

Aus dem Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Universität zu Köln
Institut für Vegetative Physiologie
Geschäftsführende Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. T. Korotkova

Gewebs-Mosaik mit mitochondrialen DNA- Mutationen bei kardialen Arrhythmien im Alterungsprozess

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Valerie Siebert
aus Königswinter

promoviert am 12. Januar 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. R. Wiesner
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. D. Steven

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mein Anteil an der Arbeit war das Einpflegen und Aktualisieren von klinischen Daten der Proband*innen in eine Datenbank (Programm: Excel, Herzzentrum Uniklinik Köln, Deutschland), die COX/SDH-Enzymfärbung sowie HE-Färbung der Herzohrproben, das Zählen der COX negativen, blauen Zellen und deren Verhältnis zur Anzahl der gesamten Kardiomyozyten sowie das Durchführen der statistischen Auswertung der erhobenen Daten. Das Zählen der COX negativen Zellen erfolgte mit Hilfe der Programme ImageJ und Aperio ImageScope. Für die statistische Auswertung verwendete ich das Programm Prism.

Die in dieser Arbeit angegebenen klinischen Daten der Patient*innen sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. Susanne Erhöfer von mir selbst ausgewertet worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind, nach entsprechender Anleitung durch Frau Ayesha Sen, von mir mit Unterstützung der Assistentin Frau Sascha Moskopp durchgeführt worden. Frau Moskopp führte das Schneiden der Herzohrproben durch, nachdem diese direkt aus dem Herz-OP des Herzzentrums der Uniklinik Köln gebracht wurden. Die weitere Bearbeitung der Proben habe ich selbstständig durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 03.10.2025

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Rudolf Wiesner für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an dem Institut für Physiologie durchzuführen, für die inspirierende Zusammenarbeit und die engagierte Betreuung.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an das Team des Herzzentrums der Uniklinik Köln, ohne das diese Studie nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank gilt insbesondere Univ.-Prof. Dr. Daniel Steven und Dr. Susanne Erhöfer für die Rekrutierung und Betreuung der Proband*innen, sowie Prof. Dr. Navid Mader und Dr. Asmae Gassa für die Bereitstellung der Vorhofproben.

Bei Ayesha Sen möchte ich mich für die wertvolle Anleitung und die vielen hilfreichen Ratschläge bedanken.

Ich möchte auch den Teilnehmer*innen meiner Studie danken, deren Bereitschaft zur Mitwirkung dieses Projekt möglich gemacht haben.

Nicht zuletzt danke ich meinem Partner, meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung. Ich bin froh, in dieser Zeit so viele wunderbare Menschen an meiner Seite gehabt zu haben.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	7
2. EINLEITUNG	8
2.1. Einführung in die Thematik	9
2.2. Fragestellung und Ziel der Arbeit	10
2.3. Das Vorhofflimmern	11
2.3.1. Definition	11
2.3.2. Epidemiologie und Relevanz der Thematik	11
2.3.3. Ätiologie und Risikofaktoren	12
2.3.4. Pathophysiologie	12
2.3.5. Therapiemöglichkeiten	14
2.4. Die Bedeutung von Mitochondrien im Herzen	16
2.4.1. Allgemeine Funktion der Mitochondrien	16
2.4.2. Funktionsweise von COX und SDH	17
2.4.3. Mitochondrien im Alterungsprozess und Einfluss auf die kardiale Funktion	18
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1. Material	21
3.1.1. Auswahl der Proband*innen	21
3.1.2. Probengewinnung	21
3.2. Methoden	23
3.2.1. Histologische Aufarbeitung der Proben	23
3.2.2. Quantifizierung	25
3.2.3. Statistische Auswertung	26
4. ERGEBNISSE	27
4.1. Patient*innenkollektiv	27
4.2. Ergebnisse der Quantifizierung	27
4.2.1. Gesamtes Patient*innenkollektiv	28
4.2.2. Geschlechtsspezifische Subgruppenanalyse	30

4.2.3.	Geschlechtsunspezifische Gesamtanalyse	32
4.2.4.	Altersabhängige Analyse	33
5.	DISKUSSION	34
5.1.	Methodendiskussion	34
5.2.	Ergebnisdiskussion	35
5.3.	Stärken und Limitationen der Arbeit	36
6.	LITERATURVERZEICHNIS	38
7.	ANHANG	40
7.1.	Abbildungsverzeichnis	40
7.2.	Tabellenverzeichnis	40

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA – einfaktorielle Varianzanalyse (englisch: analysis of variance)

ATP – Adenosintriphosphat

ATPase – Adenosintriphosphatase

AVN – Atrioventrikularknoten

BioMaSOTA – zentrale Biomaterialbank der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

BMI – Body-Mass-Index

Ca²⁺ – Calciumion

COX – Cytochrom-c-Oxidase

COX^{neg} – Cytochrom-c-Oxidase negativ

DAB – Diaminobenzidin tetrahydrochlorid

DADs – Verzögerte Nachdepolarisationen (englisch: delayed afterdepolarizations)

EADs – Frühe Nachdepolarisationen (englisch: early afterdepolarizations)

EKG – Elektrokardiogramm

FADH₂ – reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid

HE – Hämatoxylin/Eosin

KHK – koronare Herzkrankheit

MACCE – schwerwiegende unerwünschte kardiale und zerebrovaskuläre Ereignisse
(englisch: major adverse cardiac and cerebrovascular events)

MgCl₂ – Magnesiumchlorid

mM – Millimolar

mtDNA – mitochondriale DNA

NADH – reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid

NBT – Nitroblue Tetrazolium

OXPHOS – oxidative Phosphorylierung

PBS – Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate-buffered saline)

ROS – reaktive Sauerstoffspezies (englisch: reactive oxygen species)

SDH – Succinatdehydrogenase

Tris-HCl – Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid

VHF – Vorhofflimmern

1. Zusammenfassung

Das Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung und betrifft rund 2% der deutschen Gesamtbevölkerung. Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz deutlich an, sodass aufgrund demografischer Entwicklungen zukünftig mit einer hohen Relevanz der Erkrankung für das gesamte Gesundheitssystem und auch durch den hohen Leidensdruck für die Betroffenen selbst zu rechnen ist.

Obwohl die genauen Mechanismen des VHF seit langem Thema der Forschung sind, sind die komplexen pathophysiologischen Grundlagen der Arrhythmie weiterhin teilweise ungeklärt. Insbesondere die Beteiligung mitochondrialer Defekte an der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF sind bisher kaum untersucht worden. In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass es im Alterungsprozess in verschiedenen Geweben zu einer mitochondrialen Dysfunktion kommt. Bei genauerer Betrachtung wurde gezeigt, dass sich ein Mosaik bildet aus einzelnen Zellen mit schwerer mitochondrialer Dysfunktion, eingebettet in normales Gewebe. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass ein solches Gewebe-Mosaik im Myokard das Auftreten altersabhängiger Arrhythmien begünstigt.

In diesem Promotionsprojekt sollte nun dieser Befund an menschlichen Herzproben getestet werden. Dazu wurden Vorhofproben von Patient*innen mit paroxysmalem VHF bzw. persistierendem VHF verglichen. Die Hypothese war, dass paroxysmales VHF auf kleinen definierten Foci, persistierendes VHF dagegen auf einem Gewebe-Mosaik beruht. Die Proben wurden mittels Cytochrom-c-Oxidase (COX)/Succinatdehydrogenase (SDH)-Enzymfärbung behandelt, um Kardiomyozyten mit mitochondrialer Dysfunktion darzustellen. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung dieser Kardiomyozyten. Diese Ergebnisse und die klinischen Parameter der Patient*innen wurden auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang untersucht.

Es konnte in dieser Studie keine signifikante Korrelation zwischen dem altersabhängigen Auftreten von mtDNA (mitochondriale DNA) Deletionen und dem Vorliegen von VHF in diesen beiden Gruppen festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte die Wahl der Kontrollgruppe mit Proband*innen mit paroxysmalem VHF sein. In einer Folgearbeit sollten als Kontrollgruppe Proben von Patient*innen ohne VHF genutzt werden.

2. Einleitung

„Der Verstand liebt die Abwechslung; das Herz liebt die Wiederholung“. ¹ Bei einigen Menschen ist das Herz jedoch aus dem Rhythmus geraten und die regelmäßige Wiederholung der Herztätigkeit ist zeitweise nicht mehr gegeben. Allein in Deutschland sind 1,6 Millionen Menschen von VHF betroffen. Das VHF als supraventrikuläre Rhythmusstörung ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung und betrifft rund 2% der deutschen Gesamtbevölkerung. ² Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz deutlich bis auf 10-17% bei den über 80-Jährigen an, sodass durch die Alterung der Bevölkerung zukünftig mit einem Anstieg der Patient*innen mit VHF zu rechnen ist. ³ Neben einer reduzierten Lebensqualität für die Patient*innen ist VHF zudem mit thromboembolischen Ereignissen, Herzinsuffizienz sowie einer erhöhten Mortalität assoziiert. ⁴ Dies führte zu einer Hospitalisationsrate aufgrund von Herzrhythmusstörungen in den letzten Jahren von 531 pro 100.000 Einwohner. Die Zunahme der vollstationär behandelten Fälle im Bereich der Herzrhythmusstörungen betrug 7,7% zwischen 2011 und 2019. ²

Die Pathophysiologie von Herzrhythmusstörungen beruht auf drei verschiedenen Mechanismen, bei denen multiple Faktoren zusammenwirken: die physiologische Erregungsbildung von Kardiomyozyten kann verstärkt sein, eine Aktivität des Erregungsbildungssystems kann getriggert werden oder es kann ein Reentry stattfinden. ⁵ Risikofaktoren für die Entstehung von Herzrhythmusstörungen sind Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz, Adipositas, Hypertonie, genetische Prädisposition, koronare Herzerkrankheit (KHK) und zunehmendes Alter. Anhaltende Herzrhythmusstörungen führen zu einem elektrophysiologischen und strukturellen Remodeling, was zur Chronifizierung der Arrhythmie beiträgt. ⁶

Im Alterungsprozess akkumulieren Kardiomyozyten und auch alle anderen Zellen des Körpers mtDNA-Mutationen. Da die mtDNA für essenzielle Untereinheiten von Enzymkomplexen der Atmungskette codiert, führen Defekte an der mtDNA zu Funktionsverlusten in der Generierung von Adenosintriphosphat (ATP) sowie in weiteren metabolischen Aktivitäten der betroffenen Mitochondrien. Mit Zunahme dieser mtDNA-Mutationen entwickelt sich ein Mosaik aus funktionstüchtigen Zellen und aus Zellen mit mitochondrialen Funktionsdefekten. ⁷

Wie diese Veränderungen auf Zellebene im Alterungsprozess mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Herzrhythmusstörungen zusammenhängen ist jedoch weitestgehend unbekannt und wird in dieser Arbeit untersucht.

