ROS durch rekrutierte Makrophagen kann eine verstärkte kardiale Fibrosierung induziert werden (134). Diese pro-fibrotischen Prozesse tragen zur Dilatation des Vorhofs bei, welche wiederum die elektrische Signalweiterleitung im Myokard verändert und dadurch die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigen kann (134). Rekrutierte Makrophagen können zudem über vermehrte Sekretion des Nervenwachstumsfaktors NGF zu einem erhöhten Wachstum autonomer Nerven führen – gekoppelt ist dieser Mechanismus zusätzlich an Noradrenalin, die die NGF-Ausschüttung über die Kopplung an β -adrenerge Rezeptoren noch weiter verstärken kann (134).

Es gibt nicht nur Studien, die postulieren, dass Makrophagen bei Vorhofflimmern vermehrt vorhanden sind, sondern es gibt auch Hinweise dafür, dass diese direkt die elektrische Reizleitung im Myokard beeinflussen könnten und dadurch zur Aufrechterhaltung der Rhythmusstörung beitragen (31). Eine Studie zeigte eine erhöhte Rekrutierung von Makrophagen im rechten Vorhofohr bei Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten im Sinusrhythmus (31). Insbesondere wurde eine signifikante Zunahme proinflammatorischer Makrophagen

beobachtet, was auf eine verstärkte inflammatorische Aktivierung und deren mögliche Rolle in der elektrischen Dysfunktion des Vorhofs hinweist (31).

Proinflammatorische Makrophagen beeinflussen die atrialen Monozyten durch eine verstärkte Sekretion von TNF- α und IL-1 β , was zu einer Hemmung der QK1-Expression führt (31). Dadurch kommt es zu einer Unterdrückung des L-Typ-Calciumstroms (31). Diese elektrophysiologischen Veränderungen stören die atriale Reizweiterleitung, schaffen eine proarrhythmogene Umgebung und fördern somit die Makrophagen-Monozyten-induzierte Progression des Vorhofflimmerns (31).

In einer Studie von Hulsmans et al. wurden Proben aus dem linken Vorhof von Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern sowie von Kontrollprobanden entnommen (140). Mittels Single-Cell-Sequencing konnte gezeigt werden, dass bei den erkrankten Patienten eine erhöhte Anzahl von proinflammatorischen SPP1 $^+$ Makrophagen vorliegt (140). Zusätzlich zeigte sich in dieser Zellpopulation ein immunmetabolisches Remodeling, das sich durch eine verstärkte Aktivierung von pro-inflammatorischen Signalwegen in den Makrophagen bei Patienten mit Vorhofflimmern manifestierte (140).

Um die Signalwege des immunologischen Remodelings genauer zu untersuchen, wurde das Mausmodell „HOMER“ weiter analysiert. Diese Maus zeigt Übergewicht, Bluthochdruck und eine Mitralklappenerkrankung, die typischerweise mit kardiovaskulären und metabolischen Störungen assoziiert sind (140). In diesem Modell konnte eine Hochregulierung der Makrophagen-Anzahl nachgewiesen werden (140). Dabei wurde festgestellt, dass 67 % der Makrophagen im linken Vorhofohr pro-inflammatorisch Monozyten-abhängig rekrutiert wurden (140). Im Vergleich dazu stammten in den gesunden Kontrolltieren nur 36 % der Makrophagen von Monozyten, was auf einen ausgeprägteren pro-inflammatorischen Prozess bei den HOMER-Tieren hindeutet (140). Zudem wurde beobachtet, dass nur die Monozyten-rekrutierten Makrophagen eine Hochregulierung des Gens SPP1 aufwiesen (140). SPP1 ist bekannt dafür, Entzündungsprozesse zu fördern, die elektrische Leitfähigkeit zwischen Kardiomyozyten zu beeinflussen und zu einer verstärkten Fibrosierung beizutragen (140). Interessanterweise zeigte sich, dass die SPP1-Expression auf den vermehrt Monozyten-abhängig rekrutierten Makrophagen auch einen potenziellen therapeutischen Ansatz

bieten könnte: Nach einer SPP1-Deletion konnte eine signifikante Reduktion der Vorhofflimmern-Episoden beobachtet werden (140).

Da auch bei Patienten ohne Diabetes bei Vorhofflimmern eine vermehrte Präsenz von Immunzellen in den Atrien festgestellt wurde, könnte dies auf eine potenzielle Rolle der Immunzellen in der Ätiologie der Rhythmusstörung hindeuten (146, 150, 151). Veränderungen im Immunsystem, die bei Diabetes beobachtet werden, könnten die Funktion und Aktivität dieser Immunzellen beeinflussen (31). Zudem werden den Makrophagen verschiedene Funktionen mit Einfluss auf die Reizweiterleitung beschrieben (139, 140, 157). Es kann vermutet werden, dass dieses immunologische Remodeling möglicherweise ein wichtiger Faktor für die erhöhte Häufigkeit von Vorhofflimmern bei diabetischen Patienten ist. Die genauen Mechanismen, die diesen Zusammenhang erklären, sind jedoch derzeit noch unzureichend erforscht.

1.5 Tiermodelle des Diabetes mellitus

Diabetes kann in Versuchstieren über verschiedene experimentelle Ansätze induziert werden: durch genetische Modifikationen in Genen, die am Glukosestoffwechsel beteiligt sind, durch die Verabreichung betazelltoxischer Chemikalien, durch chirurgische Resektion des exokrinen und endokrinen Pankreas oder durch eine hochkalorische Diät (158-161).

In der Vergangenheit wurden in der experimentellen Diabetesforschung hauptsächlich Kleintiermodelle eingesetzt (162). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Schweinemodell wurde dabei analog zur Akita-Maus entwickelt, welche als etabliertes Kleintiermodell in der Diabetesforschung breite Anwendung findet (158). Die Akita-Maus ist ein Modell zur Untersuchung des monogenen MIDY-Diabetes, der durch eine Mutation im INS-Gen ausgelöst wird (45). Eine Punktmutation im INS2-Gen der Akita-Maus führt zur Akkumulation von fehlgefaltetem Proinsulin im endoplasmatischen Retikulum, was eine Betazell-Dysfunktion und einen daraus resultierenden Insulinmangel verursacht (158). Allerdings sind, wie bei allen Kleintiermodellen, die physiologischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch zu berücksichtigen, wodurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen begrenzt ist (163, 164).

Diabetes kann beim Schwein über verschiedene Mechanismen experimentell induziert werden (165). Eine technisch aufwendige und invasive Methode stellt dabei die chirurgische Entfernung des Pankreas dar (166). In Kleintiermodellen wird häufig Streptozotocin (STZ) eingesetzt, das durch DNA-Schädigung pankreatische Beta-Zellen zerstört (166). Studien am Schwein zeigen jedoch, dass zur erfolgreichen Induktion eines diabetischen Phänotyps eine deutlich höhere Dosis von STZ erforderlich ist (150 mg/kg KG im Vergleich zu 50 mg/kg KG beim Kleintier) (166). Allerdings sind auch bei dieser erhöhten Dosis die diabetogenen Effekte teilweise reversibel, eine weitere Dosiserhöhung auf 200 mg/kg KG ist hingegen mit einem erhöhten Risiko für nephrotoxische und hepatotoxische Nebenwirkungen assoziiert, wodurch der Einsatz von STZ beim Schwein nur eingeschränkt als geeignetes Verfahren zur Diabetesinduktion gilt (166). Es existieren mehrere genetisch modifizierte Schweinemodelle, bei denen gezielte genetische Veränderungen zu einem diabetischen Phänotyp führen:

GIPR^{dn} Schweine, die einen humanen dominant-negativen GIP-Rezeptor-Mutanten exprimieren, weisen eine deutlich reduzierte Inkretinantwort sowie eine verminderte Insulinsekretion auf (162). Der Inkretin-Effekt beschreibt die physiologische Beobachtung, dass eine orale Glukoseaufnahme im Vergleich zur intravenösen Glukosegabe eine deutlich stärkere Insulinsekretion auslöst (162). Dieses genetisch modifizierte Schweinemodell wird vorrangig zur Untersuchung der prädiabetischen Stoffwechselphase und zur Erforschung der Pathophysiologie des Typ-2-Diabetes mellitus eingesetzt (162).

In der vorliegenden Arbeit wird das INS^{C94Y}-Schweinemodell untersucht, das gezielt als translationales Großtiermodell analog zur Akita-Maus entwickelt wurde (167). Aufgrund der vergleichbaren molekularpathologischen Mechanismen eignet sich das INS^{C94Y}-Schwein insbesondere zur Erforschung des MIDY und bietet dabei eine physiologisch relevante Ergänzung zu etablierten Kleintiermodellen (168). Zur Generierung des INS^{C94Y}-Schweinemodells wurde eine gezielte Punktmutation im INS-Gen eingeführt, bei der an Position 94 ein Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin erfolgte (167). Das porcine INS^{C94Y}-Allel ist ortholog zum humanen INS^{C96Y}-Allel (169). Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer fehlerhaften Faltung des Proinsulins, das sich im endoplasmatischen Retikulum der pankreatischen Betazellen akkumuliert (167). Die daraus resultierende Belastung des endoplasmatischen Retikulums löst einen chronischen ER-Stress aus, der schließlich zur Apoptose der insulinproduzierenden Betazellen führt (167). Die genetisch modifizierten diabetischen Schweine weisen signifikant reduzierte Nüchtern-Insulinspiegel auf (167). Zusammenfassend zeigt das INS^{C94Y}-Schweinemodell einen stabilen diabetischen Phänotyp (167, 169).

1.6 Hypothese

Klinische Beobachtungen haben gezeigt, dass Patienten mit Diabetes Mellitus ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern aufweisen; die zu grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind jedoch bislang unzureichend verstanden (170).

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob die transgenen INS^{C94Y}-Schweine, die ein diabetisches Modell darstellen, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren tatsächlich vermehrt zu Vorhofflimmern neigen und somit ein geeignetes Versuchsmodell sind.

Zudem wird angenommen, dass Diabetes über immunologisches Remodeling zu einer signifikanten Veränderung in der Verteilung und Aktivierung von Makrophagen im Herzgewebe führt. Es wird postuliert, dass diese Makrophagen nicht nur entzündliche Prozesse fördern, sondern auch die kardiale Reizleitung beeinflussen. Es wird vermutet, dass die diabetischen INS^{C94Y}-Schweine eine größere Anzahl an Makrophagen im Herzen im Vergleich zu den gesunden Wildtypen aufweisen. Außerdem soll die Hypothese untersucht werden, dass Diabetes zu einem elektrischen Remodeling im Herzgewebe führt, das sich durch eine Umverteilung der Connexin-Expression zeigen könnte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob die Behandlung mit dem SGLT2-Inhibitor Dapagliflozin einen positiven Einfluss auf das proarrhythmogene kardiale Remodeling bei Diabetes hat. Kardioprotektive Effekte von SGLT2-Inhibitoren konnten in klinischen Studien bereits beobachtet werden, der genaue Mechanismus dahinter ist allerdings unbekannt (77). Im Rahmen dieser Arbeit wird angenommen, dass ein möglicher Wirkmechanismus in der Beeinflussung des immunologischen und elektrischen Remodelings bei Diabetes liegen könnte. In der vorliegenden Arbeit wird daher auch untersucht, ob Dapagliflozin das Remodeling im Hinblick auf die Connexin-Expression und die Makrophagenverteilung modifizieren kann. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die der kardioprotektiven Wirkung von Dapagliflozin zugrunde liegen, könnte wertvolle Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Diabetes und Vorhofflimmern liefern und ein mögliches Therapiekonzept darstellen.

2. Material

2.1 In vivo

2.1.1 Medikamente

Dapagliflozin, 10 mg Tabletten	AstraZeneca, Hamburg, Deutschland
Azaperon 40mg, Injektionslösung	Empresa Naviera Elcano, S.A., Madrid, Spanien
Insulin NovoRapid®	Novo Nordisk, Kopenhagen, Dänemark
Insulin Lantus®	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Ketaset 100 mg/ml, Injektionslösung	Zoetis, Berlin, Deutschland
Midazolam Amp. 15 mg/ 3 ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Propofol 2% IFL 1000 mg/ 50 ml	Fresenius, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Fentadon 50 ug/ml, Injektionslösung	Dechra Veterinary Products, Aulendorf, Deutschland
Atropinsulfat	Braun Ecoflac, Melsungen, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 % 500ml	Braun Ecoflac, Melsungen, Deutschland
Heparin-Na 25.000 IE/ 5ml	Ratiopharm GmbH, Landsham, Deutschland

2.1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

Avanti™ Einführschleuse	Cordis, Miami Lakes, Florida, USA
Führungsdraht Roadrunner®	Cook Denmark Holding ApS, Bjæverskov, Dänemark
Inquiry™ Elektrophysiologie Katheter	St. Jude Medical, St. Paul, Minnesota, USA
Anatomische Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chirurgische Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nerv- und Gefäßhäkchen	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Wundspreizer	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Sternumspreizer	Fehling Instruments GmbH & Co. KG, Karlstein, Deutschland
Nadelhalter	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Klemme	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mosquito	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chirurgische Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Intrafix Primeline, 150 cm	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Perfusorleitung, 1,0 x 2,0 mm, PE, 150 cm,	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Perfusorspritze 50 ml, transparent	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland

Rusch Super SafetyClear Endotrachealtubus 4.5-7.0 mm	Wolfram Droh GmbH Mainz, Deutschland
Ambu® Silikon-Beatmungsbeutel	Ambu GmbH, Bad Nauheim, Deutschland
Miller VET F.O. LED Laryngoskop-Spatel	Covetrus AT GmbH, Brunn am Gebirge, Deutschland
300A Servo Ventilator	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland
C-Bogen Exposcop 8000	Ziehm GmbH, Nürnberg, Deutschland
MLCL CardioLab System	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
OP-Sauger KATASPIR PRO	Medutek, Bremen, Deutschland
Pulsoxymeter Ohmeda BIOX 3700e	Ohmeda, Louisville, Colorado, USA
RAPIDLab® 1200 Blutgasmessgerät,	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland
SC 9000XL Patientenmonitor	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland
Foliodrape® Protect Lochtücher	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Gaze Nobagaze Kompressen	Noba Verbandmittel Danz GmbH u. Co. KG, Wetter, Deutschland

2.2 *In vitro*

2.2.1 Verbrauchsmaterialen

2.2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Zentrifugenröhrchen 50ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tubes®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2.1.2 Immunofluoreszenz

Formaldehyd	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Triton	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Mounting medium	Aglient Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
10x PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Goat Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Objektträger ROTILABO ®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Super PAP Pen Liquid Blocker	Science Services, München, Deutschland
Croyvial 2 ml	Simport, Bernhard-Pilon, Canada
Cryomold® 25x20x5 mm	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, Kalifornien, USA

2.2.1.3 Durchflusszytometrie

1xDPBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dnase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Collagenase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Collagenase XI	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dispase® II Protease	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Hepes	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RBC Lysis Puffer	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Live/dead Fixable Dead Cell Stains	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
Counting beads	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
Compensation beads	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
Cell Strainer 40 µm	Corning, New York, USA
Cell Strainer 50 µm	Sysmex, Nordernstedt, Deutschland

2.2.1.4 Western Blot

Ammoniumpersulfat (APS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Rotiphorese gel	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NuPage	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
Magic maker	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
P-Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ponceau-S-Staining	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Roti Block	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
ECL Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Stripping Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris-HCL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Bufferd Saline (TBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glasplatten	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
Nitrocellulose Membran, 0,2 µm	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Nitrocellulose Membran, 0,45 µm	Invitrogen, Carlsbad, California, USA

2.2.2 Antikörper

2.2.2.1 Durchflusszytometrie

CD3e	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
CD21	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
CD56	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD45	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA

CD16	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
CD172a	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
CD163	Novus Biologicals, Mainz, Deutschland
Streptavidin	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
BV421	BD Life Sciences, Allschwil, Schweiz
Fc Receptor Binding Inhibitor	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA

2.2.2.2 Histologie

Primäre Antikörper

CD163	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
Desmin	Novus Biologicals, Mainz, Deutschland
Connexin 43	Abcam plc., Cambridge, UK
Hoechst Trichlorid	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA

Sekundäre Antikörper

anti rabbit AF568	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
anti goat Cy3	Abcam plc., Cambridge, UK
anti mouse AF488	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

2.2.2.3 Western Blot

Primäre Antikörper

Connexin 37	LifeSpan BioSciences, Seattle, Washington, USA
Connexin 40	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
Connexin 43	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
Connexin 45	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien USA
GAPDH	Abcam plc., Cambridge, UK

Sekundäre Antikörper

HRP, rat anti mouse	Abcam plc., Cambridge, UK
HRP, goat anti rabbit	Abcam plc., Cambridge, UK

2.2.3 Geräte und Maschinen

Zentrifuge 5430R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH Meter ph538	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Thermomixer®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PMR-30 Mini Rocker-Shacker	Grant Instruments, Cambridge, UK
Ultraschallhomogenisator Ultra-Turrax	Janke&Kunkel, Staufen, Breisgau, Deutschland
Präzisionswage Ohaus® Pioneer®	Ohaus, Pine Brook, USA
Präzisionswage Sartorius BP610	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Präzisionswaage EWJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Axio Imager 2 Forschungsmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Digitales Forschungsmikroskop DM6B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar Wertheim, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr-Werk Biberach GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank KT1530	Liebherr-Werk Biberach GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Ultratiefkühlschrank CryoCube® F740hi	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eismaschine Ziegra	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG-REO	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
CryoStar™ NX70 Kryostat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pippetirehelfer accu-jet®S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipette Eppendorf Research Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette pipetman®	Gilson S.A.S., Villiers-le-bel, Frankreich
Färbekasten ROTILABO®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Färbekammer StainTray™	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gelkammer	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
Gelviewer GelDoc 2000	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
Gelrunner Power Pac 3000	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA

Imager	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland
Westernrunner	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
PowerPac™ Power Supply	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
Microm HM 340E Mikrotom	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NanoDrop™ 2000 Photometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
BD LSRLFortessaTM Cell Analyzer	BD Biosciences, San Diego, Kalifornien, USA

2.3 Software

GraphPad Prism v9 (Statistik, Graphenerstellung)	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
FlowJo v10 (Auswertung Durchflusszytometrie)	https://www.flowjo.com/
FIJI is just ImageJ (Auswertung Histologie)	https://imagej.net/
Biorender (Erstellung von Abbildungen)	https://BioRender.com
Duden (ausschließlich zur grammatischen Korrektur)	https://www.duden.de/
ChatGPT (ausschließlich zur grammatischen Korrektur)	https://chatgpt.com/
Microsoft Office Suite 2016 - Excel (Statistik) - Powerpoint (Abbildungen) - Word	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Endnote™ (Referenzmanager)	https://endnote.com/

3. Methoden

3.1 Tiermodell

Aufgrund von strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zum Menschen, insbesondere im Hinblick auf elektrophysiologische Eigenschaften und den Glukosestoffwechsel, stellt das deutsche Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) ein geeignetes und etabliertes Versuchstier für die kardiovaskuläre Forschung dar und wurde daher für die Wildtyp-Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit ausgewählt (164, 165, 171).

Zur Untersuchung proarrhythmogener Veränderungen wurde das genetisch modifizierte INS^{C94Y} -Schweinemodell gewählt. Bei diesem Modell kommt es an der 94. Stelle der Aminosäurekette im INS-Gen zu einem Austausch von Cystein in Tyrosin (167). Dies führt zur Bildung von fehlgefaltetem Insulin, das im endoplasmatischen Retikulum nicht abgebaut werden kann, was schließlich zum Untergang der pankreatischen Beta-Zellen führt (167). Über diesen Mechanismus entwickeln die transgenen Schweine einen stabilen diabetischen Phänotyp (165). Das INSC94Y -Schweinemodell wurde nach dem Vorbild des in der Kleintierforschung weit verbreiteten Akita-Mausmodells entwickelt und dient als tierexperimentelles Modell zur Untersuchung des MIDY-Diabetes (95).

In vorausgegagten Studien wurden bei transgenen INSC94Y -Schweinen im Alter von 4,5 Monaten signifikant erniedrigte Nüchterninsulinspiegel sowie eine erhöhte Insulinresistenz festgestellt (167). Zudem zeigte sich im Alter von 4,5 Monaten bei den transgenen Schweinen eine reduzierte Beta-Zell-Masse sowie eine signifikante Reduktion des Pankreasgewicht im Vergleich zu den Kontrollschweinen (167). Als frühe Folgeerscheinung der Diabeteserkrankung zeigte sich bei 4,5 Monate alten INSC94Y -Schweinen eine ausgeprägte Kataraktbildung (167). In 8 Monate alten INSC94Y -Schweinen wiesen Müller-Zellen, die entscheidend an der Pathogenese der diabetischen Retinopathie beteiligt sind, eine Dysregulation zentraler Proteine auf (172). Als späte Folgeerscheinung der Diabeteserkrankung zeigten zwei Jahre alte INSC94Y -Schweine typische Merkmale einer proliferativen diabetischen Retinopathie, darunter die Ansammlung harter Exsudate, cotton-wool-Spots sowie intraretinale

Mikrogefäßveränderungen, die auch für die menschliche diabetische Retinopathie charakteristisch sind (173). Auch im Herzen zeigten die INSC94Y-transgenen Schweine signifikante Veränderungen (174): Bei 5 Monate alten INSC94Y-transgenen Schweinen wurden im Vergleich zu altersgleichen Wildtyp-Tieren eine verminderte Kapillardichte sowie eine reduzierte Perizytenbesetzung im Myokard festgestellt, was auf eine durch Diabetes mellitus bedingte Destabilisierung der mikrovaskulären Herzarchitektur hinweist (174). 10–12 Wochen alte INSC94Y-Schweine zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine linksventrikuläre Dilatation und eine leicht reduzierte Ejektionsfraktion, begleitet von erhöhten endsystolischen Drücken und erhöhtem koronaren Blutfluss (175).

Zusammenfassend weisen die transgenen INSC94Y-Schweine in vorausgegangenen Studien in verschiedenen Organsystemen Hinweise auf diabetogene Folgeerkrankungen auf (172-175).

Für die nachfolgenden Versuche wurden ca. 6 Monate alte Schweine beider Geschlechter eingeschlossen und in drei Kohorten unterteilt:

- 1) Gesunde Wildtyp-Schweine (*WT*)
- 2) Transgene diabetische INSC94Y-Schweine (*DM*)
- 3) Transgene diabetische INSC94Y-Schweine mit Dapagliflozin-Therapie (*DM+DAPA*)

3.2 *In vivo*

Die Schweine werden am Moorversuchsgut, einem Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität München, in Oberschleißheim aufgezogen und mit ca. 6 Monaten in das Walter-Brendel-Institut in München 2 bis 3 Tage vor Versuchsbeginn zur Akklimatisierung überführt. Ein Teil der Schweine aus der Kohorte der diabetischen Tiere erhielt nach Ende der Säugezeit bis zum Beginn der *in vivo*-Versuchen mit ca. 6 Monaten eine Tagesdosis von 10 mg Dapagliflozin parallel zur morgendlichen Futteraufnahme (DM+DAPA-Kohorte).

Die diabetischen Tiere erhielten zudem bei Blutzuckerspitzen eine Behandlung mit Insulin. Eine intensivierte Insulintherapie wurde nicht durchgeführt, um einen ausgeprägten diabetischen Phänotyp zu etablieren und die Folgen einer chronischen Hyperglykämie bei den diabetischen Tieren untersuchen zu können. Ab einem Nüchternblutglukosewert größer als 400 mg/dl wurden die Schweine mit einem Kurzzeitinsulin behandelt, bei Bedarf wurde zusätzlich ein langwirksames Insulin verabreicht. Der Zielblutzuckerspiegel wurde zwischen 200 und 300 mg/dl festgesetzt.

Für die *in vivo*-Experimente wurde insgesamt eine Kohorte von 19 Schwestern, bestehend aus weiblichen und männlichen Tieren, untersucht und in drei separate Untergruppen eingeteilt: Gesunde Wildtyp-Schweine (WT, n=4), diabetische INSC94Y-Schweine ohne Therapie (DM, n=6) und diabetische INSC94Y-Schweine mit Dapagliflozin-Therapie (DM+DAPA, n=9).

Dieses Projekt wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeföhrten Tierexperimente wurden im Einklang mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und der Tierschutzversuchstierordnung durchgeführt.

3.2.1 Induzierbarkeit von Vorhofflimmern

Am Versuchstag erhielten alle Kohorten gleichermaßen zunächst eine intramuskuläre Narkotisierung. Hierfür wurde Atropinsulfat (0,05 mg/kg KG), Ketamin (20 mg/kg KG) und Azaperon (10 mg/kg KG) verwendet. Anschließend wurde über einen venösen Zugang am Ohr Midazolam (0,5 mg/kg KG) verabreicht und als Analgetikum Fentanyl (0,05 mg/kg KG) verwendet. Nach erfolgreicher

endotrachealer Intubation wurden die Schweine druckkontrolliert beatmet. Zur weiteren Aufrechterhaltung der Narkose wurde Propofol (0,5 mg/kg KG/min) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG) verwendet (176). Die Kontrolle der korrekten Einstellung der Beatmungsparameter erfolgte über regelmäßige Blutgasanalysen.

Nach Narkotisierung der Schweine erfolgte die Anlage eines 12-Kanal-EKGs zur Überwachung und Aufzeichnung. In den rechten Vorhof wurde ein multipolarer Katheter platziert, um elektrophysiologische Untersuchungen durchführen zu können (177). Mittels 6-sekündiger Burst-Stimulation (10 Hz) wurde anschließend die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern untersucht. Hierbei wurden irreguläre, schnelle RR-Intervalle als Vorhofflimmerepisode gewertet.

Am Ende der *in vivo*-Versuche erhielten die Schweine eine zusätzliche Analgesie mit einem Bolus von 0,5 mg/kg KG Fentanyl. Der Thorax wurde nach einer Wartezeit von ca. 5 Minuten durch eine mediane Thorakotomie eröffnet. Die Versuchstiere wurden durch exsanguinatorische Euthanasie mittels Durchtrennung der Vena cava inferior terminiert. Das Schweinherz wurde anschließend entnommen und die einzelnen Regionen wurden wie unten beschrieben herauspräpariert.

3.3 *In vitro*

3.3.1 Mikrodissektion Schweineherz

Vor Versuchsbeginn wurde pro Herz ein Liter Tyrode-Lösung hergestellt und bei +4 °C gekühlt gelagert.

Tyrode-Lösung

	Pro ein Liter
NaCl	8 g
KCl	403 mg
MgCl ₂	102 mg
CaCl ₂	265 mg
Hepes	3,76 g
D(+)-Glucose	901 mg
➔ Einstellen auf pH 7,35	

Nach Entnahme wurde das Herz in eine Schüssel mit gekühlter Tyrode-Lösung platziert. Nach Durchspülung der linken und rechten Koronararterie mit ca. 40 ml eiskalter Tyrode-Lösung je Gefäß wurden die einzelnen Areale nach folgendem Schema entnommen.

Pro Region wurde ein jeweils zweimal zwei Zentimeter großes Gewebestück für die Histologie entnommen, in ein Cryomold gelegt und mit Tissue-Tek auf Trockeneis eingebettet. Sobald das Tissue-Tek komplett ausgehärtet ist, wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Für die Molekularbiologie wurde die Gewebeprobe in mehrere kleine ca. fünfmal fünf mm große Stücke geschnitten und in einem Cryotube in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Proben wurden danach aus dem Stickstoff entnommen und bei -80 °C gelagert. Für die Durchflusszytometrie wurden je ca. einmal ein cm große Proben entnommen und zusammen mit drei ml DPBS pro Probe in einem Falcon-Tube auf Eis kühlgelagert, bis alle Proben entnommen waren und mit dem Experiment begonnen werden konnte.

3.3.1.1 Entnahme der Proben

Nach Entnahme des Herzens wurde dieses mit Blick auf das Herz von vorne auf einer Arbeitsplatte positioniert (vgl. Abb. 14-A) und anschließend vom Apex ausgehend zur Basis senkrecht zum interventrikulären Septum in circa vier Scheiben von jeweils einem Zentimeter Länge geschnitten (vgl. Abb. 14-B). Hierbei stellt sich die Wand des linken Ventrikels im Vergleich zum rechten Ventrikel durch die verstärkte Muskulatur dicker dar. Aus diesen Scheiben wurden nun Gewebeproben aus dem linken und rechten Ventrikel entnommen.

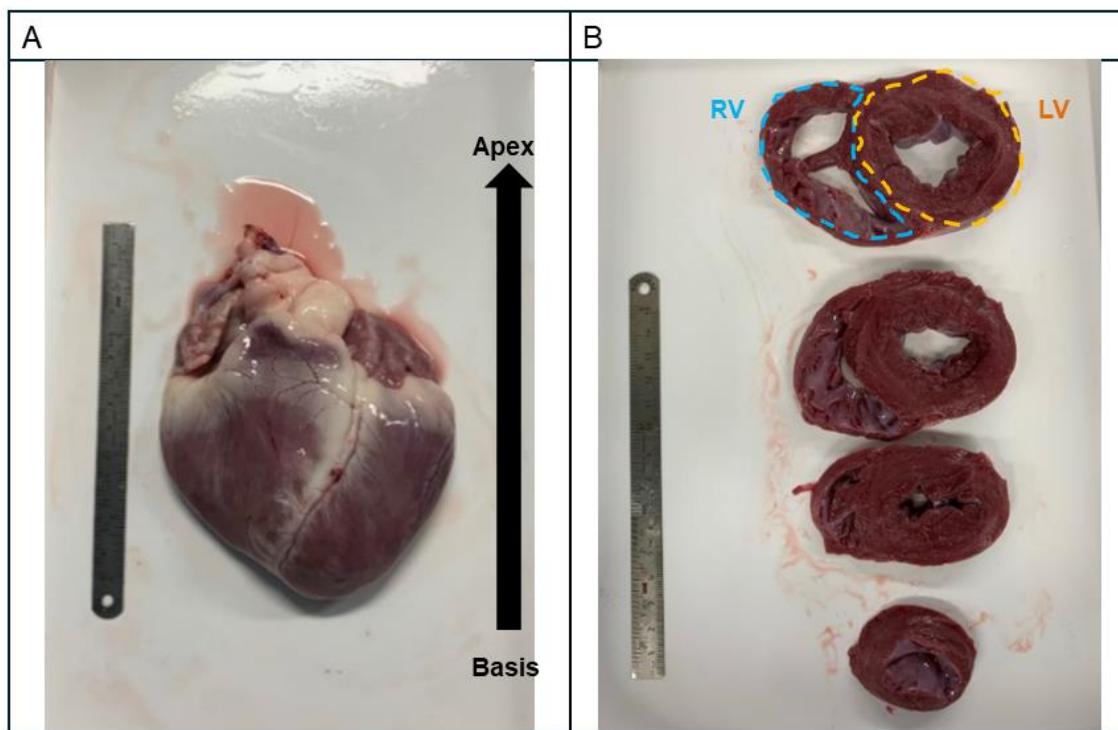


Abbildung 14. Entnahme der Proben, Teil 1. (A) Blick auf die Vorderseite des Herzens, (B) In Scheiben geschnittene Proben aus dem rechten (RV) und linken Ventrikel (LV).

Anschließend wurden die Proben des rechten Vorhofohrs sowie des rechten Vorhofes entnommen. Hierfür wurde zunächst die Vena cava superior aufgesucht, die in den rechten Vorhof mündet (vgl. Abb. 15-A) (178). Die Vena cava superior wurde nun lateral aufgeschnitten (vgl. Abb. 15-B). Dieser Schnitt wurde lateral durch das rechte Atrium weitergeführt. Für eine bessere Sicht wurde die Spitze des rechten Vorhofohres abgeschnitten. Anschließend wurde eine Probe aus dem rechten Vorhof entnommen. Das rechte Vorhofohr lässt sich von außen bereits gut sichtbar vom rechten Vorhof abgrenzen (vgl. Abb. 15-A). Von innen lässt sich das Vorhofohr eindeutig über die raue Oberfläche, hervorgerufen durch die

Musculi pectinati, im Vergleich zu der glatten Oberfläche des Vorhofes abgrenzen (179).

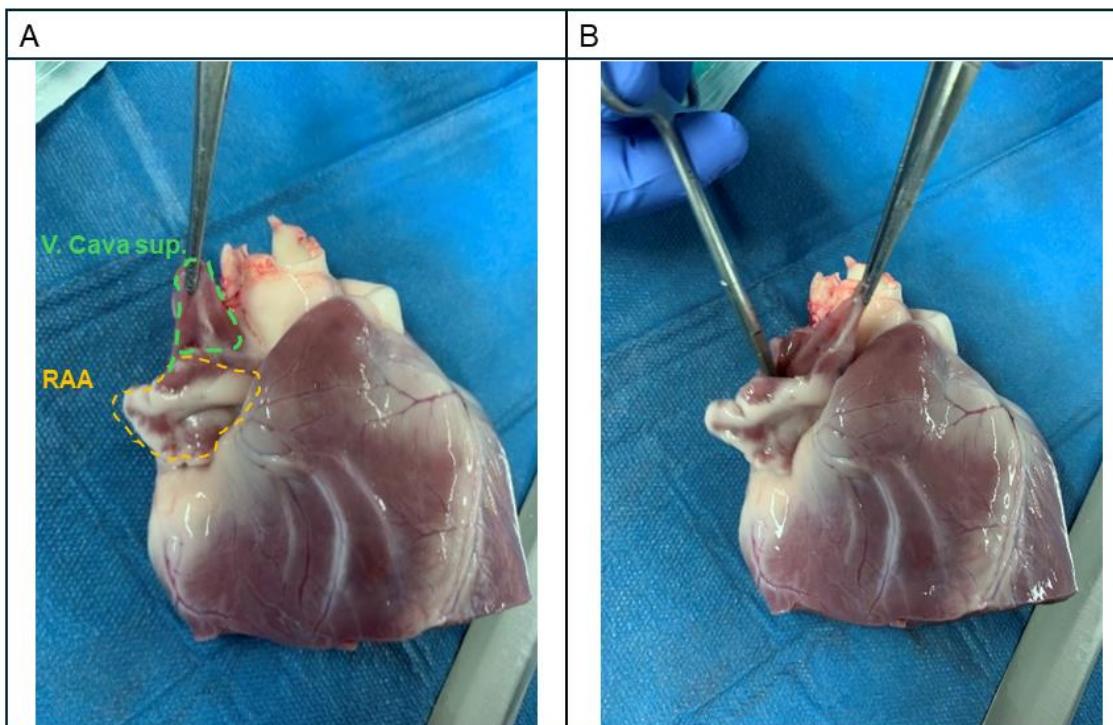


Abbildung 15. Entnahme der Proben, Teil 2. (A) Blick auf das rechte Vorhofohr (RAA), die Pinzette zeigt auf die Vena cava superior, (B) Die Vena cava superior wurde lateral eröffnet.

Zur Identifizierung des Sinusknoten-Areals wurde zunächst die Crista terminalis aufgesucht, die als Muskelstrang zwischen rechtem Vorhofohr und rechtem Vorhof verläuft (vgl. Abb. 16-A) (180). Der Sinusknoten liegt rechts der Crista terminalis, am cavoatrialen Übergang (181). Mit Start am cavoatrialen Übergang wurde eine zwei Zentimeter lange Strecke ausgemessen, senkrecht zur Crista terminalis wurde Richtung Atrium eine ein Zentimeter lange Strecke abgemessen (vgl. Abb. 16-B). Dieses entnommene Gewebestück sollte nun den Sinusknoten enthalten (vgl. Abb. 16-B).

Der laterale Schnitt, der bereits zur Eröffnung des rechten Vorhofes diente, wurde nun lateral durch den rechten Ventrikel erweitert (vgl. Abb. 17-A). Der rechte Ventrikel wurde nun aufgeklappt, sodass ein freier Blick auf die Trikuspidalklappe möglich ist (vgl. Abb. 17-B).

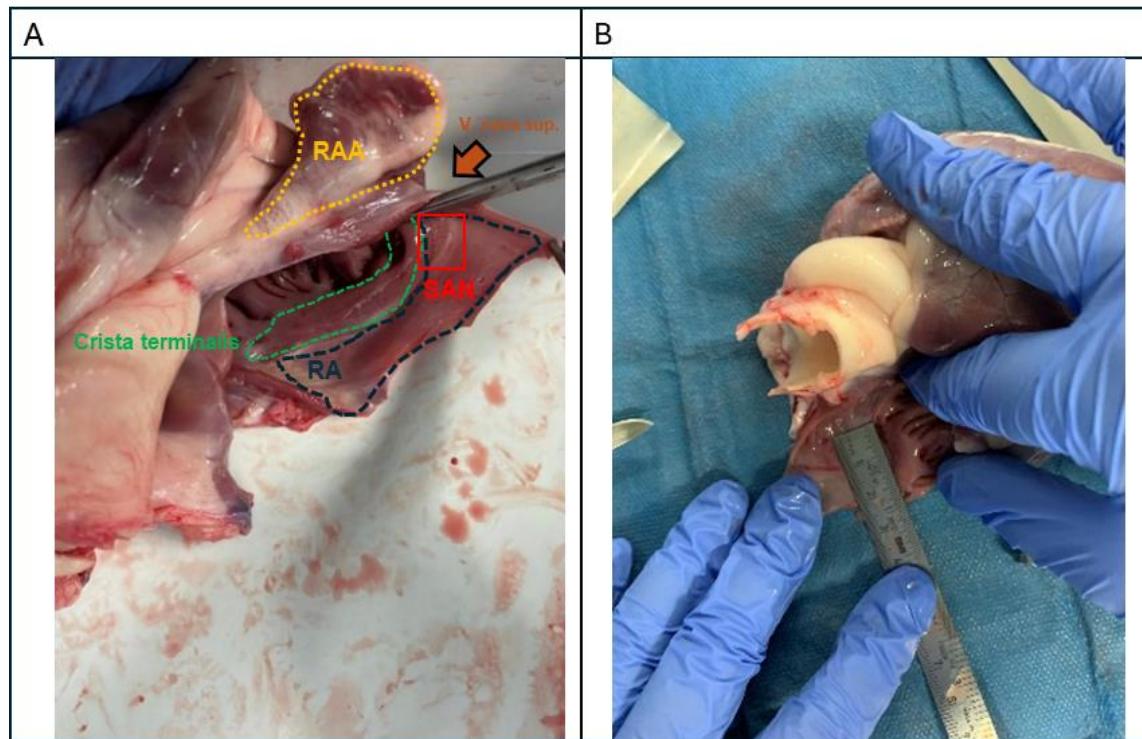


Abbildung 16. Entnahme der Proben, Teil 3. (A) Blick auf das rechte Herz. Links im Bild das rechte Vorhofovhr (RAA), der rechte Vorhof (RA) ist eröffnet, das Sinusknoten-Areal (SAN) befindet sich atrialwärts der Crista terminalis, (B) Abmessung der Probenentnahme.

