

Aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus

Mosaik-Defizienz des oxidativen mitochondrialen Metabolismus bei Patient:innen mit Vorhofflimmern

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

vorgelegt von
Merit zur Bosen
aus Köln Deutschland

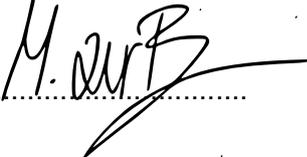
promoviert am 02.08.2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2023

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 15.03.2023

Unterschrift: 

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Universitätsprofessor Dr. Daniel Steven für die Möglichkeit bedanken, meine Promotionsarbeit in der Abteilung für Elektrophysiologie des Herzzentrums der Universität zu Köln anfertigen zu können.

Auch bedanke ich mich bei dem gesamten Team des Herzzentrums Köln, insbesondere bei Frau Dr. Susanne Erhöfer, die die Patient:innen der Studie umfassend betreut haben.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Universitätsprofessor Dr. Rudolf Wiesner und dessen gesamten Team im Institut für Physiologie der Universität zu Köln für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Materialien im Rahmen der hier beschriebenen Experimente. Vor allem bei Dr. Sammy Kimoloi möchte ich mich für die geduldige Betreuung und die vielen hilfreichen Ratschläge bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und Ala Anghaie danken. Für die viele Unterstützung über die gesamten letzten Jahre, besonders in den Phasen des Studiums und der Promotion. Danke für inspirierende Gespräche, motivierende Worte und das Vertrauen in mich.

Meinem Großvater

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	11
2.1 Einführung in die Thematik	11
2.2 Grundlagen des Vorhofflimmerns	11
2.2.1. Definition	11
2.2.2. Epidemiologie	12
2.2.3. Begleiterkrankungen und Risikofaktoren	12
2.2.4. Pathophysiologie	13
2.2.5. Kardiales Remodeling	15
2.3 Therapie des Vorhofflimmerns	16
2.3.1. Thrombembolieprophylaxe	17
2.3.2. Frequenzkontrolle	18
2.3.3. Rhythmuskontrolle	18
2.4 Mitochondrialer Metabolismus	20
2.4.1. Allgemeine Funktion der Mitochondrien	20
2.4.2. Die mitochondriale DNA	20
2.4.3. Rolle der Mitochondrien im Rahmen des Alterungsprozesses	21
2.4.4. Bedeutung für das Myokard	22
2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	23
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 Patient:innenkollektiv	25
3.2 Klinische Parameter	26
3.3 Probengewinnung	26
3.4 Histologische Aufarbeitung	27
3.4.1. Hämatoxylin-Färbung (HE-Färbung)	27
3.4.2. Cytochrom-c-Oxidase(COX)-Succinatdehydrogenase(SDH)-Doppelfärbung	28

3.5	Quantifizierung der Zellen	28
3.6	Statistische Methoden	29
4.	ERGEBNISSE	31
4.1	Patient:innenkollektiv	31
4.1.1.	Vorerkrankungen	33
4.1.2.	Vorangegangene Therapien	34
4.2	Komplikationen	35
4.3	Klinische Nachbeobachtung	35
4.4	Auftreten von mtDNA-Deletionen	36
4.4.1.	Einfluss des Alters	38
4.4.2.	Einfluss des Geschlechts	40
4.4.3.	Einfluss der Schwere des Vorhofflimmerns	40
4.4.4.	Einfluss von Vorerkrankungen	41
5.	DISKUSSION	42
5.1	Überblick	42
5.2	Auswahl des Patient:innenkollektivs	42
5.3	Korrelation klinischer Daten mit mtDNA-Deletionen	43
5.3.1.	Aussagekraft der Altersanalysen	44
5.3.2.	Aussagekraft der geschlechterabhängigen Analysen	46
5.3.3.	Auswirkung der Schwere des Vorhofflimmerns	47
5.3.4.	Zusammenhang zu Komorbiditäten	48
5.4	Stärken und Limitationen der Arbeit	49
5.4.1.	Güte der Proben	49
5.4.2.	Biopsie-Verfahren	49
5.4.3.	Färbemethode	50
5.4.4.	Auszählverfahren	51
5.5	Ausblick	51
6.	LITERATURVERZEICHNIS	53
7.	ANHANG	60

7.1	Abbildungsverzeichnis	60
7.2	Tabellenverzeichnis	60

Abkürzungsverzeichnis

AT	atriale Tachykardie
AV-Knoten	Atrio-Ventrikular-Knoten
BMI	Body-Mass-Index
Ca ²⁺	Kalzium
CFAE	komplex fraktioniertes atriales Elektrogramm
COX	Cytochrom-c-Oxidase
COX _{neg}	Cytochrom-c-Oxidase negativ
CTI	Ablation des cavotrikuspidalen Isthmus
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
HE	Hämatoxylin
KHK	koronare Herzkrankheit
LA	linkes Atrium
Max	Maximum
Min	Minimum
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
NOAK	neue orale Antikoagulantien
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PVI	Pulmonalvenenisolation
Q1	erstes Quartil
Q3	drittes Quartil
SD	Standardabweichung
SDH	Succinatdehydrogenase
SR	Sinusrhythmus
TTE	Transthorakale Echokardiographie
VHF	Vorhofflimmern
VKA	Vitamin-K-Antagonisten

1. Zusammenfassung

Beim Vorhofflimmern handelt es sich um eine der wichtigsten Herzrhythmusstörungen des Menschen, die vor allem ältere Patient:innen betrifft. Trotz vielfältiger Erklärungsansätze zur Entstehung der Erkrankung ist die zugrundeliegende Pathophysiologie bisher weitestgehend unbekannt. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet hätten potenziell weitreichende Folgen für die Prävention und Therapiestrategien des Vorhofflimmerns.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Zusammenhang zwischen zellulären Alterungsprozessen in Form von Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) kardialer Muskelzellen, dem tatsächlichen Patient:innenalter und dem Auftreten bzw. der Schwere des Vorhofflimmerns zu untersuchen.

Hierzu wurden im Rahmen der Ablationstherapie bei Vorhofflimmerpatient:innen Gewebeproben mittels einer kathetergesteuerten Myokardbiopsie entnommen. Die so gewonnenen Proben wurden enzymhistochemisch untersucht und der Anteil der mitochondrial defizienten Zellen bestimmt. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung, in der die Ergebnisse der Laboruntersuchung und die klinischen Parameter der Patient:innen im Hinblick auf deren Einfluss auf die Krankheitsentstehung und -ausprägung analysiert wurden.

Besonderer Fokus lag auf den Aspekten des Patient:innenalters und der Schwere der Vorhofflimmererkrankung. Es konnten in unseren Untersuchungen keine signifikanten Korrelationen zwischen den untersuchten Parametern und dem Auftreten von mtDNA Deletionen festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür kann die geringe Größe des untersuchten Patient:innenkollektivs sein. Dennoch lässt sich festhalten, dass die angewandte Methodik zur Untersuchung der Fragestellung geeignet ist und die zu erwartenden Daten generiert werden konnten.

Aufgrund der hohen Relevanz der Erkrankung in einer demographisch älter werdenden Bevölkerung und wegen des hohen Leidensdrucks der Betroffenen sind weitere Untersuchungen zur pathophysiologischen Entstehung des Vorhofflimmers äußerst wichtig. So sollte die hier verfolgte Fragestellung Inhalt weiterführender, größer angelegter Studien sein.