2.1. Einführung in die Thematik

Aktuelle Studien zeigen, dass im normalen Alterungsprozess eine Akkumulation von somatischen mtDNA-Mutationen in verschiedenen Geweben stattfindet.⁸ Auch dass mitochondriale Dysfunktion eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz spielt, ist bereits nachgewiesen worden. Für die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF ist die Beteiligung mitochondrialer Defekte aber bisher kaum untersucht worden.⁹

Bereits 1992 konnte Müller-Höcker mitochondriale Defekte in Gewebeproben von Menschen in hohem Alter feststellen. Im Herzen zeigte sich eine Akkumulation fokaler Defekte der COX in einzelnen Kardiomyozyten während der Alterung. Dabei sind einzelne Zellen mit schwerer mitochondrialer Dysfunktion in normales Gewebe eingebettet. Die dadurch entstehende Abnahme der Funktion der Atmungskette wurde als ein maßgeblicher Faktor für den Rückgang der funktionellen Organreserven mit zunehmendem Alter identifiziert.¹⁰ In nachfolgenden Studien konnte mittels PCR-Amplifikation des mitochondrialen Genoms aus menschlichen Kardiomyozyten nachgewiesen werden, dass eine Akkumulation von mtDNA-Mutationen in den Myokardzellen von Gewebespende*rinnen in hohem Alter vorliegt.¹¹

Um nun einen Zusammenhang zwischen der Akkumulation von mtDNA-Mutationen und VHF zu untersuchen, entwickelten Baris et al. (2015) ein genetisch modifiziertes Mausmodell, um den menschlichen Alterungsprozess zu simulieren. Mittels Expression einer mutierten Helikase (K320E-Twinkle^{Myo}) wurde ein Gewebemosaik mit mitochondrialen Defekten erzeugt. Die stochastisch entstandenen mtDNA-Deletionen führten zu mitochondrialer Dysfunktion in einzelnen Kardiomyozyten. Als Maß der Dysfunktion wurden die Aktivitäten der Komplexe II (SDH) und IV (COX) der Atmungskette analysiert. Eine blaue Färbung von Zellen zeigte dabei eine fehlende Enzymaktivität der COX an (COX^{neg} Zellen), da diese im Gegensatz zur SDH drei essenzielle, von der mtDNA kodierte Untereinheiten enthält. Die mosaikartige Verteilung von einzelnen Zellen mit mitochondrialem Defekt, eingebettet in funktionsfähiges Gewebe, führte zu Herzrhythmusstörungen bei den mutierten Mäusen. Diese kardialen Symptome wurden erst nach 18 Monaten beobachtet, wenn eine signifikante Anzahl von COX^{neg} Zellen akkumuliert hatte (1/200 Zellen). Dadurch konnte gezeigt werden, dass ein Mosaik mit COX^{neg} Kardiomyozyten das Auftreten altersabhängiger Arrhythmien begünstigt.⁷

2.2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Dieses Promotionsprojekt mit dem Thema „Gewebs-Mosaik mit mitochondrialen DNA-Mutationen bei kardialen Arrhythmien im Alterungsprozess“ soll zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von Herzrhythmusstörungen beitragen, indem der Fragestellung nachgegangen wird, inwiefern die Akkumulation mitochondrialer Defekte in Kardiomyozyten während des Alterungsprozesses das Auftreten von Arrhythmien beeinflusst. Zur Annäherung an die Fragestellung werden folgende Arbeitshypothesen verwendet:

- 1) Es besteht ein Zusammenhang zwischen einer Akkumulation von Kardiomyozyten mit mitochondrialem Defekt und dem Vorliegen kardialer Arrhythmien.
- 2) Ein im Alterungsprozess entstehendes Mosaik von Kardiomyozyten mit mitochondrialen Funktionsdefekten ist assoziiert mit dem Auftreten von Herzrhythmusstörungen im Alter.

Diese Arbeit baut auf der Arbeit von Baris et al. (2015) auf. In Zusammenarbeit mit der Kardiologie der Uniklinik Köln (Univ.-Prof. Dr. Daniel Steven und Dr. Susanne Erhöfer) und der Herzchirurgie (v.a. Prof. Dr. Navid Mader und Dr. Asmae Gassa) soll die Aussage, dass ein Mosaik mit COX^{neg} Kardiomyozyten mit dem Auftreten altersabhängiger Arrhythmien korreliert, an menschlichen Vorhofproben überprüft werden. Ziel dieser Arbeit soll sein, dadurch zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von VHF und der Auswirkung mitochondrialer Dysfunktionen auf Kardiomyozyten beizutragen.

2.3. Das Vorhofflimmern

2.3.1. Definition

Das VHF zählt zu den supraventrikulären Herzrhythmusstörungen. Dabei kommt es zu einer unkoordinierten Erregungsausbreitung im Vorhof und dementsprechend zu einer ineffektiven Vorhofmyokardkontraktion.¹² Im Elektrokardiogramm (EKG) zeigt sich dies durch unregelmäßige R-R-Abstände, fehlende P-Wellen und irreguläre atriale elektrische Aktivitäten, sogenannte Flimmerwellen/Oszillationen mit Frequenzen von 350 bis 600 pro Minute.¹³ Diese werden, abhängig von der Leitungskapazität des AV-Knotens, unregelmäßig auf den Ventrikel übergeleitet und führen zu einer absoluten Arrhythmie. Die Überleitung kann sowohl bradykard als auch tachykard erfolgen. Dies kann sich symptomatisch als Palpitationen und durch den gesteigerten Sauerstoffverbrauch auch durch Angina Pectoris Beschwerden äußern.¹⁴ Weitere mögliche Symptome können Müdigkeit, Schwindel, Dyspnoe, und Angstzustände sein.¹² Bei rund 70% der VHF-Patient*innen sind die Flimmerepisoden jedoch asymptomatisch und treten teilweise erstmals durch eine Komplikation wie einen Schlaganfall klinisch in Erscheinung.¹⁵

Einteilen lässt sich das VHF in verschiedene Gruppen, abhängig von der Dauer des Auftretens. Wird ein VHF zum ersten Mal diagnostiziert, nennt sich dies, unabhängig von der Dauer oder Ausprägung der Symptomatik, erste Episode. Das paroxysmale VHF konvertiert innerhalb von sieben Tagen nach Beginn spontan oder mittels Intervention zurück in den Sinusrhythmus. Das persistierende VHF tritt länger als eine Woche auf. Dies schließt Episoden ein, die nach mehr als sieben Tagen mittels Intervention terminiert werden. Davon abgrenzen lässt sich das langanhaltende persistierende VHF, das länger als zwölf Monate andauert. Beim permanenten VHF wird die Arrhythmie akzeptiert und es werden keine weiteren Versuche unternommen, den Sinusrhythmus wiederherzustellen.¹²

2.3.2. Epidemiologie und Relevanz der Thematik

Das VHF ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung mit einer derzeitigen Prävalenz von 1,5-2% in westlichen Industrienationen. Sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz ist in den letzten Jahren deutlich angestiegen. Weltweit ist ein Zuwachs der Prävalenz um das Dreifache in den letzten 50 Jahren zu verzeichnen.¹⁶ Insbesondere ältere Menschen haben aufgrund struktureller und funktioneller Veränderungen auf Zellebene während des Alterungsprozesses ein erhöhtes Risiko ein VHF zu entwickeln. Das Lebenszeitrisko für VHF eines 55-jährigen Menschen liegt bei 33%.¹⁷ Da die Inzidenz mit höherem Lebensalter ansteigt,¹⁶ ist durch die Alterung der Bevölkerung zukünftig mit einem starken Zuwachs der Patient*innen mit VHF zu rechnen und dementsprechend auch mit einer Zunahme der Kosten für die gesundheitliche Versorgung dieser Patient*innen.¹⁸ Da Patient*innen mit VHF von einer

erhöhten Morbidität und Mortalität sowie einer verringerten Lebensqualität betroffen sind, ist daher mit einer zunehmenden Relevanz der Thematik zu rechnen.¹⁶

2.3.3. Ätiologie und Risikofaktoren

Zu den nachgewiesenen Risikofaktoren für die Entstehung und das Aufrechterhalten eines VHF zählen ein höheres Lebensalter, ein arterieller Hypertonus, ein männliches Geschlecht, ein Diabetes mellitus, eine Adipositas, eine Dyslipidämie, eine Herzinsuffizienz, ein stattgehabter Myokardinfarkt, das Rauchen, ein Schlaf-Apnoe-Syndrom und eine genetische Prädisposition. Auf einen arteriellen Hypertonus können rund ein Viertel der VHF-Fälle zurückgeführt werden,¹⁶ bedingt durch strukturelle Veränderungen in Form von Fibroblasten-Proliferation und einer Kardiomyozyten-Hypertrophie aufgrund einer erhöhten mechanischen Druckbelastung im Rahmen des chronisch erhöhten Blutdrucks.¹⁹ Diabetes mellitus wird mit einem 1,6-fachen erhöhten Risiko in Verbindung gebracht.¹⁶ Allgemein haben Männer im Vergleich zu Frauen ein 1,5-fach höheres Risiko ein VHF zu entwickeln. Als weitere Risikofaktoren sind eine Hyperthyreose, ein exzessiver Alkoholkonsum, eine pulmonale Hypertonie, eine Kardiomyopathie und ein postoperativer Zustand nach einer Herz-Thorax-Operation bekannt. Des Weiteren sind Herzklappenfehlbildungen mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von VHF verbunden. Dies trifft insbesondere für Fehlbildungen der Aorten- oder Mitralklappe zu. Auch systemische Entzündungszustände wie bei Psoriasis oder rheumatoider Arthritis sind mit einem VHF assoziiert.¹⁹

Neben den multiplen Risikofaktoren sind verschiedene Erkrankungen bekannt, die mit dem VHF assoziiert werden. Die erhöhte Mortalität bei VHF ist weniger auf das Vorliegen des Flimmerns zurückzuführen, sondern ist häufig durch die Begleiterkrankungen und Komplikationen des VHF bedingt. Zu den typischen Begleiterkrankungen des VHF zählen Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, chronische Niereninsuffizienz, venöse Thromboembolien, Lungenembolien, kognitive Beeinträchtigungen und Demenz sowie cerebrale Infarkte. So ist bei VHF-Patient*innen beispielsweise das Risiko eines Myokardinfarkts um das 2-fache und für einen Schlaganfall um das 4- bis 5-fache erhöht.¹⁶

2.3.4. Pathophysiologie

Die genauen Mechanismen, die dem VHF zugrunde liegen, sind seit langem Thema der Forschung. Trotzdem sind die komplexen pathophysiologischen Grundlagen der Arrhythmie weiterhin teilweise ungeklärt.²⁰ Nachfolgend werden die gängigsten Erklärungsansätze zur Entstehung des VHF zusammenfassend dargestellt.