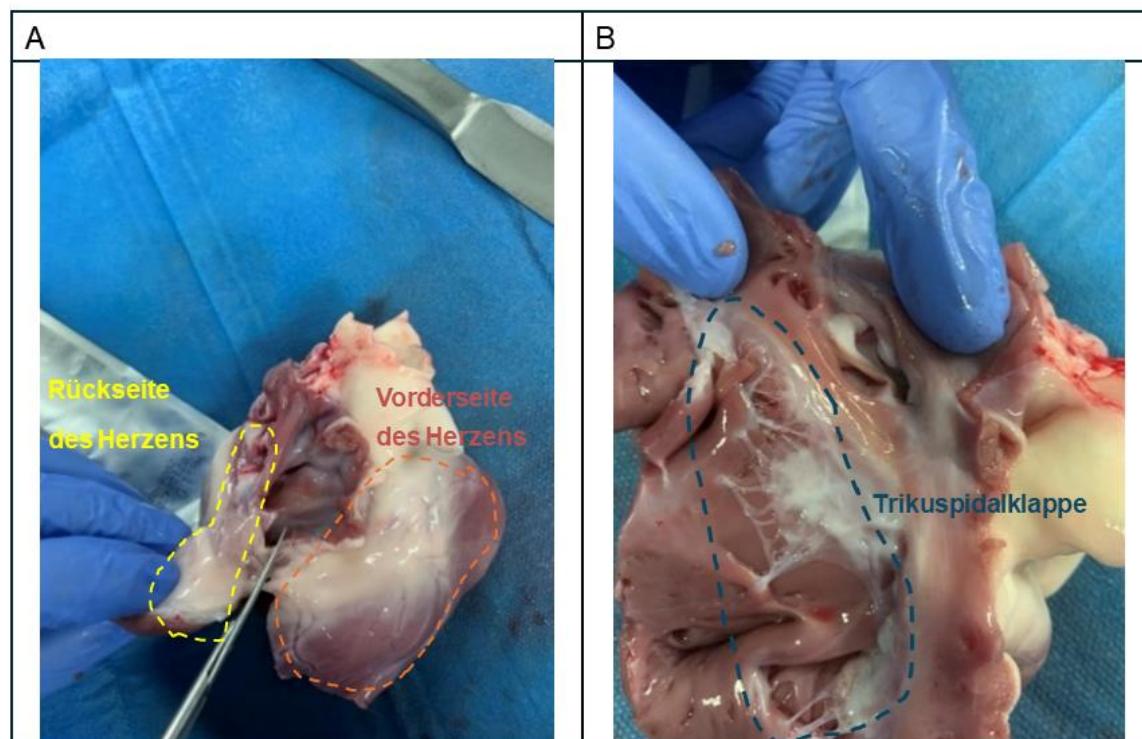


Abbildung 17. Entnahme der Proben, Teil 4. (A) Blick von lateral auf das rechte Herz, (B) Blick auf die Trikuspidalklappe.

Der AV-Knoten befindet sich im Koch-Dreieck (182). Das Koch-Dreieck wird anterior durch das septale Segel der Trikuspidalklappe, posterior durch die Tendaro Sehne, die Weiterführung der Einstrombahn der Vena cava inferior, und basal durch den Sinus coronarius begrenzt (vgl. Abb. 18-A) (182). Ein einmal ein Zentimeter großes Gewebestück wurde aus dem Kochdreieck ausgeschnitten (vgl. Abb. 18-B). Hierbei wurde nah an der Trikuspidalklappe geschnitten, da der AV-Knoten beim Schwein näher an der Trikuspidalklappe liegt als beim Menschen (181).

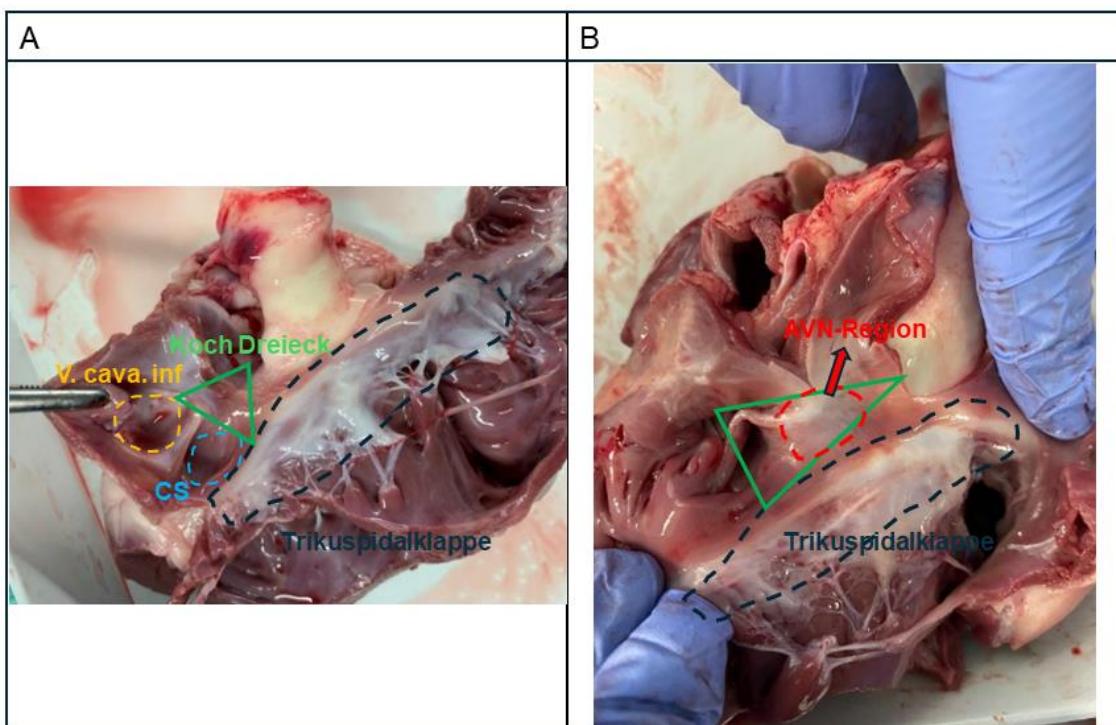


Abbildung 18. Entnahme der Proben, Teil 5. (A) Blick auf das eröffnete rechte Herz. Das Koch-Dreieck wird von der Vena cava inferior, dem Koronarsinus (CS) und der Trikuspidalklappe begrenzt, (B) die AVN-Region befindet sich innerhalb des Koch-Dreiecks (grün).

Das linke Vorhofohr kann bereits von außen durch die raue Anatomie gut identifiziert werden (vgl. Abb. 19-A). Zur Identifizierung des linken Vorhofes wurde das Herz auf die Rückseite gedreht. Als nächster Schritt wurden die Pulmonalvenen aufgesucht, die in den linken Vorhof münden (vgl. Abb. 19-B) (183). Anschließend wurden Proben aus den jeweiligen Regionen entnommen.

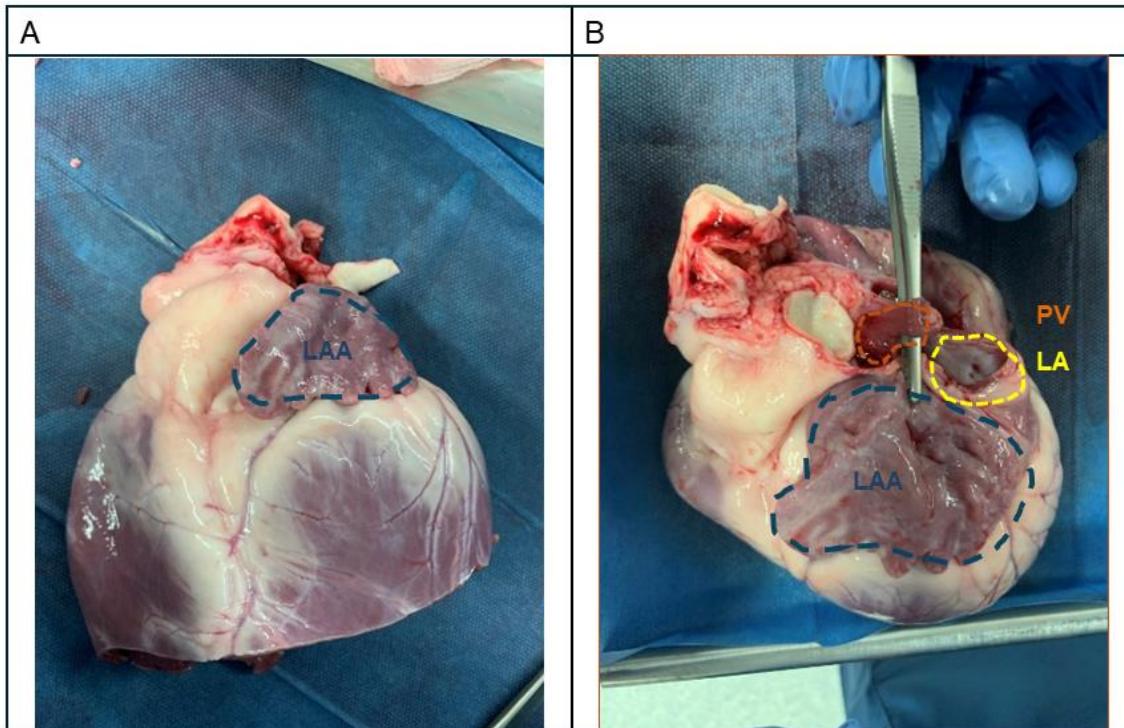


Abbildung 19. Entnahme der Probe, Teil 6. (A) Blick auf das linke Vorhofohr (LAA), (B) Die Pulmonalvenen (PV) eignen sich zur Auffindung des linken Atriums (LA).

3.3.2 Durchflusszytometrie

3.3.2.1 Puffer und Lösungen

Facspuffer

1x DPBS	500 ml
EDTA	2 ml
BSA	2,5 g

Verdauungspuffer

Enzym		Menge
DNAse	2000 U/ml	800 µl
Hyaluronidase	600 U/ml	2000 µl
Collagenase 1	5000 U/ml	2000 µl
Collagenase 11	8000 U/ml	2000 µl
Dispase	50 U/ml	2000 µl
Hepes		400 µl
1x PBS		10 800 µl

Antikörper-Mastermix

Zelltyp	Antikörper	Farbe	Verdünnung	Menge
T-Zellen	CD3e	Biotin	1:50	20 µl
B-Zellen	CD21	Biotin	1:50	20 µl
NK-Zellen	CD56	Biotin	1:50	20 µl
Leukozyten	CD45	AF647	1:5	40 µl
Monozyten	CD16	PE	1:50	100 µl

Makrophagen	CD172a	FITC	1:50	20 µl
Residente Makrophagen	CD163	APC-Cy7	1:50	20 µl
Facspuffer				760 µl

Nach Entnahme von einmal ein Zentimeter großen Gewebeproben aus den Arealen rechtes Vorhofohr (RAA), rechter Vorhof (RA), rechter Ventrikel (RV), linkes Vorhofohr (LAA), linker Vorhof (LA), linker Ventrikel (LV), sowie Sinusknoten (SAN), Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) und interventrikuläres Septum (IVS) wurden die Proben in ein 50 ml Falcon-Tube mit ca. 15 ml 1x DPBS gelegt und auf Eis gestellt. Für die weitere Probenverarbeitung wurde eine Petrischale auf Eis gestellt und darauf das Gewebeplatzt platziert. Dieses wurde mit Hilfe von Pinzette und Skalpell so lange zerkleinert, bis eine einheitliche Suspension entstand. Anschließend wurde das zerkleinerte Gewebe wieder zurück in ein Falcon-Tube befördert und mit Hilfe einer Präzisionswaage das Gewicht notiert. Pro Probe wurden je zwei 1-ml-Eppendorf-Tubes beschriftet und bereitgestellt.

Mit Hilfe einer Pasteuerpipette wurden zwei ml des Verdauungspuffers in das Falcon-Tube mit der Gewebeprobe überführt. Mit Hilfe der Pipette wurden Gewebeprobe und Puffer gründlich vermengt und anschließend die Probe in zwei Eppendorf-Tubes mit je 1 ml Gewebe-Puffer-Mix aufgeteilt. Anschließend wurden die Eppendorf-Tubes mit den Proben in einem Heizblock bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach 30 min wurden die Proben für sieben Minuten bei 450 g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde nochmals der gleiche Verdauungspuffer vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und in das Eppendorf-Tube mit dem verbliebenen Gewebe ein ml des Verdauungspuffers hinzugefügt. Nachdem die Probe mit einem Vortexgerät vermengt wurde, wurden sie nochmals im Heizblock inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Probe mit Hilfe von FACS-Puffer durch ein 40 µm großes Zellsieb filtriert. Die Proben wurden für sieben Minuten mit 340 g zentrifugiert und der Überstand wurde abgeschüttet. Anschließend wurde pro Probe ein ml des „Red Blood Cell Lysis“-Puffers hinzugefügt, für zehn Minuten

auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Proben mit einer 1:50 Mischung des FC-Block-Rezeptor-Antikörpers für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Ohne zu waschen wurden 100 µl des Antikörper-Mastermixes hinzugefügt, für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand abgekippt.

Anschließend wurden 10 µl von einem Mix einer 1:100 Streptavidin-Antikörper-Lösung hergestellt und mit den Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben wieder mit Hilfe von FACS-Puffer für sieben Minuten mit 340 g zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Anschließend wurden die Proben mit 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Verhältnis von 1:1000 mit „Live and Dead“-Antikörper vermischt. Bevor die Proben am LSR Fortessa Gerät analysiert wurden, wurden sie nochmal durch ein 50 µm großes Nylonsieb gefiltert. Anschließend wurden pro Tube 20 µl „Counting Beads“ hinzugefügt.

Für die Kompensation, bei der sichergestellt wird, dass die richtige Emission des fluoreszierenden Antikörpers gemessen wird, wird eine Probe benötigt, die nicht mit dem Antikörper-Mastermix gefärbt ist. Dafür wurde ein einmal ein Zentimeter großes Gewebestück aus dem linken Ventrikel verwendet, wie oben beschrieben verdaut und die roten Blutzellen lysiert. Nach waschen des Lysepuffers für die roten Blutzellen war die Verarbeitung der ungefärbten Probe abgeschlossen. Pro verwendete Farbe wurde ein 1 ml großes Eppendorf-Tube benötigt. In jedes Eppendorf-Tube wurde 50 µl FACS-Puffer pipettiert sowie 1 µl des verwendeten Antikörpers hinzugefügt. Pro Gefäß wurde anschließend ein Tropfen von „Compensation Beads“ hinzugefügt. Anschließend wurden die Eppendorf-Tubes kurz zentrifugiert und gevortext, um sicherzugehen, dass sich die „Counting Beads“ mit dem Antikörper-/FACS-Puffer-Gemisch vermengen. Die Mischung wurde anschließend für 20 Minuten inkubiert, danach wurden pro Tube 1000 µl FACS-Puffer hinzugefügt und diese für fünf Minuten auf 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und anschließend die Proben in je 300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

3.3.2.2 Auswertung der Durchflusszytometrie

Im Rahmen der Durchflusszytometrie wurden insgesamt 21 Schweine (WT n=6, DM n=6, DM+DAPA n=9) in neun verschiedenen Regionen (RAA, RA, RV, LAA, LA, LV, SAN, AVN, IVS) untersucht. Um verschiedene Typen von Immunzellen untersuchen zu können, müssen diese zunächst voneinander differenziert werden. Aus einer hämatopoetischen Stammzelle können sich zwei große Vorläuferklassen entwickeln (vgl. Abb. 20) (184):

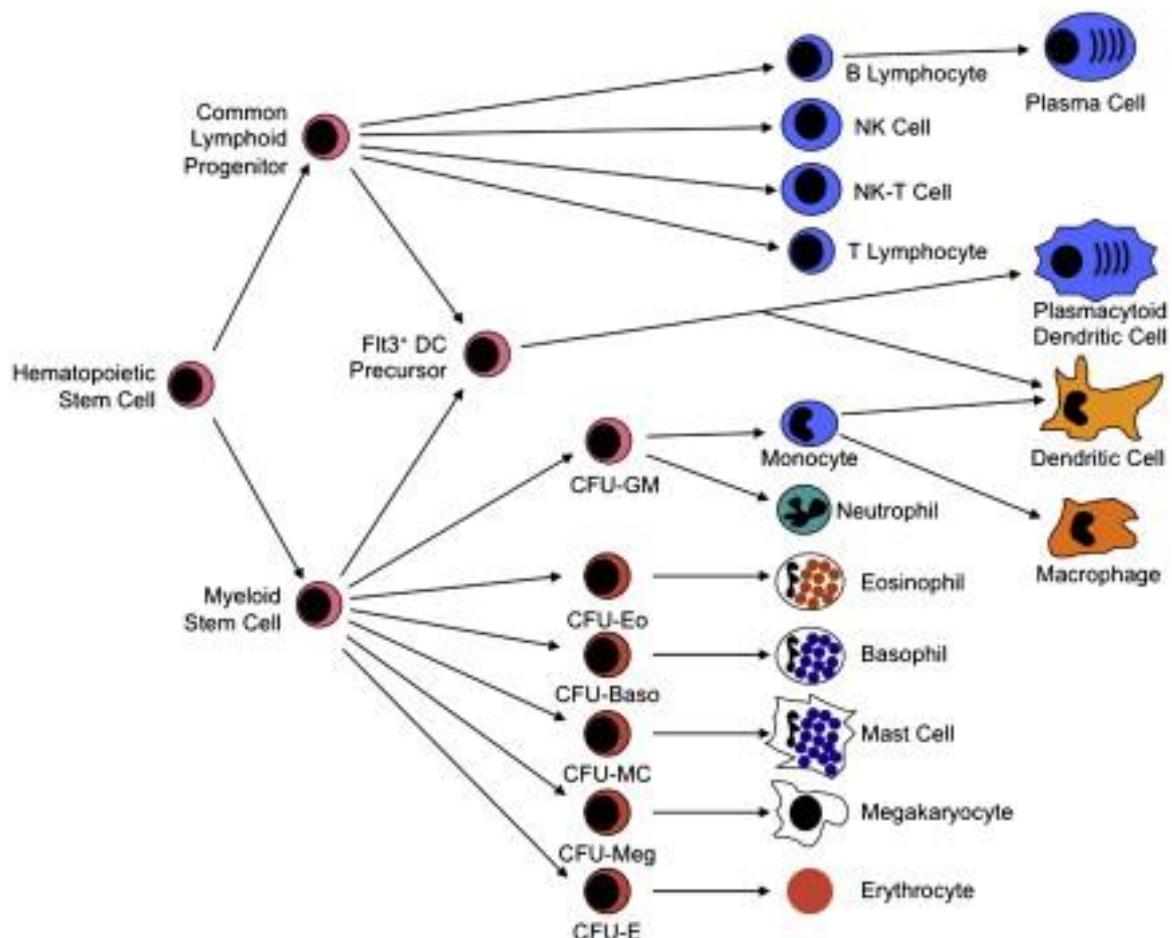


Abbildung 20. Hämatopoese. Eine hämatopoetische Stammzelle kann sich in eine lymphoide sowie myeloide Stammzelle entwickeln. Aus diesen beiden Zelllinien erfolgt die Hämatopoese. Abbildung von Chaplin D. et al. (185).

Aus der lymphoïden Stammzelle entwickeln sich B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (184). Aus der myeloïden Stammzelle entwickeln sich unter anderem Monozyten und Makrophagen (vgl. Abb. 20) (184).

Zur Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie wurde das Programm FlowJo v10 verwendet.

Da B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen nicht von der gleichen Stammzelle abstammen wie die zu untersuchenden Zellen – Leukozyten und Makrophagen - werden diese Zellen aussortiert (vgl. Abb. 21-C) (184). Hierfür wird für B-Zellen der Marker CD21, für T-Zellen der Marker CD3 und für natürliche Killerzellen der Marker CD51 verwendet (186-188). Als Leukozyten werden CD45⁺ Zellen identifiziert (vgl. Abb. 21-D), anschließend wurden innerhalb dieser Zellen CD16⁺ Zellen als Monozyten eingeschlossen (vgl. Abb. 21-E) (189, 190). Innerhalb dieser Population wurde CD172a als allgemeiner Makrophagen-Marker verwendet (vgl. Abb. 21-F) (191). Die CD172a⁺ Zellen wurden im letzten Schritt weiter unterteilt in CD163⁺ residente Makrophagen (vgl. Abb. 21-G-2) und CD163⁻ nicht-residente Makrophagen (vgl. Abb. 21-G-1) (192).

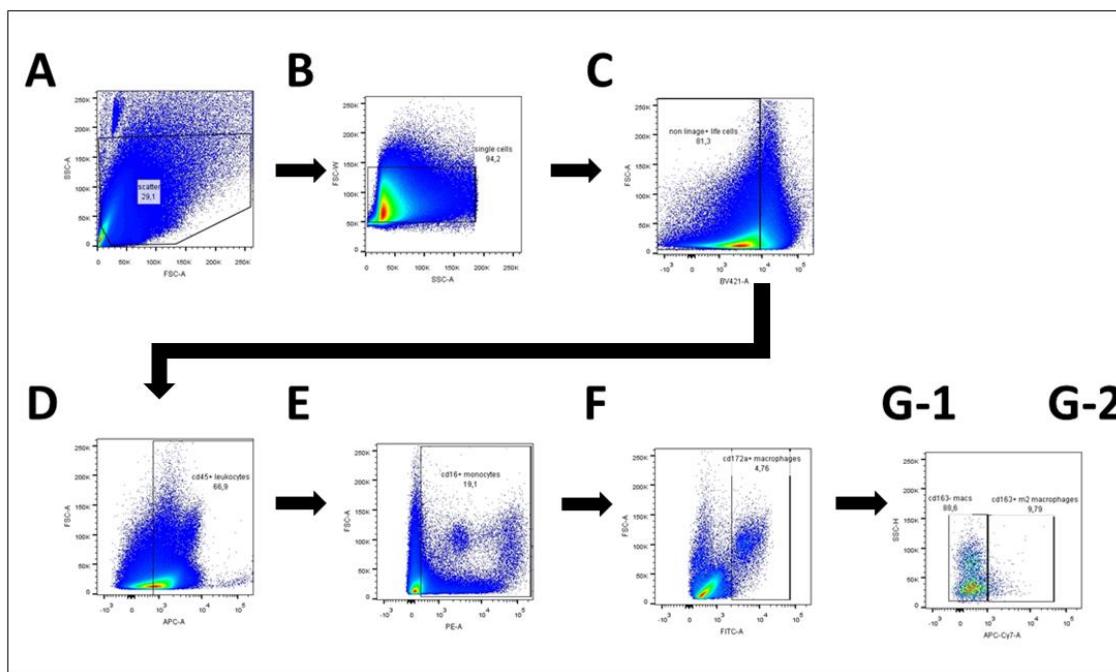


Abbildung 21. Gating Strategie der Durchflusszytometrie. A) Auswahl der gesamten Zellpopulation mittels Forward (FSC-A) und Side Scatter (SSC-A) B) Auswahl von einzelnen Zellen C) CD3e⁺CD21⁺CD51⁺ B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen werden aussortiert, D) Identifizierung von CD45⁺ Leukozyten, E) Identifizierung von CD16⁺ Monozyten, F) Identifizierung von CD172a⁺ Makrophagen, G-1) CD163⁻ nicht-residente Makrophagen und G-2) CD163⁺ residente Makrophagen.

3.3.3 Histologie

3.3.3.1 Puffer

Waschpuffer

10x PBS	100 ml
Tween 20 (< 0,5 %)	1 ml
BSA	5 g
Destilliertes Wasser	900 ml

Permeabilisationspuffer

PBS	50 ml
Triton 0,5 %	0,25 g

Blockpuffer

Ziegen Serum 100 %	0,5 ml
Waschpuffer	4,5 ml

Nach Probenentnahme wurde das Gewebe transmural in Tissue-Tek auf Trockeneis eingebettet. Die Proben wurden mit Hilfe des Cryotoms im 50 µm Abstand getrimmt und dann im zehn µm Abstand geschnitten. Die optimale Klingentemperatur für das Herz wurde auf -25 °C, sowie die Umgebungstemperatur auf -18 °C eingestellt. Das geschnittene Gewebe wurde auf einem Objektträger platziert und dieser wurde bis zu dem Beginn der Färbung auf -20 °C gelagert.

Vor Beginn der Färbung wurden die ausgewählten Objektträger mit den Gewebestücken auf einer Färbebox platziert und jedes Gewebe mit einem Liquid-Blocker-Stift umrandet. Die Umrandung mit dem Liquid-Blocker-Stift wurde nach jedem Waschvorgang kontrolliert und gegebenenfalls nachgetragen. Pro Gewebe wurden 500 µl 4 % Formaldehyd-Lösung auf den Objektträger pipettiert und

dieses für 20 Minuten inkubiert, um das Gewebe auf dem Objektträger für die Färbung zu fixieren. Anschließend wurde die Formaldehyd-Lösung auf einem Papiertuch abgetropft, die Objektträger in Waschbecher gestellt und für fünf Minuten auf einem Wippschüttler gewaschen. Nach fünf Minuten wurde die Waschlösung ausgetauscht und die Objektträger erneut für fünf Minuten gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die Objektträger wieder in die Färbebox gelegt. Anschließend wurde ca. 500 µl des Permiabilisationspuffers auf das Gewebe aufgetragen und die Objektträger erst für zehn Minuten inkubiert, dann wie oben beschrieben zweimal für fünf Minuten gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde 500 µl Blocking-Lösung aufgetragen und für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach dem Blocking-Vorgang ist kein Waschvorgang nötig, die Blocking-Lösung wurde durch Abklopfen des Objektträgers auf einem Papiertuch entfernt. Die verwendeten primären Antikörper wurden jeweils mit Blocking-Lösung im Verhältnis 1:300 (CD163), 1:300 (Connexin 43) sowie 1:400 (Desmin) verdünnt. Pro Gewebe wurde 100 µl Antikörperlösung aufgetragen und für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal für fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die verwendeten sekundären Antikörper wurden mit Waschpuffer im Verhältnis 1:300 (anti-rabbit AF568 für Connexin 43, anti-goat Cy3 für Desmin, anti-mouse AF488 für CD163) verdünnt. Von dem sekundären Antikörper wurden ca. 100 µl Lösung auf das Gewebe geträufelt und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Um die Zellkerne zu färben wurde 50 µl einer 1:1000 Mischung mit DAPI, die mit 1x PBS verdünnt wird auf die Objektträger aufgetragen, für zehn Minuten inkubiert und anschließend mit Waschpuffer dreimal für fünf Minuten gewaschen.

Nach Abschluss des Färbevorgangs wurde ca. fünf bis zehn µl „Mounting-Medium“ auf das Gewebe verteilt, ein Deckglas blasenfrei auf dem Objektträger aufgelegt und anschließend wurden die Objektträger für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie entweder mikroskopiert wurden oder in einer Münchner Mappe bei 4 °C im Dunklen gelagert wurden.

3.3.3.2 Auswertung der CD163-Färbung

Für die CD163-Färbung wurden insgesamt 17 Schweine (WT n=5, DM n=6, DM+DAPA n=6) auf CD163⁺ Makrophagen in sechs Regionen (RAA, RA, RV, LAA, LA, LV) untersucht. Pro Gewebe wurden am Mikroskop fünf Fotos in 40-facher Vergrößerung pro Region zufällig aufgenommen. Mit Hilfe der Z-Stack-Funktion wurde die erweiterte Tiefendarstellung von 20 Ebenen in je fünf mm Abstand aufgenommen und zu einem Bild zusammengefügt, um eine bessere Tiefenschärfe zu erreichen. Der Mittelwert aus allen fünf Fotos pro Region wurde mittels Excel berechnet und verwendet. Die endgültige Anzahl an CD163⁺ Makrophagen pro Bild wurde pro mm³ angegeben.

3.3.3.3 Auswertung der Connexin 43-Färbung

Für die Connexin 43-Färbung wurden insgesamt 15 Schweine untersucht. Pro Kohorte wurden jeweils fünf Tiere (WT, n=5, DM, n=5, DM+DAPA n=5) in sechs verschiedenen Regionen (RAA, RA, RV, LAA, LA und LV) auf die Expression von Connexin 43 untersucht. Die Bilder wurden mittels des Leica-Mikroskops in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Pro Region wurden fünf zufällig ausgewählte Bilder pro Tier analysiert. Mit Fiji Image J erfolgte eine Quantifizierung der Connexin 43-Expression mittels Intensität-Messung. Anschließend wurde mittels Microsoft Excel der Mittelwert sowie die Standardabweichung für jede Region berechnet.

3.3.4 Protein Isolation

3.3.4.1 Puffer und Lösungen

Tris-Lösung

Tris	18,17 g
Destilliertes Wasser	100 ml
→ pH auf 8,8 einstellen	

EDTA-Lösung

EDTA	14,61 g
Destilliertes Wasser	100 ml
→ pH auf 8,0 einstellen	

NaF-Lösung

NaF	4,20 g
Destilliertes Wasser	100 ml

20 % SDS-Lösung

SDS	20 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Kraniaspuffer

Tris-Lösung pH 8,8	6 ml
EDTA-Lösung pH 8,0	3 ml
NaF-Lösung	9 ml
20 % SDS-Lösung	45 ml

Glycerol	30 ml
Destilliertes Wasser	207 ml
→ pH auf 8,86 einstellen	

Kranias-Lösung

Kranias-Puffer	10 ml
Complete mini	1 Tablette pro 10 ml
Phospho stop	1 Tablette pro 10 ml

Für die Proteinisolation wurden die Gewebeproben wie oben beschrieben aus dem Herzen entnommen und zuerst auf Trockeneis gefroren und anschließend vor der Benutzung auf -80 °C gekühlt gelagert.

Der erste Schritt bestand aus der Gewebezerkleinerung. Hierfür wurde das Gewebe in den Eppendorf-Tubes auf Trockeneis gelagert, um eine ausreichende Härte des Gewebes zu gewährleisten. Die Probe inklusive Eppendorf-Tubes wurde in Flüssigstickstoff getunkt, anschließend wurde das tiefgefrorene Gewebe entnommen, in Alufolie gewickelt und mit einem Hammer zu Pulver zerkleinert. Gegebenenfalls wurde das Gewebe zwischendurch nochmals in Flüssigstickstoff gegeben, um die Zerkleinerung zu erleichtern. Das zerkleinerte Gewebe wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube mit 1 ml Kranias-Lösung gegeben.

Das Gefäß mit dem Gewebe und der Kranias-Lösung wurde für ca. 15 Sekunden, aber mindestens so lange, bis eine homogene Suspension entsteht, mit Hilfe eines Ultraschallgerätes weiter zerkleinert. Bis jede Probe zerkleinert ist, wurden die restlichen Proben auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C auf 900 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß pipettiert und stellt das isolierte Protein dar. Der Schaum und das Zellpellet wurden verworfen.

Alle folgenden Schritte dienen der Feststellung der Proteinkonzentration. Zuerst wurden die Proteine im Verhältnis 1:20 verdünnt, indem drei µl der Probe zu 60 µl nukleasefreiem Wasser in ein neues 1,5 ml großes Eppendorf-Tube pipettiert wurden.

BSA-Standard-Verdünnungsreihe

Standard	nukleasefreies Wasser		Finale BSA-Konzentration
A	0 µl	300 µl des Standard-Albumins	2000
B	125 µl	375 µl des Standard-Albumins	1500
C	325 µl	325 µl des Standard-Albumins	1000
D	175 µl	175 µl von Tube B	750
E	325 µl	325 µl von Tube C	500
F	325 µl	325 µl von Tube E	250
G	325 µl	325 µl von Tube F	125
H	400 µl	100 µl von Tube G	25
I	400 µl	0 µl	0

Für das „Working-Reagenz“ wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet und Reagenz A und B im Verhältnis 50 ml (A) : 1 ml (B) hergestellt. Pro Probe wurden 0,5 ml „Working-Reagenz“ benötigt. Anschließend wurden für jede Standardprobe und für jedes isolierte Protein zwei Eppendorf-Tubes beschriftet. In jedes Eppendorf-Tube wurden 500 µl „Working-Reagenz“ pipettiert und die Duplikate des Standards je 25 µl der jeweiligen Standardproben und in die Duplikate der isolierten Proteine je 25 µl des jeweiligen verdünnten Proteins aus den jeweiligen Herzregionen hinzugefügt. Diese Proben wurden für 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit konnten zuerst die Standardproben und anschließend die Proteinproben mit dem BCA-Programm gemessen und so die Proteinkonzentration festgestellt werden.

3.3.5 Western Blot

3.3.5.1 Lösungen und Gele

10x TBS

Tris-HCl	24 g
Tris-Base	5,6 g
NaCl	88 g
Destilliertes Wasser	900 ml

TBST (Tris buffered saline)

TBS 10x	100 ml
Destilliertes Wasser	900 ml
Tween 20	1 ml

10x Laufpuffer

Mit Hilfe von destilliertem Wasser wurde der 10x Laufpuffer vor Verwendung auf 1x verdünnt.

Tris-Base	30 g
Glycin	114 g
SDS	10 g
Destilliertes Wasser	Auffüllen bis 1000 ml
➔ pH auf 8,3 einstellen	

1,5 M Tris-HCL

Tris-Base	18,17 g
Destilliertes Wasser	70 ml
➔ pH auf 8,8 einstellen	

0,5 M Tris-HCL

Tris-Base	6,07 g
Destilliertes Wasser	70 ml
→ pH auf 6,8 einstellen	

Blot-Puffer

Tris-Base	3,03 g
Glycin	14,40 g
Methanol 20 %	200 ml
Destilliertes Wasser	Bis 1000 ml auffüllen
→ pH auf 8,3 einstellen	

5 % Milch-Lösung

TBST	100 ml
Milchpulver	5 g

Im Rahmen des Experiments liefen die Proteine durch Acrylamidgele. Je nach Größe des untersuchten Proteins wurde die Acrylamidkonzentration individuell angepasst:

Proteingröße	Acrylamidkonzentration
4-40 kDa	20 %
12-45 kDa	15 %
10-70 kDa	12.5 %
15-100 kDa	10 %
25-300 kDa	8 %

Für zwei Gele wurden folgende Reagenzien benötigt:

Trenngel

Material	Menge für 6 %	Menge für 8 %	Menge für 10 %	Menge für 12 %	Menge für 15 %	Menge für 18 %
Destilliertes Wasser	5,3 ml	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml	2,3 ml	1,3 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Rotiphorese Gel	2,0 ml	2,7 ml	4,0 ml	4,0 ml	5,0 ml	6,0 ml
Temed	0,008 ml	0,008 ml	0,008 ml	0,008 ml	0,008 ml	0,008 ml

Obergel

Material	Menge
Destilliertes Wasser	2,8 ml
0,5 M Tris-HCl	1,25 ml
10 % SDS	0,05 ml
10 % APS	0,05 ml
Rotiphorese Gel (Acrylamid)	0,85 ml
Temed	0,005 ml

Für den Western Blot wurde eine dünne und eine dicke Glasplatte benötigt, die in eine Halterung des „Trans Blot Cell Containers“ befestigt wurde. Das Trenngel wurde wie oben beschrieben hergestellt und mittels einer Pipette zwischen die

Glasplatten gefüllt. Nach einer Wartezeit von ca. 15 Minuten war das Trenngel ausgehärtet. Das Obergel wurde nun zusammen mit dem Probeneinsatz hinzugefügt. Nach einer weiteren Wartezeit von ca. 15 Minuten war das Obergel ausgehärtet. Aufgetretene Blasen wurden sowohl bei dem Trenngel als auch bei dem Obergel durch eine Schicht Isopropanol entfernt, welches dreimal mit Wasser abgewaschen wurde. In den Elektrophorese-Kasten wurde anschließend ein Laufpuffer geschüttet, der die Gele komplett bedeckt. 10 µl Protein wurden nun zusammen mit 3 µl „NuPage Sample-Puffer“ vermischt und für fünf Minuten bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die gewünschte Menge Protein-NuPage-Mischung in das Gel pipettiert. Nun wurde der Elektrophorator an den Strom angeschlossen, vorerst für ca. 80 Volt für 15 Minuten, aber mindestens so lange bis alle Proteine durch das Obergel gelaufen waren. Abschließend konnte dann der Strom auf 120 Volt für ca. 45 Minuten angeschlossen werden, die Laufzeit dauerte mindestens so lange, bis alle Proteine komplett das Trenngel durchlaufen hatten.

Als nächster Schritt erfolgte das Blotting. Hierfür wurde eine flache Wanne benötigt, in die ein Liter Blotting-Lösung gegossen wurde. Danach wurde links und rechts auf die Gelholderkassette ein Schwamm, darauf ein großer Blottingfilter und ein kleiner Blottingfilter platziert. In die Mitte wurde schließlich das Gel gelegt, dessen Proteine sich auf die nun platzierte Membran, die direkt auf das Gel gelegt wird, übertragen sollten. Mit Hilfe einer Rolle, die über die Membran geführt wurde, kann sanft Druck ausgeübt werden, sodass Gel und Membran in engen Kontakt kommen. Anschließend wurde die Gelholderkassette wieder zugeklappt und zurück in den Elektrophoresekasten gesetzt. Der Strom wurde für ca. 75 Minuten mit 100 Volt angeschlossen, während der Elektrophoresekasten auf Eis stand.

Der Erfolg des Blotting-Prozesses wurde mittels Ponceau-Färbung bewertet. Hierzu wurde die Membran zuerst in eine Box überführt, und dann mit TBST, das die Membran komplett bedeckt, für fünf Minuten auf einem Wippschüttler gewaschen. Nach fünf Minuten wurde das alte TBST durch neues ausgetauscht, dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach Ende des Waschvorgangs wurde das restliche TBST abgeschüttet und Ponceau-Lösung auf die Membran aufgetragen. Die Ponceau-Lösung wurde für zehn Minuten inkubiert.

Anschließend wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen. Waren nun pinke Banden auf der weißen Membran sichtbar, konnte von einem erfolgreichen Blotting-Prozess ausgegangen werden.

Anschließend erfolgte das Blocken der Membran, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Hierzu wurde zuerst eine Blocking-Lösung, bestehend aus 500 µl Roti-Lösung mit 4,5 ml Wasser hergestellt. Die Membran wurde in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Die Blocking-Lösung wurde nun in das Falcon-Tube mit der Membran überführt und hier anschließend unter Drehung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Blocking-Lösung abgeschüttet.

Der primäre Antikörper wurde mit Roti-Block im Verhältnis 1:250 (Connexin 40), 1:500 (Connexin 43), 1:500 (Connexin 37), 1:500 (Connexin 45) verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen.

Der sekundäre Antikörper wurde zusammen mit 5 % Milch verdünnt. Für Connexin 40, Connexin 45 und Connexin 43 wurde der sekundäre Antikörper rat anti mouse, der HRP konjugiert ist, im Verhältnis 1:500 verdünnt, für Connexin 37 wurde der sekundäre Antikörper goat anti rabbit, HRP konjugiert, im Verhältnis 1:5000 verdünnt. Der verdünnte Antikörper wurde in das Falcon-Tube mit der Membran befüllt, wobei pro Membran ca. fünf ml Flüssigkeit benötigt werden. Der sekundäre Antikörper wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen.

Anschließend konnte die Membran mit Hilfe von ECL visualisiert werden. Für die ECL-Lösung wurde je ein ml der A- und B-Lösung vermischt. ECL arbeitet nach dem Chemilumineszenz-Prinzip (193). HRP setzt Luminol um und emittiert dabei Licht, welches auf Film festgehalten werden kann. Die Membran wurde dann anschließend für eine Minute mit der ECL-Lösung inkubiert. Die ECL-Lösung wurde abgekippt, die Membran vorsichtig mit der proteinbeladenen Seite nach oben auf den flachen Einsatz des Western-Blot-Bildprozessors gelegt, mit Klarsichtfolie bedeckt und vorsichtig eventuell entstandene Luftblasen durch sanften Druck auf Membran und Klarsichtfolie gelöst. Alle primären Antikörper wurden für insgesamt fünf Minuten belichtet.

Anschließend wurde zur Kontrolle das Housekeeping-Protein GAPDH auf der Membran dargestellt. Hierfür wurde die Membran nach der Visualisierung zuerst dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen. Die Membran wurde anschließend mit Stripping-Puffer für eine Stunde inkubiert und danach mit TBST dreimal für fünf Minuten gewaschen. GAPDH wurde zusammen mit Roti-Block im Verhältnis 1:30.000 verdünnt (4,5 ml 10x Roti, 40,5 ml ddH₂O, 1,5 µl GAPDH) und für mindestens drei Stunden auf Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran erneut dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper goat anti-rabbit HRP im Verhältnis 1:5000 mit 5 % Milch verdünnt und für 90 Minuten inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen und konnte danach mit Hilfe von ECL-Lösung visualisiert werden. Für GAPDH wurde eine Belichtungszeit von einer Minute verwendet.

3.3.5.2 Auswertung Western Blot

Für die Westernblots wurden insgesamt 12 Schweine (WT n=4, DM n=4, DM+DAPA n=4) in neun Regionen (RAA, RA, RV, LAA, LA, LV, SAN, AVN, IVS) untersucht. Die semiquantitative Auswertung der Western Blots erfolgte mittels der Software Fiji/Image J. Hierbei wurde die Intensität der Banden der jeweiligen Connexine und des Housekeeping-Proteins GAPDH gemessen und die Connexin-Proteinexpression (A.U.) angegeben.