2. Einleitung

2.1 Einführung in die Thematik

Vorhofflimmern gehört mit einer Prävalenz von 1,5-2% zu den häufigsten Herzrhythmusstörungen¹. Es betrifft vor allem ältere Patient:innen², sodass aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung in Zukunft mit einer vermehrten Inzidenz gerechnet werden kann^{3,4}. Besonders bei symptomatischem Vorhofflimmern fühlen sich die Patient:innen stark in ihrer Lebensqualität beeinträchtigt⁵ und schon in Alltagssituationen körperlich eingeschränkt⁶. Darüber hinaus ist Vorhofflimmern mit einer erheblichen Mortalität und Morbidität vergesellschaftet⁷. Dies resultiert aus der krankheitsbedingten Kombination einer veränderten Hämodynamik, atrioventrikulärer Dyssynchronität, zunehmender mechanischer Dysfunktion und thromboembolischen Komplikationen⁸. Die Therapieziele bestehen in der Symptominderung der Patient:innen⁹, die mittels Frequenz- und Rhythmuskontrolle erreicht werden kann, sowie in der Vermeidung thromboembolischer Komplikationen¹⁰.

Auch nach vielfachen Untersuchungen ist der Mechanismus der Entstehung des Vorhofflimmerns bisher weitestgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass ein Zusammenspiel verschiedener pathophysiologischer Prozesse im Vorhof zum Auftreten der Krankheit beiträgt¹¹. Hierzu zählen die Fibrosierung des Myokards¹², elektrisches Remodeling der Vorhöfe und eine zunehmende Vorhofdilataion¹³.

Auf zellulärer Ebene ist ein weiteres mögliches pathophysiologisches Phänomen die zunehmende Mutationsrate während des Zellalterungsprozesses. Dies betrifft auch die DNA der Mitochondrien, die wiederum für den Zellstoffwechsel von zentraler Bedeutung sind¹⁴. Untersuchung am Mausmodell konnten zeigen, dass eine erhöhte Rate an Mutationen in der mtDNA von Kardiomyozyten mit der Entstehung von Herzrhythmusstörungen einhergeht¹⁵.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich dieser Zusammenhang zwischen Zellalter und Krankheitsentstehung bzw. -ausprägung auch bei Patient:innen mit Vorhofflimmern herstellen lässt.

2.2 Grundlagen des Vorhofflimmerns

2.2.1. Definition

Beim Vorhofflimmern handelt es sich um eine supraventrikuläre Herzrhythmusstörung, die auch als „Arrhythmia absoluta“ bezeichnet wird. Es kommt zur schnellen und irregulären Aktivierung der Vorhöfe mit Frequenzen von 350 bis 600 pro Minute. Die Überleitung auf den Ventrikel kann durch die Filterfunktion des Atrio-Ventrikular-Knotens (AV-Knoten) sowohl schnell als auch langsam sein und in einer bradykarden oder tachykarden Arrhythmie

resultieren. Im Elektrokardiogramm (EKG) zeichnet sich die Rhythmusstörung durch das unregelmäßige Auftreten von QRS-Komplexen, das Fehlen der P-Welle und häufig irreguläre Oszillationen, sogenannter Flimmerwellen, aus.

Vorhofflimmern lässt sich nach Dauer und Häufigkeit des Auftretens klassifizieren. Bei paroxysmalem Vorhofflimmern kommt es zur spontanen Konvertierung in den Sinusrhythmus innerhalb von 48 Stunden bis maximale 7 Tagen. Arrhythmien, die länger als 7 Tage anhalten, werden als persistierendes Vorhofflimmern bezeichnet, nicht konvertierbares und somit akzeptiertes Vorhofflimmern als permanentes Vorhofflimmern¹⁶. Besonders günstige Voraussetzungen für die Behandlung des Vorhofflimmerns haben die Patient:innen, bei denen die Episoden spontan terminieren.

2.2.2. Epidemiologie

Die Anzahl der von Vorhofflimmern betroffenen Patient:innen liegt weltweit schätzungsweise bei 33,5 Millionen¹⁷. Das mediane Durchschnittsalter beträgt 75 Jahre, 84% der Patient:innen sind älter als 65 Jahre¹⁸. Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter, sodass bei aktuell steigender Lebenserwartung der Bevölkerung mit einer Verdreifachung der Gesamtprävalenz in den nächsten drei Dekaden gerechnet werden kann¹⁷. In absoluten Zahlen sind das weibliche und männliche Geschlecht gleich stark vom Vorhofflimmern betroffen. Ab einem Alter von 75 Jahren machen weibliche Patientinnen einen Anteil von 60% der Betroffenen aus, was sich am ehestens auf die durchschnittlich höhere Lebenserwartung von Frauen zurückführen lässt¹⁹.

2.2.3. Begleiterkrankungen und Risikofaktoren

Es sind einige Erkrankungen bekannt, die mit Vorhofflimmern einhergehen oder den Progress der Erkrankung beschleunigen. Zu den nachgewiesenen Risikofaktoren zählen männliches Geschlecht und fortgeschrittenes Lebensalter, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, symptomatische Herzinsuffizienz, akuter Myokardinfarkt bei männlichen Patienten, Hyperthyreose, Adipositas, Nikotinabusus, Erkrankungen der Herzklappen (rheumatische, myxomatöse, senilkalzifizierende und angeborene Klappenanomalien)²⁰, linksatriale Dilatation²¹, linksventrikuläre Hypertrophie, Schlafapnoe²² und die koronare Herzkrankheit (KHK).^{20,23,24} Einer der wichtigsten Risikofaktoren ist die arterielle Hypertonie²⁵, was auf eine hohe Prävalenz unter den Betroffenen zurückzuführen ist. Bei Vorliegen dieser Grunderkrankung konnte ein 1,7-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Vorhofflimmerns nachgewiesen werden²³. Weitere Erkrankungen, zu denen sich eine häufige Korrelation herstellen ließ, sind die chronische Herzinsuffizienz (bis zu 50% entwickeln ein Vorhofflimmern) und das akute Koronarsyndrom (bis zu 25% entwickeln ein Vorhofflimmern)²⁶.

Es wird angenommen, dass diese Erkrankungen zu einer strukturellen Schädigung des Myokards mit Fibrosierung des Vorhofs führen und so die Grundlage für die Entstehung der Arrhythmie bilden²⁷. Die Entstehung von Thromben im Bereich der Vorhöfe, die wiederum zur Schlaganfallgenese führen, wird durch diese Veränderung noch begünstigt²⁸. So kann das Vorliegen von Vorhofflimmern die Entstehung von ischämischen Schlaganfällen (3- bis 5-fach erhöhtes Risiko)²⁶ sowie von Mitralsuffizienz²⁹ beeinflussen. Darüber hinaus hat die Erkrankung einen signifikanten Einfluss auf die Myokardinfarktentscheidung, auf das Vorliegen einer Herzinsuffizienz und auf die Gesamtmortalität³⁰.

2.2.4. Pathophysiologie

Die Pathophysiologie des Vorhofflimmerns ist sehr komplex und gilt bis heute trotz zahlreicher Untersuchungen als größtenteils ungeklärt³¹. Folgend sollen die angenommenen Mechanismen zur Entstehung und zum Erhalt des Vorhofflimmerns zusammenfassend dargestellt werden.