Zur Erklärung der Pathogenese des VHF werden drei Hauptkomponenten der zugrundeliegenden elektrophysiologischen Anomalie herangezogen. Zunächst lösen auftretende Trigger eine fokale ektopische Aktivität in den Vorhöfen oder Pulmonalvenen aus. Diese elektrische Aktivität wird dann durch strukturelle und funktionelle Anomalien aufrechterhalten, indem diese den Wiedereintritt der Erregung (Reentry) fördern. Das Vorhandensein eines abnormalen Gewebes durch strukturelles Remodeling trägt schließlich zur Aufrechterhaltung des VHF bei.¹⁹

Bei der Entstehung eines VHF wirken Veränderungen der atrialen Refraktärität, eine autonome ektopische Aktivität, Veränderungen der zellulären Calcium-Homöostase sowie frühe oder verzögerte Nachdepolarisationen als Trigger.²⁰ Frühe Nachdepolarisationen (early afterdepolarisations; EADs) werden hauptsächlich durch Membran-Spannungsschwankungen in der repolarisierenden Phase des Aktionspotenzials ausgelöst. Verzögerte Nachdepolarisationen (delayed afterdepolarizations; DADs) dagegen entstehen durch spontane Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum mit resultierender Ca^{2+} -Überlastung des Vorhofs während der Diastole.¹⁹ Die Calcium-Homöostase und Membran-Spannung beeinflussen sich gegenseitig und aus dieser Kopplung können sich neue spontane Depolarisationen und Calcium-Zyklusdynamiken ergeben.²¹ Eine fokale atriale ektopische Aktivität wird ausgelöst durch Veränderungen der einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle und Schrittmacherkanäle (If-Kanäle). Bei 90% der Patient*innen mit VHF, insbesondere bei paroxysmalem VHF, lässt sich eine ektopische Aktivität im Bereich der Pulmonalvenen nachweisen. Bei den restlichen 10% ist der Ursprung der fokalen ektopischen Aktivität häufig am inferioren Mitralanulus, am interatrialen Septum (insbesondere in der Fossa ovalis), der Hinterwand des linken Atriums oder dem linken Vorhofohr lokalisiert. Diese Fälle präsentieren sich eher als persistierendes VHF und können schwer zu identifizieren sein.¹⁹

Die Stabilität und das Wiederauftreten von VHF werden sowohl durch elektrische als auch durch strukturelle Umbauprozesse bedingt.²² Zu den strukturellen Anomalien durch Remodeling zählen die Vorhofdilatation, Fibrose, Fettgewebsinfiltration und Inflammation.¹⁹ Beim Remodeling kommt es neben den strukturellen Umbauprozessen auch zu vermehrter Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Dadurch kommt es zu einer Unterbrechung der Kontinuität der Herzmuskelbündel. Dies führt zu lokalen Überleitungsstörungen, einer Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit und schließlich zu Leitungsblockaden.²⁰ Außerdem nehmen neu gebildete Myofibroblasten Einfluss auf die Kardiomyozyten und verändern deren elektrophysiologische Eigenschaften, was zu fokaler, ektopischer Aktivität und Reentry-Kreisläufen führt.²³

Ein weiterer Erklärungsansatz für anhaltendes VHF ist die Multiple-Wavelet-Hypothese. Hier kommt es durch ein komplexes Zusammenspiel von elektrophysiologischen Mechanismen und Risikofaktoren zu multiplen, voneinander unabhängigen, simultanen Mikro-Reentry-Erregungskreisläufen. Insbesondere durch eine Hypertrophie des Vorhofs, eine verkürzte atriale Refraktärzeit und eine verzögerte intraatriale Erregungsleitung wird die Entstehung und Aufrechterhaltung dieser multiplen, hochfrequenten, ungeordneten Mikro-Reentrys begünstigt. Diese kleinen, fraktionierten Wavelets führen dann zu einer kontinuierlichen Erregung des Vorhofs und zu einer Aufrechterhaltung des VHF.^{19,24}

Gemeinsam haben die verschiedenen Erklärungsansätze, dass der Entstehung und Aufrechterhaltung des VHF komplexe pathophysiologische Prozesse zugrunde liegen. Diese begünstigen eine unkoordinierte, atriale Erregung und Reentry-Kreisläufe, die durch kardiales Remodeling aufrechterhalten werden.

2.3.5. Therapiemöglichkeiten

Bei der Therapie des VHF wird ein multimodales Konzept angewendet. Neben der Frequenz- und Rhythmuskontrolle ist auch eine Modifikation der Risikofaktoren und das Management der Komplikationen des VHF essenziell.¹³

Grundpfeiler der Therapie des VHF bilden die Frequenzkontrolle und die Rhythmuskontrolle. Die Regulation der Herzfrequenz ist häufig eines der primären Behandlungsansätze des VHF. In der Regel werden Frequenzen <110 pro Minute angestrebt. Die Frequenzkontrolle kann meist medikamentös durchgeführt werden. Dazu werden Medikamente eingesetzt, die die Refraktärzeit des Atrioventrikularknotens (AVN) verlängern, wie Betablocker, Calciumkanalblocker (Diltiazem, Verapamil) und Herzglykoside (insbesondere Digoxin). Da diese Medikamente bradykard wirken, kann bei Patient*innen mit einem Tachybradykardie-Syndrom eine zusätzliche Implantation eines Schrittmachers erforderlich sein. Bei therapierefraktärem fortbestehendem VHF unter frequenzregulierender Medikation, insbesondere bei VHF-Patient*innen mit hohen ventrikulären Frequenzen, ist die AVN-Ablation mit Pacing eine wirksame Therapieoption. Dabei wird die Überleitung am AV-Knoten unterbrochen und die Vorhöfe so von den Ventrikeln entkoppelt. Die Kontrolle der ventrikulären Frequenz wird dann durch einen implantierten Herzschrittmacher erreicht. Häufig werden dazu biventrikuläre Schrittmacher verwendet.¹³

Die Rhythmuskontrolle wird insbesondere bei VHF-Patienten*innen eingesetzt, die trotz adäquater Frequenzkontrolle Beschwerden zeigen. Die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus hat jedoch eine zunehmende Relevanz in der Therapie

des VHF, da dadurch nicht nur eine Symptomkontrolle und Verbesserung der Lebensqualität erreicht werden kann, sondern auch ein Progress der Erkrankung verhindert werden kann.¹² Auch weisen neuere Studien auf ein signifikant niedrigeres Risiko bezüglich der Gesamtmortalität, des Auftretens eines Schlaganfalls und schwerer kardiovaskulärer Ereignisse bei Etablierung einer frühen Rhythmuskontrolle (innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit frequenzkontrollierten VHF-Patient*innen hin.²⁵ Zur Rhythmuskontrolle können neben den antiarrhythmisch wirkenden Medikamenten eine Kardioversion oder auch eine Katheterablation eingesetzt werden. Antiarrhythmika können zur akuten Wiederherstellung des Sinusrhythmus oder als dauerhafte Therapie zur Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus bei Patient*innen mit rezidivierendem paroxysmalem oder persistierendem VHF genutzt werden. Häufig werden Antiarrhythmika der Klasse Ic und III verwendet wie Flecainid, Propafenon, Dronedaron und Amiodaron. Die synchronisierte Gleichstrom-Kardioversion wird primär im Notfallmanagement von VHF bei hämodynamisch instabilen Patient*innen eingesetzt. Zudem wird sie aber auch elektiv zur Wiederherstellung des Sinusrhythmus, insbesondere bei frühem persistierendem VHF, verwendet. Bei der Katheterablation wird eine Pulmonalvenenisolation mittels Radiofrequenz- oder Kryoballonablation durchgeführt. Vor allem Patient*innen mit paroxysmalem VHF haben einen hohen Nutzen von dieser Intervention, da die ektopische Aktivität häufig im Bereich der Pulmonalvenen lokalisiert ist.¹³

Bei der Einstellung der Risikofaktoren ist insbesondere die frühzeitige Abschätzung des thromboembolischen Risikos entscheidend, da das Schlaganfallrisiko von Patient*innen mit VHF im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um das Fünffache erhöht ist. Die Risikostratifizierung erfolgt in der Regel anhand des CHA₂DS₂-VASc-Scores. Bei einem erhobenen Score von ≥ 1 bei Männern und ≥ 2 bei Frauen sollte eine Antikoagulation erwogen werden. Dabei sollten direkte orale Antikoagulanzen gegenüber Warfarin (Marcumar®) bevorzugt eingesetzt werden. Eine Ausnahme bilden Patient*innen mit VHF und zusätzlich einer mittelschweren bis schweren Mitralklappenstenose oder mit einer mechanischen Klappenprothese. Eine Antikoagulation sollte immer auch gegen das individuelle Blutungsrisiko abgewogen werden. Dafür kann der HAS-BLED-Score als Entscheidungshilfe dienen.¹³

2.4. Die Bedeutung von Mitochondrien im Herzen

Mitochondrien sind essenziell für eukaryotisches Leben.⁸ Sie sind von einer Doppelmembran umschlossene Zellorganellen, die in stoffwechselaktiven Zellen zahlreich vorhanden sind.²⁶

Die zentrale Funktion der Mitochondrien besteht in der zellulären Energieproduktion. Auch in Herzmuskelzellen sind sie die Hauptproduzenten von zellulärem ATP. ATP liefert die Energie für fast alle intrazellulären Prozesse. Zudem wirkt ATP zusammen mit Calciumionen (Ca^{2+}) als Regulator der Atmungskette, um die Energieversorgung an den wechselnden Bedarf des Herzens anzupassen. Eine Störung des mitochondrialen Stoffwechsels wird, neben oxidativem Stress und einem kardialen Remodeling, mit dem Auftreten von Arrhythmien in Verbindung gebracht.⁹

Im Folgenden wird nun die Funktionsweise von Mitochondrien und deren Bedeutung im Herzen beschrieben. Anschließend werden ihre bekannten alterungsbedingten Veränderungen skizziert und deren Auswirkungen auf die kardiale Funktion.

2.4.1. Allgemeine Funktion der Mitochondrien

Die zentrale Funktion von Mitochondrien besteht in der Produktion von zellulärem ATP mittels oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS). Das OXPHOS-System besteht aus fünf Multiproteinkomplexen. Vier dieser Proteinkomplexe (Komplexe I bis IV) bilden die Elektronentransportkette. Sie leiten Elektronen zu molekularem Sauerstoff und ermöglichen dabei durch die entstehende freie Energie den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran. Dieser Gradient wird dann für die ATP-Gewinnung durch die ATP-Synthase, sowie für den Import von Präproteinen und den Transfer von Metaboliten durch die innere Mitochondrienmembran genutzt.^{27,28}

Neben der zellulären Energieproduktion erfüllen Mitochondrien weitere zahlreiche Funktionen, die für das Leben unerlässlich sind. Dazu zählen unter anderem die Regulation des Calcium-Haushalts und der Apoptose, die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern und von bestimmten Membranlipiden, sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Signaltransduktion. Aber auch essenzielle Stoffwechselwege wie der Citratzyklus als Quelle anderer Metabolite, sowie die Synthese von Aminosäuren, Lipiden und Nukleotiden sind auf Mitochondrien angewiesen.^{27,28}

2.4.2. Funktionsweise von COX und SDH

SDH und COX bilden die Komplexe II und IV der Atmungskette. Sie sind, zusammen mit dem restlichen oxidativen Phosphorylierungssystem, in den mitochondrialen Cristae lokalisiert. Cristae sind Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran, die dafür sorgen, dass die innere Membran eine um ein Vielfaches größere Oberfläche besitzt als die äußere Mitochondrienmembran.²⁸ Bei der OXPHOS findet ein Elektronentransfer über die Komplexe I bis IV schließlich auf Sauerstoff, den finalen Elektronenakzeptor der Atmungskette, statt. Während des Elektronentransfers werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt, was einen elektrochemischen Protonengradienten erzeugt. Diese protonenmotorische Kraft wird dann zur ATP-Synthese verwendet. Die benötigten Elektronen für die Atmungskette liefern NADH und FADH₂, die während des Citratzyklus, der β -Oxidation und der Glykolyse produziert werden.^{27,29}

Besonders an Komplex II (SDH) ist, dass er die innere Membran nicht überspannt und nicht an der Protonenverschiebung beteiligt ist. Im Komplex II werden die Elektronen von FADH₂ auf Coenzym Q übertragen. Coenzym Q nimmt Elektronen von Komplex I und Komplex II auf und transportiert sie zum Komplex III. Die Elektronenübertragung vom Komplex III auf den Komplex IV (COX) erfolgt durch Cytochrom c. Im Komplex IV werden die Elektronen schließlich auf Sauerstoff übertragen, wodurch Wasser entsteht. Gleichzeitig werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Durch den ATP-Synthase-Komplex (Komplex V) strömen die Protonen zurück in die Mitochondrienmatrix. Die Energie dieses Protonenflusses wird verwendet, um ADP mit anorganischem Phosphat zu verbinden und so ATP zu generieren.^{27,29}