3.3.6 Statistik

Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert ± Standardfehler, welche mittels Microsoft Office Suite 2016 berechnet wurden. Alle Grafiken wurden mit Hilfe von GraphPad Prism, Version 9.2.0.322, erstellt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von weniger als 0,05 gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes mellitus

4.1.1 In vivo

4.1.1.1 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern

Um zu untersuchen, ob die diabetischen Tiere unter mehr Vorhofflimmern leiden als die Wildtypen, wurden die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen verglichen.

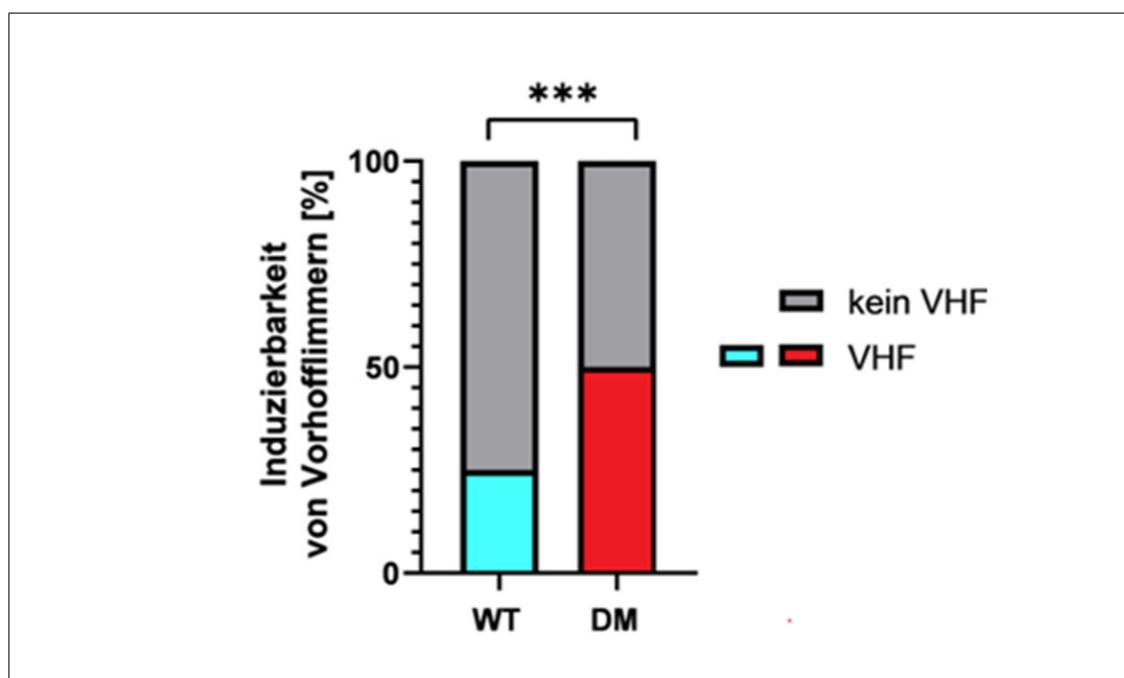


Abbildung 22. Induzierbarkeit von Vorhofflimmern [%] im Vergleich zwischen Wildtypen (WT, n=4) und Diabetikern (DM, n=6). *p<0,0005, Fishers Exact-Test.**

Untersucht wurde der Anteil an Stimulationen, der bei den Tieren der verschiedenen Kohorten eine Vorhofflimmer-Episode auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass die diabetischen Tiere im Vergleich zu den Wildtypen eine signifikant höhere Induzierbarkeit von Vorhofflimmern zeigen ($p= 0,0004$, vgl. Abb. 22).

4.1.1.2 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Dauer der Vorhofflimmer-Episode

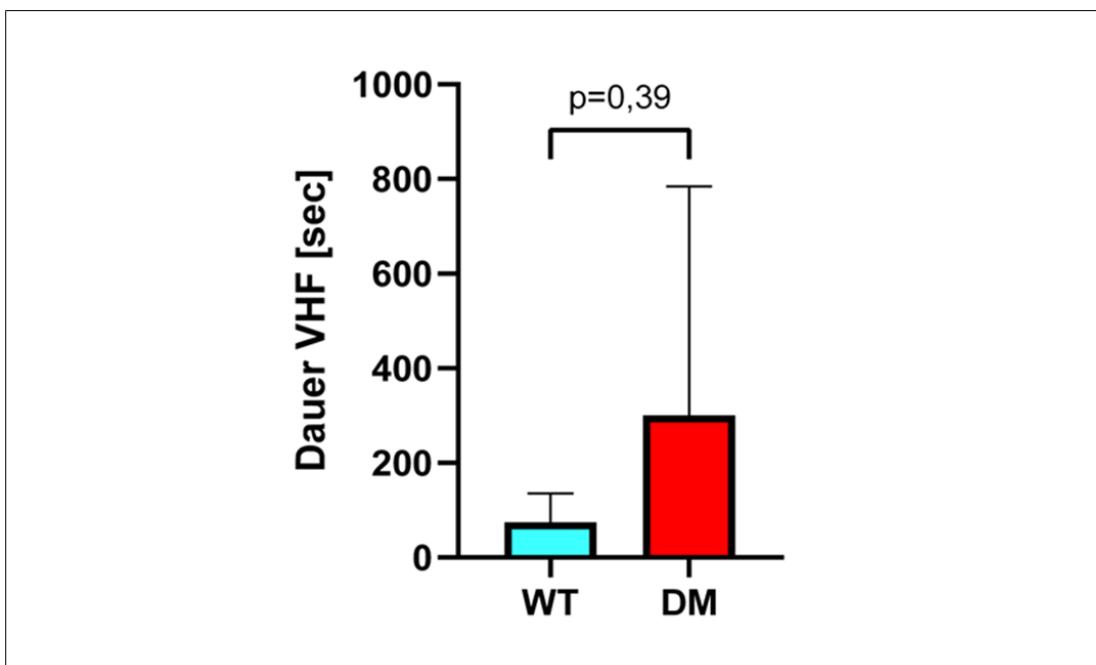


Abbildung 23. Dauer der Vorhofflimmerepisoden in Sekunden bei Wildtypen (WT, n=4) und Diabetikern (DM, n=6). Ungepaarter t-Test.

Die Dauer aller Vorhofflimmer-Episoden nach Stimulation wurden zusammenaddiert und zwischen den verschiedenen Kohorten verglichen (vgl. Abb. 23).

Im Vergleich zwischen Wildtypen und Diabetikern konnte kein signifikanter Unterschied in der Dauer der Vorhofflimmerepisode gezeigt werden (vgl. Abb. 23).

4.1.2 In vitro

4.1.2.1 Immunologisches Remodeling bei Diabetes mellitus

4.1.2.1.1 Durchflusszytometrie

4.1.2.1.1.1 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Anzahl von CD45⁺ Leukozyten

CD3e⁻CD21⁻CD52⁻CD45⁺ Zellen wurden als Leukozyten identifiziert. Zunächst konnte in jeder untersuchten kardialen Region CD45⁺ Leukozyten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 24).

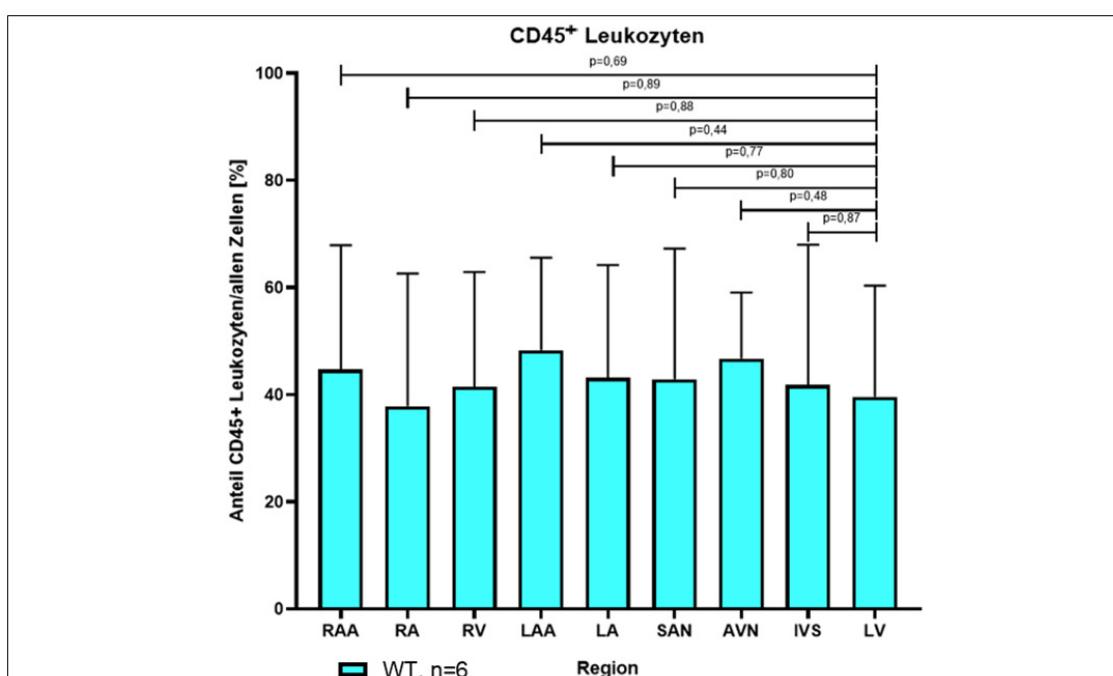


Abbildung 24. . Anteil von CD45⁺ Leukozyten in verschiedenen Regionen bei Wildtyp-Schweinen. Ungepaarter-test.

Es wurde untersucht, ob eine unterschiedliche lokale Verteilung an CD45⁺ Leukozyten im Herzen vorliegt. Hierfür wurden die übrigen Regionen mit der Kontrollregion LV verglichen. Es zeigte sich eine homogene Verteilung von CD45⁺ Leukozyten bei den Wildtyp-Tieren (vgl. Abb. 24).

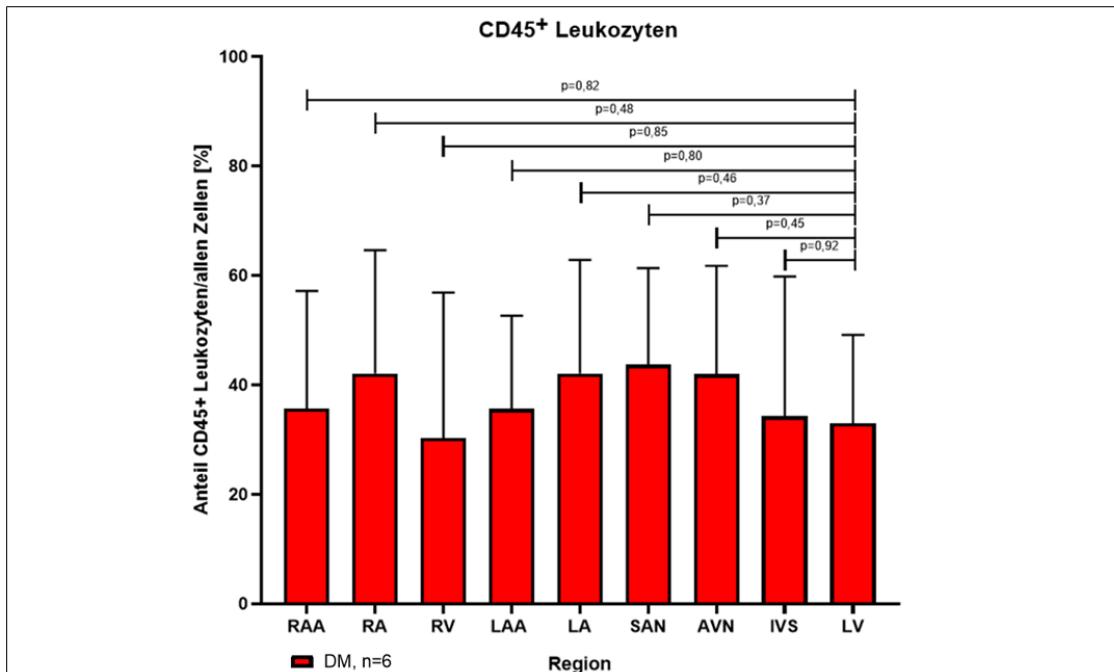


Abbildung 25. Anteil von CD45⁺ Leukozyten in verschiedenen Regionen bei diabetischen Schweinen. Ungepaarter-test.

Auch bei den diabetischen Tieren konnte in jeder untersuchten Region CD45⁺ Leukozyten nachgewiesen werden. Es zeigte sich hierbei eine nahezu homogene Verteilung von CD45⁺ Leukozyten in allen untersuchten Regionen (*vgl. Abb. 25*).

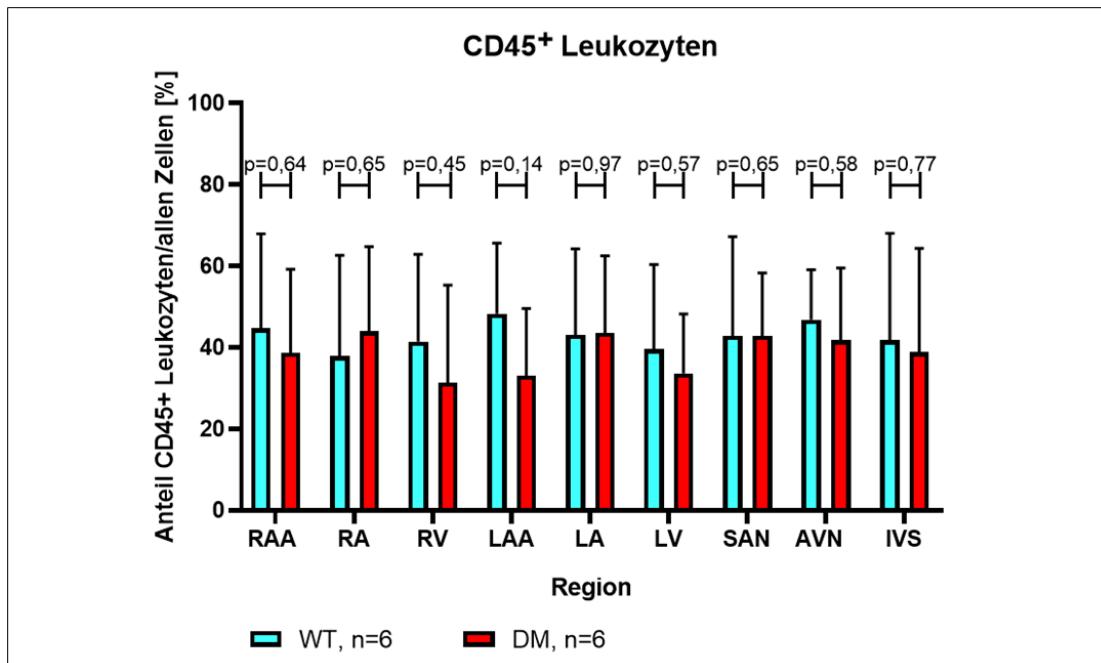


Abbildung 26. Anteil CD45⁺ Leukozyten an allen Zellen [%] in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen. Ungepaarter t-test.

CD45⁺ Leukozyten sind in allen Regionen sowohl bei den Wildtypen als auch bei den diabetischen Schweinen identifizierbar (*vgl. Abb. 26*). Die CD45⁺ Leukozyten sind über die untersuchten Regionen homogen im Herzen verteilt.

Im Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen gibt es keinen Unterschied in der Anzahl der CD45⁺ Leukozyten in den untersuchten Regionen.

4.1.2.1.1.2 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Anzahl von CD172a⁺ Makrophagen

CD3e⁻CD21⁻CD52⁻CD45⁺CD16⁺CD172a⁺ Zellen werden als Makrophagen identifiziert. Zunächst konnte in allen untersuchten Regionen CD172⁺ Makrophagen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 27).

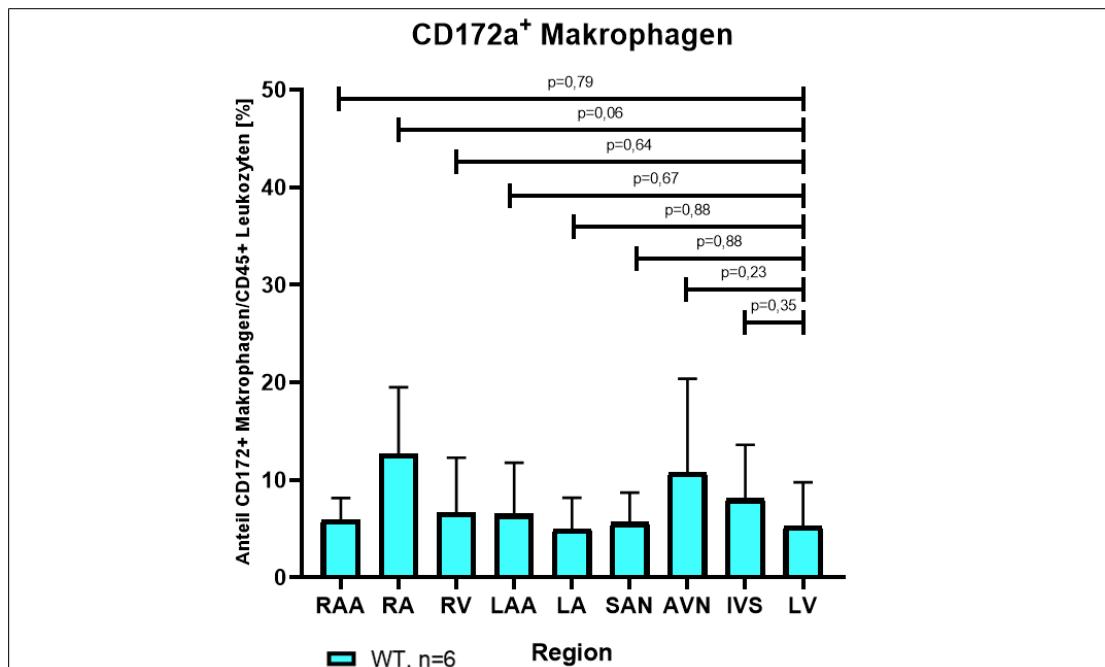


Abbildung 27. Anteil von CD172a⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen bei Wildtyp-Schweinen. Ungepaarter t-test.

Im Vergleich zwischen rechtes Atrium und linken Ventrikel konnte ein Trend zu einer vermehrten Anreicherung von CD172a⁺ Makrophagen im rechten Atrium gezeigt werden, der jedoch kein signifikantes Niveau erreicht (RA 14,1±13,7 CD172a⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; LV 8,2±6,0 CD172a⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; p=0,06; vgl. Abb. 27). In den übrigen Regionen zeigt sich eine annähernd homogene Verteilung an CD172a⁺ Makrophagen.

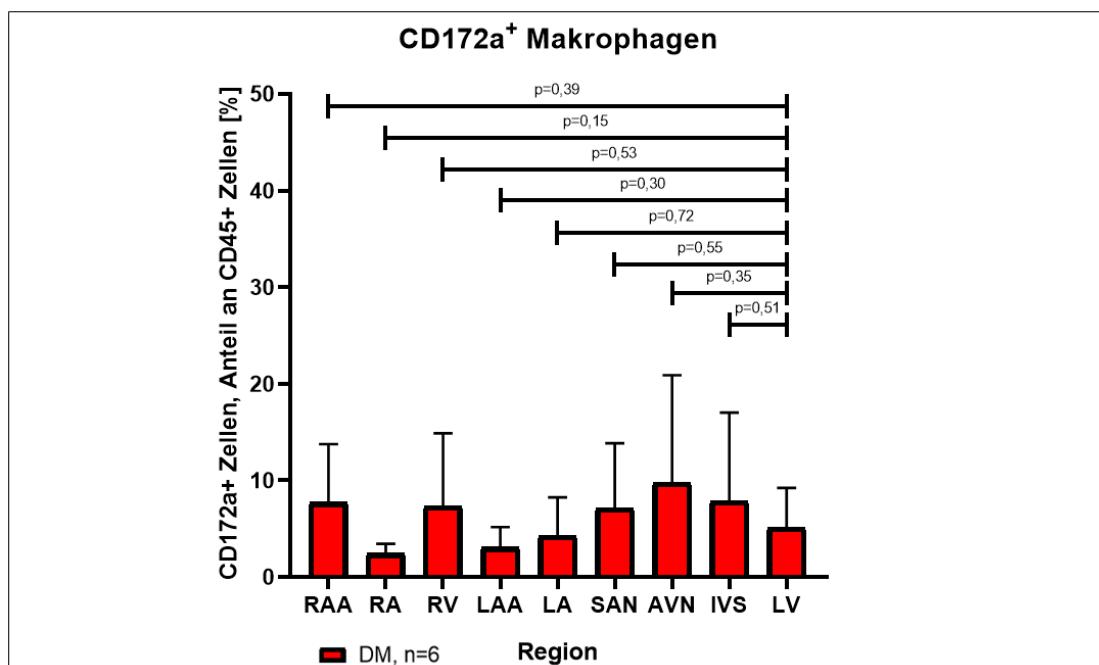


Abbildung 28. Anteil von CD172a⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen beim diabetischen Schwein. Ungepaarter t-test.

Beim diabetischen Schwein zeigte sich in allen Regionen eine nahezu homogene Verteilung von CD172a⁺ Makrophagen (vgl. Abb. 28).

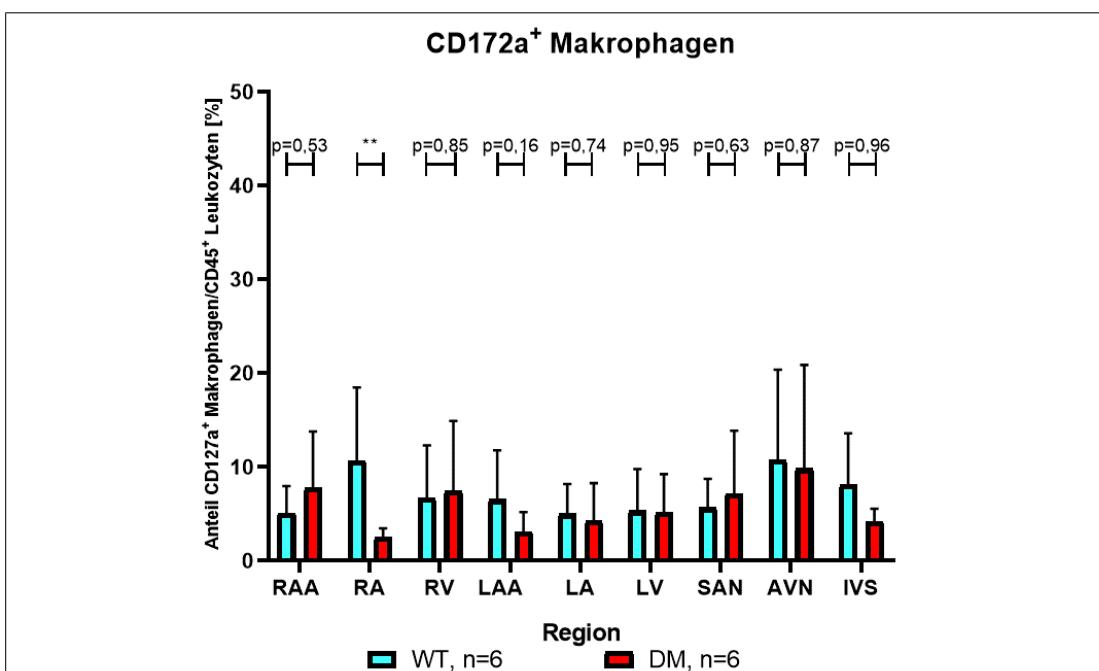


Abbildung 29. Anteil von CD172a⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen. **p<0,005, ungepaarter t-test.

Wildtyp-Schweine und Schweine mit Diabetes wurden im Hinblick auf die Anzahl an CD172a⁺ Makrophagen in verschiedenen Regionen untersucht (*vgl. Abb. 29*). Hier konnte in jeder der untersuchten Regionen bei beiden Kohorten CD172a⁺ Makrophagen nachgewiesen werden (*vgl. Abb. 29*).

Es zeigte sich im Vergleich der beiden Kohorten eine ähnliche Anzahl an CD172a⁺ Makrophagen in fast allen Regionen (*vgl. Abb. 29*).

Nur im rechten Vorhof (WT $10,6 \pm 7,1$ CD172a⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; DM $2,4 \pm 0,8$ CD172a⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; $p=0,0056$; *vgl. Abb. 29*) zeigte sich eine signifikant niedrigere Anzahl an CD172a⁺ Makrophagen bei den diabetischen Schweinen im Vergleich zu den Wildtypen.

4.1.2.1.1.3 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Anzahl von CD163⁺ residente Makrophagen

Als residente Makrophagen wurden in der Durchflusszytometrie CD4-CD3- CD45⁺CD16⁺CD172a⁺CD163⁺ Zellen identifiziert.

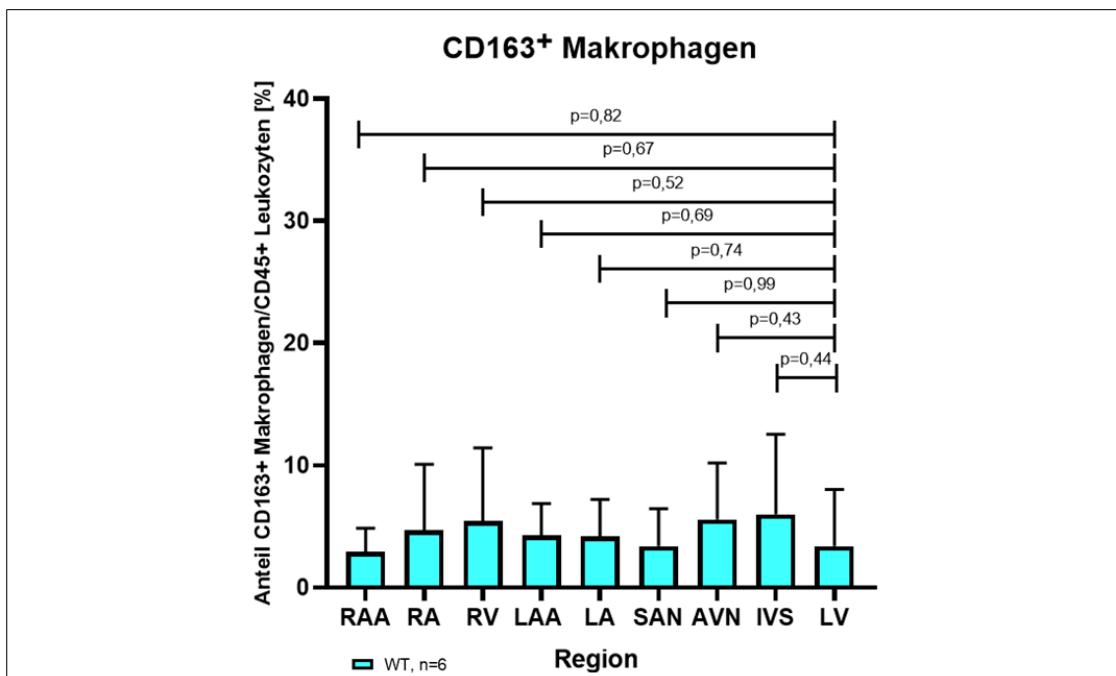


Abbildung 30. Anteil von CD163⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen bei Wildtyp-Schweinen. Ungepaarter t-test.

CD163⁺ Makrophagen konnten in allen untersuchten Regionen beim Wildtyp-Schwein nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine homogene Verteilung der Zellen über alle untersuchten Regionen (vgl. Abb. 30).

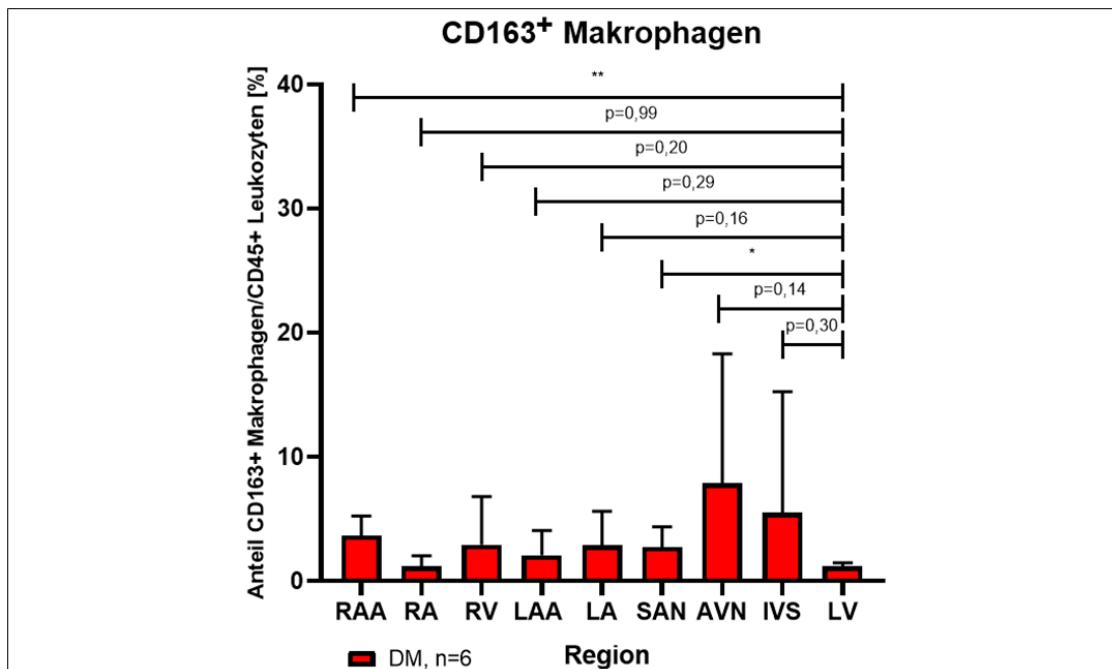


Abbildung 31. Anteil von CD163⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen bei diabetischen Schweinen. *p<0,05, **p<0,005, ungepaarter t-test.

Bei den diabetischen Schweinen zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollregion des linken Ventrikels eine signifikante Anreicherung von CD163⁺ Makrophagen im rechten Vorhofohr (RAA $3,6 \pm 1,4$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; LV $1,1 \pm 0,2$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; p=0,003; vgl. Abb. 31) sowie Sinusknoten (SAN $32,7 \pm 1,5$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; LV $1,1 \pm 0,2$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; p=0,04; vgl. Abb. 31). In den übrigen Regionen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

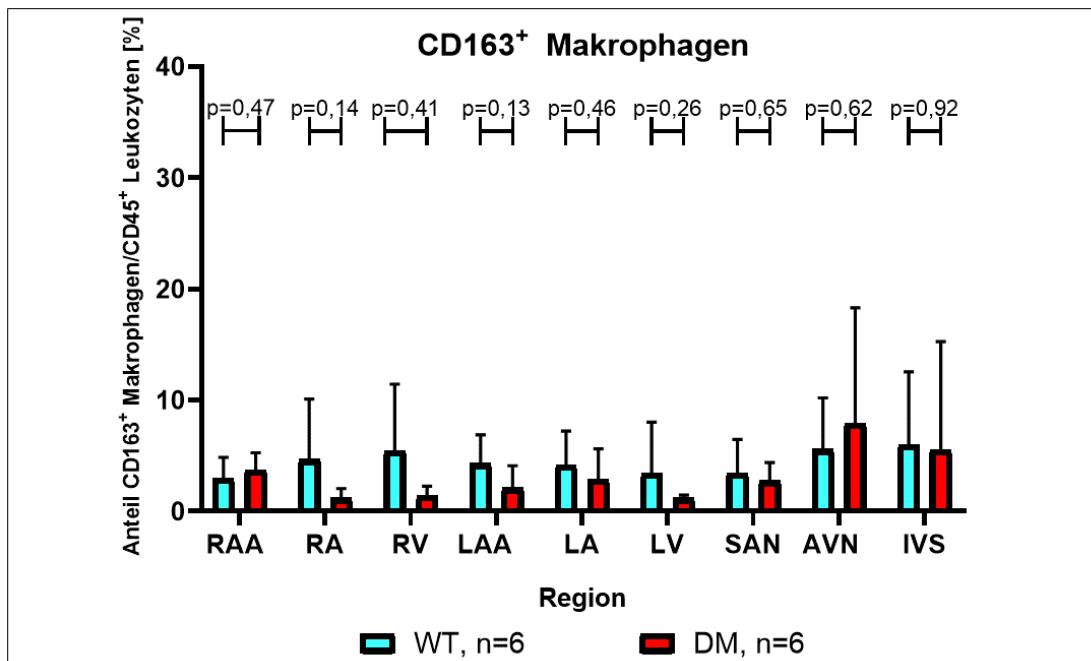


Abbildung 32. Anteil von CD163⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen. Ungepaarter t-test.

Wildtyp-Schweine und diabetische Schweine wurden im Hinblick auf ihre Anzahl an CD163⁺ Makrophagen in verschiedenen Regionen miteinander verglichen (vgl. Abb. 32). In keiner der untersuchten Regionen war ein signifikanter Unterschied erkennbar (vgl. Abb. 32).

4.1.2.1.1.4 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Anzahl von CD163-nicht-residente Makrophagen

Nicht-residente Makrophagen wurden per Durchflusszytometrie als CD4⁻CD3⁻CD45⁺CD16⁺CD172a⁺CD163⁻ identifiziert. Hier zeigte sich beim Wildtyp-Schwein eine homogene Verteilung der CD163⁻ Makrophagen über alle untersuchten Regionen (vgl. Abb. 33).

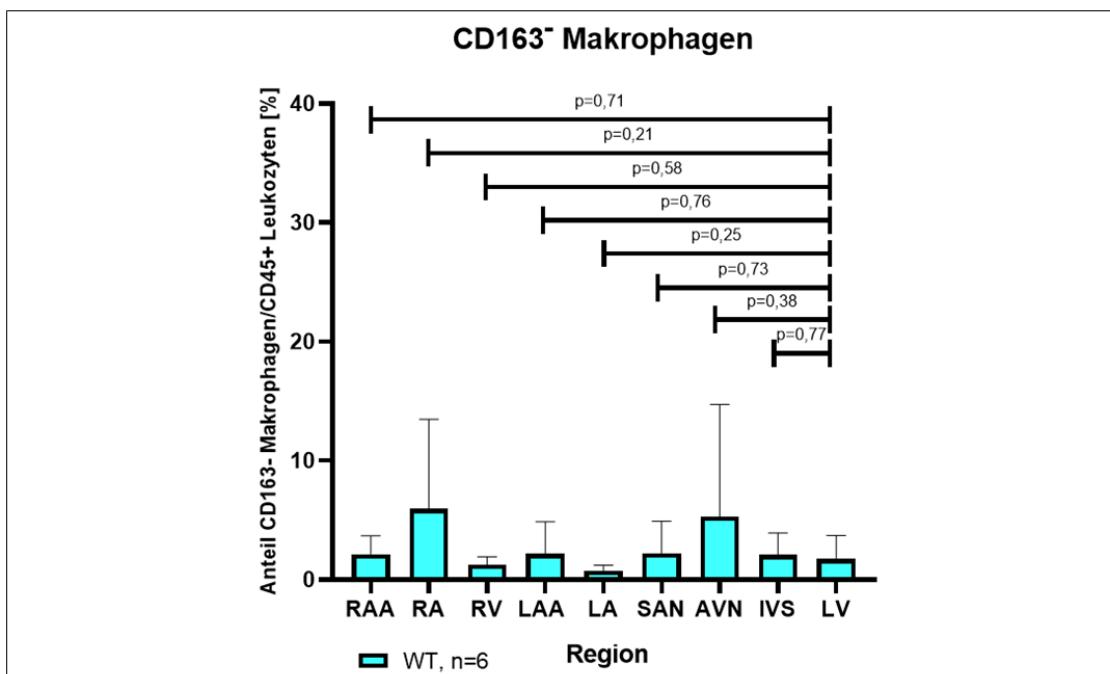


Abbildung 33. Anteil von CD163⁻ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen beim Wildtyp-Schwein. Ungepaarter t-test.

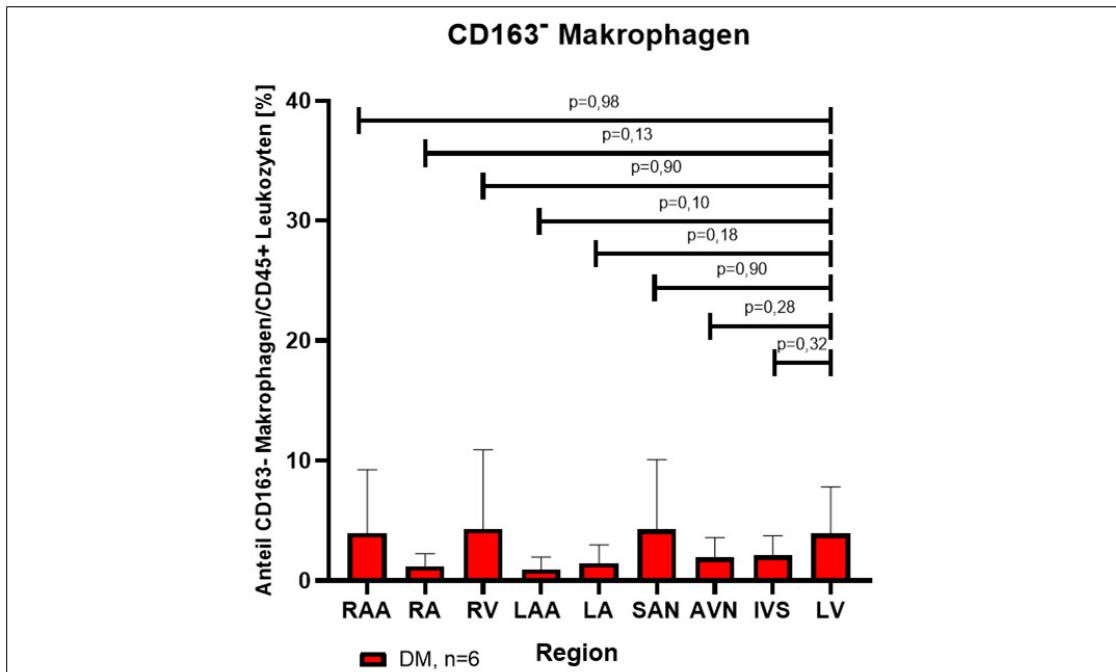


Abbildung 34. Anteil von CD163⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen beim diabetischen Schwein. Ungepaarter t-test.

Bei den diabetischen Tieren konnte in allen untersuchten Regionen CD163⁺ Makrophagen nachgewiesen werden, die eine annähernd homogene Verteilung aufweisen (vgl. Abb. 34).