Ein grundlegendes Modell zum Verständnis von Vorhofflimmern wurde in Form der „Multiple-Wavelet“-Hypothese bereits 1959 von Moe et al. entwickelt^{32,33}. Basis dieses Modells bildet die Annahme multipler stabiler und voneinander unabhängiger elektrischer Erregungskreise innerhalb des Vorhofs. Diese Mikro-Reentry-Kreisläufe entstehen ungeordnet und werden durch die elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards konstant aufrechterhalten, solange sie weiter auf erregbares Myokard treffen. Wichtige Parameter für diesen Prozess sind die langsame atriale Überleitung, die kurze Refraktärzeit der Kardiomyozyten und die Masse des erregbaren Gewebes. Je langsamer die Leitungsgeschwindigkeit, je kürzer die Refraktärperiode und je größer die Masse des Gewebes desto mehr Mikro-Reentry-Kreisläufe können sich aus den entstandenen Wellenfronten ausbilden. Die hochfrequente Erregung mehrerer ungerichteter Kreisläufe führt zur Entwicklung komplexer Aktivitätsmuster und kann in Vorhofflimmern resultieren³⁴.

Diese Hypothese wurde später durch den Nachweis spontaner elektrischer Aktivitäten, die in umschriebenen ektopen Zentren des linken Vorhofs entstehen, ergänzt^{35,36}. In der 1998 durchgeführten Studie von Haïssaguerre et al. konnten bei 94% der Patient:innen mit paroxysmalem Vorhofflimmern der Bereich der Pulmonalvenenostien im linken Vorhof als Ort der fokalen Trigger identifiziert werden³⁷. Nach elektrophysiologischem Mapping und Darstellung der Loci wurde im Zuge der Studie bereits ein Erfolg der Ablationstherapie verzeichnet, indem durch gezielte Radiofrequenzablation die spontane Aktivierung im Vorhof terminiert werden konnte³⁷.

Grund für die spontane Depolarisation im Bereich der Pulmonalvenen sind atriale Muskelfasern, die bis in die Adventitia der Pulmonalvenen hineinreichen³⁸⁻⁴⁰. In genaueren Untersuchungen dieses Gewebes konnte gezeigt werden, dass diese Muskelfasern atrialen

Ursprungs sind und daher ähnliche Eigenschaften wie das elektrische kardiale Leitungssystem aufweisen^{41,42} und gegenüber dem Vorhofmyokard zur spontanen Depolarisation neigen⁴³⁻⁴⁵. Aufgrund dieser Eigenschaften kommt es im Bereich der Pulmonalvenen bevorzugt zu spontaner elektrischer Aktivität mit hohen Frequenzen. Die Region um die Pulmonalvenenostien bildet somit den Boden sowohl für fokale Aktivitäten als auch Reentry-Kreisläufe, womit sie nicht nur bei der Entstehung sondern auch bei dem Erhalt von Vorhofflimmern eine bedeutende Rolle spielt^{43,46}.

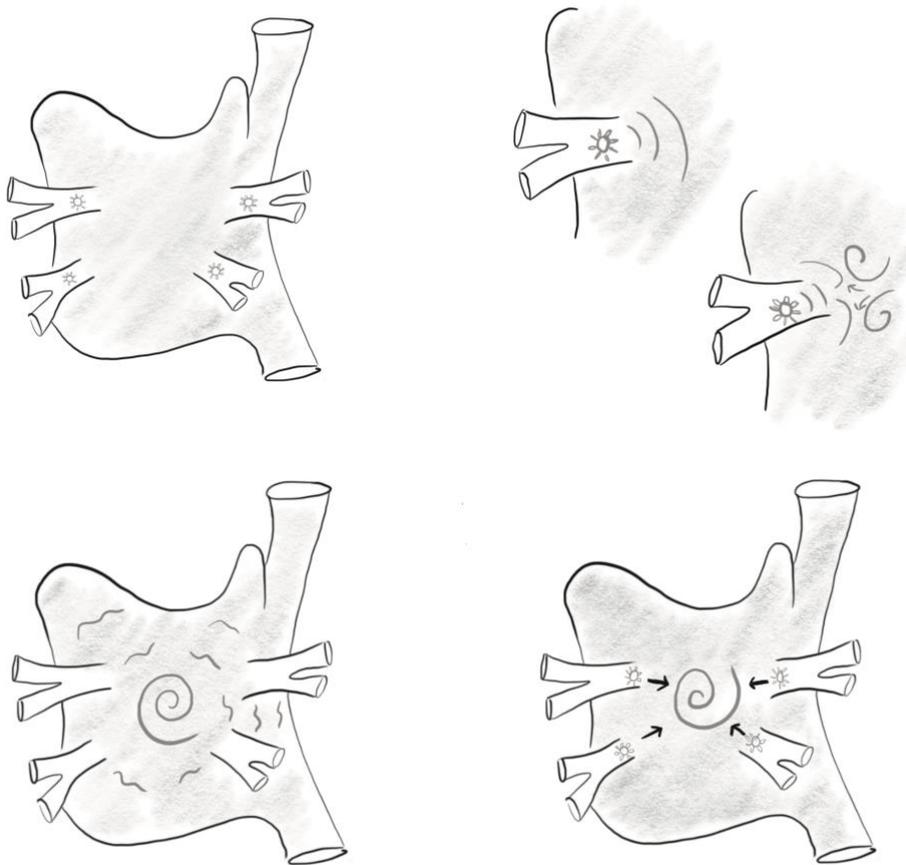


Abbildung 1: Entstehung fokaler Trigger im Vorhof.

Schematische Darstellung der Vorhöfe von posterior. Fokale Trigger initiieren den Re-Entry-Mechanismus (Rotoren). Angenommen wird, dass atriales Remodeling zu weiteren fokalen Triggern und dem Aufrechterhalten von Vorhofflimmern führt. Modifiziert nach Calkins et al., 2012⁴⁷

Jalife et al. erweiterten 2002 das Erklärungsmodell des Vorhofflimmerns durch die Einführung des sogenannten „Rotoren-Prinzips“. Darin werden stabil lokalisierte kreisförmige Erregungen beschrieben, die sich an einer weitgehend festen Position im Vorhof befinden und um die herum eine in sich kreisende Erregung entsteht. Diese multiplen unabhängigen Tochterwellen breiten sich mit hohen Frequenzen kreisförmig über den Vorhof aus und sorgen für die Entstehung der Rhythmusstörung^{34,48}.

Eine weitere wichtige Erkenntnis brachte die Erforschung von Myokardarealen mit komplex fraktionierten atrialen Elektrogrammen (CFAE). An Orten, bei denen im Mapping des Vorhofs CFAE nachgewiesen wurden, führte die Ablation zur häufigeren Termination des Vorhofflimmerns und zu einem besseren Langzeiterfolg der Therapie^{49,50}. Aus dieser Untersuchung konnte abgeleitet werden, dass die anatomisch orientierte Ablation an den Pulmonalvenenostien durch elektrophysiologisches Mapping mit Aufsuchen und Ablation der Areale mit CFAE sinnvoll ergänzt werden kann⁴⁹.