Mitochondrien haben ein eigenes Genom, das beim Menschen für 13 Proteine kodiert. Diese Proteine spielen eine essenzielle Rolle in der OXPHOS. Die übrigen Untereinheiten der OXPHOS Komplexe und mehr als 1.200 andere Proteine werden nukleär kodiert und in die Mitochondrien importiert. Die mtDNA ist anfälliger für Schäden als die nukleäre DNA und hat eine 10-bis 20-fach höhere Mutationsrate als das Kerngenom. Eine Akkumulation von mtDNA-Mutationen findet bei seltenen, teils schwerwiegenden Erbkrankheiten, aber auch somatisch im normalen Alterungsprozess statt.⁸

Bereits 1992 stellte Müller-Höcker einen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Defekten und alterndem Gewebe fest. Dazu untersuchte er verschiedene menschliche Gewebetypen. In der Skelettmuskulatur, der externen Augenmuskulatur, dem Diaphragma und dem Herzen stellte er zunehmende fokale Defekte der COX während der Alterung fest. Im Herzen waren die Defekte bereits im zweiten Lebensjahrzehnt nachweisbar und ab dem 50. Lebensjahr konstant vorhanden. Die Defekte waren dabei zufällig in einzelnen Zellen oder in kleinen

Gruppen verteilt und endeten an den Glanzstreifen der benachbarten Herzmuskelzellen. Die Anzahl der defekten Zellen stieg von 2-3 pro cm² in der 2. und 3. Lebensdekade auf 50 Defekte pro cm² im fortgeschrittenen Alter an.¹⁰

Khrapko et al. konnten dann 1999 mittels PCR-Amplifikation mitochondrialer Genome aus menschlichen Kardiomyozyten nachweisen, dass eine Akkumulation mtDNA-Mutationen in den Myokardzellen von Gewebespende*rinnen in hohem Alter vorliegt. Diese deletionsreichen Zellen traten mit einer Häufigkeit von bis zu einer von sieben Herzmuskelzellen auf. Das Vorhandensein zahlreicher mtDNA-Mutationen in einem hohen Anteil der Kardiomyozyten deutete darauf hin, dass solche Mutationen eine der Ursachen für die Alterung des menschlichen Herzens sein könnten.¹¹ Auch in nachfolgenden Studien konnten im Alterungsprozess vermehrt somatische mtDNA-Mutationen nachgewiesen werden, die zu klonaler Expansion neigen und in verschiedenen Geweben wie dem Herzen, der Skelettmuskulatur, der Substantia nigra und der Leber zu mosaikartigen Störungen der Atmungskette führen.³⁰

2.4.3. Mitochondrien im Alterungsprozess und Einfluss auf die kardiale Funktion

Insbesondere in stoffwechselaktiven Zellen, die abhängig von der Energieproduktion mittels OXPHOS sind, wirken sich mitochondriale Schäden stark auf die Gewebefunktion aus. Dazu zählen auch Herzmuskelzellen, denn sie sind auf den aeroben Stoffwechsel angewiesen. Insbesondere die Myosin-Adenosintriphosphatase (ATPase) der kontraktilen Filamente benötigt ATP, um die Energie für den Kraftschlag zu liefern und nach der Kontraktion das Aktin von der Myosin-Querbrücke abzulösen. Auch die Natrium-Kalium-ATPase und die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums sind auf ATP angewiesen, um die mechanische Arbeit des Herzmuskels aufrecht zu halten.^{8,31} Von allen Organen besitzt das Herz die größte Menge an Mitochondrien. Diese nehmen rund ein Drittel des gesamten Kardiomyozytenvolumens ein. 90% des produzierten ATP werden im Myokard direkt verwendet, um die Herzfunktion und Kontraktilität aufrechtzuerhalten. Gespeichert wird nur so viel Energie wie für die Herzaktivität über wenige Schläge benötigt wird, sodass unter Ruhebedingungen der gesamte ATP-Vorrat alle 10 Sekunden umgesetzt wird.³¹

Im Mausmodell konnten Baris et al. (2015) bereits zeigen, dass während des Alterns ein Gewebemosaik aus Kardiomyozyten mit mtDNA-Mutationen und funktionstüchtigen Mitochondrien entsteht, welches das Auftreten von Arrhythmien begünstigt. Dazu wurde ein genetisch modifiziertes Mausmodell entwickelt, um den Alterungsprozess zu simulieren. Mittels Expression einer mutierten mitochondrialen Helikase (K320E-Twinkle^{Myo}) wurde ein Gewebemosaik mit mitochondrialen Defekten erzeugt (siehe Abbildung 1). Im

Alterungsprozess erhöhte sich die Deletions-Last zwischen 12 und 18 Monaten bei K320E-Twinkle^{Myo}-Mäusen um das 5-fache. Die mutierten Mäuse wiesen somit eine beschleunigte Anhäufung von mtDNA-Deletionen im Herzen während der Alterung auf (siehe Abbildung 2). Die Akkumulation von mtDNA-Deletionen führten zu mitochondrialer Dysfunktion in den Kardiomyozyten. Dies zeigte sich durch eine Akkumulation von COX^{neg} Zellen in den genetisch modifizierten Mäusen auf bis zu 0,56% bei den älteren K320E-Twinkle^{Myo}-Mäusen (18 Monate alt).⁷

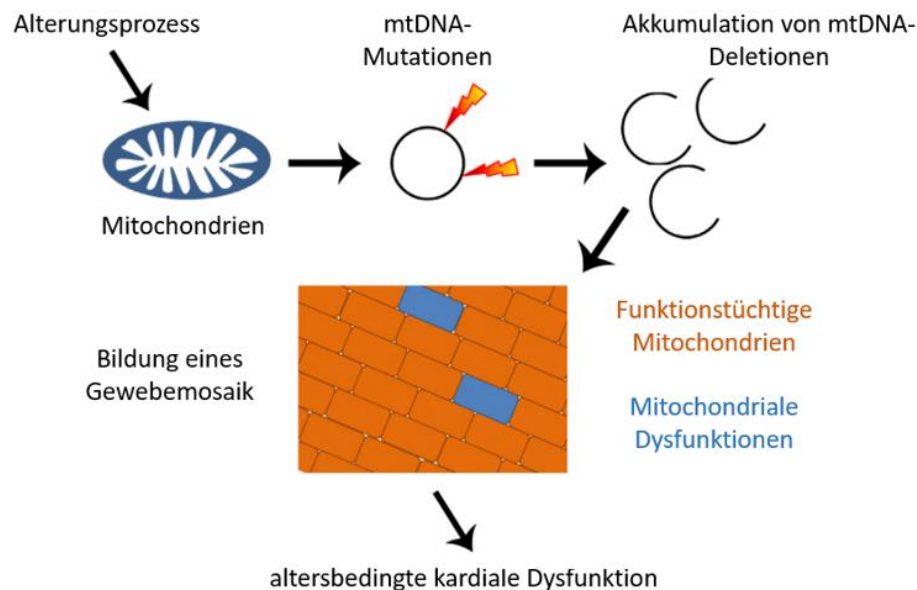


Abbildung 1: schematische Darstellung der Entstehung eines Gewebemosaiks im Alterungsprozess; modifiziert nach Baris et al. (2015)⁷

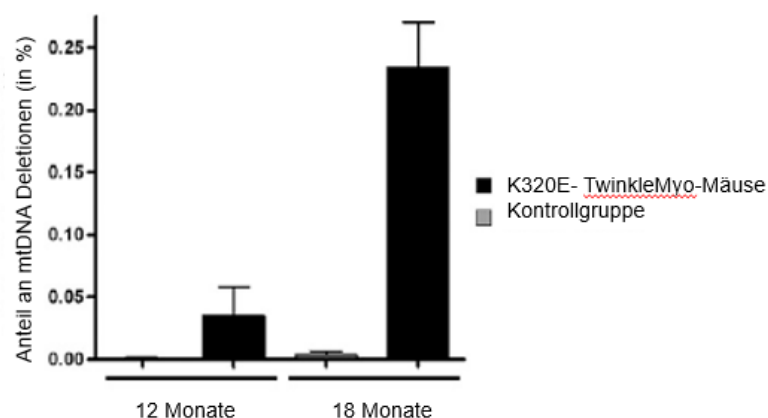


Abbildung 2: Summe des prozentualen Anteils an drei ausgewählten mtDNA Deletionen bei mutierten Mäusen im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen; modifiziert nach Baris et al. (2015)⁷

Die Abbildung 3 zeigt das Auftreten von Herzrhythmusstörungen im telemetrisch gemessenen Langzeit-EKG bei 18 Monate alten, sich frei bewegenden Mäusen. Insbesondere unter

Stressbedingungen (Schwimmen in warmem Wasser) wurden bei den genetisch modifizierten Mäusen signifikant mehr spontane vorzeitige ventrikuläre Kontraktionen und spontane AV-Blöcke im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgezeichnet. Bei 12 Monate alten K320E-Twinkle^{Myo}-Mäusen, die nur 0,2% COX^{neg} Zellen aufwiesen, wurde dagegen keine erhöhte Inzidenz von Arrhythmien beobachtet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass bei einer Akkumulation von mitochondrialen Defekten im Alterungsprozess vermehrt Arrhythmien auftreten.⁷

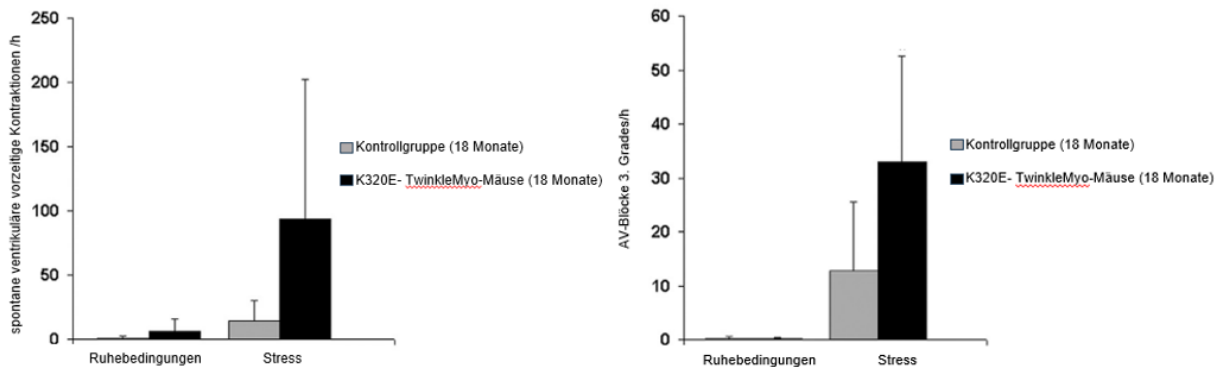


Abbildung 3: nachgewiesene Herzrhythmusstörungen im Alterungsprozess im Mausmodell; modifiziert nach Baris et al. (2015)⁷

Ob diese geringe Anzahl isolierter mitochondrial-defizienter Zellen die altersbedingt vermehrt auftretenden Herzrhythmusstörungen beim Menschen verursachen, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von Baris et al. am Mausmodell weisen jedoch darauf hin, dass auch beim Menschen die altersabhängige Akkumulation von mtDNA-Mutationen zur Entstehung eines Gewebemosaiks und damit zum Auftreten von Herzrhythmusstörungen, wie dem VHF, beitragen könnte.³²

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Auswahl der Proband*innen

Das Patient*innenkollektiv wird anhand verschiedener Parameter ausgewählt. Zu den Einschlusskriterien für die MOSAIC II Studie zählt ein Alter ≥ 65 Jahre und das Vorliegen von persistierendem, permanentem oder paroxysmalem VHF. Die Einschlusskriterien müssen alle erfüllt sein. Patient*innen jünger als 65 Jahre, Schwangere oder gebärfähige Frauen ohne negativen Schwangerschaftstest 48 Stunden vor der Behandlung können nicht in die Studie eingeschlossen werden. Auch ein medizinisches Problem, wodurch sich die Teilnahme an der Studie nachteilig auf den/die Proband*in auswirkt, zählt zu den Ausschlusskriterien. Klinische Daten werden bei Aufnahme, während der Prozedur und im Falle einer schweren kardialen und zerebrovaskulären Komplikation (MACCE: major adverse cardiac and cerebrovascular events) erhoben.