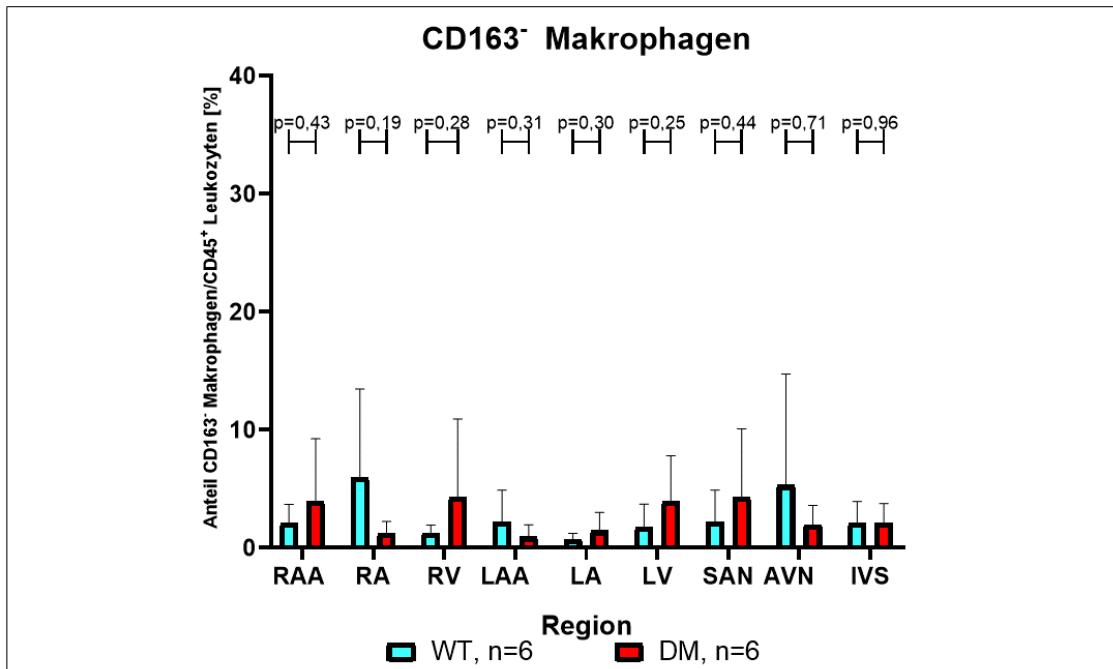


Abbildung 35. Anteil von CD163⁻ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen. Ungepaarter t-test.

Die Anzahl an CD163⁻ Makrophagen zeigte im Vergleich zwischen Wildtypen und Diabetikern innerhalb der Regionen keinen eindeutigen Unterschied (vgl. Abb. 35).

4.1.2.1.2 Immunfluoreszenzfärbungen für CD163⁺ Makrophagen

4.1.2.1.2.1 Nachweis von Makrophagen im porcinen Herzen

Mithilfe der CD163 Färbung konnte in allen untersuchten sechs Regionen die Präsenz von CD163⁺ Makrophagen nachgewiesen werden (*vgl. Abb. 36*).

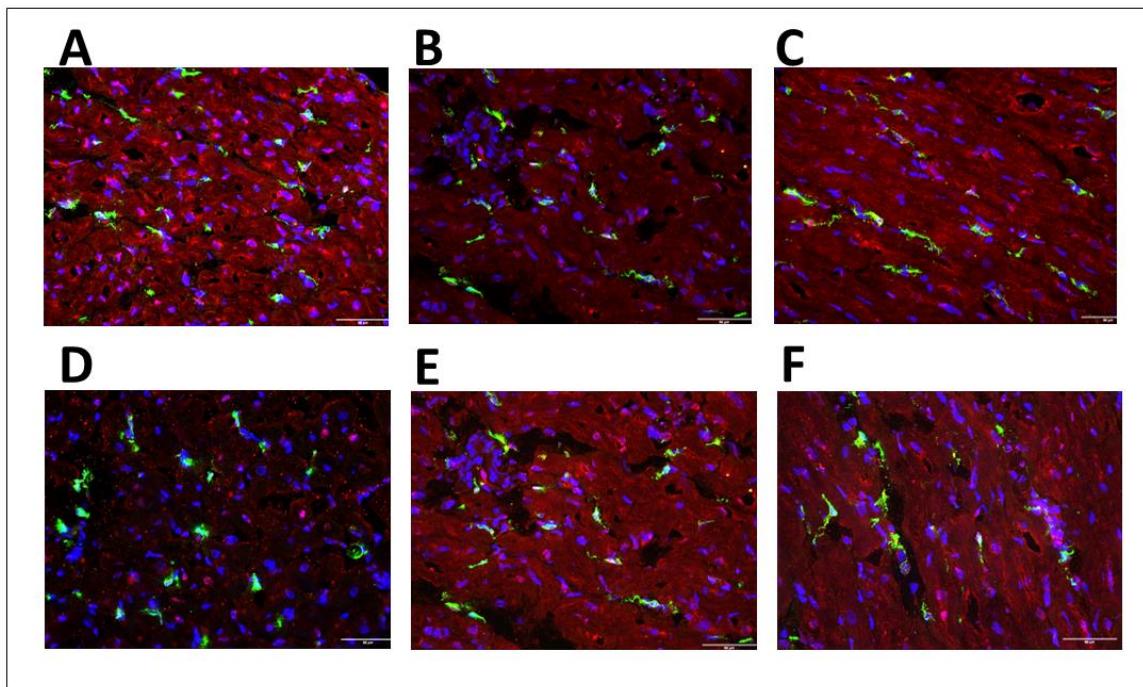


Abbildung 36. Immunfluoreszenzfärbung für CD163⁺ Makrophagen am Beispiel eines Wildtyp-Schweins. (A) Ausschnitt aus dem rechten Vorhofohr, B), dem rechten Vorhof, C) dem rechten Ventrikel, D) dem linken Vorhofohr, E) dem linken Vorhof, F) und dem linken Ventrikel. Immunfluoreszenzfärbung, in rot: Desmin (Herzmuskel); blau: DAPI (Zellkern), grün: CD163⁺ Makrophagen.

4.1.2.1.2.2 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Verteilung von CD163⁺ Makrophagen im porcinen Herzen

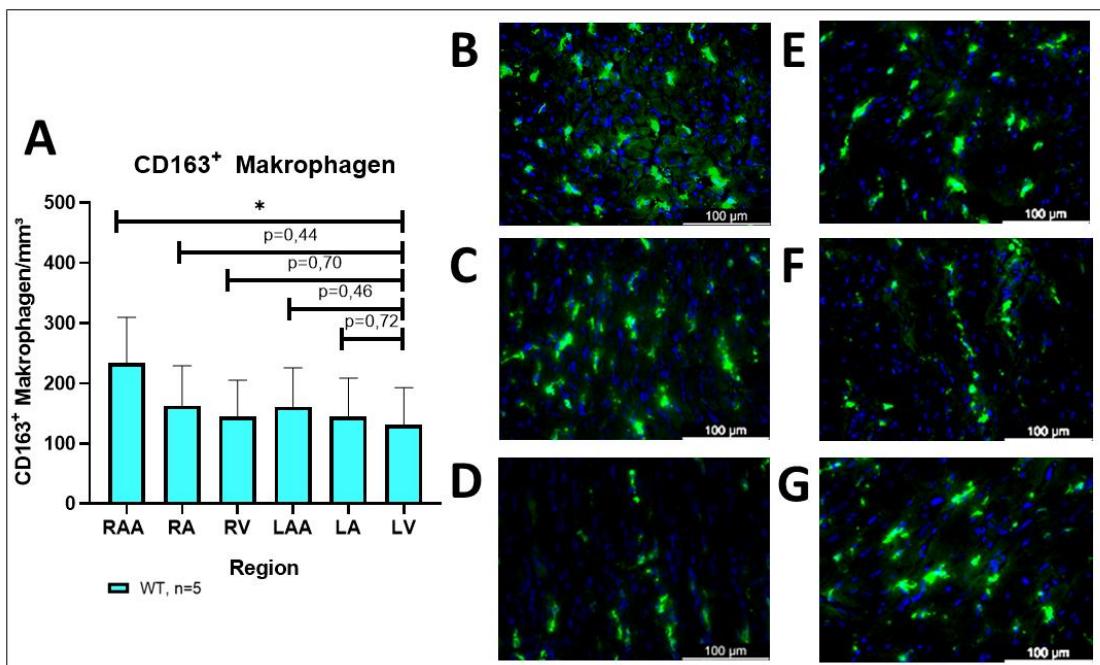


Abbildung 37. A) Anzahl an CD163⁺ Makrophagen/mm³ in den verschiedenen Regionen bei den Wildtyp-Schweinen. *p<0,05, ungepaarter t-test.

Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Färbung aus B) RAA, C) RA, D) RV, E) LAA, F) LA, G) LV. Grün: CD163⁺ Makrophagen, blau: DAPI (Zellkerne).

Bei den Wildtyp-Schweinen konnten in allen sechs Regionen Makrophagen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 37-B bis 37-G).

Im Vergleich zum linken Ventrikel sind im rechten Vorhofohr signifikant mehr Makrophagen vorhanden (RAA 233,3 ± 68,2 Makrophagen/mm³; LV 130,6 ± 55,4 Makrophagen/mm³; p=0,04; vgl. Abb. 37-A). In allen anderen Regionen zeigten die Makrophagen eine nahezu homogene Verteilung (vgl. Abb. 37-A).

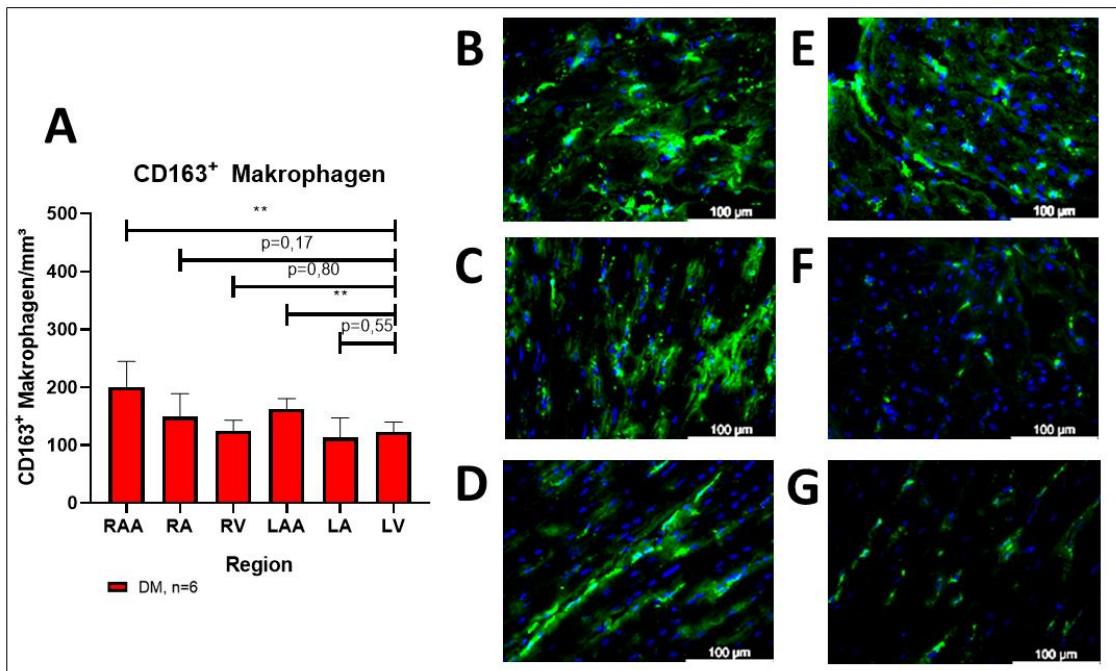


Abbildung 38. A) Anzahl an CD163⁺ Makrophagen/mm³ in den verschiedenen Regionen bei den diabetischen Schweinen. *p<0,05, **p<0,005, ungepaarter t-test. Immunfluoreszenzfärbung, repräsentative Bilder aus B) RAA, C) RA, D) RV, E) LAA, F) LA, G) LV. Grün: CD163⁺ Makrophagen, blau: DAPI (Zellkerne).

Auch bei den diabetischen Schweinen sind in allen untersuchten Regionen Makrophagen vorhanden (vgl. Abb. 38-B bis 38-G).

Das rechte Vorhofohr (RAA $201,0 \pm 39,7$ Makrophagen/mm³; LV $122,9 \pm 15,6$ Makrophagen/mm³; p=0,0022; vgl. Abb. 38-A) sowie das linke Vorhofohr (LAA $163,1 \pm 15,9$ Makrophagen/mm³; LV $122,9 \pm 15,6$ Makrophagen/mm³; p=0,0024; vgl. Abb. 38-A) zeigen im Vergleich zum linken Ventrikel eine signifikant erhöhte Anzahl an CD163⁺ Makrophagen. In den übrigen Regionen gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an CD163⁺ Makrophagen pro Region, (vgl. Abb. 38-A).

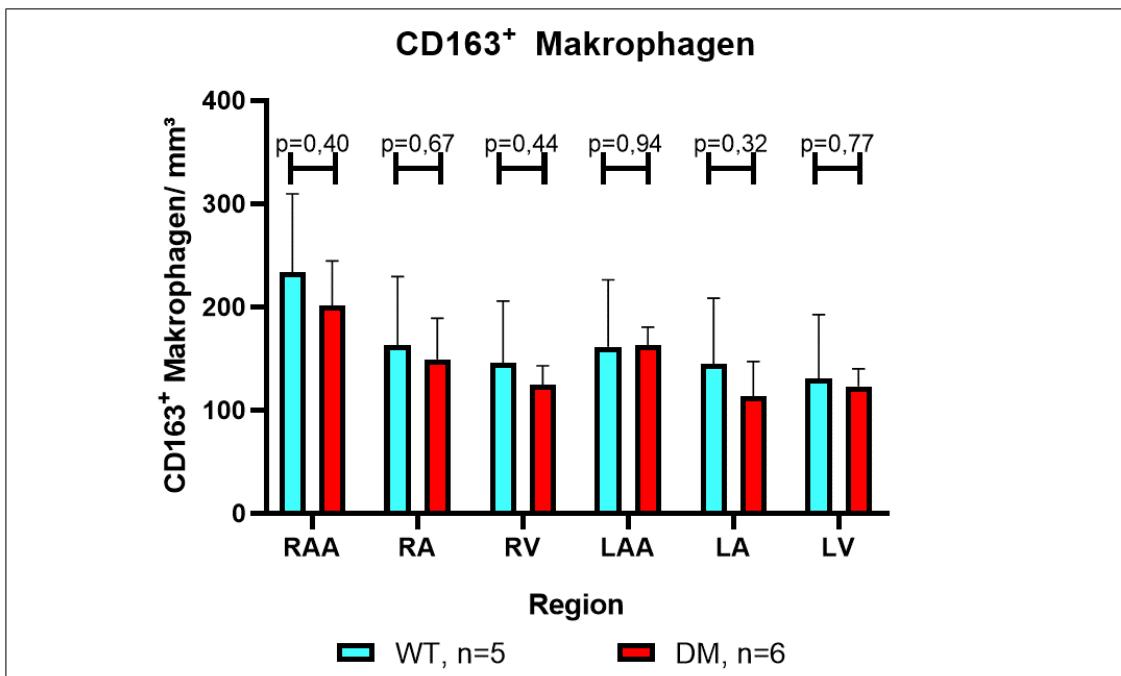


Abbildung 39. Anzahl an CD163⁺ Makrophagen in den verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtyp und diabetischen Schweinen. Ungepaarter t-test.

Die Anzahl an CD163⁺ Makrophagen wurde zwischen Wildtyp und diabetischen Schweinen in den verschiedenen Regionen verglichen. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied (vgl. Abb. 39).

4.1.2.2 Elektrisches Remodeling bei Diabetes mellitus

4.1.2.2.1 Western Blot – Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Expression der kardialen Connexine im porcinen Herzen

4.1.2.2.1.1 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Expression von Connexin 37

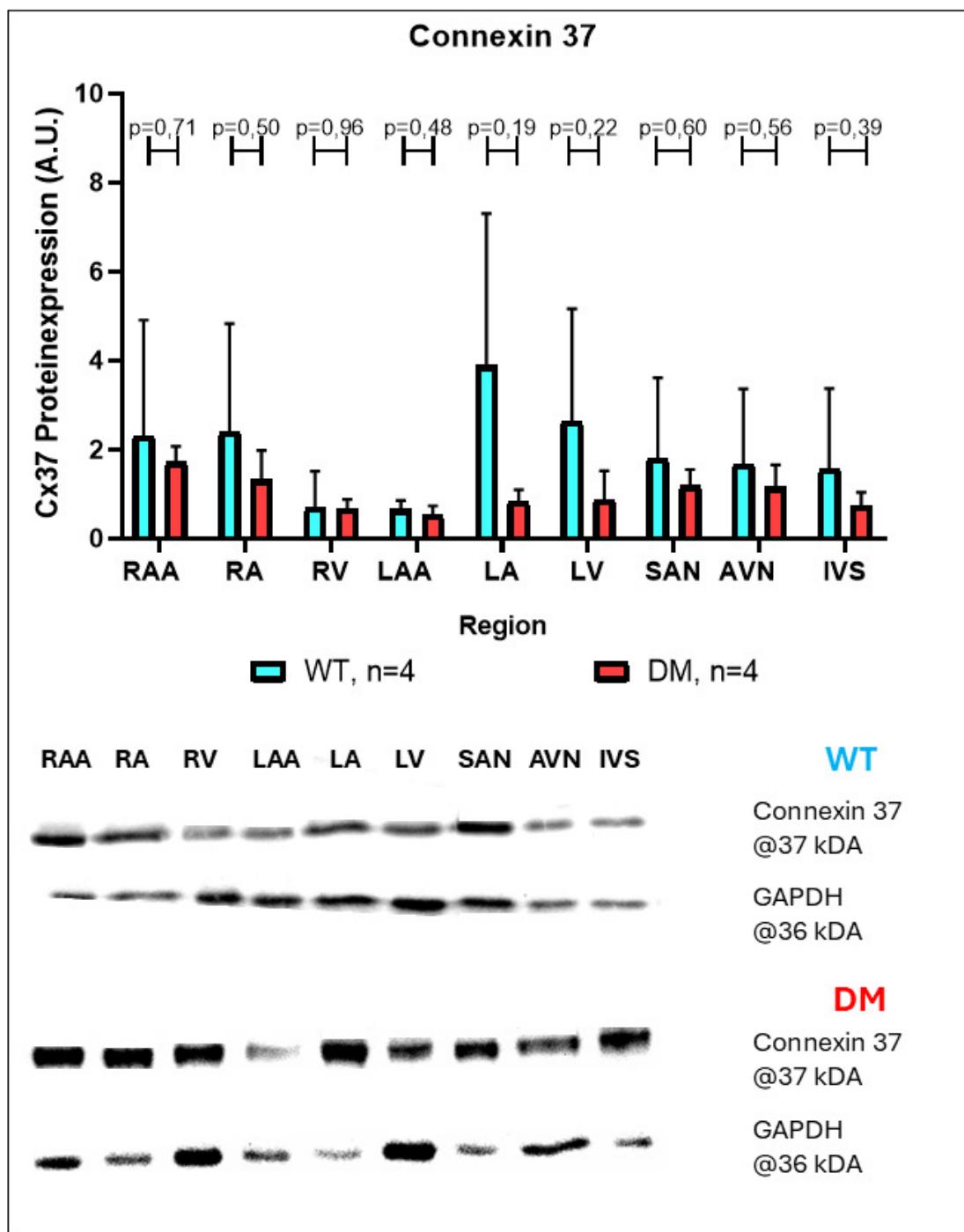


Abbildung 40. Die Connexin 37-Expression in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen. Ungepaarter t-test.

Die Connexin 37 Expression wurde in den verschiedenen Regionen zwischen Wildtyp und diabetischen Schweinen verglichen (vgl. Abb. 40). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.1.2.2.1.2 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Expression von Connexin 40

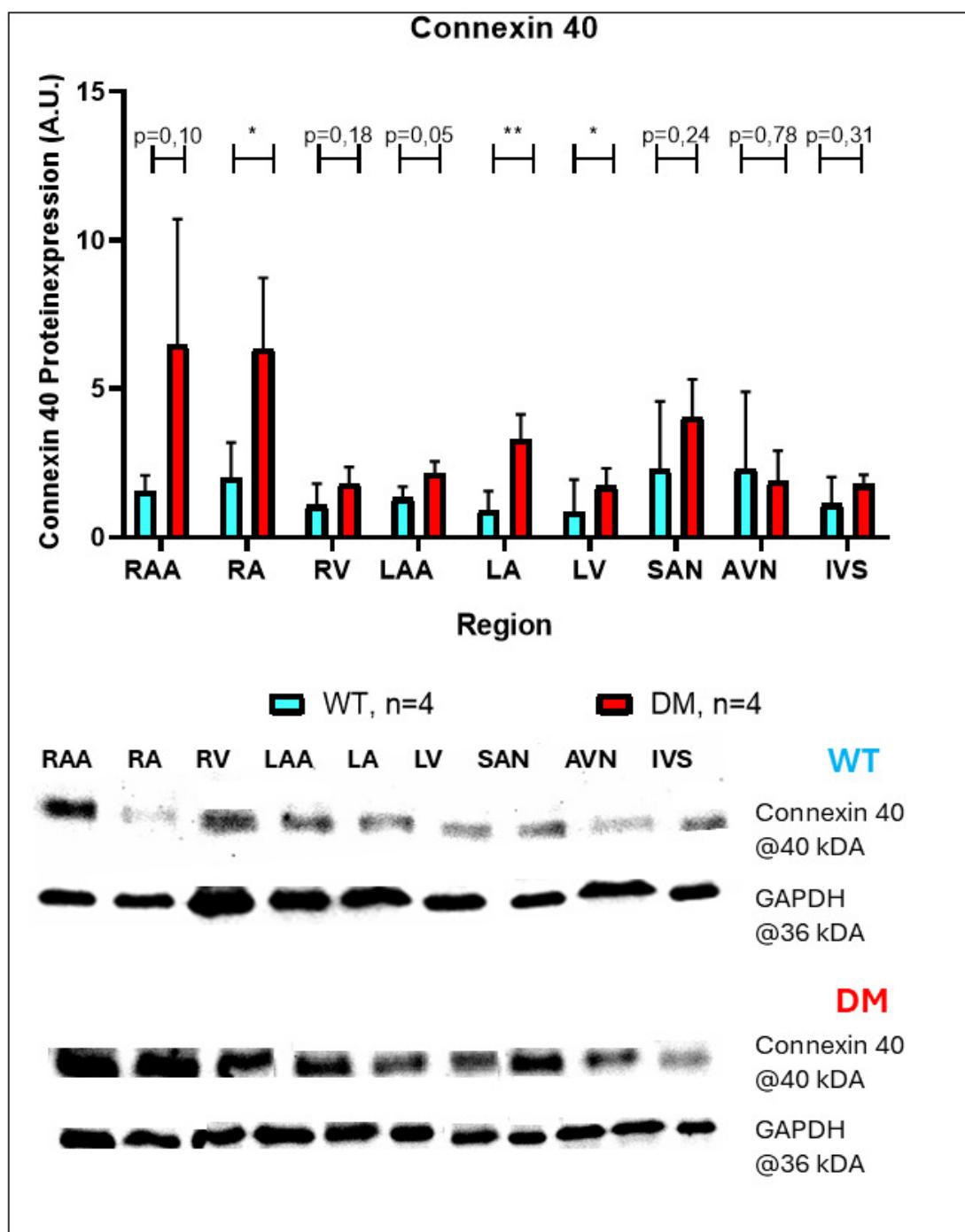


Abbildung 41. Die Connexin 40-Expression in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen. * $p<0,05$, ** $p<0,005$, ungepaarter t-test.

Wildtypen und diabetische Schweine wurden im Hinblick ihrer Expression von Connexin 40 in verschiedenen Regionen verglichen (vgl. Abb. 41).

Im rechten Vorhof (WT $1,9 \pm 0,97$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM $6,3 \pm 2,0$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,03$; vgl. Abb. 41), linken Vorhof

(WT $0,9 \pm 0,5$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM $3,3 \pm 0,7$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,009$; *vgl. Abb. 41*) und linken Ventrikel (WT $0,2 \pm 0,07$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM $1,7 \pm 0,5$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,02$; *vgl. Abb. 41*) zeigt sich bei den diabetischen Schweinen eine signifikante Hochregulierung der Connexin 40 Expression.

In den übrigen Regionen war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten erkennbar.

4.1.2.2.1.3 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Expression von Connexin 43

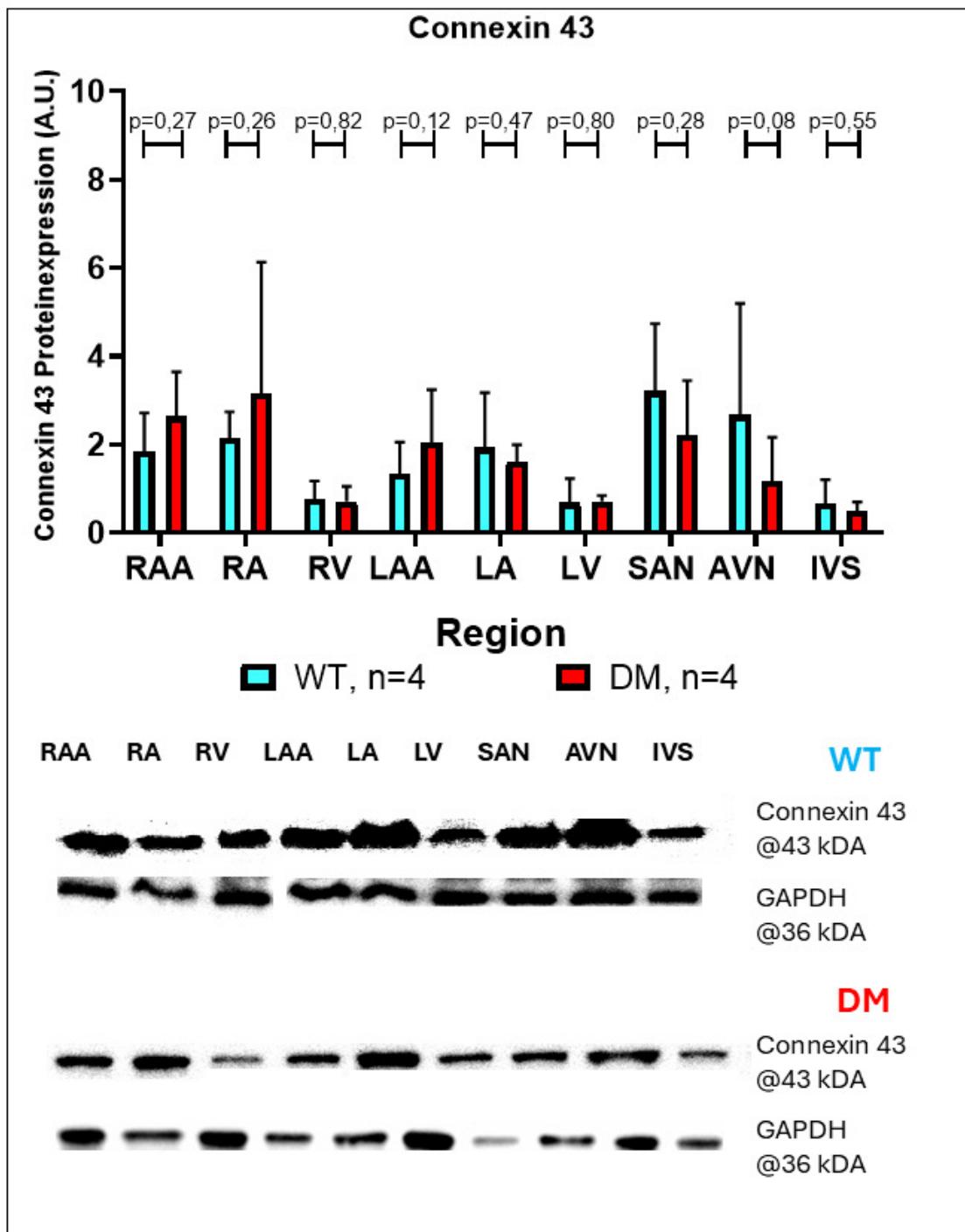


Abbildung 42. Die Connexin 43-Expression in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtyp und diabetischen Schweinen. Ungepaarter t-test.

Im Vergleich der Connexin 43-Expression konnte zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (vgl. Abb. 42).

4.1.2.2.1.4 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Expression von Connexin 45

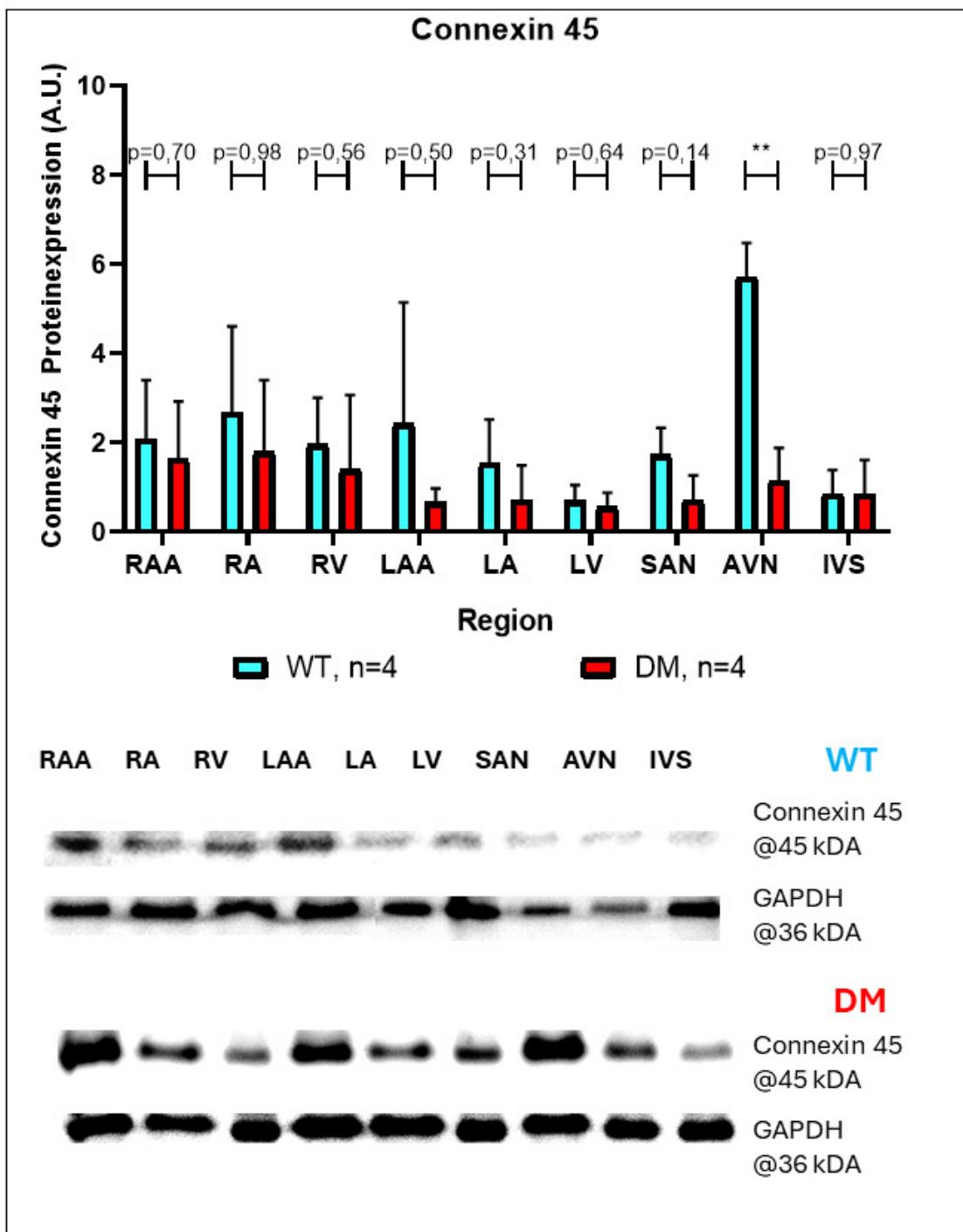


Abbildung 43. Die Connexin 45-Expression in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen Wildtypen und diabetische Schweinen. **p<0,005, ungepaarter t-test.

Die Connexin 45 Expression wurde in verschiedenen Regionen zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen verglichen (*vgl. Abb. 43*).

Hier konnte in der Region des AV-Knotens (WT $5,7 \pm 0,5$ Connexin 45 Proteinexpression (A.U.); DM $1,1 \pm 0,6$ Connexin 45 Proteinexpression (A.U.); $p=0,006$, *vgl. Abb. 43*) ein signifikantes Ergebnis erreicht werden: Die diabetischen Tiere zeigten eine deutlich verminderte Expression von Connexin 45 im Vergleich mit den Wildtypen.

In den übrigen Regionen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

4.1.2.2.2 Histologie

4.1.2.2.2.1 Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Expression von Connexin 43 im porcinen Herzen

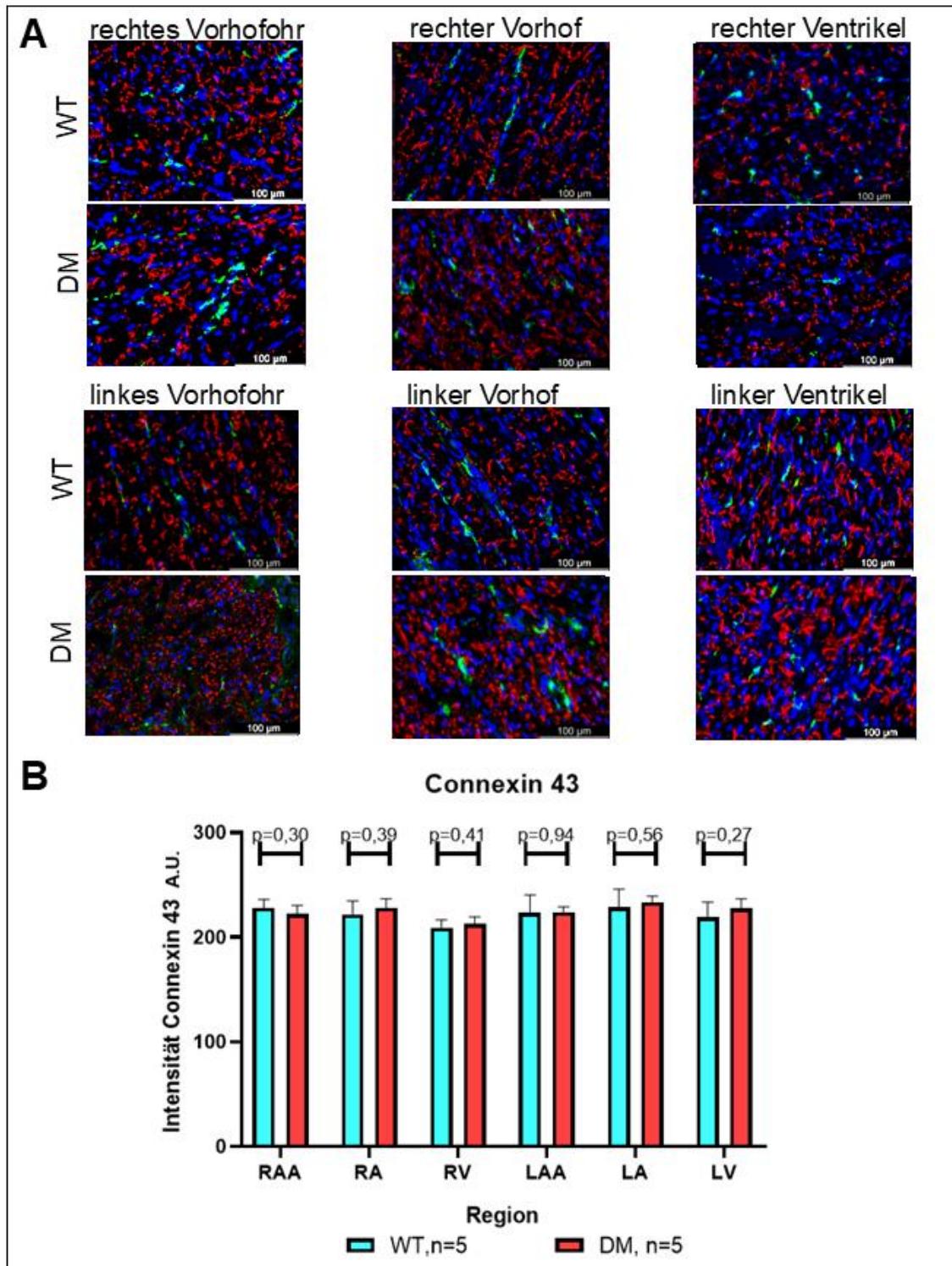


Abbildung 44. Die Connexin 43-Expression im Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen. A) Repräsentative Bilder aus der Immunhistochemiefärbung, Rot: Connexin 43, Grün: CD163⁺ Makrophagen, Blau: DAPI (Zellkerne). B) Connexin 43-Färbung, Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen. Ungepaarter t-test.

Wildtypen und diabetische Tiere wurden auf Expression von Connexin 43 untersucht und die verschiedenen Regionen zwischen den beiden Kohorten verglichen (vgl. Abb. 44-B).

Hier zeigte sich in allen Regionen eine homogene Verteilung von Connexin 43 zwischen den beiden Kohorten.

4.2 Der Einfluss von Dapagliflozin auf das proarrhythmogene Remodeling bei Diabetes mellitus

4.2.1 In vivo

4.2.1.1 Der Einfluss von Dapagliflozin auf die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern bei diabetischen Schweinen

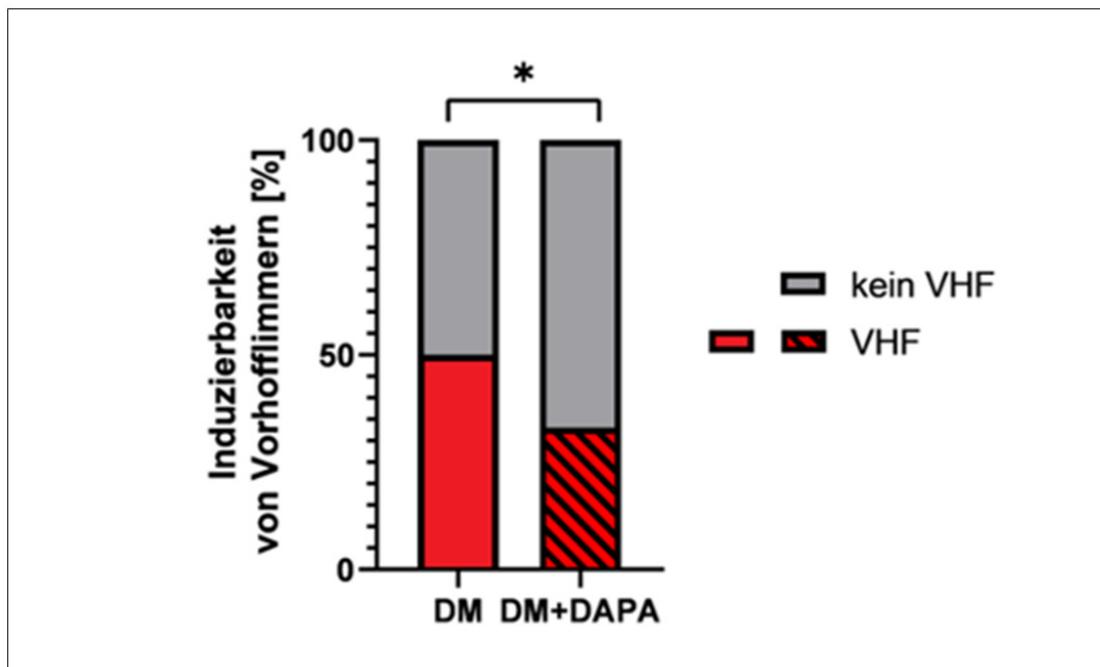


Abbildung 45. Abbildung 45. Induzierbarkeit von Vorhofflimmern [%] im Vergleich zwischen Diabetikern (DM, n=6) und Diabetikern mit Dapagliflozin-Behandlung (DM+DAPA, n=9). *p<0,05, Fishers Exact-Test.

Die mit Dapagliflozin behandelten Diabetiker haben im Vergleich zu den unbehandelten Diabetikern eine signifikant geringe Prävalenz, nach Stimulation Vorhofflimmern zu entwickeln ($p= 0,02$; vgl. Abb. 45).