Darüber hinaus scheinen die Bereiche mit CFAE oftmals eine anatomische Verbindung zu ganglionären Plexi zu haben. Dem autonomen Nervensystem wird ein Einfluss auf die Entstehung des Vorhofflimmerns zugesprochen, wobei adrenerg-vermitteltes Vorhofflimmern seltener zu beobachten ist als vagal-vermitteltes^{51,52}. Die vagale Stimulation führt über die Verkürzung des Aktionspotentials zur Abnahme der absoluten Refraktärzeit der Kardiomyozyten, die sympathische Stimulation wiederum sorgt für eine erhöhte Kalziumaufnahme (Ca^{2+}) in die Zellen und fördert dadurch das Auftreten von spontanen Erregungen. So begünstigen beide Effekte ein elektrisches Remodeling mit vermehrter Entstehung von spontanen Depolarisationen, was wiederum zur Entstehung und zum Erhalt von Vorhofflimmern führt⁵³⁻⁵⁵.

2.2.5. Kardiales Remodeling

Anhaltendes Vorhofflimmern führt im Herzen zu zahlreichen Umbauprozessen auf elektrischer, struktureller und kontraktile Ebene. Das arrhythmogene Remodeling umfasst jede Veränderung von Strukturen oder Funktionen, die die Stabilisierung und das Fortbestehen von Herzrhythmusstörungen fördert⁵⁶.

Elektrisches Remodeling wird durch unterschiedliche zelluläre Prozesse bedingt. So konnte bei anhaltendem Vorhofflimmern experimentell eine Verkürzung der absoluten Refraktärzeit der Kardiomyozyten mit einem insgesamt verkürzten Aktionspotential nachgewiesen werden⁵⁷⁻⁶⁰. Dieser Effekt kann bereits wenige Minuten nach Beginn der Rhythmusstörung beobachtet werden und ist nach Termination des Vorhofflimmerns vollständig reversibel^{57,58,60}. Außerdem findet sich in den Zellen eine verminderte Frequenzadaptation der Refraktärperiode und insgesamt eine verlangsamte Leitungsgeschwindigkeit^{58,61}. Verstärkt werden diese pathologischen Veränderungen durch eine physiologische Heterogenität der Refraktärperiode innerhalb des Myokards⁶², was zusammengenommen zu einer erhöhten Vulnerabilität für Arrhythmien im Bereich des Vorhofs führt, da die einheitliche Depolarisation des Zellverbandes gestört ist und nicht adäquat auf die hohen Frequenzen der Vorhoferregung reagiert werden kann. Das Auftreten paroxysmaler Vorhofflimmerepisoden wird wahrscheinlicher und die persistierenden und permanenten Formen stabilisieren sich.

Die erhöhten Entladungsfrequenzen sorgen zu Beginn der Tachykardie für einen stark vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Um eine für die Zelle vital bedrohliche Ca^{2+} Überladung zu verhindern, werden zunächst Ca^{2+} -Kanäle inaktiviert und in der Folge die Bildung von α -Untereinheiten der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle supprimiert⁶³. So liegen insgesamt weniger Ca^{2+} -Kanäle vor und der übermäßige Ca^{2+} Einstrom in die Zelle wird verhindert. Außerdem wird weniger Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Der so entstandene reduzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel mündet in einer verminderten Kontraktilität der Myokardzellen, was als kontraktiles Remodeling beschrieben wird⁶⁴.

Diese und weitere Veränderungen führen im Herzen bei Andauern des Vorhofflimmerns zum strukturellen Remodeling. Die reduzierte oder ganz fehlende Vorhofkontraktion führt zu einer höheren Volumenbelastung mit konsekutiver mechanischer Dehnung der Vorhöfe^{65,66}. Die chronische Volumenbelastung sorgt im Vorhof über verschiedenen Signalwege für Myozyten-Hypertrophie, Fibroblasten-Proliferation und Gewebsfibrose¹³. Diese elektroanatomischen Veränderungen und die progrediente mechanische Vorhof-Dilatation resultieren in einer erhöhten Anisotropie, also ungleichförmige Ausbreitung der elektrischen Erregung und Verlangsamung der Erregungsleitung, was die Entstehung der beschriebenen Reentry-Kreisläufe befördert¹³.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass es in Kardiomyozyten im Rahmen von Vorhofflimmern zu Prozessen der Myolyse mit Verlust der zellulären myofibrillären Strukturen kommt⁶⁷. Dies äußert sich in morphologisch veränderten Mitochondrien und einer Desorganisation des sarkoplasmatischen Retikulums. Auch ein Remodeling der Zell-Zell-Kontakte konnte beobachtet werden. So wird das Zellverbindungsprotein Connexin 40 im Zellverband heterogen exprimiert⁶⁸, wodurch Gruppen atrialer Myozyten wechselnd sehr gut oder unzureichend mit gap-junctions miteinander verbunden sind⁶⁹. Die Zell-Zell-Leitung elektrischer Signale ist damit pathologisch verändert und förderlich für die Entstehung arrhythmogener Prozesse⁷⁰.

Diese Prozesse des strukturellen Remodelings scheinen nur bedingt reversibel zu sein und gelten als mitverantwortlich für Rezidive nach Ablationstherapie oder Kardioversion⁷¹.

2.3 Therapie des Vorhofflimmerns

Die Therapie des Vorhofflimmerns beruht auf verschiedenen Säulen. Frequenz- und Rhythmuskontrolle bilden dabei die Basis. Zum einen sollen zu hohe Kammerfrequenzen vermieden und somit ein normofrequentes Vorhofflimmern erreicht werden. Persistiert die Rhythmusstörung, kann per Kardioversion eine Konvertierung in den Sinusrhythmus erreicht werden. Die Thromboembolieprophylaxe in Form einer Antikoagulationstherapie dient der Verhinderung thromboembolischer Komplikationen. Neben der medikamentösen Therapie hat

in den vergangenen Jahren die kathetergestützte interventionelle Therapie Einzug in die Standardtherapiekonzepte des Vorhofflimmerns erhalten. Darüber hinaus haben die Behandlung von Grunderkrankungen wie zum Beispiel der arteriellen Hypertonie sowie präventive Maßnahmen zur Verhinderung der Krankheitsentstehung einen großen Stellenwert in den therapeutischen Ansätzen des Vorhofflimmerns.

Die verschiedenen Aspekte der Vorhofflimmertherapie werden im Folgenden erläutert.

2.3.1. Thrombembolieprophylaxe

Die Notwendigkeit einer antithrombotischen Therapie wird anhand zweier Scoring Systeme zur Risikostratifizierung festgestellt, dem CHA₂DS₂-VASc sowie dem HAS-BLED Score. Der CHA₂DS₂-VASc Score schätzt mittels einer festgelegten Punktzahl das jährliche Schlaganfallrisiko bei Vorhofflimmerpatient:innen ab. Punkte werden dabei für verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren vergeben. So gibt es je einen Punkt für das Vorliegen von Herzinsuffizienz, arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus, weiblichem Geschlecht, Alter zwischen 65-74 Jahre und anderen vaskulären Vorerkrankungen wie KHK oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit, sowie zwei Punkte für Alter >75 Jahre und stattgehabtes thromboembolisches Ereignis wie Schlaganfall, transitorisch ischämische Attacke oder Thromboembolie⁷². Liegt der Punktwert für Männer bei ≥ 2 und für Frauen bei ≥ 3 besteht die Indikation zur oralen Antikoagulation. Bei einem Wert von 1 bei Männern und 2 bei Frauen sollte die Entscheidung zur Antikoagulation nach individueller Abwägung und orientiert am Patient:innenwillen erfolgen¹⁰.