In die Studie werden 31 Proband*innen eingeschlossen. 29 Patient*innen werden nach Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien - oder weil kein Probenmaterial intraoperativ gewonnen werden konnte - nicht in die Studie aufgenommen.

3.1.2. Probengewinnung

Nach schriftlicher Aufklärung auf Basis des bereits bestehenden Ethikvotums von BioMaSOTA (zentrale Biomaterialbank der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, Ethik-Nr. 13-091) und Einwilligung der Patient*innen zum Einschluss in die Studie mehr als 24 Stunden vor dem operativen Eingriff wird im Rahmen eines herzchirurgischen Eingriffs das Probengewebe generiert. Es handelt sich dabei um Gewebe aus dem rechten und/oder linken Herzohr, das routinemäßig bei Eröffnung des Vorhofs im Rahmen des herzchirurgischen Eingriffs anfällt und andernfalls vernichtet würde. Es werden keine Proben von herzgesunden Patient*innen im Sinusrhythmus untersucht und die Kontrollgruppe wird durch Proband*innen mit paroxysmalem VHF gebildet.

Die Gewebeproben werden auf Eis gekühlt direkt aus dem Herz-OP der Uniklinik Köln in das Labor des Instituts für Physiologie transportiert. Dort werden die Proben zur Konservierung mittels Isopentan schockgefroren und im Anschluss bei -80°C gelagert. Um möglichst viele Abschnitte der Probe zu erfassen, werden aus fünf verschiedenen Bereichen (A-E) Querschnitte angefertigt. Nach dem Schneiden der verschiedenen Bereiche der Herzmuskelproben in 10 μm dicke Scheiben werden die Querschnitte auf Objektträgern fixiert.

Pro Objektträger werden zwei aufeinanderfolgende Querschnitte verwendet. Abbildung 4 stellt die beiden Vergleichsgruppen sowie den Schneideprozess der gewonnenen Vorhofohr-Proben dar.

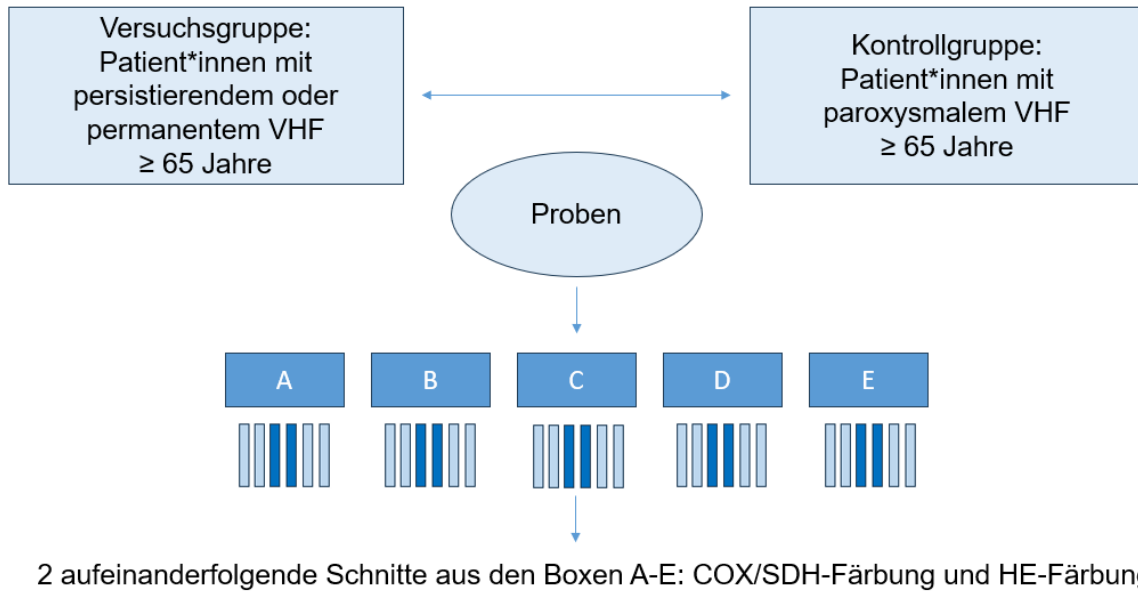


Abbildung 4: Patient*innenkollektiv und Probenaufbereitung

3.2. Methoden

3.2.1. Histologische Aufarbeitung der Proben

Im Anschluss werden die Querschnitte entsprechend zweier Färbeprotokolle behandelt. Nach dem Auftauen und Lufttrocknen von jeweils 12 Objektträgern mit je 2 Querschnitten werden diese zunächst auf COX-Aktivität durch Inkubation für 20 Minuten bei 37°C angefärbt. Die Enzymaktivität von COX wird mittels Diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB) sichtbar gemacht und zeigt sich dann in einer kräftig braunen Färbung der Zelle. Die COX-Enzymreaktion wird nach der Inkubationszeit mittels phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) abgebrochen, damit die Braunfärbung nicht zu dunkel wird. Im Anschluss werden die Schnitte mittels SDH-Färbung mit Nitroblue Tetrazolium (NBT) behandelt und zwischen 55 und 65 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aktivität von SDH führt mittels Reduktion von NBT zu einem blauen Endprodukt. SDH wird nukleär codiert und sollte daher auch in Kardiomyozyten mit mtDNA-Mutationen funktionstüchtig sein. Die Blaufärbung wird jedoch vom Braun der COX-Färbung überdeckt. Nur in den Zellen, in denen durch funktionale Defekte der COX aufgrund von mtDNA-Mutationen die braune Färbung nicht erfolgte, wird die SDH-Färbung nicht überlagert und die Zellen erscheinen unter dem Mikroskop sichtbar blau. Wird nun die Aktivität der COX als Maß der mitochondrialen Funktionsfähigkeit verwendet, kann mittels dieser Färbemethode das Ausmaß der mitochondrialen Dysfunktion anhand der Anzahl blau angefarbter Zellen in der Probe dargestellt werden.³³

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der COX- und SDH-Färbungen. Die einzelnen Komponenten werden vermischt und ergeben 10 ml der COX-Lösung und 20 ml der SDH-Lösung. Die jeweiligen Färbelösungen werden in Portionen von 70 µl aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

COX-Lösung (10 ml)	SDH-Lösung (20 ml)
-Sucrose 750 mg	-NBT 40 mg
-DAB 10 mg	-Milli-Q-Wasser 9 ml
-50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) 10ml	-50 mM Tris-(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl) (pH 7,4) 5 ml
-20mg/ml Katalase 2 µl	-0,2 M Natriumsuccinat 5 ml
-Cytochrom c 20mg	-50 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 1 ml

Tabelle 1: Zusammensetzung der COX- und SDH-Färbelösung

Abbildung 5 stellt schematisch die verschiedenen Färbungen je Färbungsprozess dar. Es werden zeitgleich 12 Objektträger von 12 Proband*innen mit jeweils 2 aufeinanderfolgenden Probenschnitten angefärbt. Die Schnitte werden vollständig zunächst mit der COX-Lösung und anschließend mit der SDH-Lösung angefärbt. Zur Kontrolle wird pro Färbeprozess ein Querschnitt nur mit der COX-Färbung behandelt und ein Querschnitt nur mit der SDH-Färbung, sodass pro Färbungsprozess 22 Schnitte mit beiden Enzymfärbungen behandelt werden und zwei Schnitte als Kontrolle dienen.

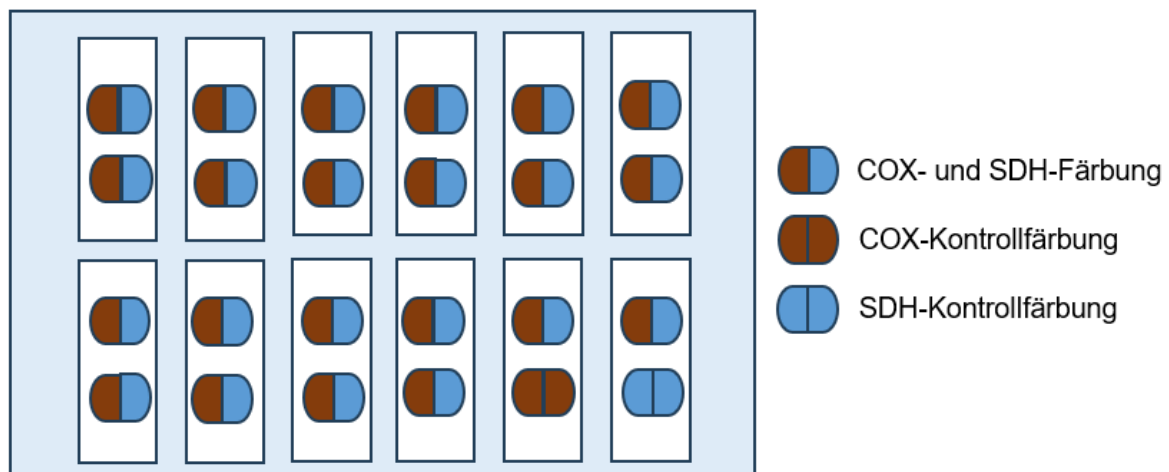
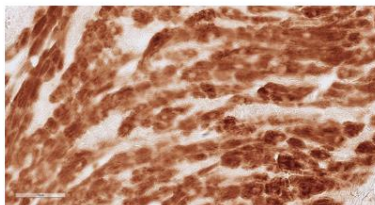


Abbildung 5: schematische Darstellung der verwendeten Färbungen je Färbungsprozess

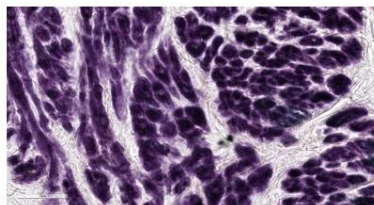
Die SDH-Kontrollfärbung wird verwendet, um die geeignete Inkubationszeit zu bestimmen. Dazu wird während der Inkubation das Maß der Blaufärbung der SDH-Kontrollfärbung unter dem Mikroskop immer wieder bestimmt, bis eine kräftige blaue Färbung sichtbar ist. Abschließend wird auf die Proben Glycerin-Glycerol aufgetragen und jeder Objektträger erhält eine Deckplatte. Die Abbildung 6 zeigt Beispiele für die verschiedenen Enzymfärbungen.