4.2.1.2 Der Einfluss von Dapagliflozin auf die Dauer der Vorhofflimmerekopode bei diabetischen Schweinen

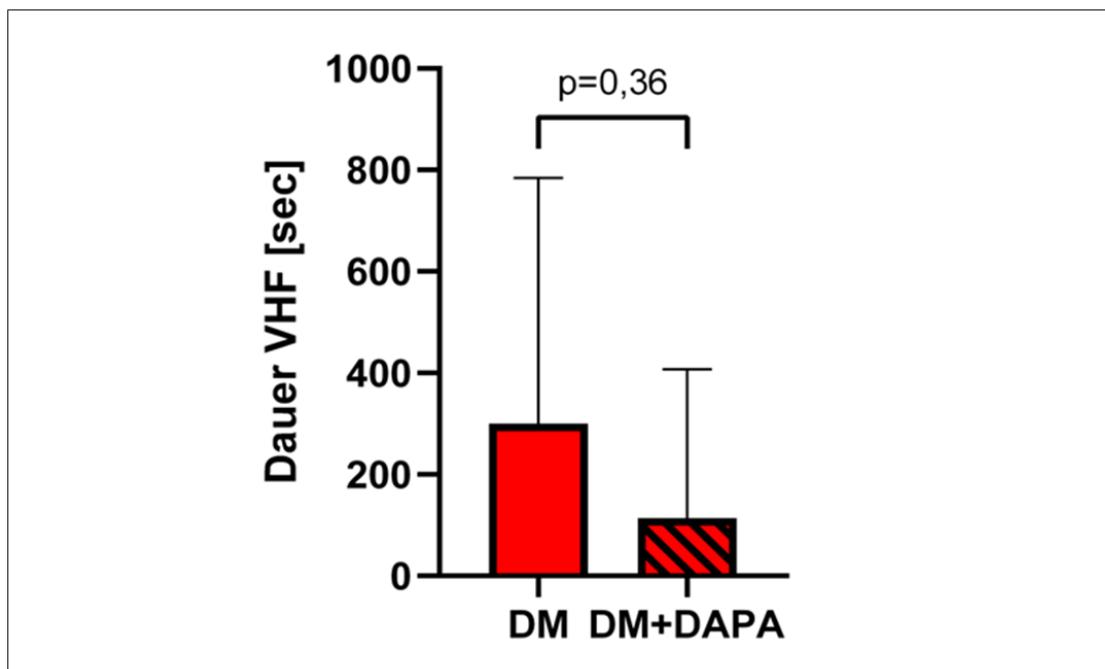


Abbildung 46. Dauer der Vorhofflimmerekopoden in Sekunden. Vergleich zwischen Diabetikern (DM, n=6) sowie Diabetikern, die mit Dapagliflozin behandelt wurden (DM+DAPA, n=9). Ungepaarter t-test.

Im Vergleich zwischen diabetischen Schweinen ohne Therapie und bei den mit Dapagliflozin behandelten Tieren war kein signifikanter Unterschied erkennbar (vgl. Abb. 46).

4.2.2 In vitro

4.2.2.1 Die Rolle von Dapagliflozin auf das Immunologische Remodeling bei Diabetes mellitus

4.2.2.1.1 Durchflusszytometrie

4.2.2.1.1.1 Die Rolle von Dapagliflozin auf die Anzahl von CD45⁺ Leukozyten

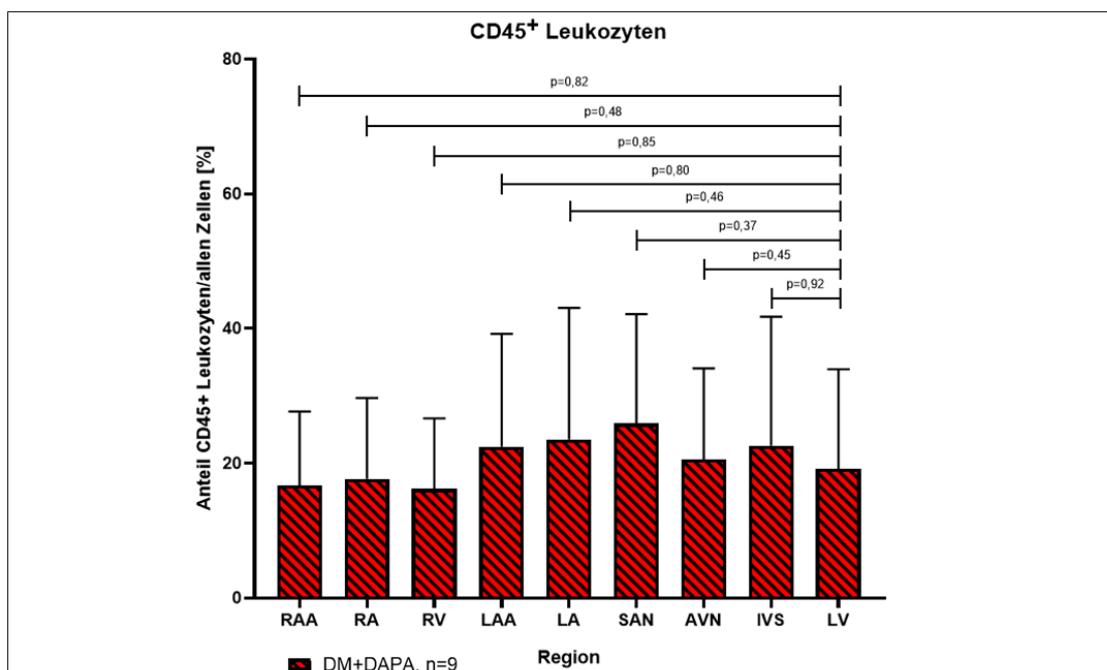


Abbildung 47. Anteil CD45⁺ Leukozyten an allen Zellen [%] in verschiedenen Regionen bei diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. Ungepaarter t-test.

Bei den mit dem SGLT2-Inhibitor Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen konnte in jeder untersuchten Region CD45⁺ Leukozyten nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrollregion LV zeigte sich eine weitestgehend homogene Verteilung der CD45⁺ Leukozyten (vgl. Abb. 47).

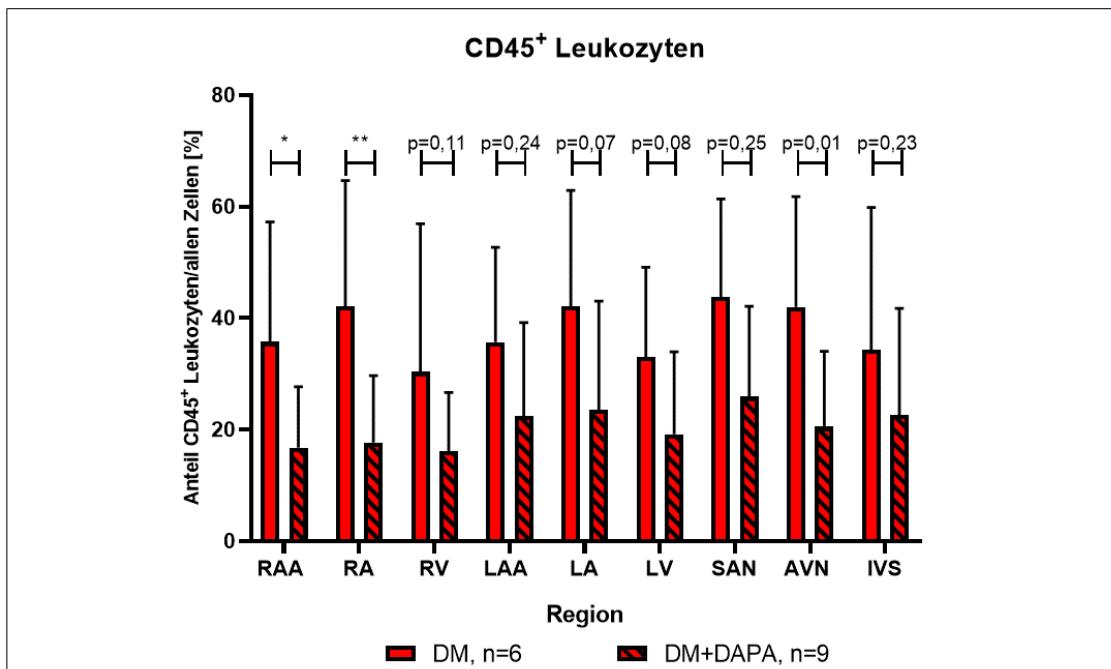


Abbildung 48. Anteil CD45⁺ Leukozyten an allen Zellen [%] in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. *p<0,05, **p<0,005, ungepaarter t-test.

Bei den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten diabetischen Tieren eine erniedrigte Anzahl an CD45⁺ Leukozyten (*vgl. Abb. 48*).

Nur im rechten Vorhofohr (DM $38,7 \pm 18,7$ CD45⁺ Leukozyten/allen Zellen [%]; DM+DAPA $16,7 \pm 10,3$ CD45⁺ Leukozyten/allen Zellen [%]; p=0,01; *vgl. Abb. 48*) und rechten Vorhof (DM $44,0 \pm 18,9$ CD45⁺ Leukozyten/allen Zellen [%]; DM+DAPA $17,7 \pm 11,3$ CD45⁺ Leukozyten/allen Zellen [%]; p=0,007; *vgl. Abb. 48*) ist diese Veränderung signifikant.

In den übrigen Regionen kann kein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Kohorten nachgewiesen werden.

4.2.2.1.1.2 Die Rolle von Dapagliflozin auf die Anzahl von CD172a⁺ Makrophagen

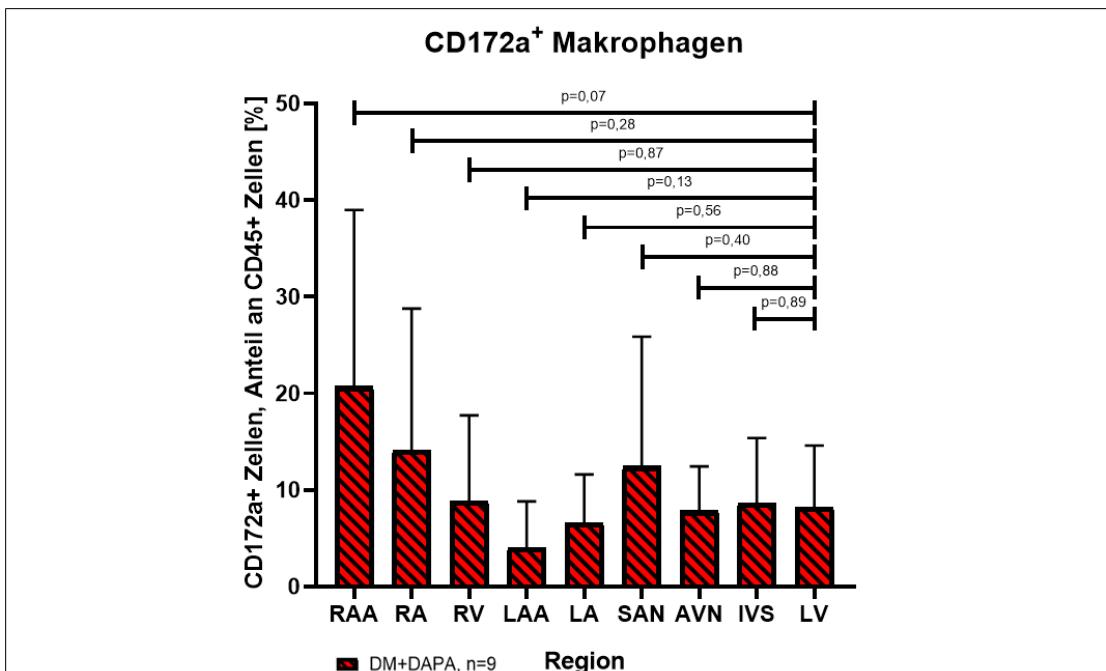


Abbildung 49. Anteil von CD172a⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen bei diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. Ungepaarter t-test.

In allen untersuchten Regionen konnten bei dem mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen CD172a⁺ Makrophagen festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrollregion des linken Ventrikels zeigte sich im rechten Vorhofohr ein Trend zu einer vermehrten Anreicherung von CD172a⁺ Makrophagen, der jedoch kein signifikantes Niveau erreichte ($RAA\ 20,6 \pm 11,2$ CD172a⁺ Leukozyten/allen Zellen [%]; $LV\ 82 \pm 6,0$ CD172a⁺ Leukozyten/allen Zellen [%]; $p=0,07$; vgl. Abb. 49). In den übrigen Regionen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der CD172a⁺ Makrophagen (vgl. Abb. 49).

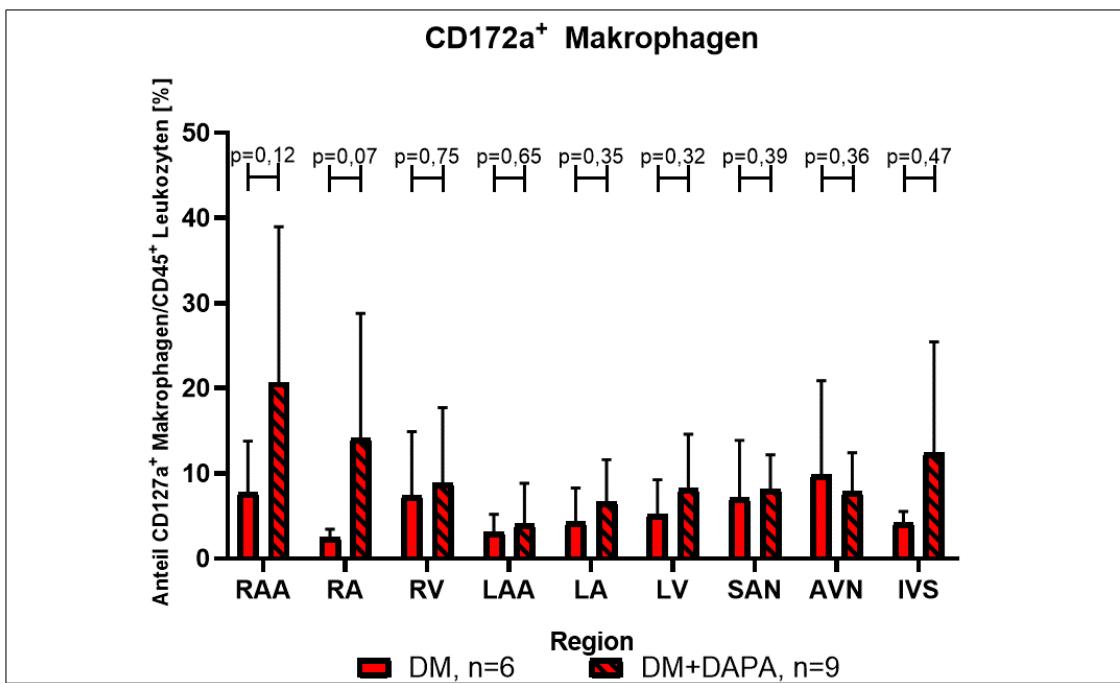


Abbildung 50. Anteil von CD172a⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. Ungepaarter t-test.

Diabetische Schweine und mit Dapagliflozin behandelte diabetische Schweine wurden im Hinblick auf die Anzahl an CD172a⁺ Makrophagen in verschiedenen Regionen untersucht (vgl. Abb. 50).

Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Regionen zwischen den beiden Kohorten festgestellt werden.

4.2.2.1.1.3 Die Rolle von Dapagliflozin auf die Anzahl von CD163⁺ residenten Makrophagen

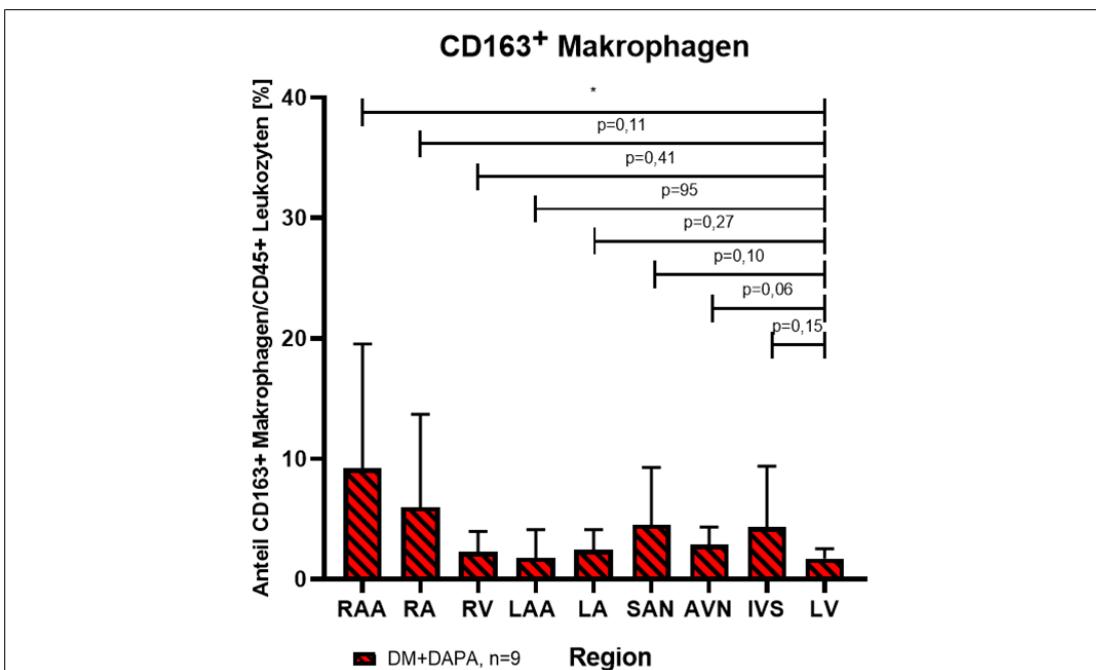


Abbildung 51. Anteil von CD163⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen bei diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. *p<0,05, ungepaarter t-test.

Bei den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Tieren konnte in allen Regionen CD163⁺ Makrophagen nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der Kontrollregion des linken Ventrikels zeigte das rechte Vorhofohr eine signifikante Anreicherung von CD163⁺ Makrophagen (RAA $9,2 \pm 9,7$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; LV $1,1 \pm 0,2$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%], p=0,04; vgl. Abb. 51). Auch im Sinusknoten zeigte sich ein Trend zu einer Anreicherung von CD163⁺ Makrophagen, der jedoch kein signifikantes Niveau erreichte (SAN $2,7 \pm 1,5$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; LV $1,1 \pm 0,2$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%], p=0,08; vgl. Abb. 51).

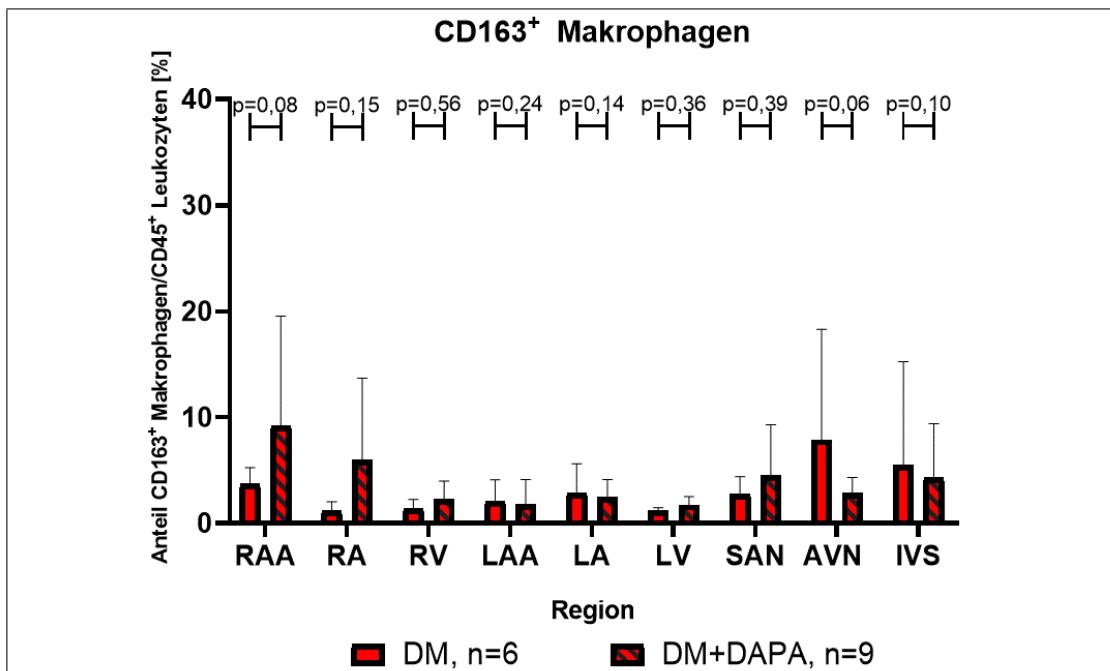


Abbildung 52. Anteil von CD163⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. Ungepaarter t-test.

Diabetische Schweine und diabetische Schweine mit Dapagliflozin wurden im Hinblick ihrer Anzahl an CD163⁺ Makrophagen in verschiedenen Regionen miteinander verglichen (vgl. Abb. 52). Bei keiner der untersuchten Regionen war zwischen den beiden Kohorten ein signifikanter Unterschied feststellbar.

4.2.2.1.1.4 Die Rolle von Dapagliflozin auf die Anzahl von CD163⁺ nicht-residenten Makrophagen

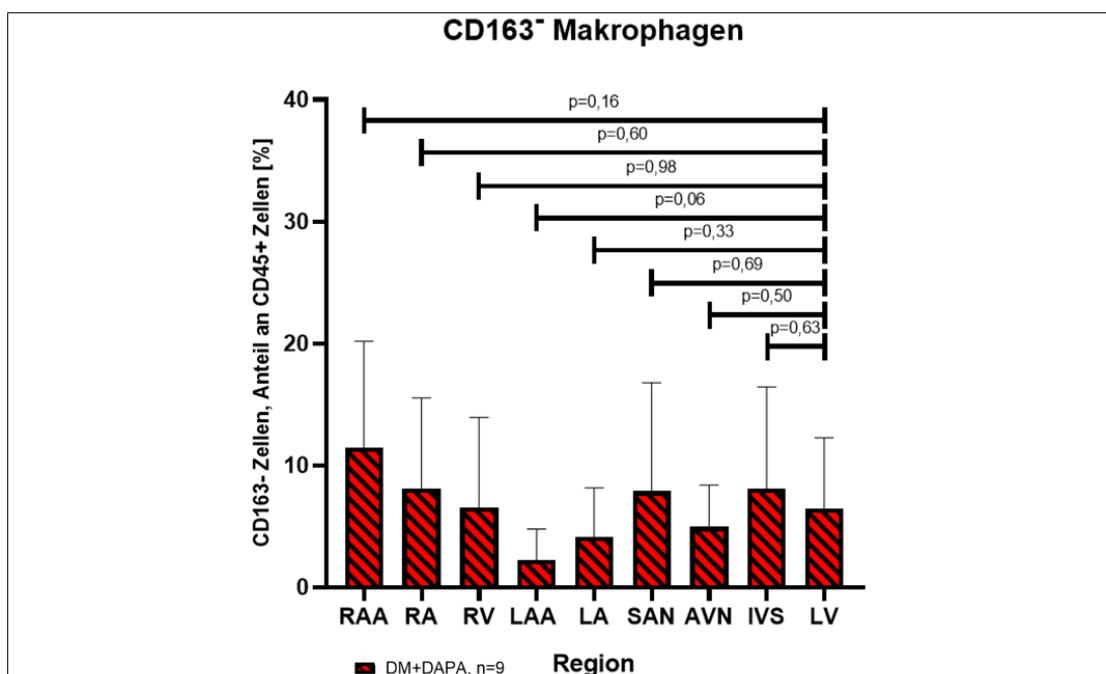


Abbildung 53. Anteil von CD163⁺ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen bei diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. Ungepaarter t-test.

Zunächst konnte in allen untersuchten Regionen bei den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen CD163⁺ Leukozyten festgestellt werden, die sich in fast allen Regionen gleichmäßig verteilten. Im linken Vorhofohr zeigt sich im Vergleich zur Kontrollregion des linken Ventrikels der Trend zu einer verminderten Anreicherung von CD163⁺ Leukozyten, der jedoch knapp kein signifikantes Niveau erreichen konnte ($LAA 2,2 \pm 2,3$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; $LV 6,5 \pm 5,6$ CD163⁺ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; $p=0,06$; vgl. Abb. 53).

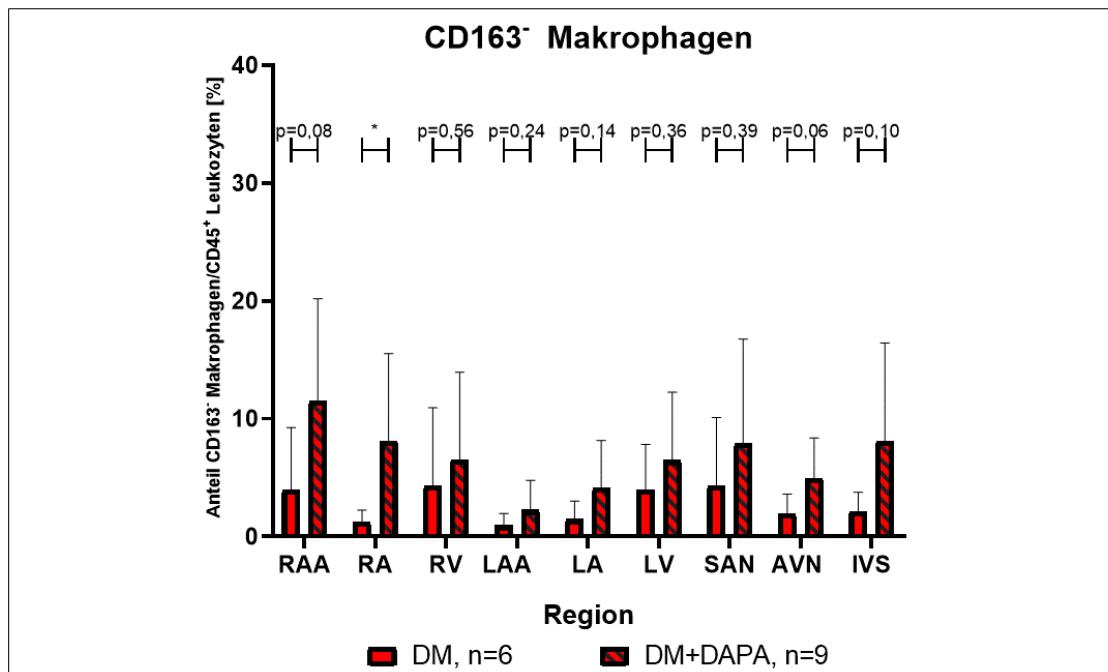


Abbildung 54. Anteil von CD163⁻ Makrophagen an CD45⁺ Leukozyten [%] in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. *p<0,05, ungepaarter t-test.

Die Anzahl von CD163⁻ Makrophagen wurde in verschiedenen Regionen zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen, die mit Dapagliflozin behandelt wurden, verglichen (vgl. Abb. 54).

In einer Region – dem rechten Vorhof (DM $1,2 \pm 0,9$ CD163⁻ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%]; DM+DAPA $8,1 \pm 6,9$ CD163⁻ Makrophagen/CD45⁺ Leukozyten [%], p=0,04; vgl. Abb. 54) – zeigten die mit Dapagliflozin behandelten Tiere eine größere Menge an CD163⁻ Makrophagen im Vergleich zu den unbehandelten diabetischen Schweinen. In allen anderen Regionen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

4.2.2.1.2 Immunfluoreszenzfärbung

4.2.2.1.2.1 Die Rolle von SGLT2-Inhibitoren in der Anzahl von CD163⁺ Makrophagen im porcinen Herzen

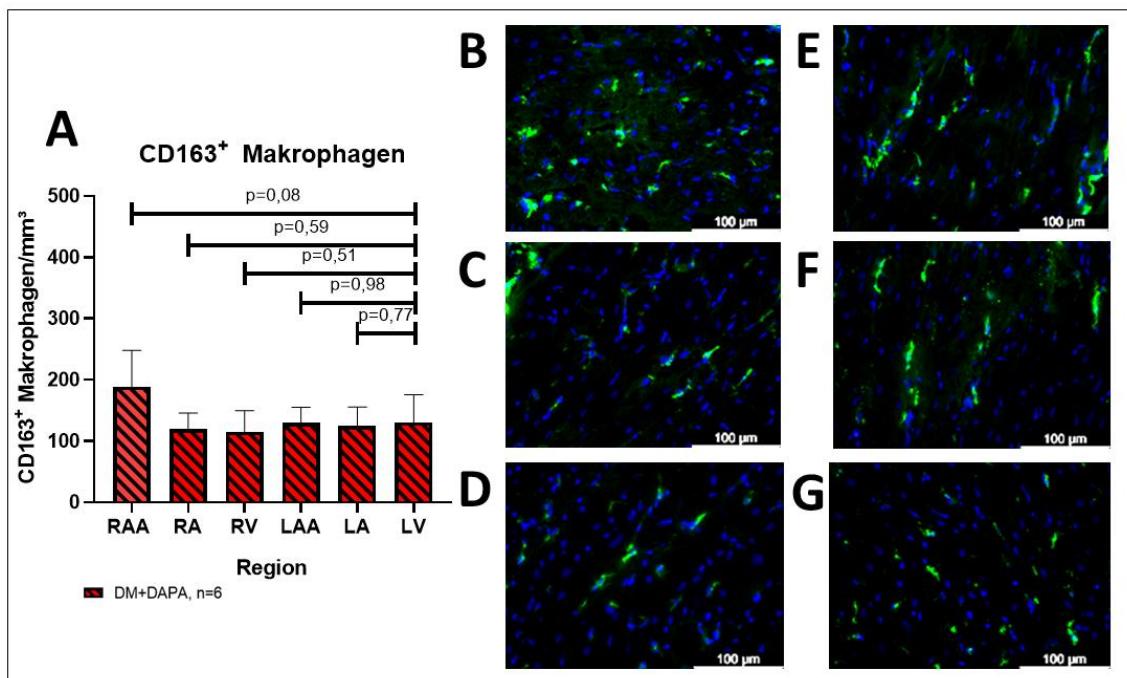


Abbildung 55. A) Anzahl an CD163⁺ Makrophagen/mm³ in den verschiedenen Regionen bei den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen; ungepaarter t-test. Repräsentative Bilder der Immunhistochemie-Färbung aus B) RAA, C) RA, D) RV, E) LAA, F) LA, G) LV. Grün: CD163⁺ Makrophagen, blau: DAPI (Zellkerne).

In der Gruppe der mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweine befinden sich in allen untersuchten Regionen CD163⁺ Makrophagen (*vgl. Abb. 55-B bis 55-G*).

Im Bereich des rechten Vorhofohres zeigte sich ein Trend zu einer vermehrten Anreicherung von CD163⁺ Makrophagen, der jedoch knapp kein signifikantes Niveau erreichen konnte (RAA $188,8 \pm 53,8$ CD163⁺ Makrophagen/mm³; LV $130,8 \pm 40,7$ CD163⁺ Makrophagen/mm³; $p=0,08$; *vgl. Abb. 55-A*). In den übrigen Regionen zeigt sich eine nahezu homogene Verteilung von CD163⁺ Makrophagen.

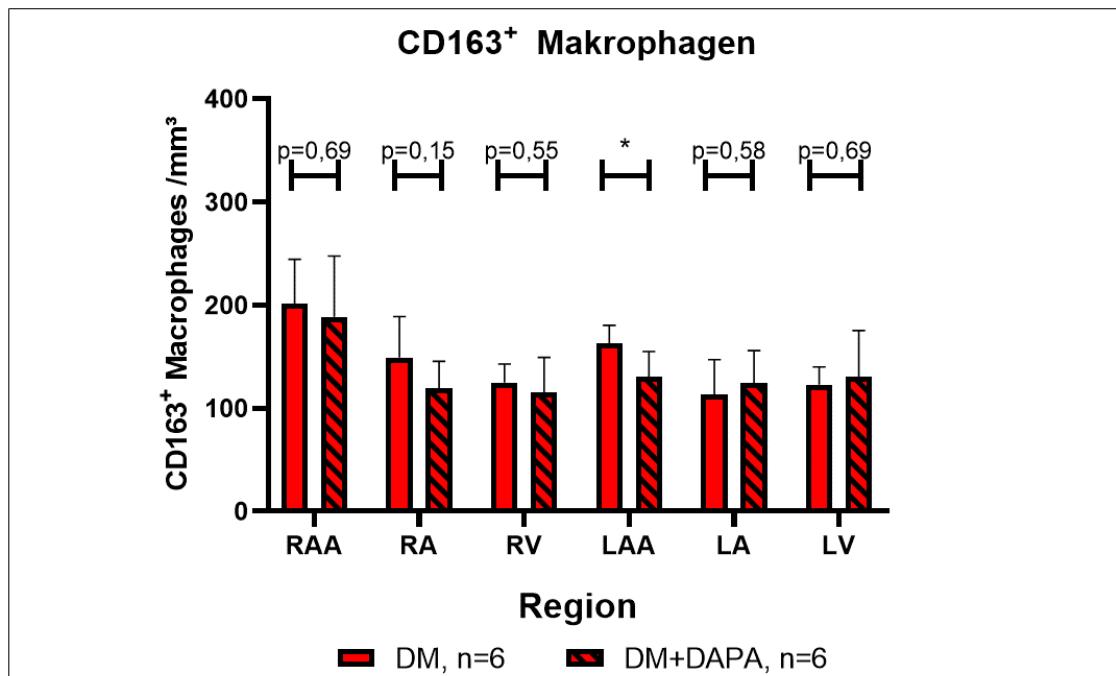


Abbildung 56. Anzahl an CD163⁺ Makrophagen in den verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. *p<0,05, ungepaarter t-test.

Die Anzahl an CD163⁺ Makrophagen wurde zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen, die mit Dapagliflozin behandelt wurden, in den unterschiedlichen Regionen untersucht (vgl. Abb. 56).

Im linken Vorhofohr (WT $161,3 \pm 57,9$ CD163⁺ Makrophagen/mm³; DM $144,7 \pm 33,3$ CD163⁺ Makrophagen/mm³; p=0,0024; vgl. Abb. 56) zeigten die mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Tiere eine signifikant kleinere Anzahl an CD163⁺ Makrophagen im Vergleich mit den unbehandelten diabetischen Schweinen. In den übrigen Regionen ist kein signifikanter Unterschied erkennbar.

4.2.2.2 Die Rolle von Dapagliflozin auf das Elektrische Remodeling bei Diabetes mellitus

4.2.2.2.1 Western Blot

4.2.2.2.1.1 Die Connexin 37-Expression bei mit Dapagliflozin behandelten Diabetikern

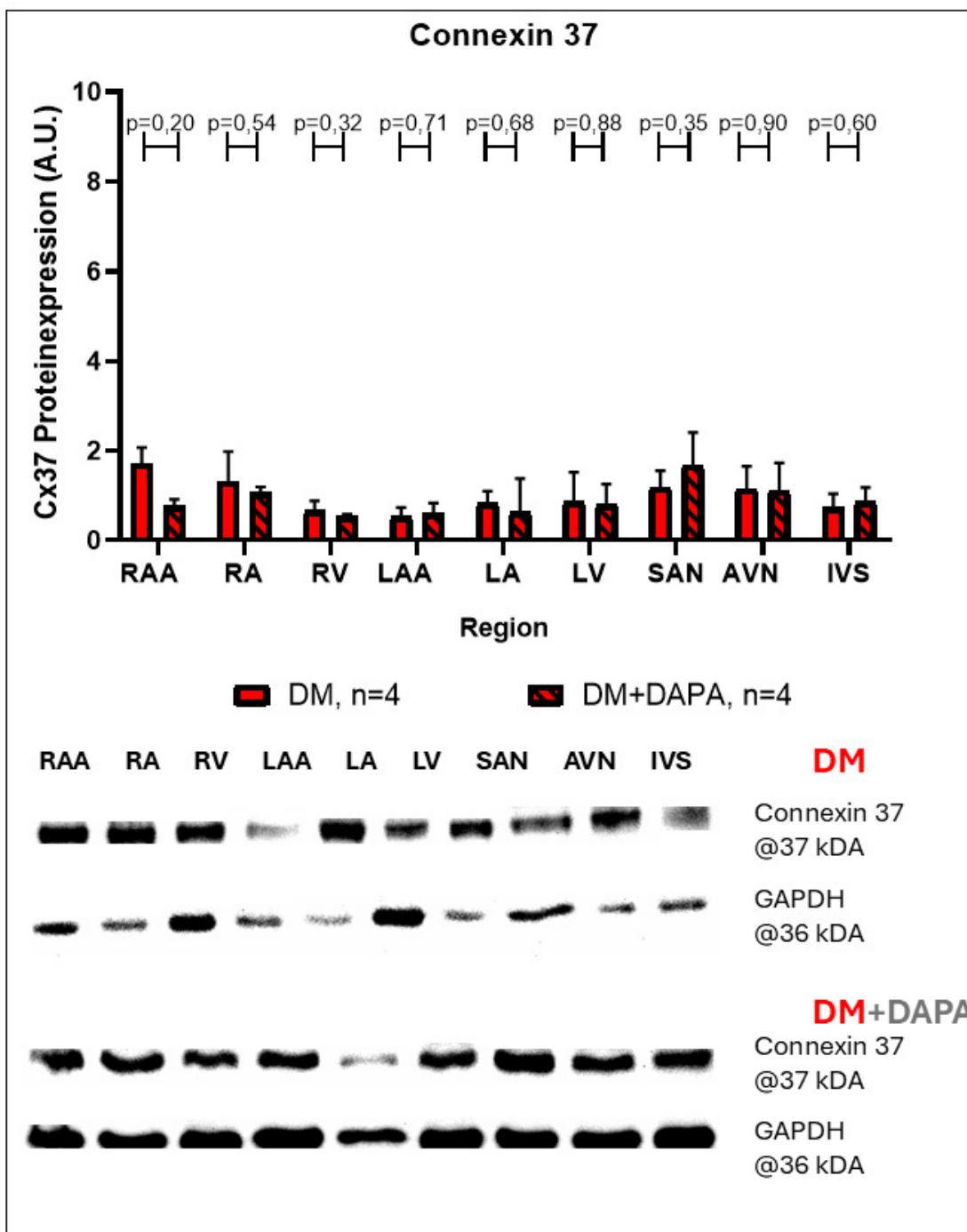


Abbildung 57. Die Connexin 37-Expression in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. Ungepaarter t-test.

Diabetische Schweine und mit Dapagliflozin behandelte diabetische Schweine wurden im Hinblick auf die Connexin 37-Expression in verschiedenen Regionen verglichen (*vgl. Abb. 57*).

Hier konnte kein relevanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen dargestellt werden (*vgl. Abb. 57*).