Zur Einschätzung des durch die Antikoagulation bedingten erhöhten Blutungsrisikos kann der HAS-BLED Score hinzugezogen werden. Auch beim HAS-BLED Score wird jeweils ein Punkt, diesmal für blutungsrelevante Risikofaktoren, vergeben. Betrachtet werden arterieller Hypertonus, eingeschränkte Nieren- oder Leberfunktion, stattgehabter Schlaganfall, Blutungsneigung wie beispielsweise bei bekannter Hämophilie, labiler INR-Wert unter Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten (VKA), Alter >65 Jahre und die Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern, nicht-steroidalen Antirheumatika oder Alkoholabusus. Ab einem Score ≥ 3 wird von einem hohen Blutungsrisiko ausgegangen, was die Indikation zur Antikoagulation nicht beeinflusst, aber eine sorgfältige Einstellung und engmaschige Überwachung erfordert¹⁰. Die Kombination beider Scores dient dazu, das Gleichgewicht zwischen optimaler Schlaganfallprävention bei gleichzeitiger Vermeidung von Blutungsereignissen zu finden.

Zur oralen Antikoagulation stehen verschiedene Medikamentenklassen zur Verfügung. So wird in der aktuellen Leitlinie für Patient:innen ohne Herzklappenersatz die Verabreichung neuer oraler Antikoagulantien (NOAK) der Gabe von VKA vorgezogen. Es konnte eine höhere Sicherheit und Effektivität der NOAKs im Vergleich zu Warfarin⁷³, insbesondere bei einem

vulnerableren älteren Patient:innenkollektiv, nachgewiesen werden⁷⁴, darüber hinaus besteht eine bessere Pharmakokinetik, was die Einnahme für die Patient:innen erleichtert⁷⁵. VKA kommen bei Patient:innen nach mechanischem Herzklappenersatz oder mittelschwerer bis schwerer Mitralklappenstenose zum Einsatz, dabei liegt der Ziel-INR im Bereich von 2,0 bis 3,0¹⁰. Eine Thrombozytenaggregationshemmung allein (Monotherapie mit Acetylsalicylsäure oder Gabe von Acetylsalicylsäure kombiniert mit Clopidogrel) wird nicht empfohlen⁷⁶.

2.3.2. Frequenzkontrolle

Ziel der medikamentösen Therapie des Vorhofflimmerns ist in erster Linie die Symptomkontrolle der Patient:innen. Zur Frequenzkontrolle bei tachykarden Arrhythmien stehen Betablocker und Calciumantagonisten vom Verapamil-Typ (Verapamil und Diltiazem) zur Verfügung. Digitalisglykoside wie beispielsweise Digoxin finden als Zweitlinientherapie immer noch Beachtung in den aktuellen Leitlinien. Allerdings ergab eine Metaanalyse von 2019, in der die Auswirkung von Digoxin auf das Überleben von Patient:innen mit Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz untersucht wurde, dass die Einnahme von Digoxin mit einer erhöhten Mortalität einhergeht⁷⁷ und deshalb auf den Einsatz dieser Medikamentengruppe verzichtet werden sollte.

Bei Versagen der Erstlinientherapie kann Amiodaron als Reservemedikament auch zur Frequenzlimitierung eingesetzt werden, das Klasse-III-Antiarrhythmikum wird allerdings vornehmlich zur Rhythmuskontrolle verwendet. Bei unzureichendem Erfolg der Monotherapie mit einem der genannten Medikamente besteht die Möglichkeit der Kombinationstherapie. Die Auswahl des eingesetzten Medikaments ist individuell abhängig von den Symptomen und Komorbiditäten der Patient:innen sowie den potenziellen Nebenwirkungen¹⁰.

2.3.3. Rhythmuskontrolle

Beim Therapieansatz der Rhythmuskontrolle ist das vornehmliche Ziel, Vorhofflimmern in den Sinusrhythmus zu konvertieren und diesen in der Folge zu erhalten, Wie die 2020 veröffentlichte EAST Studie zeigt, ist eine frühe Rhythmuskontrolle auch bei wenig symptomatischen Patient:innen prognoseverbessernd. So konnte ein positiver Einfluss auf das Auftreten von kardiovaskulären Todesursachen, Schlaganfällen oder Hospitalisierung auf Grund von Herzversagen oder akutem Koronarsyndrom gezeigt werden, weshalb die Therapiesäule der Rhythmuskontrolle einen zunehmend hohen Stellenwert in der Vorhofflimmertherapie einnimmt.⁷⁸

Pharmakologische und elektrische Kardioversion

Zur Termination des Vorhofflimmerns und der Konvertierung in den Sinusrhythmus kommen sowohl antiarrhythmische Medikamente als auch die elektrische Kardioversion in Kurzzeitsedierung in Frage. Üblicherweise werden Antiarrhythmika der Klasse Ic (Flecainid, Propafenon) und Klasse III (Amiodaron, Dronedaron, Vernakalant) verwendet¹⁰.

Das Erreichen eines stabilen Sinusrhythmus stellt ein vorrangiges Ziel der Therapie dar, da bei Unterbindung der Arrhythmie die Remodeling-Effekte rückläufig sind, eine Symptomverbesserung der Patient:innen zu verzeichnen ist und Komplikationen vermieden werden können⁷⁹.

Ablationstherapie

Es konnte belegt werden, dass interventionelle Therapieansätze den Antiarrhythmika bezüglich Rezidivrate, Beschwerdefreiheit und Lebensqualität überlegen sind⁸⁰⁻⁸². Eine Überlegenheit in Bezug auf die Gesamtmortalität, das Auftreten von Schlaganfällen oder schweren Blutungsereignissen konnte bisher nicht nachgewiesen werden⁸³. Insbesondere nach frustanem Rhythmisierungsversuch oder bei Unverträglichkeit der medikamentösen Therapie wird bei Patient:innen mit paroxysmalem oder persistierendem Vorhofflimmern ein interventionelles Vorgehen empfohlen. Entsprechend hat die Katheterablation des Vorhofflimmerns in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen und gehört nach den internationalen Richtlinien zur Standardtherapie der Erkrankung^{10,84}. Hierbei gibt es zwei technische Verfahren, die sich hinsichtlich des Therapieerfolgs nicht unterscheiden, die Radiofrequenz- und die Kryoablation^{85,86}. Die Auswahl des technischen Materials obliegt der Verfügbarkeit innerhalb der medizinischen Einrichtung und den Präferenzen von Behandler:in und Patient:in.

Die Basis der Katheterablation bildet die Pulmonalvenenisolation (PVI). Bei der PVI wird der linke Vorhof mittels multipolarem Mappingkatheter elektrophysiologisch und anatomisch charakterisiert und eine 3D-Karte der Verhältnisse erstellt⁸⁷. Anschließend wird entlang der Einmündungen der Pulmonalvenen in den Vorhof die Muskulatur verödet. Die so erzeugten zirkulären transmuralen Läsionen unterbinden die Fortleitung der dort entstehenden ungerichteten elektrischen Aktivität auf die Vorhofmuskulatur⁸⁸. Um Pulmonalvenenstenosen bei der Ablation innerhalb der Pulmonalvenen selbst zu vermeiden, hat sich eine zwar ostiumnahe aber innerhalb des Vorhofs gelegene Ablation etabliert^{89,90}. Weitere häufig auftretende Komplikationen der Ablationstherapie sind gefäßassoziierte Komplikationen wie arteriovenöse Fistelbildung, femorale Pseudoaneurysmen im Bereich der Leiste oder das Auftreten von Perikardtamponaden⁹¹.