1) nur COX-Färbung



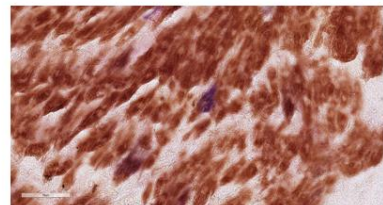
Probe: Box A, 27.10.2022

2) nur SDH-Färbung



Probe: Box E, 27.10.2022

3) COX- und SDH-Färbung



Probe: Box C, 27.10.2022

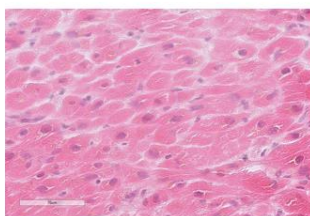
Abbildung 6: Beispiel für die histologische Aufbereitung der Proben mittels Enzymfärbung

Angrenzend zu der Schnittebene der Enzymfärbung werden weitere konsekutive Querschnitte mittels Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung bearbeitet, um die Zellkerne darzustellen. Zellkerne stehen dabei stellvertretend für alle Zellen, um im Quantifizierungsprozess den Prozentsatz der blauen Zellen an der Gesamtzahl der Herzmuskelzellen bestimmen zu können. Nach dem Auftauen und Lufttrocknen von jeweils 8 Objektträgern mit je 2 Querschnitten werden diese für 3 Minuten mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend für 10 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Im Folgenden werden die Proben für 2 Minuten mit Eosin gefärbt und dann mit Milli-Q-Wasser gewaschen. Die Dehydratation erfolgt mit Ethanol in aufsteigender Reihenfolge (50%, 70%, 80%, 90% und 100% Ethanol). Mittels eines Xylol-basierten Eindeckmediums und Deckgläsern werden die Proben schließlich eingedeckt. Abschließend werden die Schnitte mit einem Slidescanner (Hamamatsu S360, Köln, Deutschland) fotografiert. Je Patient*in werden fünf Querschnitte (A bis E) an verschiedenen Stellen der Herzohrprobe auf diese Weise angefärbt und ausgewertet.

3.2.2. Quantifizierung

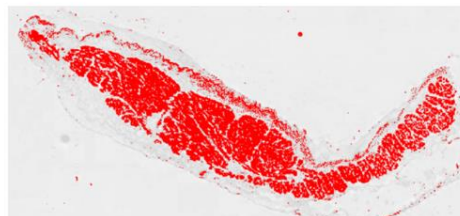
Die Quantifizierung der COX^{neg} Kardiomyozyten erfolgt mittels der Programme Aperio ImageScope und ImageJ. In drei Ausschnitten der Proben in 40-facher Vergrößerung werden nun die Zellkerne gezählt und so die Zahl aller Zellen pro Beobachtungsfeld ermittelt. Anschließend wird diese Zahl durch zwei dividiert und mittels des Colour Threshold in ImageJ auf den gesamten Probenquerschnitt hochgerechnet. Dadurch wird näherungsweise die Gesamtzahl an Kardiomyozyten, die ungefähr die Hälfte der Zellkerne stellen, in dem Probenquerschnitt berechnet. Nun wird aus der Anzahl der blauen Zellen und der Gesamtzahl der Kardiomyozyten der Anteil an COX-defizienten Zellen in Prozent errechnet. Abbildung 7 stellt einzelne Schritte des Quantifizierungsprozesses dar.

1) HE-Färbung



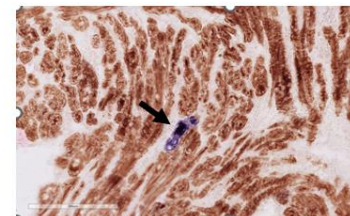
↳ Zahl der Zellkerne = Kardiomyozyten in 3 Bildausschnitten

2) Colour Threshold in ImageJ



↳ Gesamtzahl an Kardiomyozyten

3) COX/SDH-Färbung



↳ Anzahl von blauen Zellen pro Probe (min: 0; max: 69 blaue Zellen)

→ Anteil an COX^{neg}-Zellen

Abbildung 7: Der Quantifizierungsprozess

3.2.3. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wird das Programm GraphPad Prism verwendet. Die ermittelte Prozentzahl an Zellen mit mitochondrialen Funktionsdefekten wird mit den klinischen Daten der Patient*innen aus der erstellten Datenbank (Patient*innenalter, Geschlecht, Herzrhythmusstörungen paroxysmal oder persistierend/permanent) korreliert. Der Zusammenhang wird mittels linearer Regression ermittelt. Ein p-Wert von $<0,05$ wird als statistisch signifikant angenommen. Da je Patient*in fünf Querschnitte (A bis E) an verschiedenen Stellen der Herzohrprobe ausgewertet werden, wird der Mittelwert der errechneten COX-defizienten Kardiomyozyten für die statistische Analyse verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Patient*innenkollektiv

In die Studie wurden 31 Proband*innen eingeschlossen. Die Proben wurden in dem Zeitraum von November 2021 bis Februar 2023 im Herzzentrum der Uniklinik Köln entnommen. Von drei Proband*innen konnten Proben sowohl aus dem rechten als auch aus dem linken Vorhofohr gewonnen werden. 11 Proben wurden doppelt angefärbt. Hier wurde der Mittelwert der errechneten COX-defizienten Zellen für die statistische Auswertung verwendet. Zwei Proben konnten nicht ausgewertet werden: eine Probe konnte aufgrund einer fehlerhaften Beschriftung keinem/keiner Proband*in zugeordnet werden und eine Probe wurde verworfen, da sich eine so hohe Zahl an Kardiomyozyten blau anfärbte, dass keine einzelnen Zellen mehr abgegrenzt und gezählt werden konnten. Bei den 29 ausgewerteten Proben handelte es sich um 9 Patient*innen mit paroxysmalem VHF, 18 mit persistierendem und 2 mit permanentem VHF. 34% der Proband*innen waren weiblich (n=10), 66% männlich (n=19) und 0% divers (n=0). Das mediane Alter der Proband*innen lag bei 73 Jahren (max.=82 Jahre, min.=65 Jahre).

4.2. Ergebnisse der Quantifizierung

Tabelle 2 zeigt die Anzahl an COX^{neg} Zellen bei den ausgewerteten Proben. Es wurden mindestens 0 und maximal 69 COX-defiziente Zellen pro Querschnitt und mindestens 7 und maximal 212 COX^{neg} Zellen pro Probe gezählt. Im Verhältnis zur Gesamtzahl der Kardiomyozyten wurden pro Probe mindestens 0,02% und maximal 0,31% an COX^{neg} Zellen ermittelt.

Anzahl an COX ^{neg} Zellen	
<i>absolut</i>	
max.	212
min.	7
<i>relativ (gerundet in %)</i>	
max.	0,31
min.	0,02

Tabelle 2: Rohdaten der Quantifizierung, Anzahl an COX^{neg} Zellen

In Tabelle 3 ist der Anteil an COX^{neg} Zellen an der Gesamtzahl der Kardiomyozyten dargestellt. Die Proband*innen wurden nach den Merkmalen Geschlecht und VHF (paroxysmal oder

persistierend/permanent) gruppiert. Die Proband*innen mit paroxysmalem VHF bildeten die Kontrollgruppe. Der Mittelwert des Anteils an COX-defizienten Zellen in allen ausgewerteten Proben betrug 0,09%. Die Frauen mit persistierendem/permanentem VHF hatten im Mittel 0,05% COX^{neg} Zellen und die Probandinnen der Kontrollgruppe mit paroxysmalem VHF einen Anteil von 0,07%. Bei den Männern hatten die Probanden mit persistierendem/permanentem VHF im Mittel einen Anteil an COX^{neg} Zellen von 0,09% und die Probanden in der Kontrollgruppe einen Anteil von 0,14% an COX-defizienten Kardiomyozyten.

Anteil an COX^{neg} Zellen (gerundet in %)	
<i>Frauen mit persistierendem/permanentem VHF (n=7)</i>	<i>Männer mit persistierendem/permanentem VHF (n=13)</i>
0,04	0,12
0,03	0,13
0,07	0,10
0,04	0,02
0,08	0,18
0,04	0,06
0,03	0,07
	0,14
	0,08
	0,07
	0,04
	0,04
	0,07
Mittelwert: 0,05	Mittelwert: 0,09
<i>Frauen mit paroxysmalem VHF (n=3)</i>	<i>Männer mit paroxysmalem VHF (n=6)</i>
0,02	0,06
0,03	0,19
0,15	0,03
	0,16
	0,06
	0,31
Mittelwert: 0,07	Mittelwert: 0,14
Mittelwert aller Proben: 0,09	

Tabelle 3: Rohdaten der Quantifizierung, Anteil an COX^{neg} Zellen

4.2.1. Gesamtes Patient*innenkollektiv

Tabelle 4 und Abbildung 8 zeigen die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) aller ausgewerteten Proben. Nach den Merkmalen Geschlecht und Art des VHF wurden vier verschiedene Gruppen gebildet. Mit einem p-Wert von 0,08 war die Gesamtanalyse nicht signifikant. Im Turkey-Test wurden die einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Die sechs einzelnen Analysen waren mit p-Werten jeweils >0,05 nicht signifikant.

Tukey's multiple comparisons test	Standard-abweichung	95% Konfidenz-intervall	p-Wert
Frauen mit paroxysmalem VHF vs. Frauen mit persistierendem/permanentem VHF	0,0211	-0,0947 bis 0,1369	0,96
Frauen mit paroxysmalem VHF vs. Männer mit paroxysmalem VHF	-0,0700	-0,1887 bis 0,0487	0,39
Frauen mit paroxysmalem VHF vs. Männer mit persistierendem/permanentem VHF	-0,0205	-0,1280 bis 0,0870	0,95
Frauen mit persistierendem/permanentem VHF vs. Männer mit paroxysmalem VHF	-0,0911	-0,1845 bis 0,0023	0,06
Frauen mit persistierendem/permanentem VHF vs. Männer mit persistierendem/permanentem VHF	-0,0416	-0,1203 bis 0,03709	0,48
Männer mit paroxysmalem VHF vs. Männer mit persistierendem/permanentem VHF	0,0495	-0,0333 bis 0,1323	0,37

Tabelle 4: ANOVA der gesamten Proben

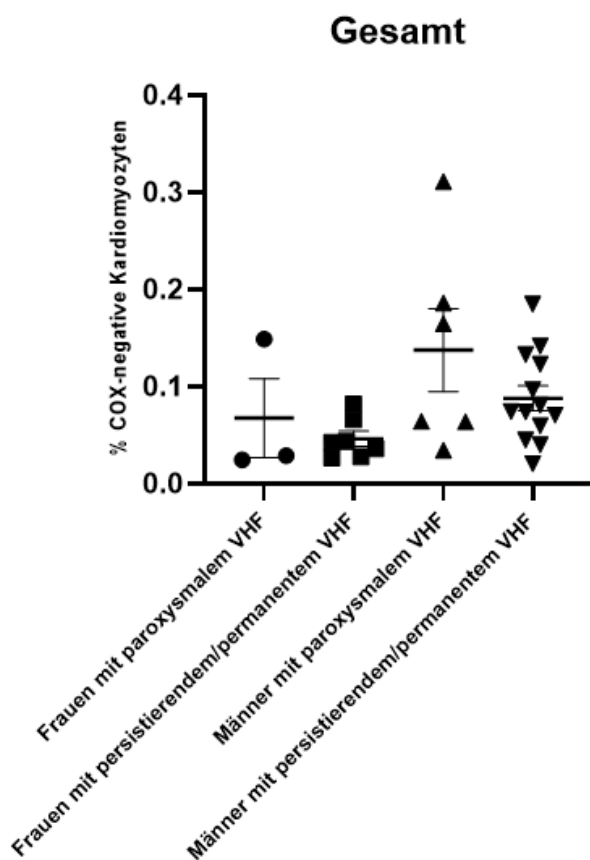


Abbildung 8: Analyse aller Proband*innen nach den Merkmalen Geschlecht (Frauen/Männer) und Art des VHF

4.2.2. Geschlechtsspezifische Subgruppenanalyse

In der Subgruppenanalyse der Frauen wurde der Anteil an COX^{neg} Kardiomyozyten bei den Probandinnen mit paroxysmalen VHF (n=3) mit dem Anteil an COX-defizienten Zellen bei den Probandinnen mit persistierendem/permanentem VHF (n=7) verglichen. Hier zeigte sich im ungepaarten t-Test mit einem p-Wert von p=0,46 keine Signifikanz.