4.2.2.2.1.2 Die Connexin 40-Expression bei mit Dapagliflozin behandelten Diabetikern

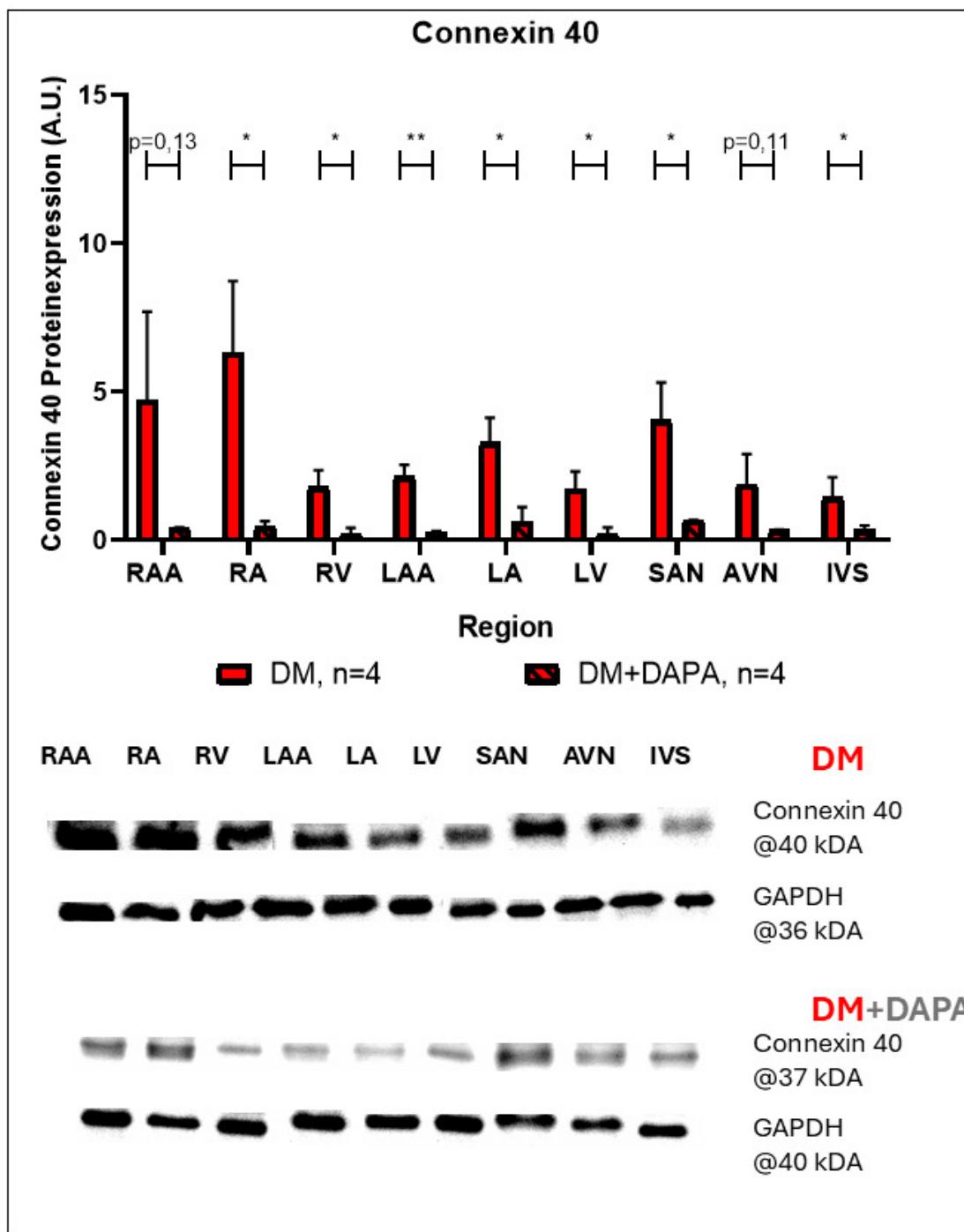


Abbildung 58. Die Connexin 40-Expression in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schwein und diabetischen Schwein mit Dapagliflozinbehandlung.
*p<0,05; **p<0,005, ungepaarter t-test.

Diabetische Schweine und diabetische Schweine, die mit Dapagliflozin behandelt wurden, wurden im Hinblick auf ihre Expression von Connexin 40 in verschiedenen Regionen verglichen (vgl. Abb. 58).

Hier zeigte sich in fast allen Regionen bei den mit Dapagflilozin behandelten diabetischen Schweinen eine erniedrigte Expression von Connexin 40 im Vergleich zu den unbehandelten Diabetikern (*vgl. Abb. 58*).

Signifikant wurde dieser Unterschied im rechten Vorhof (DM $6,3 \pm 2,0$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,4 \pm 0,1$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,04$; *vgl. Abb. 58*), rechter Ventrikel (DM $1,8 \pm 0,4$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,2 \pm 0,1$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,02$; *vgl. Abb. 58*), linkes Vorhofohr (DM $3,1 \pm 1,8$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,2 \pm 0,02$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,007$; *vgl. Abb. 58*), linker Vorhof (DM $3,3 \pm 0,7$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,6 \pm 0,3$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $P=0,01$; *vgl. Abb. 58*), linker Ventrikel (DM $1,7 \pm 0,5$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,2 \pm 0,1$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,03$; *vgl. Abb. 58*), Sinusknoten (DM $4,0 \pm 1,0$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,6 \pm 0,004$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,02$; *vgl. Abb. 58*) und interventrikulärem Septum (DM $1,7 \pm 0,2$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,3 \pm 0,09$ Connexin 40 Proteinexpression (A.U.); $p=0,01$; *vgl. Abb. 58*).

4.2.2.2.1.3 Die Connexin 43-Expression bei mit Dapagliflozin behandelten Diabetikern

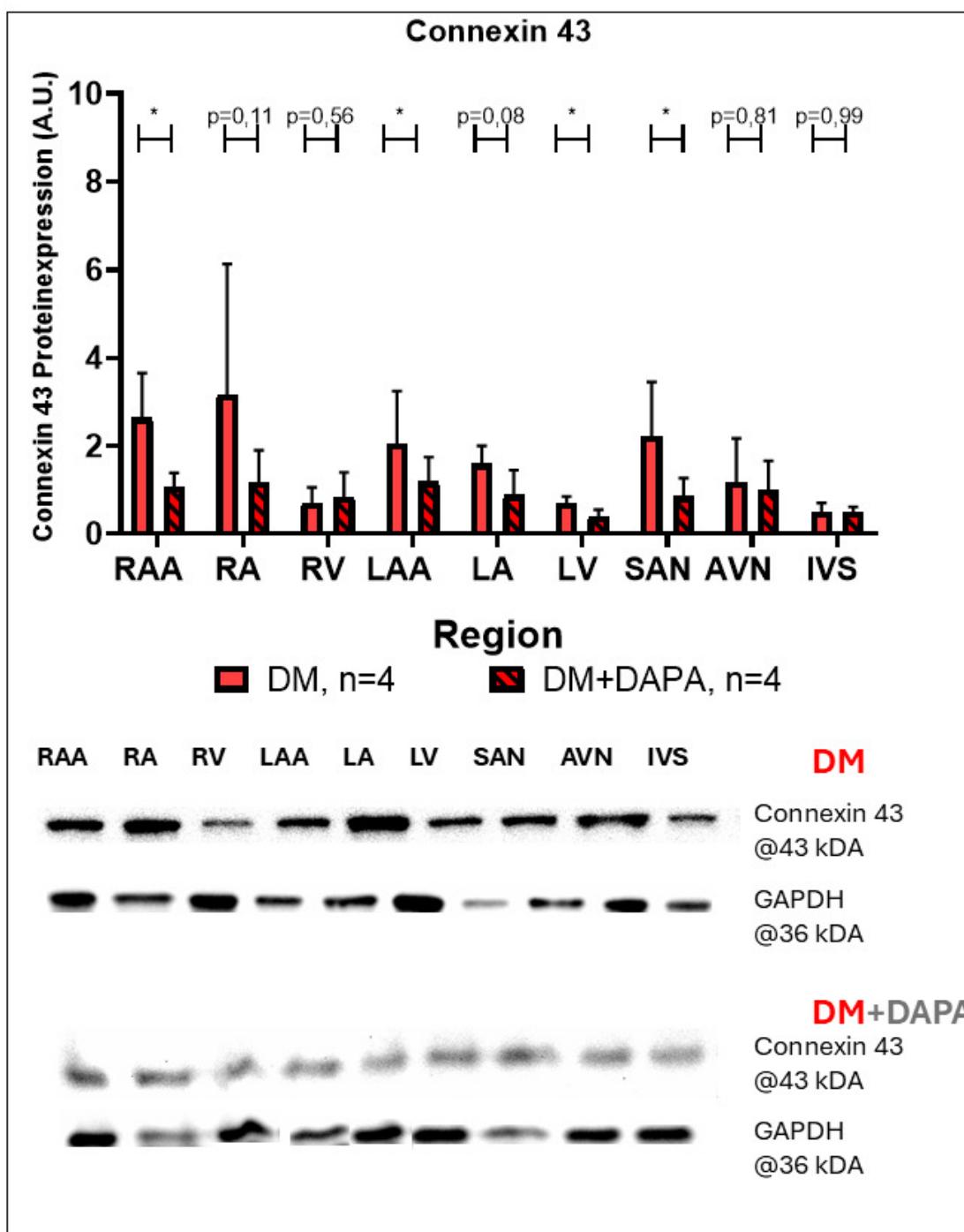


Abbildung 59. Die Connexin 43-Expression in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. *p<0,05, ungepaarter t-test.

Diabetische Schweine und diabetische Schweine mit Dapagliflozinbehandlung wurden im Hinblick auf ihre Connexin 43-Expression in verschiedenen Regionen miteinander verglichen (*vgl. Abb. 59*).

Eine signifikant erniedrigte Expression von Connexin 43 zeigte sich bei den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen im rechten Vorhofohr (DM $2,6 \pm 0,8$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $1,0 \pm 0,2$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); $p=0,02$; *vgl. Abb. 59*), linken Vorhofohr ($2,5 \pm 0,4$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $1,0 \pm 0,4$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); $p=0,02$; *vgl. Abb. 59*), LV (DM $0,7 \pm 0,1$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,4 \pm 0,1$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); $p=0,02$; *vgl. Abb. 59*) und Sinusknoten (DM $2,6 \pm 0,7$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,8 \pm 0,3$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); $p=0,01$; *vgl. Abb. 59*) konnte diese Veränderung ein Signifikantes Niveau erreichen.

Im linken Vorhof (DM $1,6 \pm 0,3$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); DM+DAPA $0,8 \pm 0,4$ Connexin 43 Proteinexpression (A.U.); $p=0,08$; *vgl. Abb. 59*) zeigte sich der gleiche Trend, jedoch konnte hier kein signifikantes Niveau erreicht werden.

4.2.2.2.1.4 Die Connexin 45-Expression bei mit Dapagliflozin behandelten Diabetikern

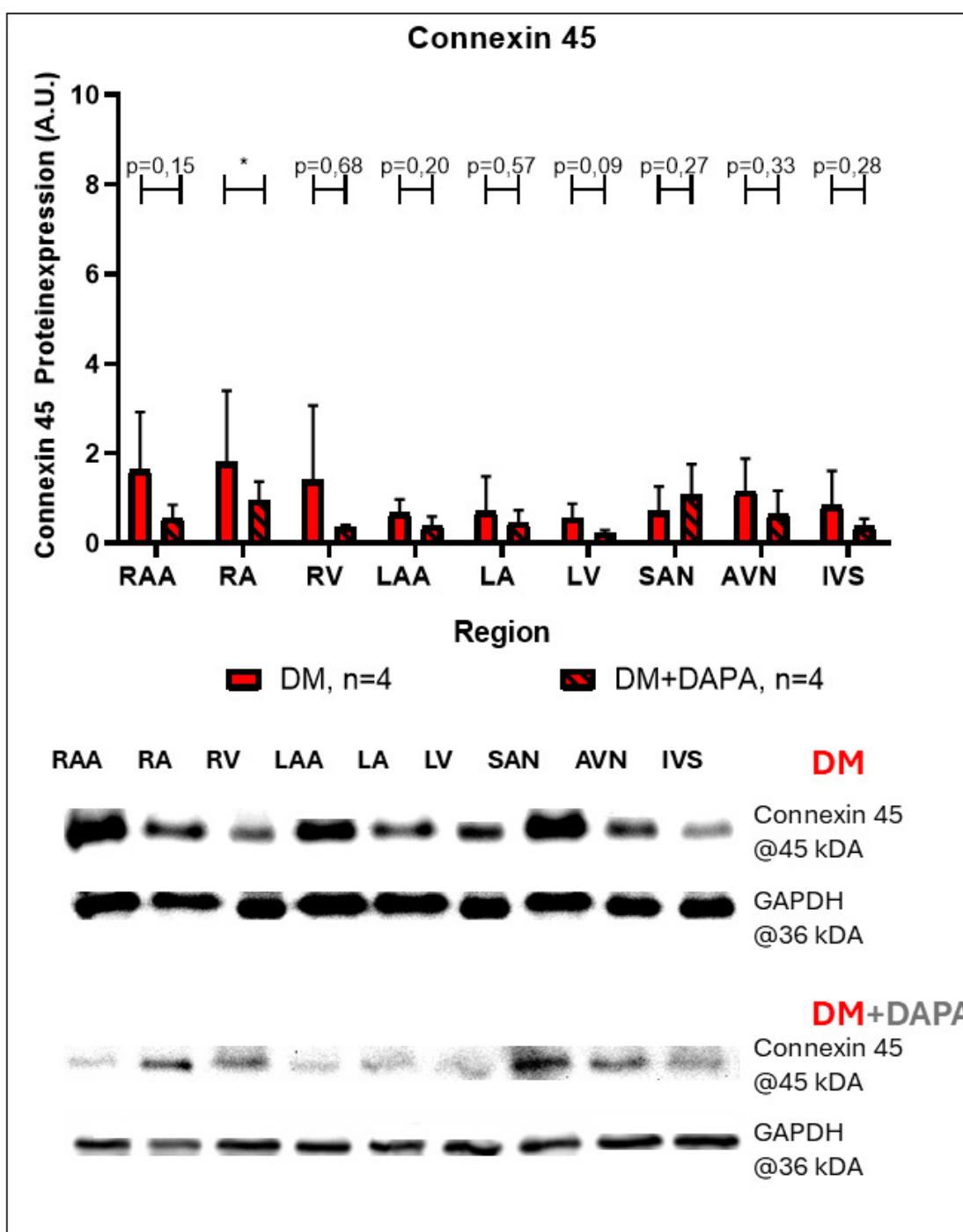


Abbildung 60. Die Connexin 45-Expression in verschiedenen Regionen, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozinbehandlung. *p<0,05, ungepaarter t-test.

Diabetische Schweine und diabetische Schweine mit Dapagliflozin Behandlung wurden auf ihre Expression von Connexin 45 in verschiedenen Regionen untersucht (*vgl. Abb. 60*).

Es zeigte sich eine signifikant erniedrige Expression von Connexin 45 bei dem mit Dapagliflozin behandelten Diabetikern im rechten Vorhof ($DM\ 2,6 \pm 0,6$ Connexin 45 Proteinexpression (A.U.); $DM+DAPA\ 0,9 \pm 0,3$ Connexin 45 Proteinexpression (A.U.); $p=0,02$; *vgl. Abb. 60*). In den übrigen Regionen zeigte sich kein relevanter Unterschied.

4.2.2.2.2 Histologie

4.2.2.2.2.1 Die Rolle von Dapagliflozin auf die Verteilung von Connexin 43 bei Diabetes mellitus

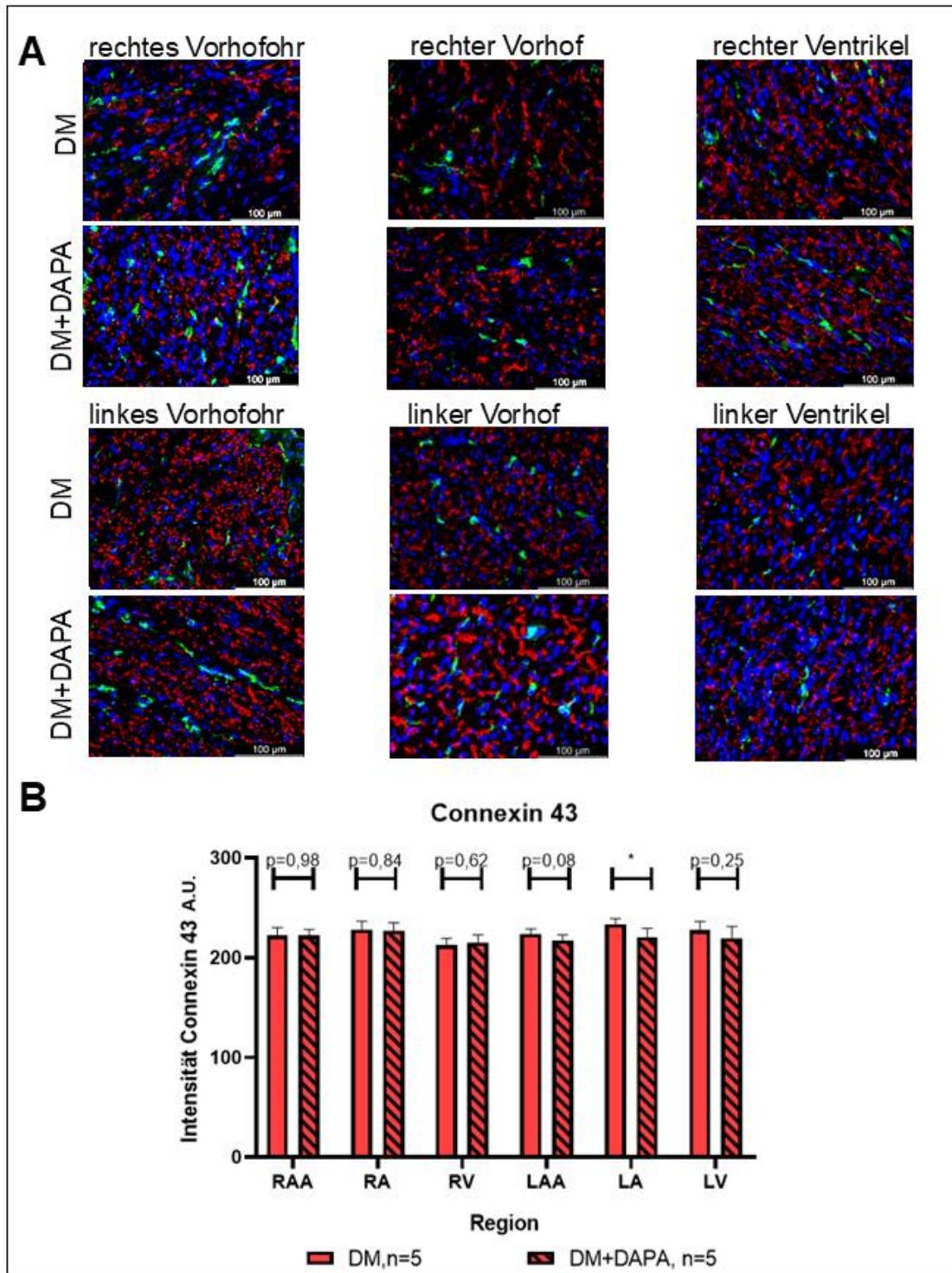


Abbildung 61. Die Rolle von Dapagliflozin auf die Connexin 43 Expression bei Diabetes mellitus. A) Immunhistochemie, Rot: Connexin 43, Grün: CD163⁺ Makrophagen, Blau: DAPI (Zellkerne). B) Connexin 43 Färbung, Vergleich zwischen diabetischen Schweinen und diabetischen Schweinen mit Dapagliflozin. *p<0,05, ungepaarter t-test.

Verschiedene Regionen von diabetischen Schweinen sowie von mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen wurden auf die Expression von Connexin 43 untersucht (*vgl. Abb. 61-A*).

Hier zeigte sich im linken Vorhof (DM $233,6 \pm 5,3$ Intensität Connexin 43 A.U.; DM+DAPA $220,5 \pm 7,8$ Intensität Connexin 43 A.U.; $p=0,02$, *vgl. Abb. 61-B*) eine signifikante Verminderung der Connexin 43-Expression bei den mit Dapagliflozin behandelten Tieren. Auch im linken Vorhofohr (DM $224,1 \pm 4,3$ Intensität Connexin 43 A.U.; DM+DAPA $217,8 \pm 4,7$ Intensität Connexin 43 A.U.; $p=0,08$, *vgl. Abb. 61-B*) zeigte sich dieser Trend, erreicht jedoch kein signifikantes Niveau.

In allen anderen Regionen ist die Expression von Connexin 43 zwischen den beiden zu vergleichenden Kohorten in einem ähnlichen Bereich.

5. Diskussion

5.1 Das Schwein als Versuchstier

Aufgrund guter sozialer Akzeptanz von Schweineversuchen und vergleichbarer physiologischer sowie anatomischer Parameter des Herz-Kreislauf-Systems ist das Schwein ein ideales Versuchstier für die kardiovaskuläre Forschung (164, 194). Zusätzlich kann aufgrund des ähnlichen Körpergewichts humanes Equipment und Geräte für *in vivo*-Studien am Schwein verwendet werden, was die Übertragbarkeit der Daten erhöht (164). Für die Validierung präklinischer Tiermodelle ist die physiologische Ähnlichkeit zum Menschen von zentraler Bedeutung (195). Die endokrine und exokrine Pankreasstruktur sowie der Glukosestoffwechsel des Schweins ähneln in hohem Maße denen des Menschen (162). Das Insulin des Schweins unterscheidet sich lediglich in einer Aminosäure vom humanen Insulin (162). Darüber hinaus liegen die physiologischen Blutzuckerspiegel beim Hausschwein mit 70–115 mg/dl im vergleichbaren Bereich wie beim Menschen (162). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten gilt das Schwein als besonders geeigneter Modellorganismus für die translationale Diabetesforschung (162). Die hier verwendeten INS^{C94Y} genetisch modifizierten Schweine weisen einen stabilen diabetischen Phänotyp auf und eignen sich somit für die Untersuchung von Diabetes-assoziierten Folgeerkrankungen und deren zugrundeliegenden Mechanismen, wie beispielsweise das zu Rhythmusstörungen führende diabetische proarrhythmogene Remodeling (167).

Zudem eignet sich das Schwein besonders für die Untersuchung elektrophysiologischer Vorgänge, da seine EKG-Parameter – einschließlich Herzfrequenz, Aktionspotenzialdauer und Reizleitung – denjenigen des Menschen deutlich nähern kommen als die entsprechenden Kleintiermodelle (*vgl. Tabelle 6*) (164).

	Mensch	Schwein	Hase	Maus
Herzfrequenz (bpm)	60-80	68-100	130-300	600-800
P-Wellen Dauer (ms)	110	60-80	10-50	11-13
PR-Intervall (ms)	120-200	50-120	40-80	30-56
QRS-Dauer (ms)	84-110	70-90	20-60	9-30
QT-Intervall (ms)	400-430	260-380	80-160	30-124

Tabelle 6. Überblick über die EKG-Parameter bei Mensch, Schwein, Hase und Maus. Tabelle modifiziert nach Clauss et al. (164).

Im Vergleich zur Maus eignet sich das Schwein aufgrund seiner dem Menschen ähnlichen Physiologie besonders gut für die Untersuchung von Rhythmusstörungen wie Vorhofflimmern (164). Das Aktionspotenzial der Maus weist im Vergleich zum Menschen mehrere bedeutende Limitationen auf (164):

Insbesondere führen Unterschiede in der Zusammensetzung und Ausprägung der Ionenströme, wie zum Beispiel ein deutlich schwächerer Calcium-Einstrom sowie verstärkte Kaliumströme aufgrund veränderter Expression und Funktion kardialer Kaliumkanäle, zu einer abweichenden Morphologie des Aktionspotenzials (164). Charakteristisch für das murine Aktionspotenzial ist das Fehlen einer ausgeprägten Plateauphase (164). Darüber hinaus sind sowohl das atriale als auch das ventrikuläre Aktionspotential bei der Maus signifikant kürzer als beim Menschen (vgl. Abb. 62) (164).

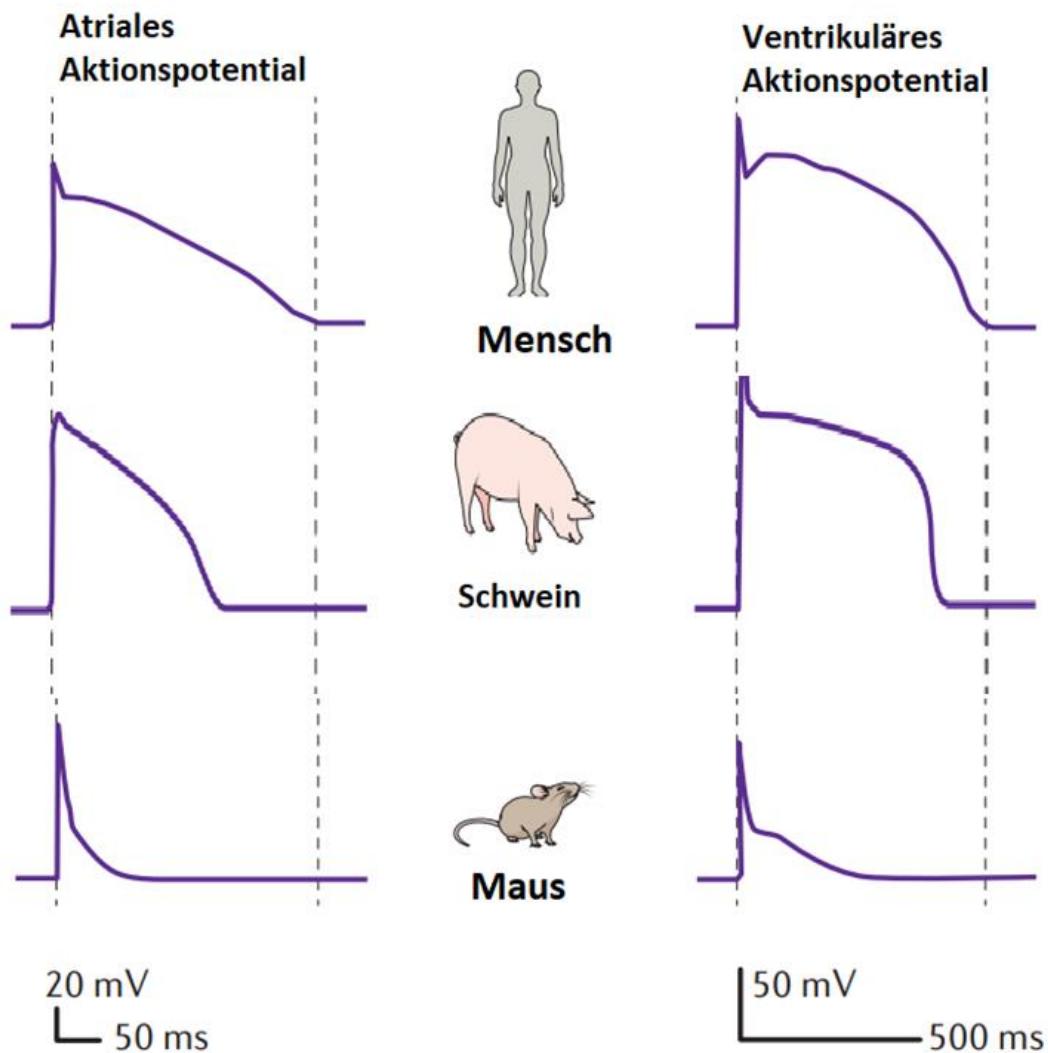


Abbildung 62. Vergleich des atrialen und ventrikulären Aktionspotentials zwischen Mensch, Schwein und Maus. Abbildung modifiziert von Clauss et al. (164).

Das Schwein weist im Vergleich zu Kleintieren eine deutlich größere physiologische Ähnlichkeit zum Menschen auf (164). Mit Ausnahme des transienten auswärtsgerichteten Kaliumstroms (I_{to}) sind im Schwein alle relevanten kardialen Ionenströme vorhanden, die auch im menschlichen Aktionspotential eine Rolle spielen (164). Jüngste Studien haben im Schwein den sogenannten I_{to2} -Strom charakterisiert, der maßgeblich zur Phase 1 der Repolarisation beiträgt (196). Dieser Strom ist funktionell dem transienten auswärtsgerichteten Kaliumstrom (I_{to}) beim Menschen ähnlich (196). Dies führt zu einer dem Menschen sehr ähnlichen Morphologie des kardialen Aktionspotentials (vgl. Abb. 62) (164).

5.2 Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes mellitus

5.2.1 *In vivo*

5.2.1.1 Induzierbarkeit von Vorhofflimmern

Die Framingham Heart Study konnte erstmals zeigen, dass Diabetes mellitus einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung von Vorhofflimmern darstellt (87). In nachfolgenden Untersuchungen wurde dieser Zusammenhang bestätigt: Individuen mit Diabetes weisen eine erhöhte Prävalenz von Vorhofflimmern auf (85, 197). Durch Katheterstimulation konnte im Rahmen dieser Arbeit bei den diabetischen Tieren signifikant häufiger Vorhofflimmern induziert werden als bei den gesunden Kontrolltieren.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten diabetischen INS^{C94Y}-Schweine stellen demnach ein geeignetes translationales Großtiermodell zur Untersuchung der diabetesspezifischen Pathophysiologie von Vorhofflimmern dar.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die INS^{C94Y}-Schweine keine spontane Entwicklung von Vorhofflimmern zeigten, sondern die Arrhythmie ausschließlich nach elektrischer Stimulation auftrat. Eine Studie von Mohsin et al. zeigte einen positiven Zusammenhang zwischen der Dauer der Diabeteserkrankung und dem Risiko für Vorhofflimmern (198): Das Erkrankungsrisiko steigt demnach pro Jahr Diabetesdauer um etwa 3 % (198). Da die in dieser Arbeit verwendeten Tiere zum Zeitpunkt der Untersuchung ein mittleres Alter von lediglich sechs Monaten aufwiesen, könnte das Fehlen spontaner Arrhythmien auf die noch nicht ausreichend lange Expositionsdauer gegenüber dem diabetischen Stoffwechselmilieu zurückzuführen sein.

Hinsichtlich der Dauer der induzierten Vorhofflimmerepisoden konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den diabetischen Tieren und den Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der durch externe Stimulation induzierten Natur der Arrhythmie liegen. Darüber hinaus könnte der diabetische Phänotyp zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht ausreichend ausgeprägt gewesen sein, um zu einer Verlängerung der Vorhofflimmerepisoden zu führen.

5.2.2 *In vitro*

5.2.2.1 Immunologisches Remodeling bei Diabetes mellitus

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels histologischer Analysen nachgewiesen werden, dass CD163⁺ Makrophagen in allen untersuchten kardialen Regionen präsent sind. Zudem zeigte sich eine regionale Heterogenität in der Verteilung dieser Zellen: Sowohl in der Wildtyp-Gruppe als auch bei diabetischen Tieren wurde eine signifikant erhöhte Makrophagen-Dichte im rechten Vorhofohr im Vergleich zum linken Ventrikel beobachtet. Darüber hinaus weisen die diabetischen Tiere auch im linken Vorhofohr eine signifikant höhere Makrophagenanzahl im Vergleich zum linken Ventrikel auf. Auch in der Durchflusszytometrie zeigten die diabetischen Tiere eine signifikante Anreicherung von CD163⁺ Makrophagen im rechten Vorhofohr. Vor dem Hintergrund der bekannten Entstehungslokalisierungen von Vorhofflimmern ist diese regionale Häufung von besonderem Interesse. Während in der Vergangenheit primär die Pulmonalvenen des linken Atriums als Hauptursprung ektoper Erregungen galten, konnten neuere *in vivo*-Studien auch das rechte Vorhofohr als Quelle ektoper Aktivität identifizieren (199-201). Diese Erkenntnis ist insofern von besonderem Interesse, als in unserem Schweinemodell eine vermehrte Ansammlung von CD163⁺ Makrophagen genau in diesem Bereich nachgewiesen wurde, was auf eine mögliche immunologisch vermittelte Rolle bei der Entstehung von Arrhythmien hinweisen könnte.

Weitere Daten stützen diesen Zusammenhang: Bei Patienten mit Vorhofflimmern wurden sowohl im rechten Vorhofohr signifikant erhöhte Mengen an CD163⁺ Makrophagen sowie im linken Vorhofohr an inflammatorischen B- und T-Zellen im Vergleich zu Patienten im Sinusrhythmus nachgewiesen (202, 203). Eine weitere Untersuchung zeigte eine signifikante Anreicherung von CD68⁺ Makrophagen in den linken Vorhofohren von Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten im Sinusrhythmus (146). Darüber hinaus zeigte eine Untersuchung an humanen Gewebeproben eine signifikant erhöhte Anzahl von CCR2⁻ Monozyten/Makrophagen im linken Vorhof sowie im linken Vorhofohr bei Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten, bei denen bislang kein Vorhofflimmern diagnostiziert wurde (204). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass CCR2⁺ Makrophagen als rekrutierte Makrophagen gelten (205).

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Marker CD163 dient als spezifischer Indikator für einen residenten Makrophagen-Phänotyp und dient in der Literatur häufig zur Charakterisierung von anti-inflammatorischen Gewebemakrophagen (206, 207). Diese Unterscheidung ist essenziell, da residente und rekrutierte Makrophagen unterschiedliche Funktionen in Entzündungsprozessen einnehmen (208, 209). Residenten Makrophagen werden eine Rolle als anti-inflammatoryisch zugeschrieben, wohingegen rekrutierte Makrophagen Entzündungen begünstigen (208, 209).

Ein Hinweis darauf, dass diese Beobachtung möglicherweise einen Einfluss auf die kardiale Erregungsleitung haben könnte, ergibt sich aus einer Studie von Hulsmans et al. an Mausmodellen, in der erstmals die Bedeutung von Makrophagen für die Weiterleitung elektrischer Impulse im Herzen aufgezeigt wurde (139). Die Studie demonstrierte, dass Makrophagen im AV-Knoten durch ihre elektrophysiologische Kopplung über Connexin 43 das Aktionspotenzial beeinflussen können (139). Die essentielle Rolle von Makrophagen in der Erregungsleitung wurde zudem anhand von Cd11b^{DTR}-Mäusen, einem Makrophagen-Knockout-Modell, deutlich: Diese Tiere entwickelten infolge des Makrophagenverlusts einen AV-Block, was die Relevanz dieser Zellen für die Aufrechterhaltung der normalen kardialen Erregungsleitung weiter unterstreicht (139, 210). Makrophagen können über verschiedene Mechanismen inflammatorische Prozesse und Fibrose fördern, die ihrerseits die kardiale Erregungsleitung beeinträchtigen (140). Zudem wurde in experimentellen Modellen gezeigt, dass Makrophagen elektrophysiologische Veränderungen hervorrufen können, die ein proarrhythmogenes Milieu begünstigen (211). Die Anwendung von Glukokortikoiden führte dabei zu einer teilweisen Rückbildung dieser Veränderungen, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen immunologischen Prozessen und der Entstehung von Vorhofflimmern hinweist (211).

Eine zentrale Hypothese dieser Arbeit ist, dass Diabetes als inflammatorische Erkrankung eine verstärkte Rekrutierung von Makrophagen induziert. Allerdings zeigte der Vergleich zwischen Wildtyp- und diabetischen Tieren weder in der histologischen Analyse noch in der Durchfluszytometrie einen signifikanten Unterschied in der Anzahl von CD163⁺ Makrophagen zwischen den beiden Kohorten.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass eine inflammatorische Umgebung zu einer verstärkten Rekrutierung von Makrophagen aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe führt (156, 212). Dieser Prozess wird durch proinflammatorische Signale und chemotaktische Faktoren vermittelt, die die Migration und Infiltration von Makrophagen in entzündete Gewebe fördern (156, 212). Diese gewebspezifische Rekrutierung spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion (156, 212). Eine Studie von Al-Rashed et al. an Patienten mit Typ-2-Diabetes konnte zudem nachweisen, dass eine anhaltende Hyperglykämie mit einer verstärkten Rekrutierung von proinflammatorischen Makrophagen in Zusammenhang steht (213). Der in dieser Studie verwendete Makrophagen-Marker CD163 gilt als Indikator für anti-inflammatorische Zellen sowie für residente Gewebemakrophagen. Diese Eigenschaft könnte erklären, warum kein signifikanter Unterschied in der Anzahl dieser Zellen bei den diabetischen Schweinen festgestellt werden konnte (208, 214).

Auch bei den CD163⁻ Zellen, einer Population, die im Rahmen dieser Arbeit auch eingewanderte Makrophagen umfassen sollte, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den diabetischen Tieren und den gesunden Wildtypen festgestellt werden. Ein spezifischer Marker für proinflammatorische Zellen oder eingewanderte Makrophagen könnte möglicherweise einen Unterschied aufzeigen. Allerdings war zum Zeitpunkt dieser Arbeit ein schweinespezifischer Antikörper für diese Zellen leider nicht verfügbar, was die Identifikation und Differenzierung dieser Zellpopulation erschwerte. Eine anhaltende Hyperglykämie steht in direktem Zusammenhang mit einer verstärkten Inflammation (215). Da bei den in dieser Studie verwendeten diabetischen Schweinen Hyperglykämische Spitzen mittels Insulintherapie kontrolliert wurden, könnte dies ein möglicher Grund dafür sein, dass kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von CD163⁻ Zellen zwischen den diabetischen und Wildtyp-Tieren erkennbar war. Die Insulintherapie könnte die Blutzuckerschwankungen stabilisiert und damit die entzündliche Reaktion abgeschwächt haben, wodurch Unterschiede in der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen möglicherweise nicht festgestellt wurden. Die in dieser Studie eingesetzten Schweine waren zum Zeitpunkt der Untersuchung sechs Monate alt. Es ist möglich, dass ein höheres Lebensalter und die damit verbundene längere Krankheitsdauer des Diabetes mellitus die Rekrutierung von Makrophagen bei den diabetischen Tieren beeinflussen könnten. Interessanterweise zeigte die

Durchflusszytometrie eine signifikant verminderte Anzahl von CD172a⁺ Makrophagen im rechten Vorhof der diabetischen Schweine im Vergleich zu den Wildtypen. Auf Grundlage der aktuellen Studienlage wäre bei Diabetes mellitus aufgrund des chronischen Entzündungszustandes jedoch eher eine erhöhte Makrophagendichte zu erwarten (156, 212). CD172a⁺ Makrophagen wurden in früheren Arbeiten im Dottersack sowie in der fetalen Leber beschrieben, was darauf hinweist, dass diese Zellen einen residenten Ursprung haben könnten (216). CD172a ist als Oberflächenmolekül auf Zellen der myeloischen Linie wie dendritischen Zellen und Makrophagen bekannt (217). Über die Interaktion mit dem Liganden CD47 vermittelt CD172a inhibitorische Signale, die sowohl die Aktivierung als auch die Phagozytose dieser Zellen hemmen können (217). Bei Diabetes mellitus liegt häufig eine Dysregulation zwischen pro- und antiinflammatorischen Mechanismen vor (38, 218). Diese könnte dazu beitragen, dass CD172a⁺ Zellen bei den diabetischen Tieren in dieser Region vermindert vorkommen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Schweine zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an CD45⁺ Leukozyten in der Durchflusszytometrie zwischen den diabetischen Tieren und den gesunden Kontrollen. In verschiedenen Studien, die vor allem bei Typ 2 Diabetes durchgeführt wurden, wurde eine wegweisende Rolle von Leukozyten in der Entwicklung der Erkrankung beschrieben: So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass Leukozyten, die im Fettgewebe akkumulieren, einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz bei Typ-2-Diabetes haben (219). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Schwere der Inflammation im direkten Zusammenhang mit der Leukozytenrekrutierung steht (220). In einer proinflammatorischen Umgebung, wie sie bei Diabetes vorliegt, kommt es unter anderem durch die Hochregulierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zu einer verstärkten Rekrutierung von Leukozyten, was die entzündliche Reaktion weiter verstärken kann (220). Unabhängig von Diabetes scheint es auch bei Vorhofflimmern eine vermehrte Akkumulation von CD45⁺ Zellen zu geben, wie eine Studie an humanen Proben von Aguiar et al. zeigen konnte (221). In dieser Studie wurde festgestellt, dass Patienten mit Vorhofflimmern eine höhere Anzahl an CD45⁺ Leukozyten in den Vorhöfen aufweisen als Kontrollprobanden ohne diese Rhythmusstörung (221). Darüber hinaus zeigte sich, dass auch ältere Patienten eine höhere Zahl an CD45⁺ Leukozyten im Vergleich zu jüngeren Kontrollprobanden hatten, wobei diese Beobachtung

jedoch kein signifikantes Niveau erreichte (221). Im Vergleich zu diesen Studien wäre es naheliegend, dass auch die in unserer Studie verwendeten diabetischen Tiere eine höhere Anzahl CD45⁺ Leukozyten aufweisen müssten. Die hier erwähnten Daten wurden am Tiermodell mit Typ 2 Diabetes erarbeitet. Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere hatten einen Diabetes, der vergleichbar mit einem MIDY-Diabetes ist (167). Der MIDY-Diabetes unterscheidet sich von Diabetes Typ 2 oft durch einen unspezifischeren und symptomärmeren Phänotyp (44). So ist bei Erkrankten mit MIDY-Diabetes häufig ein niedrigeres Risikoprofil mit weniger Komorbiditäten, wie beispielsweise Adipositas, vorhanden (44). Diese Faktoren könnten möglicherweise zu einer verminderten Entzündung führen, was wiederum die Rekrutierung von Leukozyten in den gewebeentzündlichen Prozessen reduziert.