Um den Therapieerfolg zu verbessern, ergänzen heutige Ablationsstrategien die PVI durch die Ablation von CFAE⁵⁰ oder autonomer Ganglien⁹², sowie die Anlage linearer Läsionen an extra-

pulmonalen Orten im Bereich der Vena Cava, der Herzohren oder des Coronarsinus⁹³. Als eine weitere mögliche Ergänzung der PVI ist die Ablation des cavotrikuspiden Isthmus (CTI) zu nennen. Hierbei handelt es sich um eine alternative Ablationsstrategie, die besonders bei der Ablation von Vorhofflattern zum Einsatz kommt⁹⁴. In einer randomisierten Studie von 2021 konnte nachgewiesen werden, dass eine durch weitere Ablationsstrategien ergänzte PVI der alleinigen PVI bezüglich der Rezidivrate überlegen ist, was vielversprechende Auswirkungen auf die Weiterentwicklung der Ablationsbehandlungen hat⁹⁵.

2.4 Mitochondrialer Metabolismus

2.4.1. Allgemeine Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind essenzieller Bestandteil eukaryontischer Zellen. Die zentrale Funktion der Organellen liegt in der zellulären Energieproduktion über die β -Oxidation und den Zitratzyklus innerhalb der mitochondrialen Matrix und über die Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran. Hier findet die Synthese von ATP durch oxidative Phosphorylierung statt. Die Atmungskette besteht aus den Multienzymkomplexen I bis IV, der ATP-Synthase (Komplex V) sowie zwei Elektronentransportmolekülen, dem Coenzym Q₁₀ und Cytochrom-c⁹⁶. Neben der Energiebereitstellung sind Mitochondrien wichtig für zahlreiche andere Zellstoffwechselforgänge wie die Regulation des Kalzium-Haushalts und den Vorgang des programmierten Zelltods (Apoptose)^{97,98}. In Abhängigkeit vom Gewebetyp und dem damit einhergehenden Energiebedarf enthalten eukaryontische Zellen sehr unterschiedliche Mitochondrien-Gehalte⁹⁹.

2.4.2. Die mitochondriale DNA

Mitochondrien enthalten ein eigenes Genom, das in vielen tausend Kopien in jeder Zelle vorliegt (Polyploidie). Sie sind Träger der einzigen extrachromosomalen DNA innerhalb menschlicher Zellen¹⁰⁰. Bei der mitochondrialen DNA (mtDNA) handelt es sich um ein zirkuläres doppelsträngiges Molekül, bestehend aus 16.569 Basenpaaren. Auf der mtDNA liegen die Gene für 13 Proteine der Atmungskette sowie für Bestandteile der mitochondrialen Translation (2 mitochondriale rRNAs und 22 tRNAs)¹⁰¹. Die Gendichte der mtDNA ist sehr hoch und es gibt nur wenige nicht codierende Anteile. Die einzig längere dieser Regionen ist der displacement loop (D-loop), hier sind wichtige Sequenzen für die Initiation der Transkription und der Replikation der mtDNA lokalisiert. Alle weiteren mitochondrialen Proteine werden im Nukleus codiert, an den Ribosomen im Zytosol synthetisiert und über spezifische Transportproteine an ihren Platz im Mitochondrium geschleust¹⁰⁰. Mitochondrien stehen damit unter der dualen Kontrolle sowohl der mitochondrialen als auch der nukleären DNA.

Von zentraler Bedeutung für die in dieser Arbeit angewandte Methodik ist, dass die drei größten der insgesamt 13 Untereinheiten I, II und III der Cytochrom-c-Oxidase (COX) (vierter Komplex der Atmungskette) im mitochondrialen Genom und die vier Bestandteile der Succinatdehydrogenase (SHD) (Komplex II der Atmungskette) nur im nukleären Genom codiert werden^{102,103}. Bei einer Dysfunktion der Atmungskette lässt die Aktivitätsmessung der beiden Enzyme daher Rückschlüsse darauf zu, ob nukleäre oder mitochondriale Mutationen stattgefunden haben.

2.4.3. Rolle der Mitochondrien im Rahmen des Alterungsprozesses

Im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses von Geweben kommt es zu Mutationen¹⁰⁴. Dabei ist das mitochondriale Genom deutlich häufiger als die nukleäre DNA betroffen¹⁰⁵. Gründe hierfür sind ein möglicherweise nicht suffizientes Reparatursystem, unzureichender Schutz durch Histone und die enge räumliche Beziehung zu freien reaktiven Sauerstoffspezies, die im Rahmen der Energiegewinnung vor Ort entstehen und zu Schäden im Doppelstrang führen. Es wird davon ausgegangen, dass mit steigendem Lebensalter somatische de-novo Mutationen der mtDNA, vor allem große Deletionen und Duplikationen großer Abschnitte, in Zellen akkumulieren, ganz besonders in postmitotischen Geweben wie bspw. Hirn, Skelett- oder Herzmuskel^{106,107}. Durch solche mtDNA-Deletionen kommt es zur Funktionseinschränkung der Enzyme der Atmungskette, wenn der Gehalt mutierter mtDNA-Kopien den Gehalt der wildtyp-Kopien übertrifft. Daraus resultiert eine Minderung der bioenergetischen Zellaktivität. Das passiert nicht in allen Zellen in gleichem Maße und es entsteht ein Zellverband, in dem die betroffenen Zellen mosaikförmig inmitten normaler Zellen eingestreut sind¹⁴. Welche Auswirkungen die Mutationen der mtDNA und damit die mitochondriale Funktionseinschränkungen haben, lässt sich individuell für das betroffene Gewebe betrachten und ist noch nicht vollständig bekannt. So reicht das Spektrum mitochondrialer Erkrankungen von milden Symptomen bis zu Multiorganaffektionen. Die Pathologie ist klinisch, biochemisch und genetisch heterogen¹⁰⁸.