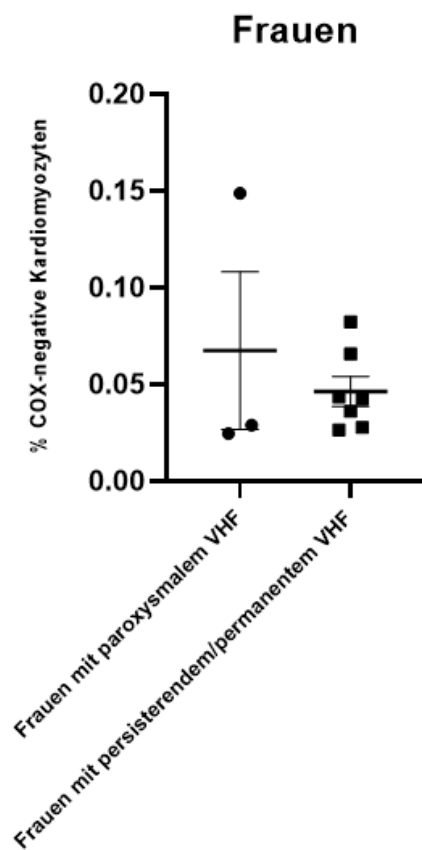


Abbildung 9: Subgruppenanalyse der Frauen

In der geschlechtsspezifischen Subgruppenanalyse der Männer zeigte sich im Vergleich der Probanden mit paroxysmalen VHF (n=6) zu den Probanden mit persistierendem/permanentem VHF (n=13) in Bezug auf den Anteil an COX^{neg} Kardiomyozyten im ungepaarten t-Test mit einem p-Wert von p=0,16 keine Signifikanz.

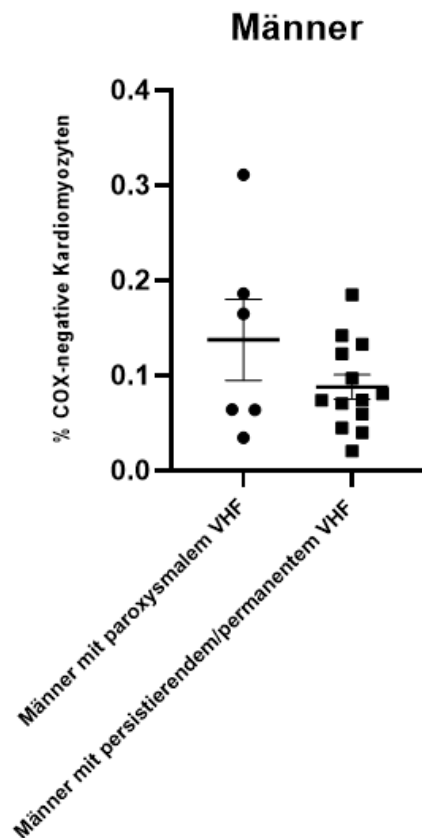


Abbildung 10: Subgruppenanalyse der Männer

4.2.3. Geschlechtsunspezifische Gesamtanalyse

In der Gesamtanalyse wurden die Proband*innen mit paroxysmalen VHF (n=9) mit den Proband*innen mit persistierendem/permanentem VHF (n=20) in Bezug auf den Anteil an COX^{neg} Kardiomyozyten verglichen, ohne nach dem Geschlecht zu unterscheiden. Auch hier zeigte sich im ungepaarten t-Test mit einem p-Wert von p=0,13 keine Signifikanz.

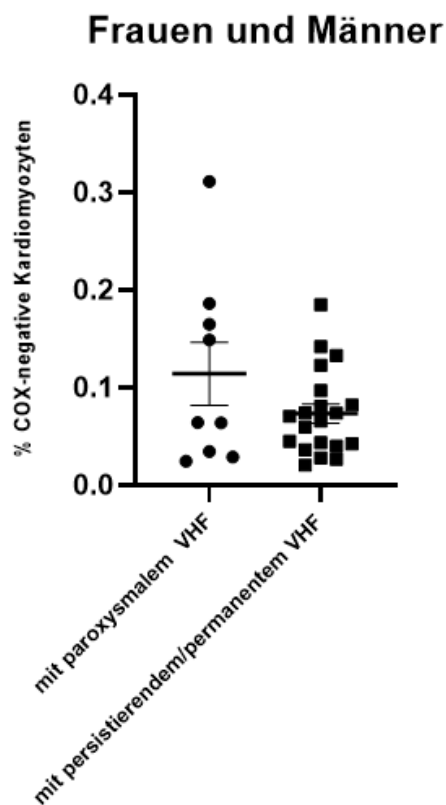


Abbildung 11: geschlechtsunspezifische Gesamtanalyse

4.2.4. Altersabhängige Analyse

In der Alterskorrelation wurde mittels einfacher linearer Regression der Anteil an COX^{neg} Kardiomyozyten als abhängige Variable mit dem Alter der Proband*innen bei Probenentnahme als unabhängige Variable analysiert. In der einfachen linearen Regressionsanalyse zeigte sich mit einem p-Wert von $p=0,82$ keine Signifikanz.

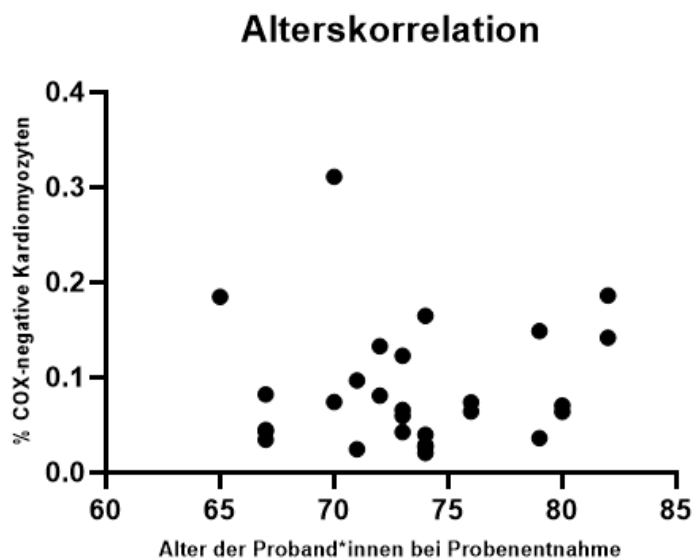


Abbildung 12: geschlechtsunspezifische, altersabhängige Analyse

5. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob Veränderungen der Mitochondrienfunktionalität auf Einzel-Zellebene mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Herzrhythmusstörungen zusammenhängen. Die zu Beginn formulierte Fragestellung kann nach den experimentellen Ergebnissen der Arbeit nun folgendermaßen beantwortet werden:

- 1) Es besteht bei den ausgewerteten Proband*innen kein signifikanter Unterschied bei der Akkumulation von Kardiomyozyten mit mitochondrialem Defekt bei Patient*innen mit persistierendem oder permanentem VHF gegenüber Menschen mit paroxysmalem VHF.
- 2) Eine Assoziation von einem im Alterungsprozess entstehenden Mosaik von Kardiomyozyten mit mitochondrialen Funktionsdefekten und dem Auftreten von Herzrhythmusstörungen im Alter konnte mit dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

Die zuvor aufgestellten Arbeitshypothesen können dementsprechend durch die Ergebnisse nicht bestätigt werden.

5.1. Methodendiskussion

Das in dieser Studie verwendete Färbeprotokoll ermöglicht die Visualisierung von Zellen mit mitochondrialer Dysfunktion. Die kombinierte histochemische COX/SDH-Methode ist lange etabliert und geeignet für die Identifizierung mitochondrialer Erkrankungen.³³ In der Arbeit von Baris et al. bildete sich im Alterungsprozess ein Gewebe-Mosaik mit einzelnen Kardiomyozyten mit mitochondrialem Defekt eingebettet in gesundes Gewebe.⁷ Auch in diesem Promotionsprojekt konnte durch das verwendete Färbeprotokoll beobachtet werden, dass sich einzelne blaue Zellen mit Funktionsdefekt der COX einbetten in gesundes Herzmuskelgewebe.

Bei der Auswahl der Proband*innen spielte das Alter eine wesentliche Rolle. Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass im Alterungsprozess einzelne Herzmuskelzellen zunehmend mitochondriale Defekte aufweisen und auch, dass die Prävalenz des VHF mit dem Alter zunimmt.^{8,10,26,34} Deshalb wurden nur Patient*innen, die ≥ 65 Jahre sind, in die Studie eingeschlossen. In der in dieser Arbeit untersuchten Altersspanne von 65 bis 82 Jahren zeigte sich in der einfachen linearen Regressionsanalyse keine signifikante Zunahme des Anteils an COX^{neg} Kardiomyozyten mit dem Alter. Da das höhere Lebensalter zu den Einschlusskriterien dieser Studie gehörte, liegen keine Daten von Patient*innen jünger als 65 Jahre vor, die eine Betrachtung des Anteils der COX^{neg} Kardiomyozyten über eine größere Altersspanne erlaubt hätten.

Sowohl bei der Experimental- als auch bei der Kontrollgruppe handelte es sich um Patient*innen mit VHF. Die Hypothese war, dass paroxysmales VHF auf kleinen definierten Foci, persistierendes VHF aber auf einem Gewebe-Mosaik im Gewebe beruhen. Dadurch konnten die Proben ohne zusätzliches Risiko für die Proband*innen im Rahmen einer ohnehin erfolgenden Herzoperation gewonnen werden. Jedoch wäre ein Vergleich von VHF-Patient*innen mit Herzgesunden möglicherweise aussagekräftiger gewesen.

5.2. Ergebnisdiskussion

In der Arbeit von Baris et al. wurde bei den mutierten Mäusen nach 12 Monaten ein Anteil an Kardiomyozyten mit mitochondrialem Defekt von 0,17% und nach 18 Monaten von 0,56% nachgewiesen.⁷ Der ermittelte Anteil von COX^{neg} Kardiomyozyten in diesem Promotionsprojekt mit einem Mittelwert von 0,09% (gesamtes Patient*innenkollektiv) lag damit unterhalb der erhobenen Daten in Mäusen. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einem Mosaik von Kardiomyozyten mit mtDNA Defekten und dem Vorliegen von VHF. Jedoch sind diese Ergebnisse kritisch zu bewerten, da nur eine geringe Zahl an Proband*innen (n=29) in der Studie betrachtet wurden. Insbesondere die Kontrollgruppe fiel mit 9 Patient*innen klein aus. Dadurch haben einzelne Proband*innen den durchschnittlichen Anteil an COX^{neg} Zellen in ihrer Subgruppe stark beeinflusst. So hat ein Patient in der Gruppe von Männern mit paroxysmalem VHF mit 0,31% einen deutlich höheren Anteil an COX^{neg} Zellen als der Rest der Gruppe. Diese hatten einen Mittelwert von 0,10% bezogen auf den Anteil an COX^{neg} Zellen. Die Werte dieses einen Patienten haben dadurch den Mittelwert in der Gruppe von Männern mit paroxysmalem VHF um 40% auf einen durchschnittlichen Anteil an COX^{neg} Zellen von 0,14% angehoben und damit stark beeinflusst.

In der Literatur ist ein männliches Geschlecht als bekannter Risikofaktor für das Vorliegen eines VHF beschrieben.¹⁹ Die Tabelle 3 zeigt, dass bei den Proband*innen dieser Studie sowohl in der Gruppe mit paroxysmalem als auch mit persistierendem/permanentem VHF ein durchschnittlich höherer Anteil an COX^{neg} Zellen bei den Männern als bei den Frauen vorliegt. Mangels statistischer Signifikanz sollten diese Ergebnisse jedoch kritisch bewertet werden.