Die Hypothese, dass die diabetischen Schweine im Vergleich zu den Wildtypen eine vermehrte Anzahl von Makrophagen im Herzen aufweisen muss somit verworfen werden.

5.2.2.2 Elektrisches Remodeling bei Diabetes mellitus

Connexine sind für die Reizweiterleitung im Herzen essenziell (108). Eine modifizierte Connexin-Expression wurde in früheren Studien bereits mit einer erhöhten Inzidenz von Herzrhythmusstörungen, insbesondere Vorhofflimmern assoziiert (116): Veränderungen in der Connexin-Expression, welche die Funktion der Gap Junctions betreffen, können die elektrische Kopplung zwischen Kardiomyozyten destabilisieren und die Reizweiterleitung im Myokard beeinträchtigen (116).

Eine weitere Hypothese dieser Arbeit lautet, dass Diabetes zu elektrischen Remodeling-Prozessen im Herzen führt, welche mit einer veränderten Reizleitung verbunden sind. Es wird untersucht, ob es eine Veränderung der Connexin-Expression gibt, die möglicherweise zu einer Störung der Gap Junction-Kommunikation zwischen Kardiomyozyten führt. Diese Störung könnte die elektrische Homogenität des Myokards beeinträchtigen und somit das Risiko für die Entwicklung von Vorhofflimmern bei Diabetikern erhöhen.

Im Western Blot konnte beim Vergleich der Connexin 37-Expression zwischen Diabetikern und Wildtyp kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ein

möglicher Hinweis darauf, dass eine diabetische Stoffwechsellage die Expression von Connexin 37 beeinflussen kann, ergibt sich aus Studien, die sich mit der vaskulären Connexin-Expression beschäftigen. Hou et al. untersuchte die Aorta thoracica von diabetogenen Mäusen (222). Bei den Tieren mit Diabetes konnte eine signifikante Reduktion von Connexin 37 im Endothel im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren festgestellt werden (222). Auch eine Studie an Mäusen mit Hyperlipidämie konnte eine signifikante Reduktion der Connexin 37-Expression in der Aorta nachweisen (223). Die bisherigen Untersuchungen an Kleintiermodellen deuten darauf hin, dass Diabetes eine Modulation der Connexin-Expression bewirken kann. Allerdings wurden die erwähnten Studien an Gefäßen und nicht am Myokard selbst durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss von Diabetes auf die Expression von Connexin 37 im Myokard nachgewiesen werden. Daher bleibt die spezifische Rolle von Connexin 37 im proarrhythmogenen Remodeling des Herzens unter diabetischen Bedingungen unklar.

Bei den diabetischen Schweinen wurde eine signifikante Erhöhung der Connexin 40-Expression im rechten Atrium, linken Atrium und linken Ventrikel im Vergleich zu den Wildtypen festgestellt. Connexin 40 ist das am meisten exprimierte Connexin in den Atrien (108). Diese Ergebnisse lassen sich mit einer Studie an humanen Proben vergleichen, in der bei Patienten mit Vorhofflimmern eine erhöhte Connexin 40-Expression im linken Atrium nachgewiesen wurde (113). Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass die Probanden in dieser Studie im Gegensatz zu den hier untersuchten diabetischen Tieren keinen Diabetes hatten. In einer Studie an Ratten, bei denen durch Streptozytokin-Injektion Diabetes induziert wurde, konnte – ähnlich zu den in unserem Modell beobachteten Veränderungen – mittels PCR eine Hochregulation der mRNA-Expression des Gens Gja5, das für Connexin 40 kodiert, nachgewiesen werden (125). Ebenso wurde eine erhöhte Expression der Gene Gja1 und Gja7, die für Connexin 43 bzw. Connexin 45 kodieren, bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren festgestellt (125). Diese Hochregulation war jedoch auf die Region des Sinusknotens beschränkt, während in den Atrien und Ventrikeln keine vergleichbare Expressionserhöhung nachgewiesen werden konnte (125). Die zentrale Bedeutung von Connexin 40 für die kardiale Reizweiterleitung wird durch eine Studie an Patienten mit einer Connexin-40-Mutation verdeutlicht (224): Eine Mutation im

GJA5-Gen führt zur Einführung eines Stoppcodons und resultiert in einer verkürzten, mutierten Form von Connexin 40 (224). Diese Mutation ist mit einer familiären Prädisposition für Vorhofflimmern assoziiert (224). Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien eine reduzierte Expression von Connexin 40 bei Diabetes nachgewiesen werden (126, 225): Gewebeproben von Patienten mit Typ-2-Diabetes zeigten im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes eine signifikant reduzierte Expression von Connexin 40 im rechten Vorhofohr (126). Eine Studie an diabetischen Ratten zeigte unter anderem eine reduzierte Expression von Connexin 40 in den Vorhöfen (225). Als mögliche Ursache wird eine erhöhte Konzentration von Verzuckerungsendprodukten (AGEs) bei Diabetes diskutiert, die möglicherweise zur Dysregulation der Connexin-Expression beitragen könnten (225). Auch bei Patienten mit Vorhofflimmern wurde eine verringerte Expression von Connexin 40 in den Vorhöfen nachgewiesen (226). Zusammenfassend wird eine veränderte Expression von Connexin 40 mit dem Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert (113, 225). Ob es dabei zu einer erhöhten oder verminderten Expression kommt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen und bislang nicht abschließend geklärt.

Im Western Blot ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von Connexin 43 zwischen Wildtyp- und diabetischen Schweinen nachweisen. Auch die histologischen Analysen zeigten keine abweichenden Befunde zwischen den beiden Gruppen. Es gibt jedoch in anderen Tiermodellen Hinweise auf Veränderungen der Connexin 43-Expression (128): In einem Rattenmodell mit streptozotocininduziertem Diabetes konnten sowohl erhöhte Connexin 43-Spiegel als auch eine verstärkte Verteilung von Connexin 43 in den Ventrikeln nachgewiesen werden (128). Während in dem Schweinemodell in der vorliegenden Arbeit der Diabetes infolge einer Mutation im *INS*-Gen auftritt, wurde der Diabetes im genannten Rattenmodell pharmakologisch durch das pankreatotoxische Streptozotocin induziert. Die unterschiedliche Pathogenese der Erkrankung könnte sich auf die kardialen molekularen Veränderungen auswirken, sodass direkte Vergleiche nur mit Vorsicht zu ziehen sind. Veränderung der Connexin 43-Expression wurde in der Literatur nicht nur mit Diabetes, sondern auch mit Arrhythmien in Verbindung gebracht (109): In einem Schweinemodell wurde durch Gentransfer die Expression von Connexin 43 gezielt in den Vorhöfen gesteigert (109). Bei den Schweinen wurde Vorhofflimmern mittels atrialem Burst-Pacing induziert (109).

Während ein Teil der unbehandelten Wildtyp-Tiere im Verlauf des 14-tägigen Beobachtungszeitraums eine Reduktion des atrialen Connexin 43 aufwiesen und teilweise persistierendes Vorhofflimmern entwickelten, zeigte sich bei den transgenen Tieren kein Auftreten von Vorhofflimmern (109). Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine erhöhte atriale Expression von Connexin 43 einen protektiven Effekt gegenüber der Entwicklung von Vorhofflimmern haben könnte (109). Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit die Versuchstiere unmittelbar nach Abschluss der *in vivo*-Experimente terminiert. Daher war es nicht möglich zu untersuchen, ob sich im weiteren Verlauf eine veränderte Expression von Connexin 43 entwickelt hätte oder ob sich permanentes Vorhofflimmern manifestiert hätte. Diese Fragestellungen könnten im Rahmen zukünftiger Experimente weiterverfolgt werden.

In der Analyse der Connexin 45-Expression konnte im AV-Knoten eine signifikant niedrigere Anzahl an Connexin 45 bei den diabetischen Tieren festgestellt werden (227). Connexin 45 ist das dominierende Connexin in Schrittmacherzellen des Herzens, zu denen auch der AV-Knoten zählt (108). Ob die reduzierte Connexin 45-Expression kausal mit der beobachteten atrioventrikulären Reizleitungsstörung in Verbindung steht, bleibt derzeit unklar. Die entscheidende Rolle von Connexin 45 in der kardialen Erregungsleitung wurde bereits in verschiedenen Mausmodellen demonstriert (228-230). So handelt es sich bei Connexin 45 um das erste Connexin, das während der Embryogenese des Herzens exprimiert wird (231). Embryonale Connexin 45-Knockout-Mäuse entwickeln infolgedessen einen vollständigen Block der elektrischen Erregungsleitung im Herzen und sterben in der Regel um den 10. Tag der Embryonalentwicklung an Herzversagen (228). In einem weiteren Connexin 45- Knockout Mausmodell wurden AV-Blockierungen im Rahmen eines höhergradigen AV-Block Grad II bis Grad III beobachtet (229). Tamoxifen-induzierte, adulte Connexin 45-Knockout-Mäuse sind zwar überlebensfähig, zeigen jedoch eine deutlich verzögerte Erregungsleitung im AV-Knoten (230). Vor diesem Hintergrund erscheint die bei diabetischen Schweinen beobachtete Reduktion der Connexin 45-Expression besonders interessant, da Connexin 45 in mehreren Studien als essenziell für die elektrische Kopplung und Erregungsweiterleitung im AV-Knoten beschrieben wurde (228, 230, 231). So konnte in einer dänischen Kohortenstudie ein signifikanter Zusammenhang zwischen Typ-2-Diabetes mellitus und dem Auftreten eines AV-Blocks

Grad III nachgewiesen werden, wobei Diabetes als unabhängiger Risikofaktor identifiziert wurde (232). Ob die Connexin 45-Expression dabei eine zentrale pathogenetische Rolle spielt, ist bislang nicht geklärt. Neben Veränderungen in der Connexin-Expression gibt es Hinweise dafür, dass andere diabetesassoziierte Faktoren – etwa Elektrolytverschiebungen, autonome Dysregulation oder Hypertonie – zur Entwicklung höhergradiger atrioventrikulärer Leistungsstörungen beitragen können (232). In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhofflimmern untersucht. Ein direkter Zusammenhang zwischen einer veränderten Connexin 45-Expression und einem vermehrten Auftreten von Vorhofflimmern kann anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht festgestellt werden. Dennoch stellt die nachgewiesene Veränderung der Connexin 45-Expression bei diabetischen Tieren eine interessante Beobachtung dar, die als Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen dienen kann. Um einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen einer gestörten Connexin 45-Expression und atrioventrikulären Leistungsstörungen im Rahmen eines diabetischen Stoffwechselmilieus zu klären, sind weitere experimentelle Studien erforderlich.

Zusammenfassend zeigt sich somit eine veränderte Expression von Connexin 40 sowie Connexin 45 in bestimmten Regionen bei den diabetischen Schweinen, was möglicherweise auf ein elektrisches Remodeling bei Diabetes hinweisen könnte.

5.3 Der Einfluss von Dapagliflozin auf das proarrhythmogene Remodeling bei Diabetes mellitus

5.3.1 *In vivo*

5.3.1.1 Der Einfluss von Dapagliflozin auf die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern

Bei den mit dem SGLT2-Inhibitor Dapagliflozin behandelten diabetischen INS^{C94Y}-Schweinen konnte nach elektrischer Stimulation signifikant seltener Vorhofflimmern induziert werden als bei den unbehandelten diabetischen Kontrolltieren. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bereits publizierten Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Einnahme von SGLT2-Inhibitoren mit einer signifikanten Reduktion der Inzidenz von Vorhofflimmern assoziiert ist (233-235).

In der vorliegenden Untersuchung zeigte die Behandlung der diabetischen INS^{C94Y}-Schweine mit einem SGLT2-Inhibitor keinen signifikanten Einfluss auf die Dauer der nach Stimulation induzierten Vorhofflimmerepisoden im Vergleich zu unbehandelten diabetischen Tieren. Die Dauer der Arrhythmieepisoden blieb zwischen beiden Gruppen vergleichbar. Ein Grund hierfür könnte beispielsweise die geringe Behandlungsdauer mit SGLT2-Inhibitoren von wenigen Monaten sein oder dass es nicht spontan zu Vorhofflimmern kam, sondern dass diese Episoden jeweils iatrogen ausgelöst wurden.

Der protektive Effekt von SGLT2-Inhibitoren wurde kürzlich in einer Studie an Patienten mit Typ-2-Diabetes beschrieben, die eine Katheterablation erhalten hatten (236). Dabei zeigte sich, dass Patienten unter SGLT2-Inhibitor-Therapie nach der Ablation ein signifikant geringeres Risiko für Rezidive von Herzrhythmusstörungen aufweisen (236). In einer Studie an Schweinen, bei denen Vorhofflimmern durch atriales Pacing induziert wurde, erhielten die Tiere während der *in vivo*-Versuche einen intravenösen Bolus von 3 mg/kg Körpergewicht Dapagliflozin (82). Interessanterweise konnte durch diese Bolusgabe die Vorhofflimmerepisode in 100 % der Fälle terminiert werden (82). In einer weiteren Kohorte wurde über einen Zeitraum von drei Wochen täglich eine hochdosierte Behandlung mit Dapagliflozin (3 mg/kg Körpergewicht i.v.) durchgeführt (82). Mittels

implantiertem Schrittmacher wurde eine Burst-Stimulation zur Induktion von Vorhofflimmern appliziert (82). Interessanterweise konnte die Dapagliflozin-Behandlung in dieser Studie eine Dilatation der Atrien verhindern (82). Zudem zeigten die mit Dapagliflozin behandelten Tiere eine verringerte Last an Vorhofflimmern (82).

Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit ist zu beachten, dass die Schweine keinen Bolus während einer akuten Flimmerepisode erhielten, sondern lediglich eine einmal tägliche orale Dosis von 10 mg Dapagliflozin. Diese Dosis liegt deutlich unterhalb der in der hier vorgestellten Studie verwendeten Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht. Für zukünftige Untersuchungen könnte eine höhere Dosis der Dapagliflozin-Behandlung einen vielversprechenden Ansatzpunkt darstellen. Diese Studie sowie die Daten der vorliegenden Arbeit verdeutlichen den protektiven Einfluss von Dapagliflozin auf die Entstehung und Progression von Vorhofflimmern (82) .

5.3.2 *In vitro*

5.3.2.1 Der Einfluss von Dapagliflozin auf das immunologische Remodeling

Basierend auf den Ergebnissen unserer *in vivo*-Versuche und der bestehenden Literatur, die eine verringerte Inzidenz von Vorhofflimmern nach Behandlung mit SGLT2-Inhibitoren wie Dapagliflozin zeigen, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass SGLT2-Inhibitoren möglicherweise eine elektrische und imunologische Modulation im Herzgewebe bewirken, die zur Reduktion der Vorhofflimmerinzidenz führt (79). Der genaue Mechanismus, durch den diese Effekte vermittelt werden, bleibt jedoch bislang unklar und wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Im Rahmen der histologischen Auswertung der CD163⁺ Makrophagen zeigte sich in der mit Dapagliflozin behandelten Schweinekohorte – vergleichbar mit der Kohorte der Wildtypen sowie unbehandelten diabetischen Tieren – im rechten Vorhofohr im Vergleich zur entsprechenden Kontrollregion des linken Ventrikels ein tendenzieller Anstieg der Makrophagenanzahl. Dieser Trend zur lokalen Akkumulation von CD163⁺ Makrophagen erreichte jedoch mit einem p-Wert von 0,08 knapp kein statistisch signifikantes Niveau. Ergänzend hierzu ergaben durchflusszytometrische Analysen eine signifikante Zunahme der CD163⁺ Makrophagen im rechten Vorhofohr im Vergleich zur Kontrollregion.

Im zweiten Schritt wurde die Gruppe der mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Tiere mit den unbehandelten diabetischen Schweinen verglichen. In der Durchflusszytometrie konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von CD172⁺ Makrophagen zwischen den diabetischen Schweinen und den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen festgestellt werden. In der Histologie konnte im Vergleich zu den unbehandelten diabetischen Schweinen jedoch im linken Vorhofohr der mit Dapagliflozin behandelten Tiere eine signifikant reduzierte Anzahl von CD163⁺ Makrophagen festgestellt werden. In der Durchflusszytometrie war jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an CD163⁺ Makrophagen zwischen den Gruppen erkennbar. Es wurde eine vermehrte Anzahl von CD163⁻ rekrutierten Makrophagen im rechten Atrium bei den diabetischen Schweinen im Vergleich zu den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Tieren festgestellt. Dies steht im Kontrast zu einer Studie an diabetischen Mäusen

(237). Hier konnte gezeigt werden, dass Dapagliflozin die Einwanderung von proinflammatorischen CD11c⁺ Makrophagen signifikant verringert (237). Bei der Gruppe der antiinflammatorischen CD206⁺ Makrophagen wurde hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt (237). Eine weitere Untersuchung von Lee et al. an Ratten mit Myokardinfarkt zeigte, dass SGLT-2-Inhibitoren auch die Anzahl von residenten, anti-inflammatorischen Makrophagen reduzieren können (238). Auch in der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Reduktion von residenten Makrophagen im linken Vorhofohr nach Dapagliflozin-Behandlung. Da Remodeling-Prozesse nach einem Myokardinfarkt, ähnlich wie bei Diabetes, als immunologische Effekte betrachtet werden, sind die immunologischen Bedingungen dieser Studie und der vorliegenden Arbeit zwar in gewissen Teilen ähnlich, allerdings in ihren direkten Ergebnissen nicht vollständig vergleichbar. Dennoch stellt der Einfluss von SGLT-2-Inhibitoren auf die Anzahl von Makrophagen in immunologischen Prozessen eine interessante Gemeinsamkeit dar, die für zukünftige Forschungen relevant sein könnte (238). Eine gemeinsame Eigenschaft aller dieser Studien ist, dass die Untersuchung von Makrophagen im Kontext von inflammatorischen Erkrankungen an Nagetieren durchgeführt wurde, nicht jedoch an Großtieren. In den Studien an Ratten oder Mäusen wurden andere Antikörper verwendet, die zwar den gleichen Zelltyp anvisieren sollten, aber unterschiedliche Antikörper erschweren jedoch die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse. Der Einsatz identischer Antikörper könnte die Vergleichbarkeit zwischen den Studien an Klein- und Großtieren erhöhen.

In der Durchflusszytometrie zeigten die mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweine signifikant weniger CD45⁺ Leukozyten im rechten Vorhofohr und im rechten Atrium im Vergleich zu den unbehandelten diabetischen Tieren. Es ist jedoch zu beachten, dass vergleichende Literatur zur Untersuchung des Effekts von SGLT-2-Inhibitoren auf Leukozyten bei Diabetes oder Vorhofflimmern im Zeitpunkt dieser Dissertation nicht vorliegt. Eine Studie von Nikolaou et al. konnte zeigen, dass die Verabreichung von Empagliflozin, einem SGLT-2-Inhibitor, 48 Stunden vor und nach der Induktion eines akuten Myokardinfarkts zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen-Infiltration im Herz führte, einer spezifischen Untergruppe von Leukozyten (239). Diese Beobachtung ähnelt den Ergebnissen unserer Studie, bei der eine reduzierte Anzahl von Leukozyten bei den mit einem SGLT-2-Inhibitor behandelten diabetischen Tieren festgestellt

wurde. Aufgrund der methodischen Unterschiede im Versuchsaufbau sollten diese Daten jedoch mit Vorsicht verglichen werden. Die reduzierte Leukozyteninfiltration in den mit SGLT-2-Inhibitoren behandelten Tieren deutet darauf hin, dass Dapagliflozin möglicherweise entzündungshemmende Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem ausübt, indem es die Rekrutierung von proinflammatorischen Zellen im Herzgewebe verringert.

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Behandlung mit Dapagliflozin bei den diabetischen Schweinen einen Einfluss auf die Anzahl der Makrophagen und Monoxyten in bestimmten kardialen Regionen hat.

5.3.2.2 Der Einfluss von Dapagliflozin auf das elektrische Remodeling

Im Western Blot konnte kein signifikanter Unterschied in der Connexin 37-Expression zwischen den diabetischen Schweinen und den mit Dapagliflozin behandelten Tieren festgestellt werden. Bei Connexin 40 zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression in mehreren Herzregionen, einschließlich des rechten Atriums, rechten Ventrikels, linken Vorhoftores, linken Atrium, linken Ventrikel, Sinusknotens und interventrikulären Septums bei den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Schweinen. Im Fall von Connexin 43 war eine signifikante Reduktion in den Regionen des rechten und linken Vorhoftor, sowie im linken Ventrikel und Sinusknoten bei der DM+DAPA-Kohorte zu beobachten, wobei die Expression im linken Atrium mit einem p-Wert von 0,08 knapp nicht signifikant war. In der Analyse der Connexin-Expression zeigte sich bei der Connexin 43 Färbung eine signifikant geringere Expression im linken Atrium bei den mit Dapagliflozin behandelten diabetischen Tieren. Bei den Western Blots für Connexin 45 wurde signifikant erniedrigte Connexin 45-Expression im rechten Atrium bei den mit Dapagliflozin behandelten Tieren festgestellt.

Studien, die die Auswirkungen von SGLT2-Inhibitoren auf die Connexin-Expression untersuchen, sind derzeit sehr begrenzt. Eine Studie an Ratten mit Typ-2-Diabetes konnte zeigen, dass unbehandelte Ratten eine signifikant geringere Connexin 43-Expression aufwiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe (240). Nach der Behandlung mit Dapagliflozin wurde jedoch eine Erhöhung der Connexin 43-Expression bei den diabetischen Tieren festgestellt (240). In einem Rattenmodell

für Myokardinfarkt konnte nachgewiesen werden, dass die mit Dapagliflozin behandelten Tiere eine verminderte Anfälligkeit für Herzrhythmusstörungen zeigten (241). Bei diesen Tieren wurde nach dem Myokardinfarkt eine Reduktion der Connexin 43-Expression an den Glanzstreifen beobachtet, während die Connexin 43-Expression nach der Gabe von Dapagliflozin signifikant hochreguliert wurde (241). Mäuse, die mit dem Toxin Ponatinib behandelt wurden, zeigten eine zunehmende Lateralisierung sowie Phosphorylierung von Connexin 43 (242). Interessanterweise konnte der SGLT2-Inhibitor Empagliflozin eine Lateralisierung von Connexin 43 verhindern (242). Eine vermehrte Lateralisierung von Connexin 43 wird auch mit Vorhofflimmern in Zusammenhang gebracht (116).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Dapagliflozin einen Einfluss auf die Connexin-Expression bei den hier untersuchten Tieren hat.

6. Limitationen

Trotz der wertvollen Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, gibt Limitationen, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Eine Limitation dieser Studie betrifft die Verfügbarkeit und Spezifität von Antikörpern. In experimentellen Studien an Kleintieren werden Antikörper verwendet, die für das Modelltier optimiert sind. Diese Antikörper sind jedoch nicht immer für Großtiermodelle wie Schweine geeignet. Viele kommerziell erhältliche Antikörper, die für Kleintiere validiert wurden, sind für Schweine nicht verfügbar oder funktionieren nicht. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erstellten Antikörperpanels zeigen eine gute Spezifität für Schweine. Allerdings konnten einige Experimente aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit der Antikörper nicht durchgeführt werden.

Auch wenn die Tiere unmittelbar nach den *in vivo*-Experimenten terminiert wurden, liefern die gewonnenen Daten bereits wertvolle Hinweise auf funktionelle Unterschiede zwischen den Gruppen. Jedoch kann in der hier vorliegenden Arbeit nur schwer eine Aussage zu Langzeiteffekten von Vorhofflimmern bei Diabetes getroffen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine verlängerte Beobachtungsperiode im Anschluss an die *in vivo*-Versuche in zukünftigen Studien vielversprechende Einblicke in die Entwicklung von Vorhofflimmern bei Diabetes sowie in mögliche strukturelle und molekulare Veränderungen im Verlauf liefern könnte.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Vorhofflimmern ist eine weit verbreitete Herzrhythmusstörung, die mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert ist. Trotz vielfältiger medikamentöser und interventioneller Therapieansätze sind diese häufig nicht ausreichend effektiv oder mit erheblichen Nebenwirkungen behaftet. Besonders Patienten mit Diabetes mellitus weisen eine erhöhte Prävalenz für Arrhythmien, insbesondere Vorhofflimmern, auf. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind jedoch bislang nur unzureichend verstanden. Evidenz aus aktuellen Studien legt nahe, dass eine chronisch hyperglykämische Stoffwechsellage spezifische immunologische und elektrophysiologische Remodeling-Prozesse im Myokard induzieren könnte, die unter Umständen zur Entwicklung einer proarrhythmogenen Umgebung beitragen. Die genauen Remodeling-Prozesse sind aktuell nur unzureichend erforscht. In vorherigen Studien wurde dem SGLT-2-Inhibitor Dapagliflozin eine kardioprotektive Rolle zugeschrieben. Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen dieses Effekts sind jedoch bislang unzureichend erforscht und stellen einen zentralen Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die durch Diabetes mellitus induzierten immunologischen und elektrischen Remodeling-Prozesse des Myokards zu untersuchen und mögliche Effekte einer spezifischen Intervention mit dem SGLT-2-Inhibitor Dapagliflozin zu evaluieren.

Hierzu wurde ein translationales Großtiermodell unter Verwendung transgener INS^{C94Y}-Schweine mit neonatalem Diabetes etabliert. In *in vivo*-Experimenten zeigten diese Tiere eine signifikant höhere Anfälligkeit für Vorhofflimmern im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Kontrollen. Immunhistochemisch konnten CD163⁺ Makrophagen in allen untersuchten Herzregionen festgestellt werden. Bei den Wildtyp-Schweinen zeigte sich eine fokale Anreicherung im rechten Vorhofohr. Bei den diabetischen Tieren war eine signifikant größere Anzahl CD163⁺ Makrophagen im rechten sowie linken Vorhofohr identifizierbar. Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Gesamtanzahl der CD163⁺ Makrophagen zwischen diabetischen und Wildtyp-Tieren. Elektrophysiologische Analysen wiesen auf eine Hochregulation der Connexin 40- und Runterregulation Connexin 45-Expression in bestimmten Regionen bei den diabetischen Tieren hin.

Die Behandlung einer diabetischen Kohorte mit Dapagliflozin führte zu einer signifikant geringeren Induktion von Vorhofflimmern nach elektrischer Stimulation. Parallel zeigten sich Hinweise auf eine reduzierte Anzahl von CD163⁺ Makrophagen sowie CD45⁺ Leukozyten in bestimmten Regionen bei den mit Dapagliflozin behandelten Tieren. Auf elektrophysiologischer Ebene zeigte sich bei den mit Dapagliflozin behandelten Diabetikern eine verringerte Expression von Connexin 40, Connexin 43 und Connexin 45 im Vergleich zur unbehandelten diabetischen Gruppe in bestimmten Regionen.

Die vorliegenden Ergebnisse liefern wichtige Hinweise auf die Rolle von durch Diabetes mellitus induzierten immunologischen und elektrischen Remodeling-Prozessen bei der Entstehung von Vorhofflimmern. Insbesondere der modulierende Einfluss von SGLT-2-Inhibitoren auf immunologische und elektrophysiologische Parameter sowie der klinische Befund, dass nach SGLT-2-Inhibition signifikant weniger häufig Vorhofflimmern induziert werden kann, eröffnen neue Einblicke in den potenziellen Wirkmechanismus dieser Substanzklasse. Zukünftige Studien sollten sich auf die detaillierte Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Signalwege konzentrieren, um ein vertieftes Verständnis der beobachteten Remodeling-Prozesse zu ermöglichen. Dies könnte wesentlich dazu beitragen, die Inzidenz und Mortalität von Vorhofflimmern in dieser Hochrisikopopulation nachhaltig zu senken und die Therapie zu verbessern.

Abstract (Englisch)

Atrial fibrillation is a common arrhythmia associated with significant morbidity and mortality. Current pharmacological and interventional treatments often lack long-term efficacy and can lead to substantial side effects, highlighting the urgent need for novel therapeutic and preventive approaches targeting the underlying arrhythmogenic mechanisms. Diabetes mellitus, a condition of growing global prevalence, is known to increase the risk of arrhythmias, yet the molecular and cellular mechanisms remain insufficiently understood. Recent evidence suggests that chronic hyperglycemia may induce specific immunological and electrophysiological remodeling processes within the myocardium, contributing to a pro-arrhythmogenic substrate. These remodeling processes are still insufficiently characterized. Prior studies have attributed a cardioprotective effect to the SGLT-2 inhibitor dapagliflozin. This study aimed to investigate diabetes-induced immunological and electrical remodeling in a translational large animal model and to assess the potential modulatory effects of the SGLT-2 inhibitor dapagliflozin.

Using transgenic INS^{C94Y} pigs with neonatal diabetes, three cohorts were studied: diabetic pigs, healthy wild-type controls, and diabetic pigs treated with dapagliflozin. *In vivo*-experiments demonstrated that diabetic pigs exhibited a significantly higher susceptibility to atrial fibrillation following electrical stimulation compared to healthy controls. CD163⁺ macrophages were present in all cardiac regions, with accumulation in the right atrial appendage of wild-type animals. Diabetic pigs showed significantly increased CD163⁺ macrophage infiltration in both the right and left atrial appendages, although the overall number of CD163⁺ macrophages did not differ significantly between diabetic and non-diabetic animals. Electrophysiological assessments demonstrated upregulation of connexin 40 and downregulation of connexin 45 in specific atrial regions of diabetic pigs compared to controls.

Dapagliflozin treatment markedly reduced atrial fibrillation inducibility in diabetic pigs. This effect was accompanied by a reduction in CD163⁺ macrophages and CD45⁺ leukocytes in selected atrial regions. Moreover, dapagliflozin-treated animals exhibited decreased expression of connexin 40, connexin 43, and connexin

45 compared to untreated diabetic controls in certain regions, suggesting an influence on gap junction remodeling.

Overall, the results highlight the role of diabetes-induced immunological and electrical remodeling in the development of atrial fibrillation. These findings provide new insights into the potential mechanisms underlying the cardioprotective effects of SGLT-2 inhibitors in diabetes. Further research is needed to investigate the detailed pathophysiological mechanisms of diabetes-related atrial remodeling and the protective role of SGLT-2 inhibitors.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich die Gelegenheit nutzen, all denen zu danken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, PD Dr. med. Sebastian Clauß, der mir mit fachlicher Kompetenz und wertvollen Impulsen stets zur Seite stand. Für die Einführung in die Wissenschaft und die Möglichkeit, selbstständig zu arbeiten, bin ich sehr dankbar.

Zudem danke ich meiner gesamten Arbeitsgruppe für die spannende Zeit während der Versuche und das schöne Miteinander. Diese Arbeit entstand dann plötzlich inmitten der Pandemie – eine Phase, die durch die positive Atmosphäre im Labor deutlich erleichtert wurde. Ich denke gern an die gemeinsame Zeit im Labor zurück und werde sie immer als sehr besonders in Erinnerung behalten.

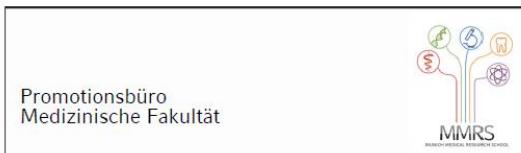
Ein besonderer Dank gilt unseren Tierärztinnen Valerie, Julia und Nora, ohne deren engagierte Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ebenso danke ich Dr. Ruibing Xia, die mir nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich stets zur Seite stand – thank you for everything, Bing!

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeitenden und Doktoranden der AG Clauss – Bianca, Philipp, Dominik, Julia, Lina, Hannes, Aparna, Li, Hao, Bing, Sarah –, das Team der AG Merkus – Prof. Dr. Daphne Merkus, Jules, Theresa und Payel - sowie alle Mitarbeitenden im Walter-Brendel-Zentrum für die stets angenehme Zusammenarbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch meinen Freunden, die mit ihrer Herzlichkeit immer für mich da waren. Ihr macht das Leben nicht nur leichter, sondern auch so viel schöner und wertvoller.

Zuletzt möchte ich mich vor allem bei meiner Familie von ganzem Herzen für ihre bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken.

Affidavit



Eidesstaatliche Versicherung

Name, Vorname Loy, Simone _____

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

***Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes mellitus am
INS^{C94Y}-Schweinemodell***

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

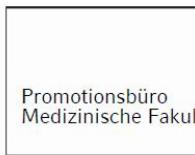
Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.01.2026

Ort, Datum

S.Loy _____
Unterschrift Doktorandin

Übereinstimmungserklärung



**Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation
mit der elektronischen Fassung**

Loy, Simone _____
Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

***Proarrhythmogenes Remodeling bei Diabetes mellitus am
INS^{C94Y}-Schweinemodell***

In Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 14.01.2026

S. Loy

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Ausbildung

2020-2026	<i>Promotion,</i> Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern München
05/2024	<i>Approbation als Ärztin,</i> Regierung von Oberbayern
2017-2024	<i>Studium Humanmedizin,</i> Ludwigs-Maximilians-Universität München
2009-2017	<i>Abitur,</i> Staatliches Landesgymnasium Marquartstein

Berufserfahrung

seit 09/2024	<i>Assistenzärztin</i>
2023-2024	<i>Praktisches Jahr</i> in Zürich, Kapstadt und Berlin
2022-2023	<i>Studentische Hilfskraft in der Kardiologie,</i> Praxis Kardiologie im Süden, München
2021-2022	<i>Studentische Hilfskraft in der Allgemeinmedizin,</i> Hausarztpraxis Dr. Fischer-Brandes, München
2018-2020	<i>Studentische Hilfskraft als OP-Assistenz,</i> Dr. Lubos Kliniken, München

S.Loy

Unterschrift Doktorandin

Publikationsliste

Im Rahmen dieser Dissertation wurde an folgenden Publikationen mitgewirkt:

Xia R, Loy S, Kääb S, Titova A, Schulz C, Massberg S, Clauss S. ***Isolation and Culture of Resident Cardiac Macrophages from the Murine Sinoatrial and Atrioventricular Node.*** J Vis Exp. 2021 May 7;(171). doi: 10.3791/62236. PMID: 34028452.

Xia R, Tomsits P, Loy S, Zhang Z, Pauly V, Schüttler D, Clauss S. ***Cardiac Macrophages and Their Effects on Arrhythmogenesis.*** Front Physiol. 2022 Jun 22;13:900094. doi: 10.3389/fphys.2022.900094. PMID: 35812333; PMCID: PMC9257039.

S., Tomsits, P., Vlcek, J., Pauly, V., Hesse, N., Xia, R., Loy, S., Volz, L.-S., Villgrater, H. E., Kottu, L., Renner, S., Kaab, S., Wolf, E., & Schüttler, D. (2022). PO-630-07 ***Investigation of Diabetes-induced atrial remodeling in a preclinical large animal model.*** Heart Rhythm, 19(5), S166-S167.

Pauly V, Vlcek J, Zhang Z, Hesse N, Xia R, Bauer J, Loy S, Schneider S, Renner S, Wolf E, Kääb S, Schüttler D, Tomsits P, Clauss S. ***Effects of Sex on the Susceptibility for Atrial Fibrillation in Pigs with Ischemic Heart Failure.*** Cells. 2023 Mar 23;12(7):973. doi: 10.3390/cells12070973. PMID: 37048048; PMCID: PMC10093477.

Literaturverzeichnis

1. Totland MZ, Omori Y, Sørensen V, Kryeziu K, Aasen T, Brech A, et al. Endocytic trafficking of connexins in cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2023;1869(7):166812.
2. Nesheiwat Z, Goyal A, Jagtap M. Atrial Fibrillation. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
3. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Cervellin G. Global epidemiology of atrial fibrillation: An increasing epidemic and public health challenge. *Int J Stroke.* 2021;16(2):217-21.
4. Cintra FD, Figueiredo MJO. Atrial Fibrillation (Part 1): Pathophysiology, Risk Factors, and Therapeutic Basis. *Arq Bras Cardiol.* 2021;116(1):129-39.
5. Kornej J, Börschel CS, Benjamin EJ, Schnabel RB. Epidemiology of Atrial Fibrillation in the 21st Century. *Circ Res.* 2020;127(1):4-20.
6. Brundel B, Ai X, Hills MT, Kuipers MF, Lip GYH, de Groot NMS. Atrial fibrillation. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8(1):21.
7. van Marion DM, Lanters EA, Wiersma M, Allessie MA, Brundel BB, de Groot NM. Diagnosis and Therapy of Atrial Fibrillation: The Past, The Present and The Future. *J Atr Fibrillation.* 2015;8(2):1216.
8. Van Gelder IC, Rienstra M, Bunting KV, Casado-Arroyo R, Caso V, Crijns HJGM, et al. 2024 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): Developed by the task force for the management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC), with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. Endorsed by the European Stroke Organisation (ESO). *European Heart Journal.* 2024;45(36):3314-414.
9. Schleberger R, Rillig A, Kirchhof P, Metzner A, Reissmann B. [Update atrial fibrillation: the 2020 ESC guidelines and recent data on early rhythm control]. *Herzschriftmacherther Elektrophysiol.* 2021;32(2):257-63.
10. Rienstra M, Lubitz SA, Mahida S, Magnani JW, Fontes JD, Sinner MF, et al. Symptoms and functional status of patients with atrial fibrillation: state of the art and future research opportunities. *Circulation.* 2012;125(23):2933-43.
11. Romero I, Nedios S, Kriatselis C. Diagnosis and management of atrial fibrillation: an overview. *Cardiovasc Ther.* 2014;32(5):242-52.
12. Kozlowski D, Budrejko S, Lip GY, Rysz J, Mikhailidis DP, Raczk G, et al. Lone atrial fibrillation: what do we know? *Heart.* 2010;96(7):498-503.
13. Potpara TS, Lip GY. Lone atrial fibrillation - an overview. *Int J Clin Pract.* 2014;68(4):418-33.
14. Wejs B, Schotten U, Crijns HJ. Pathophysiology of idiopathic atrial fibrillation - prognostic and treatment implications. *Curr Pharm Des.* 2015;21(5):551-72.
15. Staerk L, Sherer JA, Ko D, Benjamin EJ, Helm RH. Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes. *Circ Res.* 2017;120(9):1501-17.
16. Larsen R. Physiologie des Herzens und des Kreislaufs. In: Larsen R, editor. *Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 646-63.
17. Wei X, Yohannan S, Richards JR. Physiology, Cardiac Repolarization Dispersion and Reserve. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.; 2025.
18. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1205-53.
19. Santana LF, Cheng EP, Lederer WJ. How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(6):901-3.

20. Njegic A, Wilson C, Cartwright EJ. Targeting Ca(2+) Handling Proteins for the Treatment of Heart Failure and Arrhythmias. *Front Physiol.* 2020;11:1068.
21. Chen SA, Tai CT, Yu WC, Chen YJ, Tsai CF, Hsieh MH, et al. Right atrial focal atrial fibrillation: electrophysiologic characteristics and radiofrequency catheter ablation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999;10(3):328-35.
22. Liu Y, Song Z, Jiang W, Wu S, Liu X, Qin M. Right atrial appendage: an important structure to drive atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol.* 2022;65(1):73-82.
23. Iwasaki Y-k, Nishida K, Kato T, Nattel S. Atrial Fibrillation Pathophysiology. *Circulation.* 2011;124(20):2264-74.
24. Wit AL, Boyden PA. Triggered activity and atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2007;4(3 Suppl):S17-23.
25. Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Chen PS, Qu Z. Early afterdepolarizations and cardiac arrhythmias. *Heart Rhythm.* 2010;7(12):1891-9.
26. Fink M, Noble PJ, Noble D. Ca²⁺-induced delayed afterdepolarizations are triggered by dyadic subspace Ca²⁺ affirming that increasing SERCA reduces aftercontractions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(3):H921-35.
27. Huang X, Song Z, Qu Z. Determinants of early afterdepolarization properties in ventricular myocyte models. *PLOS Computational Biology.* 2018;14(11):e1006382.
28. Geng M, Lin A, Nguyen TP. Revisiting Antiarrhythmic Drug Therapy for Atrial Fibrillation: Reviewing Lessons Learned and Redefining Therapeutic Paradigms. *Frontiers in Pharmacology.* 2020;11.
29. Goyal A, Basit H, Bhyan P, Zeltser R. Reentry Arrhythmia(Archived). StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.; 2025.
30. Ramos-Mondragón R, Lozhkin A, Vendrov AE, Runge MS, Isom LL, Madamanchi NR. NADPH Oxidases and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Atrial Fibrillation. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(10).
31. Sun Z, Zhou D, Xie X, Wang S, Wang Z, Zhao W, et al. Cross-talk between macrophages and atrial myocytes in atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol.* 2016;111(6):63.
32. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology.* 2008;1(1):62-73.
33. Wolfes J, Eckardt L. [The 2024 ESC guidelines for management of atrial fibrillation : AF-CARE as new credo]. *Herzschriftmacherther Elektrophysiol.* 2024;35(4):318-23.
34. Li J, Gao M, Zhang M, Liu D, Li Z, Du J, et al. Treatment of atrial fibrillation: a comprehensive review and practice guide. *Cardiovasc J Afr.* 2020;31(3):153-8.
35. Lane DA, Lip GYH. Use of the CHA₂DS₂-VASc and HAS-BLED Scores to Aid Decision Making for Thromboprophylaxis in Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2012;126(7):860-5.
36. Humphries KH, Kerr CR, Steinbuch M, Dorian P. Limitations to antiarrhythmic drug use in patients with atrial fibrillation. *Cmaj.* 2004;171(7):741-5.
37. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes.* 2015;6(6):850-67.
38. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
39. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;93(1):137-88.
40. Seyed Ahmadi S, Svensson A-M, Pivodic A, Rosengren A, Lind M. Risk of atrial fibrillation in persons with type 2 diabetes and the excess risk in relation to glycaemic control and renal function: a Swedish cohort study. *Cardiovascular Diabetology.* 2020;19(1):9.