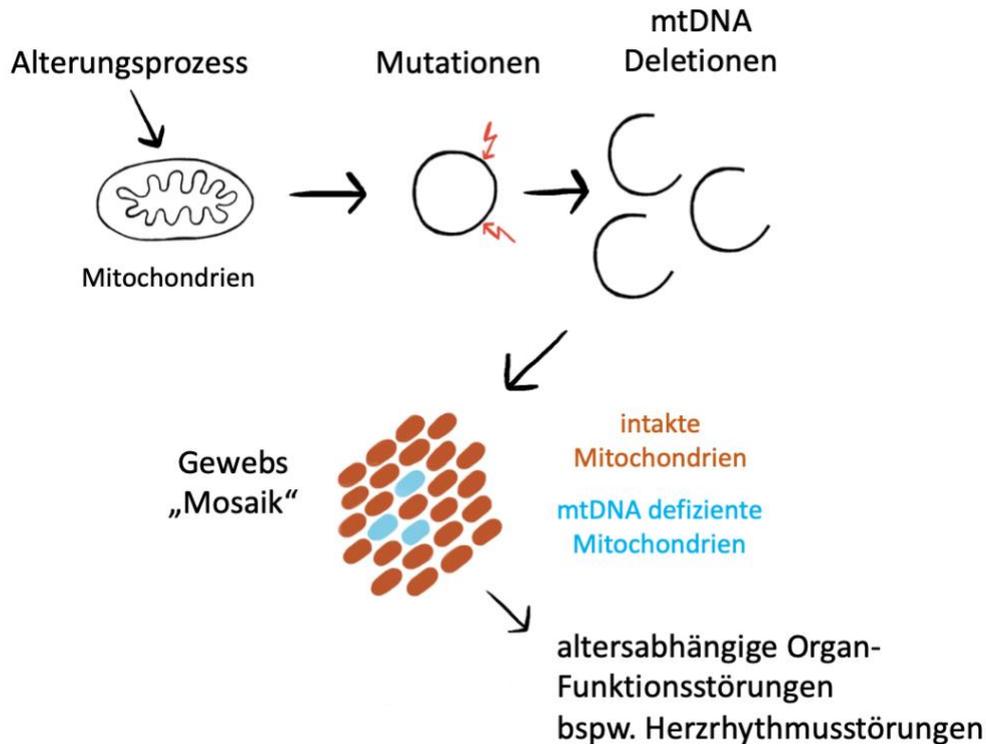


Abbildung 2: Entstehung des Gewebsmosaiks

Schematische Darstellung der altersabhängigen Entstehung von Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) und deren Einfluss auf die Gewebsstruktur. Zellen mit mtDNA defizienten Mitochondrien sind mosaikförmig innerhalb des Gewebes angeordnet und führen zu Organfunktionsstörungen wie bspw. Herzrhythmusstörungen. Modifiziert nach Baris et al., 2015¹⁵

2.4.4. Bedeutung für das Myokard

Es kann davon ausgegangen werden, dass das Herz in besonderer Weise vom mitochondrialen Metabolismus abhängt. Hier ist die Anzahl an Mitochondrien besonders hoch und der Funktionsverlust im Alter besonders gravierend. Die Prävalenz kardialer Erkrankungen steigt mit dem Patient:innenalter. So treten neben dem Vorhofflimmern auch andere supraventrikuläre und ventrikuläre Arrhythmien wie Extrasystolen und AV-Blöcke im Alter gehäuft auf^{109,110}.

In Untersuchungen des menschlichen Herzmuskels konnte in zufällig verteilten Zellen innerhalb des Zellverbands eine Funktionsstörung der COX festgestellt werden. Dabei bestand ein direkter Zusammenhang zwischen dem Alter der Proband:innen und der Anzahl der Zellen mit eingeschränkter COX Funktion¹¹¹.

Baris et al. untersuchten 2015 am Mausmodell, inwieweit kardiale Arrhythmien mit der Akkumulation von Deletionen in der mtDNA zusammenhängen. Die Studie ergab, dass bei

Mäusen mit künstlich gestörter Mitochondrienfunktion nach 18 Monaten vorzeitige früh einfallende Extrasystolen und AV-Blockierungen nachzuweisen waren. Die Arrhythmien waren nach 12 Monaten noch nicht nachweisbar und konnten darüber hinaus nicht auf eine generelle Dysfunktion der Mitochondrien des gesamten Myokards zurückgeführt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die altersabhängige Akkumulation von mtDNA-Deletionen mit einhergehendem Atmungsketten-Defizit zur Entstehung von Herzrhythmusstörungen wie bspw. Vorhofflimmern beiträgt¹⁵.

2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Vorhofflimmern ist eine der wichtigsten Erkrankungen des älteren Menschen und daher ein großes Patient:innenkollektiv von der Herzrhythmusstörung betroffen. Der Mechanismus der Rhythmusstörung ist aber gerade bei den persistierenden Formen noch nicht verstanden und die aktuellen Behandlungsmethoden sind zwar größtenteils effektiv aber nicht bei allen Patient:innen in gleichem Masse erfolgreich.

Trotz vielfacher Erforschung der molekular-pathologischen Grundlagen des Vorhofflimmerns gibt es nach wie vor viele Lücken im Verständnis der Erkrankung. Strukturelles Remodeling und Fibrosierung der Herzmuskulatur scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen¹¹². Beides tritt im Rahmen des Alterungsprozesses von Geweben auf, genau wie die Zunahme von Deletionen in der mtDNA¹¹¹. Untersuchungen am Mausmodell legen die Vermutung nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Zellen mit Akkumulation von mtDNA-Deletionen und der Entstehung von Herzrhythmusstörungen gibt. Dabei sind die mutationstragenden Zellen mosaikförmig innerhalb des Zellverbands der Kardiomyozyten angeordnet¹⁵. Die Untersuchung dieses Zusammenhangs hat bisher noch nicht an menschlichem Gewebe stattgefunden und soll Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein. Hierzu soll das myokardiale Gewebe von Vorhofflimmerpatient:innen nach deren genauer klinischer und elektrophysiologischer Charakterisierung hinsichtlich des Auftretens von mitochondrialen Funktionsstörungen untersucht werden. Grundlage der experimentellen Herangehensweise bilden hierbei die Aktivitätsbestimmung der beiden Enzyme der Atmungskette COX (codiert im mitochondrialen Genom und funktionseingeschränkt bei mtDNA Deletionen) und SDH (codiert im nukleären Genom und nicht von mtDNA Deletionen betroffen), wodurch spezifisch Störungen in der mtDNA nachgewiesen werden können.

Die Hypothese ist, dass es eine Korrelation zwischen Patient:innenalter, Schwere des Vorhofflimmerns und dem Vorkommen von Deletionen in der mtDNA gibt. So könnte in der vorliegenden Studie erstmals ein mechanistischer und kausaler Zusammenhang zwischen dem generellen Alterungsprozess und dem im Alter gehäuft auftretenden Vorhofflimmern hergestellt werden. Dies könnte Implikationen für Diagnostik und Therapie des

Vorhofflimmerns haben und erklären, warum ältere Menschen eine erhöhte Suszeptibilität für Vorhofflimmern aufweisen.

3. Material und Methoden

3.1 Patient:innenkollektiv

Das Patient:innenkollektiv der vorliegenden Arbeit umfasst 20 Patient:innen, die im Zeitraum von August 2017 bis Dezember 2017 in der Abteilung für Elektrophysiologie des Herzzentrums der Universitätsklinik Köln behandelt wurden. Es handelt sich um Patient:innen, die sich mit paroxysmalem (n=5) oder persistierendem (n=15) Vorhofflimmern zur Ablationstherapie vorstellten.

Einschlusskriterien waren, neben dem Vorliegen eines symptomatischen, behandlungsbedürftigen Vorhofflimmerns, das Alter über 18 Jahre. Von der Teilnahme ausgeschlossen waren Patient:innen mit permanentem Vorhofflimmern, einer vorhergegangenen chirurgischen Therapie des Vorhofflimmerns, einem BMI >35kg/m², einer vorliegenden Schwangerschaft, einer hämorrhagischen Diathese oder einer anderen Koagulopathie, Kontraindikationen für orale Antikoagulation sowie einer Hyper- oder Hypothyreose.

Die Proband:innen wurden mindestens 24 Stunden vor dem Eingriff über Verlauf und Risiken des Prozederes aufgeklärt und unterzeichneten eine vorgefertigte Einverständniserklärung.