Des Weiteren sind multiple Risikofaktoren und Begleiterkrankungen des VHF bekannt, deren Vorliegen und Ausprägung in dieser Arbeit nicht in die Analyse eingeschlossen wurden. Es wurden jedoch für die Datenbank zahlreiche Merkmale wie das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, einer KHK, einer Kardiomyopathie, eines Diabetes mellitus, eines Schlaf-Apnoe-Syndroms, einer Niereninsuffizienz sowie zurückliegende Schlaganfälle erhoben. Auch der Body-Mass-Index (BMI), die Einnahme von Antiarrhythmika und Betablockern sowie der Nikotin- und Alkoholkonsum wurden erfragt. Diese Risikofaktoren und Begleiterkrankungen in

die Bewertung einzubeziehen, könnte zu weiteren Erkenntnissen führen. Zudem lagen bei einem Teil der Proband*innen weitere kardiale Erkrankungen und Voroperationen wie eine Kardiomyopathie, eine KHK, eine konzentrische Myokardhypertrophie oder eine durchgeführte Bypass- und/oder Herzklappenoperation vor. Diese Vorerkrankungen wurden nicht in die Analyse einbezogen und könnten die Ergebnisse verfälscht haben.

5.3. Stärken und Limitationen der Arbeit

Bei dem vorliegenden Promotionsprojekt handelt es sich um eine experimentelle, prospektive single center Studie. Das experimentelle Studiendesign bildet eine der wesentlichen Stärken dieser Arbeit. Zudem kann aufgrund der Relevanz und Aktualität des Themas aktuelle, internationale Literatur als Grundlage genutzt werden. Bisherige Forschungen am Tiermodell werden mit dieser Studie weiterentwickelt und am Menschen reproduziert.

Zu den Limitationen der Arbeit zählt, dass sowohl die histologische Bearbeitung und Auswertung der Proben als auch das Pflegen der Datenbank mit den klinischen Daten der Patient*innen von derselben Person durchgeführt wurde. Damit trotzdem eine Verblindung erreicht wird, wurden die Daten zu dem Vorliegen von permanenten, paroxysmalen oder persistierenden Herzrhythmusstörungen in der Datenbank ausgeblendet und waren so nicht einsehbar. Die VHF-Daten wurden von Mitarbeitenden des Herzzentrums der Uniklinik Köln eingepflegt. Erst nach dem Zählen der COX^{neg} Zellen wurde für die statistische Auswertung die Verblindung aufgehoben und die zugehörigen VHF-Daten zu den Proben wurden sichtbar.

Die geringe Probenanzahl bildet eine wesentliche Limitation der Arbeit. Mit 29 auswertbaren Proben sind die Ergebnisse dieser Studie begrenzt repräsentativ. Zudem sind die Subgruppen nicht gleich verteilt. In die Studie wurden mehr Männer als Frauen und mehr Patient*innen in die Experimentalgruppe als in die Kontrollgruppe eingeschlossen.

Zudem bilden Patient*innen mit paroxysmalem VHF die Kontrollgruppe. Dies ermöglicht die Probengewinnung im Rahmen eines ohnehin erfolgenden, notwendigen herzchirurgischen Eingriffs. Da Gewebestücke aus dem Vorhof dabei routinemäßig anfallen und normalerweise vernichtet werden, bedeutet die Probengewinnung dementsprechend kein zusätzliches Risiko für die Patient*innen. Jedoch könnte ein Vergleich von VHF-Patient*innen zu herzgesunden Menschen im Sinusrhythmus aussagekräftiger sein. Dieser Ansatz kann die Grundlage für weitere Studien bilden. Aktuell wird bereits ein Anschlussprojekt zu dieser Promotionsarbeit durchgeführt, mit einer Kontrollgruppe bestehend aus Patient*innen im Sinusrhythmus. Die Ergebnisse dieser Studie stehen zum jetzigen Zeitpunkt noch aus. Sie könnten zum weiteren Verständnis der Pathophysiologie des VHF, sowie der Rolle mitochondrialer Dysfunktionen im

Alterungsprozess beitragen. Somit könnte dieses Anschlussprojekt die Daten dieser Studie ergänzen und den bisherigen Forschungserkenntnissen zum VHF einen weiteren Teil des „Mosaiks“ hinzufügen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Sachse H. Esther von Kirchbach - Lebensbild und Persönlichkeitsprofil. 2009. <http://oops.uni-oldenburg.de/921/1/sacest09.pdf> (Zuletzt abgerufen am 20.08.2024).
- 2 Fleck E, Heinemann M, Meinertz T, *et al.* Deutscher Herzbericht 2020. Frankfurt am Main, 2020.
- 3 Zoni-Berisso M, Lercari F, Carazza T, *et al.* Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol* 2014; **6**: 213–220.
- 4 Fürnkranz A, Brugada J, Albenque JP, *et al.* Rationale and design of fire and ice: A multicenter randomized trial comparing efficacy and safety of pulmonary vein isolation using a cryoballoon versus radiofrequency ablation with 3d-reconstruction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014; **25**: 1314–1320.
- 5 Fu D. Cardiac Arrhythmias: Diagnosis, Symptoms, and Treatments. *Cell Biochem Biophys* 2015; **73**: 291–296.
- 6 Fürnkranz A. Kryoballoon-Ablation von Vorhofflimmern: Klinische Effektivität und Entwicklung von Sicherheitsstrategien zur Vermeidung von Komplikationen. Habilitation. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf, 2021.
- 7 Baris OR, Ederer S, Neuhaus JFG, *et al.* Mosaic Deficiency in Mitochondrial Oxidative Metabolism Promotes Cardiac Arrhythmia during Aging. *Cell Metab* 2015; **21**: 667–677.
- 8 Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in health and disease. *Cells* 2019; **8**: 1–7.
- 9 Mason FE, Pronto JRD, Alhussini K, *et al.* Cellular and mitochondrial mechanisms of atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2020; **115**: 1–16.
- 10 Müller-Höcker J. Mitochondria and Ageing. *Brain Pathol* 1992; **2**: 149–158.
- 11 Khrapko K, Bodyak N, Thilly WG, *et al.* Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2434–2441.
- 12 Hindricks G, Potpara T, Kirchhof P, *et al.* 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J* 2021; **42**: 373–498.
- 13 Saleh K, Haldar S. Atrial fibrillation: a contemporary update. *Clin Med (Northfield Il)* 2023; **23**: 437–441.
- 14 Hennersdorf MG, Strauer BE. Vorhofflimmern. *Internist* 2006; **47**: 990–1000.
- 15 Rosemann A. Vorhofflimmern. *Praxis (Bern 1994)* 2022; **111**: 640–652.
- 16 Kornej J, Börschel CS, Benjamin EJ, *et al.* Epidemiology of Atrial Fibrillation in the 21st Century: Novel Methods and New Insights. *Circ Res* 2020; **127**: 4–20.
- 17 Scherr D, Manninger-Wünscher M. Vorhofflimmern: Frequenzkontrolle versus Rhythmuskontrolle. *Universum Inn Medizin* 2021; **93**: 164–165.
- 18 Go AS, Hylek EM, Phillips KA, *et al.* Prevalence of Diagnosed Atrial Fibrillation in Adults.

- Jama* 2001; **285**: 2370–2375.
- 19 Nayak S, Natarajan B, Pai RG. Etiology, Pathology, and Classification of Atrial Fibrillation. *Int J Angiol* 2020; **29**: 65–71.
 - 20 Lau DH, Linz D, Schotten U, *et al.* Pathophysiology of Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation: Rotors, Foci and Fibrosis. *Hear Lung Circ* 2017; **26**: 887–893.
 - 21 Song Z, Ko CY, Nivala M, *et al.* Calcium-voltage coupling in the genesis of early and delayed afterdepolarizations in cardiac myocytes. *Biophys J* 2015; **108**: 1908–1921.
 - 22 Lubitz SA, Benjamin EJ, Ruskin JN, *et al.* Challenges in the classification of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol* 2010; **7**: 451–460.
 - 23 Heijman J, Voigt N, Nattel S, *et al.* Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res* 2014; **114**: 1483–1499.
 - 24 Iwasaki YK, Nishida K, Kato T, *et al.* Atrial fibrillation pathophysiology: Implications for management. *Circulation* 2011; **124**: 2264–2274.
 - 25 Han S, Jia R, Cen Z, *et al.* Early rhythm control vs . rate control in atrial fibrillation : A systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med* 2023; **10**: 1–8.
 - 26 Muszyński P, Bonda TA. Mitochondrial dysfunction in atrial fibrillation—mechanisms and pharmacological interventions. *J Clin Med* 2021; **10**. DOI:10.3390/jcm10112385.
 - 27 Monzel AS, Enríquez JA, Picard M. Multifaceted mitochondria: moving mitochondrial science beyond function and dysfunction. *Nat Metab* 2023; **5**: 546–562.
 - 28 Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial protein organization: from biogenesis to networks and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; **20**: 267.
 - 29 Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol* 2020; **37**: 1–9.
 - 30 Larsson N-G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem* 2010; **79**: 683–706.
 - 31 Li A, Shami GJ, Griffiths L, *et al.* Giant mitochondria in cardiomyocytes: cellular architecture in health and disease. *Basic Res Cardiol* 2023; **118**: 1–21.
 - 32 Khrapko K, Trayanova N, Nattel S. Modeling the Aging Heart: From Local Respiratory Defects to Global Rhythm Disturbances. *Cell Metab* 2015; **21**: 662–663.
 - 33 Ross JM. Visualization of mitochondrial respiratory function using cytochrome C oxidase/succinate dehydrogenase (COX/SDH) double-labeling histochemistry. *J Vis Exp* 2011; : 1–6.
 - 34 Lok NS, Lau CP. Prevalence of palpitations, cardiac arrhythmias and their associated risk factors in ambulant elderly. *Int J Cardiol* 1996; **54**: 231–236.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung der Entstehung eines Gewebemosaiks im Alterungsprozess; modifiziert nach Baris et al. (2015) ⁷	19
Abbildung 2: Summe des prozentualen Anteils an drei ausgewählten mtDNA Deletionen bei mutierten Mäusen im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen; modifiziert nach Baris et al. (2015) ⁷	19
Abbildung 3: nachgewiesene Herzrhythmusstörungen im Alterungsprozess im Mausmodell; modifiziert nach Baris et al. (2015) ⁷	20
Abbildung 4: Patient*innenkollektiv und Probenaufbereitung	22
Abbildung 5: schematische Darstellung der verwendeten Färbungen je Färbungsprozess	24
Abbildung 6: Beispiel für die histologische Aufbereitung der Proben mittels Enzymfärbung	24
Abbildung 7: Der Quantifizierungsprozess	25
Abbildung 8: Analyse aller Proband*innen nach den Merkmalen Geschlecht (Frauen/Männer) und Art des VHF	29
Abbildung 9: Subgruppenanalyse der Frauen	30
Abbildung 10: Subgruppenanalyse der Männer	31
Abbildung 11: geschlechtsunspezifische Gesamtanalyse	32
Abbildung 12: geschlechtsunspezifische, altersabhängige Analyse	33

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der COX- und SDH-Färbelösung	23
Tabelle 2: Rohdaten der Quantifizierung, Anzahl an COX ^{neg} Zellen	27
Tabelle 3: Rohdaten der Quantifizierung, Anteil an COX ^{neg} Zellen	28
Tabelle 4: ANOVA der gesamten Proben	29