41. Dal Canto E, Ceriello A, Rydén L, Ferrini M, Hansen TB, Schnell O, et al. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(2_suppl):25-32.
42. Genuth SM, Palmer JP, Nathan DM. Classification and Diagnosis of Diabetes. In: Cowie CC, Casagrande SS, Menke A, Cissell MA, Eberhardt MS, Meigs JB, et al., editors. *Diabetes in America*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US); 2018.
43. Nkonge KM, Nkonge DK, Nkonge TN. The epidemiology, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatment of maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Clinical Diabetes and Endocrinology.* 2020;6(1):20.
44. Hoffman LS, Fox TJ, Anastasopoulou C, Jialal I. *Maturity Onset Diabetes in the Young*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.; 2025.
45. Liu M, Hodish I, Haataja L, Lara-Lemus R, Rajpal G, Wright J, et al. Proinsulin misfolding and diabetes: mutant INS gene-induced diabetes of youth. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(11):652-9.
46. Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes.* 2015;6(4):598-612.
47. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(3):481-97.
48. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health.* 2020;10(1):107-11.
49. Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes.* 2015;6(13):1246-58.
50. Zhang H, Colclough K, Gloyn AL, Pollin TI. Monogenic diabetes: a gateway to precision medicine in diabetes. *J Clin Invest.* 2021;131(3).
51. Sun J, Xiong Y, Li X, Haataja L, Chen W, Mir SA, et al. Role of Proinsulin Self-Association in Mutant INS Gene-Induced Diabetes of Youth. *Diabetes.* 2020;69(5):954-64.
52. Bonfanti R, Colombo C, Nocerino V, Massa O, Lampasona V, Iafusco D, et al. Insulin gene mutations as cause of diabetes in children negative for five type 1 diabetes autoantibodies. *Diabetes Care.* 2009;32(1):123-5.
53. Vyas V, K D, Singh K. A Case of Neonatal Diabetes Mellitus Due to INS Gene Mutation with Maternal Mosaicism and Atypical Presentation. *J Pediatr Genet.* 2021;10(2):156-8.
54. Pippitt K, Li M, Gurge HE. Diabetes Mellitus: Screening and Diagnosis. *Am Fam Physician.* 2016;93(2):103-9.
55. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization
- Copyright © World Health Organization 2011.; 2011.
56. Pandey AK, Bhatt DL, Pandey A, Marx N, Cosentino F, Pandey A, et al. Mechanisms of benefits of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J.* 2023;44(37):3640-51.
57. Nikolaus Marx AB, Patrick Diemert, Christine Espinola-Klein, Martin Halle, Felix Mahfoud*, Dirk Müller-Wieland, Katharina Schütt, Harm Wienbergen Pocket-Leitlinie: Diabetes (Version 2023)
- Leitlinien für das Management von kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit Diabetes. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz-und Kreislaufforschung eV (2023) Pocket-Leitlinien. 2023;Diabetes Version 2023.
58. Nauck MA. Pathophysiologie des Typ-2-Diabetes. *Die Diabetologie.* 2024;20(2):173-5.

59. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008;41(1):11-8.
60. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(2):98-107.
61. Witcoski Junior L, de Lima JD, Somensi AG, de Souza Santos LB, Paschoal GL, Uada TS, et al. Metabolic reprogramming of macrophages in the context of type 2 diabetes. *Eur J Med Res*. 2024;29(1):497.
62. Martin S, Kempf K, Röhling M. Pathophysiologie und Prävention des Typ-2-Diabetes. *Der Diabetologe*. 2019;15(5):382-91.
63. Werner C, Schmidt S, Kellner C, Burghardt K, Reuken PA, Kloos C, et al. [Striking manifestation and unexpected therapeutic course of diabetes mellitus in a 22-year-old male patient]. *Inn Med (Heidelb)*. 2025;66(2):236-40.
64. Hur KY, Moon MK, Park JS, Kim SK, Lee SH, Yun JS, et al. 2021 Clinical Practice Guidelines for Diabetes Mellitus of the Korean Diabetes Association. *Diabetes Metab J*. 2021;45(4):461-81.
65. Call JT, Cortés P, Harris DM. A practical review of diabetes mellitus type 2 treatment in primary care. *Rom J Intern Med*. 2022;60(1):14-23.
66. Oetjen E. Orale Antidiabetika. *Der Kardiologe*. 2012;6(6):467-73.
67. Pérez López P, Bahillo Curiezes P, Fernández P, Martínez R, Delgado E, Ortolá A, et al. Clinical, glycometric features and treatment in a family with monogenic diabetes due to a new mutation in the insulin gene. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English ed)*. 2024;71(2):77-82.
68. Andersen A, Bagger JI, Baldassarre MPA, Christensen MB, Abelin KU, Faber J, et al. Acute hypoglycemia and risk of cardiac arrhythmias in insulin-treated type 2 diabetes and controls. *Eur J Endocrinol*. 2021;185(2):343-53.
69. Dubó S, Gallegos D, Cabrera L, Sobrevia L, Zúñiga L, González M. Cardiovascular Action of Insulin in Health and Disease: Endothelial L-Arginine Transport and Cardiac Voltage-Dependent Potassium Channels. *Frontiers in Physiology*. 2016;Volume 7 - 2016.
70. Lee TTL, Hui JMH, Lee YHA, Satti DI, Shum YKL, Kiu PTH, et al. Sulfonylurea Is Associated With Higher Risks of Ventricular Arrhythmia or Sudden Cardiac Death Compared With Metformin: A Population-Based Cohort Study. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(18):e026289.
71. Xu Y, Boyle TA, Lyu B, Ballew SH, Selvin E, Chang AR, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and the risk of atrial fibrillation in adults with diabetes: a real-world study. *J Gen Intern Med*. 2024;39(7):1112-21.
72. Robinson RTCE, Harris ND, Ireland RH, Lee S, Newman C, Heller SR. Mechanisms of Abnormal Cardiac Repolarization During Insulin-Induced Hypoglycemia. *Diabetes*. 2003;52(6):1469-74.
73. Ostropolets A, Elias PA, Reyes MV, Wan EY, Pajvani UB, Hripcsak G, et al. Metformin Is Associated With a Lower Risk of Atrial Fibrillation and Ventricular Arrhythmias Compared With Sulfonylureas. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2021;14(3):e009115.
74. Kolesnik E, Scherr D, Rohrer U, Benedikt M, Manninger M, Sourij H, et al. SGLT2 Inhibitors and Their Antiarrhythmic Properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(3):1678.
75. Usman MS, Siddiqi TJ, Anker SD, Bakris GL, Bhatt DL, Filippatos G, et al. Effect of SGLT2 Inhibitors on Cardiovascular Outcomes Across Various Patient Populations. *J Am Coll Cardiol*. 2023;81(25):2377-87.
76. Wright EM. SGLT2 Inhibitors: Physiology and Pharmacology. *Kidney360*. 2021;2(12):2027-37.
77. Tentolouris A, Vlachakis P, Tzeravini E, Eleftheriadou I, Tentolouris N. SGLT2 Inhibitors: A Review of Their Antidiabetic and Cardioprotective Effects. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(16).
78. Xiang B, Zhao X, Zhou X. Cardiovascular benefits of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in diabetic and nondiabetic patients. *Cardiovascular Diabetology*. 2021;20(1):78.

79. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, et al. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2018;380(4):347-57.
80. Zelniker TA, Bonaca MP, Furtado RHM, Mosenzon O, Kuder JF, Murphy SA, et al. Effect of Dapagliflozin on Atrial Fibrillation in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2020;141(15):1227-34.
81. Butt JH, Docherty KF, Jhund PS, de Boer RA, Böhm M, Desai AS, et al. Dapagliflozin and atrial fibrillation in heart failure with reduced ejection fraction: insights from DAPA-HF. *Eur J Heart Fail*. 2022;24(3):513-25.
82. Paasche A, Wiedmann F, Kraft M, Seibertz F, Herlt V, Blochberger PL, et al. Acute antiarrhythmic effects of SGLT2 inhibitors-dapagliflozin lowers the excitability of atrial cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*. 2024;119(1):93-112.
83. Lopaschuk GD, Verma S. Mechanisms of Cardiovascular Benefits of Sodium Glucose Co-Transporter 2 (SGLT2) Inhibitors: A State-of-the-Art Review. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(6):632-44.
84. Kreutz R, Camm AJ, Rossing P. Concomitant diabetes with atrial fibrillation and anticoagulation management considerations. *European Heart Journal Supplements*. 2020;22(Supplement_O):O78-O86.
85. Leopoulou M, Theofilis P, Kordalis A, Papageorgiou N, Sagris M, Oikonomou E, et al. Diabetes mellitus and atrial fibrillation-from pathophysiology to treatment. *World J Diabetes*. 2023;14(5):512-27.
86. Seyed Ahmadi S, Svensson AM, Pivodic A, Rosengren A, Lind M. Risk of atrial fibrillation in persons with type 2 diabetes and the excess risk in relation to glycaemic control and renal function: a Swedish cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2020;19(1):9.
87. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. *The Framingham Heart Study*. *Jama*. 1994;271(11):840-4.
88. Bano A, Rodondi N, Beer JH, Moschovitis G, Kobza R, Aeschbacher S, et al. Association of Diabetes With Atrial Fibrillation Phenotype and Cardiac and Neurological Comorbidities: Insights From the Swiss-AF Study. *Journal of the American Heart Association*. 2021;10(22):e021800.
89. Borén J, Öörni K, Catapano AL. The link between diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2024;394.
90. Wang A, Green JB, Halperin JL, Piccini JP. Atrial Fibrillation and Diabetes Mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;74(8):1107-15.
91. Galea R, Cardillo MT, Caroli A, Marini MG, Sonnino C, Narducci ML, et al. Inflammation and C-reactive protein in atrial fibrillation: cause or effect? *Tex Heart Inst J*. 2014;41(5):461-8.
92. Ihara K, Sasano T. Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atrial Fibrillation. *Front Physiol*. 2022;13:862164.
93. De Sensi F, De Potter T, Cresti A, Severi S, Breithardt G. Atrial fibrillation in patients with diabetes: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2015;5(5):364-73.
94. Polina I, Jansen HJ, Li T, Moghtadaei M, Bohne LJ, Liu Y, et al. Loss of insulin signaling may contribute to atrial fibrillation and atrial electrical remodeling in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(14):7990-8000.
95. Barbetti F, Colombo C, Haataja L, Cras-Méneur C, Bernardini S, Arvan P. Hyperglucagonemia in an animal model of insulin-deficient diabetes: what therapy can improve it? *Clin Diabetes Endocrinol*. 2016;2:11.
96. Hu P, McKenzie JA, Buettmann EG, Migotsky N, Gardner MJ, Silva MJ. Type 1 diabetic Akita mice have low bone mass and impaired fracture healing. *Bone*. 2021;147:115906.
97. Mathews CE, Langley SH, Leiter EH. New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplantation*. 2002;73(8):1333-6.

98. Lorenzo-Almorós A, Casado Cerrada J, Álvarez-Sala Walther LA, Méndez Bailón M, Lorenzo González O. Atrial Fibrillation and Diabetes Mellitus: Dangerous Liaisons or Innocent Bystanders? *J Clin Med.* 2023;12(8).
99. Bohne LJ, Johnson D, Rose RA, Wilton SB, Gillis AM. The Association Between Diabetes Mellitus and Atrial Fibrillation: Clinical and Mechanistic Insights. *Front Physiol.* 2019;10:135.
100. Wang A, Green JB, Halperin JL, Piccini JP, Sr. Atrial Fibrillation and Diabetes Mellitus: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(8):1107-15.
101. Bohne LJ, Jansen HJ, Daniel I, Dorey TW, Moghtadaei M, Belke DD, et al. Electrical and structural remodeling contribute to atrial fibrillation in type 2 diabetic db/db mice. *Heart Rhythm.* 2021;18(1):118-29.
102. Jansen HJ, Bohne LJ, Gillis AM, Rose RA. Atrial remodeling and atrial fibrillation in acquired forms of cardiovascular disease. *Heart Rhythm O2.* 2020;1(2):147-59.
103. Clauss S, Tomsits P, Vlcek J, Pauly V, Hesse N, Xia R, et al. PO-630-07 INVESTIGATION OF DIABETES-INDUCED ATRIAL REMODELING IN A PRECLINICAL LARGE ANIMAL MODEL. *Heart Rhythm.* 2022;19(5):S166-S7.
104. Wang Q, Wang J, Wang P, Wang L, Jia L, Ling X, et al. Glycemic control is associated with atrial structural remodeling in patients with type 2 diabetes. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):278.
105. Dublin S, Glazer NL, Smith NL, Psaty BM, Lumley T, Wiggins KL, et al. Diabetes mellitus, glycemic control, and risk of atrial fibrillation. *J Gen Intern Med.* 2010;25(8):853-8.
106. Hillson R. Arrhythmias and diabetes: atrial fibrillation. *Practical Diabetes.* 2021;38(3):6-7.
107. Ritchie RH, Abel ED. Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease. *Circ Res.* 2020;126(11):1501-25.
108. Rodríguez-Sinovas A, Sánchez JA, Valls-Lacalle L, Consegal M, Ferreira-González I. Connexins in the Heart: Regulation, Function and Involvement in Cardiac Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9).
109. Bikou O, Thomas D, Trappe K, Lugenbiel P, Kelemen K, Koch M, et al. Connexin 43 gene therapy prevents persistent atrial fibrillation in a porcine model. *Cardiovasc Res.* 2011;92(2):218-25.
110. Chaloupki SM, Loh P, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV. The role of connexin40 in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2009;84(1):15-23.
111. Qian LL, Liu XY, Li XY, Yang F, Wang RX. Effects of Electrical Remodeling on Atrial Fibrillation in Diabetes Mellitus. *Rev Cardiovasc Med.* 2023;24(1):3.
112. Kato T, Iwasaki Y-k, Nattel S. Connexins and Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2012;125(2):203-6.
113. Dhein S. Role of connexins in atrial fibrillation. *Adv Cardiol.* 2006;42:161-74.
114. Hesketh GG, Shah MH, Halperin VL, Cooke CA, Akar FG, Yen TE, et al. Ultrastructure and regulation of lateralized connexin43 in the failing heart. *Circ Res.* 2010;106(6):1153-63.
115. Rucker-Martin C, Milliez P, Tan S, Decrouy X, Recouvreur M, Vranckx R, et al. Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2006;72(1):69-79.
116. Jennings MM, Donahue JK. Connexin Remodeling Contributes to Atrial Fibrillation. *J Atr Fibrillation.* 2013;6(2):839.
117. Mitašíková M, Lin H, Soukup T, Imanaga I, Tribulová N. Diabetes and thyroid hormones affect connexin-43 and PKC-epsilon expression in rat heart atria. *Physiol Res.* 2009;58(2):211-7.
118. Howarth FC, Chandler NJ, Kharche S, Tellez JO, Greener ID, Yamanushi TT, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein expression in ventricular muscle. *Mol Cell Biochem.* 2008;319(1-2):105-14.
119. Inoguchi T, Yu HY, Imamura M, Kakimoto M, Kuroki T, Maruyama T, et al. Altered gap junction activity in cardiovascular tissues of diabetes. *Med Electron Microsc.* 2001;34(2):86-91.

120. Sato T, Haimovici R, Kao R, Li AF, Roy S. Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes*. 2002;51(5):1565-71.
121. Wei X, Chang ACH, Chang H, Xu S, Xue Y, Zhang Y, et al. Hypoglycemia-Exacerbated Mitochondrial Connexin 43 Accumulation Aggravates Cardiac Dysfunction in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;Volume 9 - 2022.
122. Nygren A, Olson ML, Chen KY, Emmett T, Kargacin G, Shimoni Y. Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat heart: reduced conduction reserve. *J Physiol*. 2007;580(Pt 2):543-60.
123. Seidel T, Salameh A, Dhein S. A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue. *Biophys J*. 2010;99(9):2821-30.
124. Wright JA, Richards T, Becker DL. Connexins and diabetes. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:496904.
125. Howarth FC, Nowotny N, Zilahi E, El Haj MA, Lei M. Altered expression of gap junction connexin proteins may partly underlie heart rhythm disturbances in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2007;305(1):145-51.
126. Pascal Daleau GC, Dominique Fournier, Dany Patoine, Patrick Mathieu, Paul Poirier. Higher expression of connexin 40 in human atrial tissue of patients with type 2 diabetes who have undergone a coronary artery bypass graft surgery. *Health*. 2. 2010;Vol.2 No.3, March 2010:272-8.
127. Jiang WY, Huo JY, Wang SC, Cheng YD, Lyu YT, Jiang ZX, et al. Trimethylamine N-oxide facilitates the progression of atrial fibrillation in rats with type 2 diabetes by aggravating cardiac inflammation and connexin remodeling. *J Physiol Biochem*. 2022;78(4):855-67.
128. Joshi MS, Mihm MJ, Cook AC, Schanbacher BL, Bauer JA. Alterations in connexin 43 during diabetic cardiomyopathy: competition of tyrosine nitration versus phosphorylation. *J Diabetes*. 2015;7(2):250-9.
129. Lin H, Ogawa K, Imanaga I, Tribulova N. Alterations of connexin 43 in the diabetic rat heart. *Adv Cardiol*. 2006;42:243-54.
130. Watanabe S, Alexander M, Misharin AV, Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest*. 2019;129(7):2619-28.
131. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:123-47.
132. Frodermann V, Nahrendorf M. Macrophages and Cardiovascular Health. *Physiological Reviews*. 2018;98(4):2523-69.
133. Sansonetti M, Waleczek FJG, Jung M, Thum T, Perbellini F. Resident cardiac macrophages: crucial modulators of cardiac (patho)physiology. *Basic Res Cardiol*. 2020;115(6):77.
134. Xia R, Tomsits P, Loy S, Zhang Z, Pauly V, Schüttler D, et al. Cardiac Macrophages and Their Effects on Arrhythmogenesis. *Front Physiol*. 2022;13:900094.
135. Pinto AR, Godwin JW, Rosenthal NA. Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. *Stem Cell Res*. 2014;13(3 Pt B):705-14.
136. Chen M, Li X, Wang S, Yu L, Tang J, Zhou S. The Role of Cardiac Macrophage and Cytokines on Ventricular Arrhythmias. *Front Physiol*. 2020;11:1113.
137. Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med*. 2018;24(8):1234-45.
138. Chen R, Zhang H, Tang B, Luo Y, Yang Y, Zhong X, et al. Macrophages in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024;9(1):130.
139. Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell*. 2017;169(3):510-22.e20.

140. Hulsmans M, Schloss MJ, Lee IH, Bapat A, Iwamoto Y, Vinegoni C, et al. Recruited macrophages elicit atrial fibrillation. *Science*. 2023;381(6654):231-9.
141. Simon-Chica A, Fernández MC, Wülfers EM, Loher A, Hilgendorf I, Seemann G, et al. Novel insights into the electrophysiology of murine cardiac macrophages: relevance of voltage-gated potassium channels. *Cardiovasc Res*. 2022;118(3):798-813.
142. Bogert NV, Therre M, Din S, Furkel J, Zhou X, El-Battrawy I, et al. Macrophages enhance sodium channel expression in cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*. 2024;119(6):1063-73.
143. Fei YD, Wang Q, Hou JW, Li W, Cai XX, Yang YL, et al. Macrophages facilitate post myocardial infarction arrhythmias: roles of gap junction and KCa3.1. *Theranostics*. 2019;9(22):6396-411.
144. Kain D, Amit U, Yagil C, Landa N, Naftali-Shani N, Molotski N, et al. Macrophages dictate the progression and manifestation of hypertensive heart disease. *Int J Cardiol*. 2016;203:381-95.
145. Loredo-Mendoza ML, Ramirez-Sánchez I, Bustamante-Pozo MM, Ayala M, Navarrete V, Garate-Carrillo A, et al. The role of inflammation in driving left ventricular remodeling in a pre-HFpEF model. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020;245(8):748-57.
146. Yamashita T, Sekiguchi A, Iwasaki YK, Date T, Sagara K, Tanabe H, et al. Recruitment of immune cells across atrial endocardium in human atrial fibrillation. *Circ J*. 2010;74(2):262-70.
147. Moskalik A, Niderla-Bielńska J, Ratajska A. Multiple roles of cardiac macrophages in heart homeostasis and failure. *Heart Fail Rev*. 2022;27(4):1413-30.
148. Sugita J, Fujii K, Nakayama Y, Matsubara T, Matsuda J, Oshima T, et al. Cardiac macrophages prevent sudden death during heart stress. *Nat Commun*. 2021;12(1):1910.
149. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(12):733-44.
150. Smorodinova N, Bláha M, Melenovský V, Rozsívalová K, Přidal J, Ďurišová M, et al. Analysis of immune cell populations in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation or sinus rhythm. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172691.
151. Chen MC, Chang JP, Liu WH, Yang CH, Chen YL, Tsai TH, et al. Increased inflammatory cell infiltration in the atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2008;102(7):861-5.
152. Meng T, Wang J, Tang M, Liu S, Ding L, Yan Y. Diabetes Mellitus Promotes Atrial Structural Remodeling and PARP-1/Ikka/NF-κB Pathway Activation in Mice. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:2189-99.
153. Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, Akar JG, Akar FG. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovascular Diabetology*. 2017;16(1):120.
154. Monnerat G, Alarcón ML, Vasconcellos LR, Hochman-Mendez C, Brasil G, Bassani RA, et al. Macrophage-dependent IL-1 β production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. *Nat Commun*. 2016;7:13344.
155. Hu Y-F, Chen Y-J, Lin Y-J, Chen S-A. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation. *Nature Reviews Cardiology*. 2015;12(4):230-43.
156. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):281-6.
157. Hulsmans M, Sager HB, Roh JD, Valero-Muñoz M, Houstis NE, Iwamoto Y, et al. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *J Exp Med*. 2018;215(2):423-40.
158. Hsueh W, Abel ED, Breslow JL, Maeda N, Davis RC, Fisher EA, et al. Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease. *Circ Res*. 2007;100(10):1415-27.
159. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;95:605-13.
160. Qamar F, Sultana S, Sharma M. Animal models for induction of diabetes and its complications. *J Diabetes Metab Disord*. 2023;22(2):1021-8.

161. Tripathi V, Verma J. Different models used to induce diabetes: A comprehensive review. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;6:29-32.
162. Wolf E, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S. Genetically engineered pig models for diabetes research. Transgenic Research. 2014;23(1):27-38.
163. Camacho P, Fan H, Liu Z, He JQ. Small mammalian animal models of heart disease. Am J Cardiovasc Dis. 2016;6(3):70-80.
164. Clauss S, Bleyer C, Schüttler D, Tomsits P, Renner S, Klymiuk N, et al. Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals. Nat Rev Cardiol. 2019;16(8):457-75.
165. Wolf E, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S. Genetically engineered pig models for diabetes research. Transgenic Res. 2014;23(1):27-38.
166. Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbel R-M, Saliez A, Gianello P. Streptozotocin-Induced Diabetes in Large Animals (Pigs/Primates): Role of GLUT2 Transporter and β-cell Plasticity. Transplantation. 2006;81(1):36-45.
167. Renner S, Braun-Reichhart C, Blutke A, Herbach N, Emrich D, Streckel E, et al. Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. Diabetes. 2013;62(5):1505-11.
168. Blutke A, Renner S, Flenkenthaler F, Backman M, Haesner S, Kemter E, et al. The Munich MIDY Pig Biobank - A unique resource for studying organ crosstalk in diabetes. Mol Metab. 2017;6(8):931-40.
169. Perleberg C, Kind A, Schnieke A. Genetically engineered pigs as models for human disease. Dis Model Mech. 2018;11(1).
170. Sun Y, Hu D. The link between diabetes and atrial fibrillation: cause or correlation? J Cardiovasc Dis Res. 2010;1(1):10-1.
171. Jia H, Chang Y, Song J. The pig as an optimal animal model for cardiovascular research. Lab Anim (NY). 2024;53(6):136-47.
172. Grosche A, Kaplan L, Bludau O, Wunderlich K, Hoffelner P, Deeg C, et al. Early changes of glia cells in the INSC94Y pig model for diabetic retinopathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2024;65(7):848-.
173. Kleinwort KJH, Amann B, Hauck SM, Hirmer S, Blutke A, Renner S, et al. Retinopathy with central oedema in an INSC94Y transgenic pig model of long-term diabetes. Diabetologia. 2017;60(8):1541-9.
174. Hinkel R, Howe A, Renner S, Ng J, Lee S, Klett K, et al. Diabetes Mellitus-Induced Microvascular Destabilization in the Myocardium. J Am Coll Cardiol. 2017;69(2):131-43.
175. Sen P, Sittig T, Hamers J, d'Ambrosio L, Ornek I, Zhang J, et al. From kidney injury to cardiac dysfunction: the central role of oxidative stress in diabetes and CKD. Basic Research in Cardiology. 2025.
176. Zhang Z, Vlcek J, Pauly V, Hesse N, Bauer J, Chataut KR, et al. Atrial fibrosis heterogeneity is a risk for atrial fibrillation in pigs with ischaemic heart failure. Eur J Clin Invest. 2024;54(4):e14137.
177. Pauly V, Vlcek J, Zhang Z, Hesse N, Xia R, Bauer J, et al. Effects of Sex on the Susceptibility for Atrial Fibrillation in Pigs with Ischemic Heart Failure. Cells. 2023;12(7).
178. White HJ, Soos MP. Anatomy, Thorax, Superior Vena Cava. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.; 2025.
179. Siddiqui AU, Daimi SR, Gandhi KR, Siddiqui AT, Trivedi S, Sinha MB, et al. Crista terminalis, musculi pectinati, and taenia sagittalis: anatomical observations and applied significance. ISRN Anat. 2013;2013:803853.
180. Loukas M, Tubbs RS, Tongson JM, Polepalli S, Curry B, Jordan R, et al. The clinical anatomy of the crista terminalis, pectinate muscles and the teniae sagittalis. Ann Anat. 2008;190(1):81-7.

181. Lelovas PP, Kostomitsopoulos NG, Xanthos TT. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014;53(5):432-8.
182. Tretter JT, Spicer DE, Sánchez-Quintana D, Back Sternick E, Farré J, Anderson RH. Miniseries 1-Part III: 'Behind the scenes' in the triangle of Koch. *Europace.* 2022;24(3):455-63.
183. Aktan İkiz ZA, Üçerler H, Özgür T. Anatomic characteristics of left atrium and openings of pulmonary veins. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2014;14(8):674-8.
184. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2(6):640-53.
185. Chaplin DD. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2010;125(2):S3-S23.
186. Lawetzky A, Hüning T. Analysis of CD3 and antigen receptor expression on T cell subpopulations of aged athymic mice. *Eur J Immunol.* 1988;18(3):409-16.
187. Sojka DK, Tian Z, Yokoyama WM. Tissue-resident natural killer cells and their potential diversity. *Semin Immunol.* 2014;26(2):127-31.
188. Braun M, Melchers I, Peter HH, Illges H. Human B and T lymphocytes have similar amounts of CD21 mRNA, but differ in surface expression of the CD21 glycoprotein. *Int Immunol.* 1998;10(8):1197-202.
189. Ye N, Cai J, Dong Y, Chen H, Bo Z, Zhao X, et al. A multi-omic approach reveals utility of CD45 expression in prognosis and novel target discovery. *Front Genet.* 2022;13:928328.
190. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2035.
191. Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One.* 2009;4(10):e7475.
192. Strizova Z, Benesova I, Bartolini R, Novyseidlak R, Cecrdlova E, Foley LK, et al. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? *Clin Sci (Lond).* 2023;137(15):1067-93.
193. Erler K. Elecsys immunoassay systems using electrochemiluminescence detection. *Wien Klin Wochenschr.* 1998;110 Suppl 3:5-10.
194. Spannbauer A, Traxler D, Zlabinger K, Gugerell A, Winkler J, Mester-Tonczar J, et al. Large Animal Models of Heart Failure With Reduced Ejection Fraction (HFref). *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:117.
195. Varga OE, Hansen AK, Sandøe P, Olsson IA. Validating animal models for preclinical research: a scientific and ethical discussion. *Altern Lab Anim.* 2010;38(3):245-8.
196. Li GR, Sun H, To J, Tse HF, Lau CP. Demonstration of calcium-activated transient outward chloride current and delayed rectifier potassium currents in Swine atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36(4):495-504.
197. Gumprecht JJ, Kalarus Z. ATRIAL FIBRILLATION IN PATIENTS WITH CONCOMITANT DIABETES MELLITUS - WHAT DO WE ALREADY KNOW AND WHAT DO WE NEED TO DISCOVER? *Wiad Lek.* 2022;75(1):123-7.
198. Mohsin M, Zeyad H, Khalid H, Gapizov A, Bibi R, Kamani YG, et al. The Synergistic Relationship Between Atrial Fibrillation and Diabetes Mellitus: Implications for Cardiovascular and Metabolic Health. *Cureus.* 2023;15(9):e45881.
199. Saleh K, Haldar S. Atrial fibrillation: a contemporary update. *Clin Med (Lond).* 2023;23(5):437-41.
200. Baptiste F, Kalifa J, Durand C, Gitenay E, Bremondy M, Ayari A, et al. Right atrial appendage firing in atrial fibrillation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine.* 2022;Volume 9 - 2022.
201. Ghannam M, Jame S, Jongnarangsin K, Cheng YW, Gunda S, Fadahunsi O, et al. Catheter ablation of the left and right atrial appendages without isolation in persistent atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2021;18(5):694-701.

202. Hohmann C, Pfister R, Mollenhauer M, Adler C, Kozlowski J, Wodarz A, et al. Inflammatory cell infiltration in left atrial appendageal tissues of patients with atrial fibrillation and sinus rhythm. *Sci Rep.* 2020;10(1):1685.
203. Watson CJ, Glezeva N, Horgan S, Gallagher J, Phelan D, McDonald K, et al. Atrial Tissue Pro-Fibrotic M2 Macrophage Marker CD163+, Gene Expression of Procollagen and B-Type Natriuretic Peptide. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(11):e013416.
204. Miyosawa K, Iwata H, Minami-Takano A, Hayashi H, Tabuchi H, Sekita G, et al. Enhanced monocyte migratory activity in the pathogenesis of structural remodeling in atrial fibrillation. *PLoS One.* 2020;15(10):e0240540.
205. Boniakowski AE, Kimball AS, Joshi A, Schaller M, Davis FM, denDekker A, et al. Murine macrophage chemokine receptor CCR2 plays a crucial role in macrophage recruitment and regulated inflammation in wound healing. *Eur J Immunol.* 2018;48(9):1445-55.
206. van Elsas MJ, Labrie C, Etzerodt A, Charoentong P, van Stigt Thans JJC, Van Hall T, et al. Invasive margin tissue-resident macrophages of high CD163 expression impede responses to T cell-based immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2023;11(3).
207. Lund H, Hunt MA, Kurtović Z, Sandor K, Kägy PB, Fereydouni N, et al. CD163+ macrophages monitor enhanced permeability at the blood–dorsal root ganglion barrier. *Journal of Experimental Medicine.* 2023;221(2).
208. Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology.* 2005;210(2-4):153-60.
209. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol.* 2020;877:173090.
210. Stoneman V, Braganza D, Figg N, Mercer J, Lang R, Goddard M, et al. Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ Res.* 2007;100(6):884-93.
211. Hutschalik T, Özgül O, Casini M, Szabó B, Peyronnet R, Bártulos Ó, et al. Immune response caused by M1 macrophages elicits atrial fibrillation-like phenotypes in coculture model with isogenic hiPSC-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Research & Therapy.* 2024;15(1):280.
212. Lubos N, van der Gaag S, Gerçek M, Kant S, Leube RE, Krusche CA. Inflammation shapes pathogenesis of murine arrhythmogenic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2020;115(4):42.
213. Al-Rashed F, Sindhu S, Arefanian H, Al Madhoun A, Kochumon S, Thomas R, et al. Repetitive Intermittent Hyperglycemia Drives the M1 Polarization and Inflammatory Responses in THP-1 Macrophages Through the Mechanism Involving the TLR4-IRF5 Pathway. *Cells.* 2020;9(8):1892.
214. Skytthe MK, Graversen JH, Moestrup SK. Targeting of CD163(+) Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15).
215. Matuschik L, Riabov V, Schmuttermaier C, Sevastyanova T, Weiss C, Klüter H, et al. Hyperglycemia Induces Inflammatory Response of Human Macrophages to CD163-Mediated Scavenging of Hemoglobin-Haptoglobin Complexes. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3).
216. Álvarez B, Revilla C, Poderoso T, Ezquerra A, Domínguez J. Porcine Macrophage Markers and Populations: An Update. *Cells.* 2023;12(16).
217. Liu Y, Suarez-Arnedo A, Shetty S, Wu Y, Schneider M, Collier JH, et al. A Balance between Pro-Inflammatory and Pro-Reparative Macrophages is Observed in Regenerative D-MAPS. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(11):e2204882.
218. Berbudi A, Khairani S, Tjahjadi AI. Interplay Between Insulin Resistance and Immune Dysregulation in Type 2 Diabetes Mellitus: Implications for Therapeutic Interventions. *Immunotargets Ther.* 2025;14:359-82.
219. Pezhman L, Tahrani A, Chimen M. Dysregulation of Leukocyte Trafficking in Type 2 Diabetes: Mechanisms and Potential Therapeutic Avenues. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:624184.
220. Bajpai A, Tilley DG. The Role of Leukocytes in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Physiology.* 2018;9.

221. Aguiar CM, Gawdat K, Legere S, Marshall J, Hassan A, Kienesberger PC, et al. Fibrosis independent atrial fibrillation in older patients is driven by substrate leukocyte infiltration: diagnostic and prognostic implications to patients undergoing cardiac surgery. *Journal of Translational Medicine*. 2019;17(1):413.
222. Hou CJ, Tsai CH, Su CH, Wu YJ, Chen SJ, Chiu JJ, et al. Diabetes reduces aortic endothelial gap junctions in ApoE-deficient mice: simvastatin exacerbates the reduction. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(8):745-52.
223. Yeh H-I, Lu C-S, Wu Y-J, Chen C-C, Hong R-C, Ko Y-S, et al. Reduced Expression of Endothelial Connexin37 and Connexin40 in Hyperlipidemic Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003;23(8):1391-7.
224. Sun Y, Tong X, Chen H, Huang T, Shao Q, Huang W, et al. An atrial-fibrillation-linked connexin40 mutant is retained in the endoplasmic reticulum and impairs the function of atrial gap-junction channels. *Dis Model Mech*. 2014;7(5):561-9.
225. Yang F, Liu HH, Zhang L, Zhang XL, Zhang J, Li F, et al. Advanced Glycation End Products Downregulate Connexin 43 and Connexin 40 in Diabetic Atrial Myocytes via the AMPK Pathway. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2023;16:3045-56.
226. Gemel J, Levy AE, Simon AR, Bennett KB, Ai X, Akhter S, et al. Connexin40 abnormalities and atrial fibrillation in the human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;76:159-68.
227. Singh J, Smail M, Rupee S, Rupee K, Ahmed Ismail AM, Sultan S, et al. Effects of Diabetes Mellitus on the Conduction System of the Heart: Mini-Review. In: Said SM, editor. *New Insights on Cardiomyopathy*. Rijeka: IntechOpen; 2022.
228. Kumai M, Nishii K, Nakamura K-i, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development*. 2000;127(16):3501-12.
229. Nishii K, Seki A, Kumai M, Morimoto S, Miwa T, Hagiwara N, et al. Connexin45 contributes to global cardiovascular development by establishing myocardial impulse propagation. *Mechanisms of Development*. 2016;140:41-52.
230. Frank M, Wirth A, Andrié RP, Kreuzberg MM, Dobrowolski R, Seifert G, et al. Connexin45 provides optimal atrioventricular nodal conduction in the adult mouse heart. *Circ Res*. 2012;111(12):1528-38.
231. Coppen SR, Gourdie RG, Severs NJ. Connexin45 is the first connexin to be expressed in the central conduction system of the mouse heart. *Exp Clin Cardiol*. 2001;6(1):17-23.
232. Haxha S, Halili A, Malmborg M, Pedersen-Bjergaard U, Philbert BT, Lindhardt TB, et al. Type 2 diabetes mellitus and higher rate of complete atrioventricular block: a Danish Nationwide Registry. *Eur Heart J*. 2023;44(9):752-61.
233. Fichadiya A, Quinn A, Au F, Campbell D, Lau D, Ronksley P, et al. Association between sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors and arrhythmic outcomes in patients with diabetes and pre-existing atrial fibrillation. *Europace*. 2024;26(3).
234. Kidess GG, Hamza M, Goru R, Basit J, Alraiyes M, Alraies MC. The Impact of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors on Atrial Fibrillation Burden in Diabetic Patients. *American Journal of Cardiology*. 2025;246:65-70.
235. Noh HJ, Cha SJ, Kim CH, Choi SW, Lee CH, Hwang JK. Efficacy of dapagliflozin in improving arrhythmia-related outcomes after ablation for atrial fibrillation: a retrospective single-center study. *Clin Res Cardiol*. 2024;113(6):924-32.
236. Abu-Qaoud MR, Kumar A, Tarun T, Abraham S, Ahmad J, Khadke S, et al. Impact of SGLT2 Inhibitors on AF Recurrence After Catheter Ablation in Patients With Type 2 Diabetes. *JACC Clin Electrophysiol*. 2023;9(10):2109-18.
237. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, et al. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS One*. 2014;9(6):e100777.
238. Lee TM, Chang NC, Lin SZ. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic Biol Med*. 2017;104:298-310.

239. Nikolaou PE, Konijnenberg LSF, Kostopoulos IV, Miliotis M, Mylonas N, Georgoulis A, et al. Empagliflozin in Acute Myocardial Infarction Reduces No-Reflow and Preserves Cardiac Function by Preventing Endothelial Damage. *JACC: Basic to Translational Science*. 2025;10(1):43-61.
240. Ren M, Pan D, Zha D, Shan Z. Dapagliflozin Improves Diabetic Cardiomyopathy by Modulating the Akt/mTOR Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2022;2022:9687345.
241. Lee C-C, Chen W-T, Chen S-y, Lee T-M. Dapagliflozin attenuates arrhythmic vulnerabilities by regulating connexin43 expression via the AMPK pathway in post-infarcted rat hearts. *Biochemical Pharmacology*. 2021;192:114674.
242. Mattii L, Moscato S, Ippolito C, Polizzi E, Novo G, Zucchi R, et al. Empagliflozin mitigates ponatinib-induced cardiotoxicity by restoring the connexin 43-autophagy pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024;178:117278.