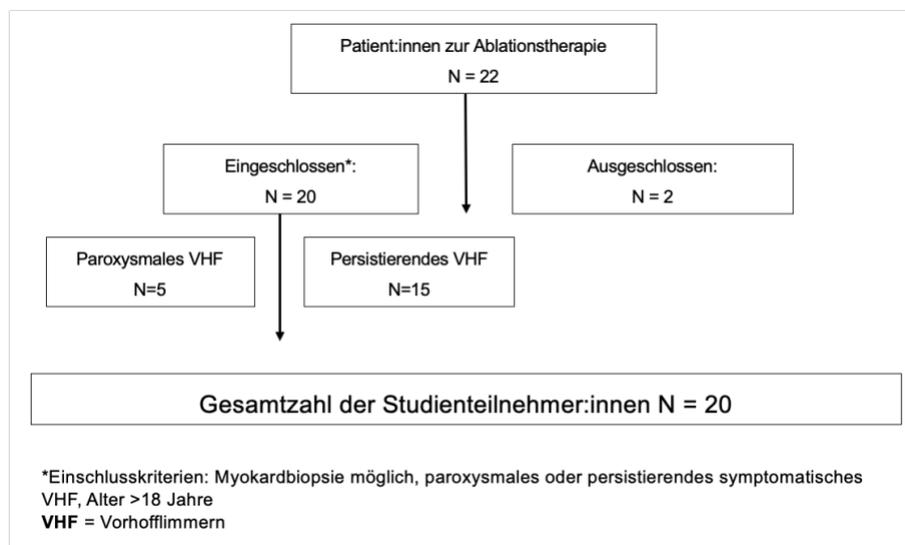


Abbildung 3: Übersicht über das Patient:innenkollektiv

Für die Studie liegt ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universitätsklinik Köln (06.03.2017) vor. Alle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärzteverbandes (1983) sowie den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

3.2 Klinische Parameter

Patient:innenbezogene Daten wurden zum Zeitpunkt der Intervention, nach 3 und 12 Monaten erhoben. Hierzu erfolgten eine Anamneseerhebung, eine körperliche Untersuchung und eine Laboruntersuchung. Außerdem wurde eine transthorakale Echokardiographie (TTE) durchgeführt sowie ein 12-Kanal-EKG erstellt. Zusätzlich wurde bei den Follow-Up Terminen ein Langzeit-EKG angefertigt. Die Datenerhebung umfasste außerdem Kennzahlen zur Ablationsprozedur, eingenommenen Medikamenten sowie Komplikationen von Prozedur oder Therapie.

Von zentraler Bedeutung waren das Patient:innenalter, die Länge der Vorhofflimmerepisoden, die Anzahl der Jahre seit Erkrankungsbeginn und das Auftreten eines Vorhofflimmerrezidivs in den ersten 12 Monaten nach der Ablationstherapie. Fehlende oder ergänzende Informationen bezüglich der kardiologischen Anamnese wurden in Absprache mit den Patient:innen von den behandelnden Hausärzt:innen bzw. Kardiolog:innen angefordert.

3.3 Probengewinnung

Bei dem zu untersuchenden Gewebe handelte es sich um Biopsate des ventrikulären Myokards der in die Studie eingeschlossenen Proband:innen, welches mittels einer Myokardbiopsie gewonnen wurde.

Im Rahmen ihres Aufenthalts in der Uniklinik Köln unterzogen sich alle Patient:innen einer Katheterablations-Therapie. Im untersuchten Kollektiv wurden 15 Patient:innen mittels Radiofrequenz- und 5 Patient:innen mittels Kryo-Ablation behandelt.

Um den Ort der Ablation aufzusuchen, wurde ein elektroanatomisches Mapping-Programm verwendet. Unter geringer Strahlenbelastung konnten damit die anatomischen Strukturen des Herzens dargestellt werden und im Anschluss gezielt die gewünschten Loci ablatiert werden. Mit Hilfe dieser Mapping Programme war es möglich, den Ort für die Biopsie ohne zusätzliche Strahlenbelastung für die Patient:innen zu lokalisieren. Die Entnahmestelle für die Myokardbiopsie lag an einer beliebigen Stelle im rechten Ventrikel. Diese Stelle konnte vom rechten Vorhof aus entsprechend des natürlichen Zugangswegs über die Trikuspidalklappe erreicht werden, ohne andere Strukturen zu schädigen. Mit einer Biopsiezange wurden 2-3mm große Gewebstücke aus dem Herzmuskel entnommen. Dabei kam es zu keiner Zunahme der Prozedurzeit, da die Biopsie in der ohnehin vorgesehenen Wartezeit für die Persistenz der PVI durchgeführt werden konnte. Die so gewonnenen Proben wurden in einen mit gekühlter PBS-Pufferlösung gefüllten sterilen Behälter gegeben und transportfähig gemacht.

Obwohl der Ursprung der Arrhythmien im Vorhof liegt, konnte die Gewebeentnahme und damit die Untersuchung der zellulären Prozesse nur im Myokard des Ventrikels erfolgen. Grund hierfür ist die geringe Dicke der Vorhofwand und die damit einhergehende Fragilität. Eine

Biopsie des Vorhofmyokards wurde als zu risikobehaftet eingestuft. Bei einem Patienten des Kollektivs kam es auch bei ventrikulärer Biopsieentnahme zur Perikardtamponade als Folge der Punktion (siehe Absatz 4.2).

3.4 Histologische Aufarbeitung

Im Labor wurde das entnommene Gewebe in ein mit O.C.T.-Masse für Kryoschnitte (Tissue Tek, Vogel) gefülltes Einbetttschälchen gegeben und schockgefroren. Hierzu wurde die Probe einige Minuten in eine Schale mit durch Flüssigstickstoff heruntergekühltem Isopentan gehalten. Die so konservierten Proben wurden bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Kryoblöcke mit der darin enthaltenen Gewebssprobe im Kryostat (Leica CM 3050s, Techno-med) bei -20°C in 10µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Durch das kurze Antauen der Probe blieben die Gewebsschnitte am Glas des Objektträgers haften. Die so hergestellten Schnitte konnten weiterhin bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden. Beim Prozess des Schneidens wurde darauf geachtet, an verschiedenen Stellen der Herzmuskelbiopsie Schnitte anzufertigen, um einen möglichst großen Bereich der Probe zu erfassen. Die Schnitte wurden in Paaren sortiert, so dass aufeinanderfolgende Ebenen des Herzmuskels in unterschiedlichen Färbungen miteinander verglichen werden konnten. Die entstandenen Querschnitte durch das Myokard wurden entsprechend zweier Färbeprotokolle wie im Folgenden beschrieben weiterverarbeitet.

Um das am Mausmodell entwickelte Färbeprotokoll zu überprüfen und an das menschliche Gewebe anzupassen wurden zusätzlich angefertigte Gewebspräparate verwendet. Diese wurden in der Datenauswertung nicht berücksichtigt.

3.4.1. Hämatoxylin-Färbung (HE-Färbung)

Jeder zweite Schnitt wurde mit Hämatoxylin gefärbt, um die generellen Gewebestrukturen sichtbar zu machen und die Gesamtanzahl der Zellen zu erfassen. Hierbei war die Darstellung der Nuklei von zentraler Bedeutung, ein Nukleus stand dabei stellvertretend für eine Zelle.

Hierzu wurden die Gewebsschnitte für 10 Minuten an der Luft angetaut und getrocknet. Es erfolgt die Färbung mit Gill 3 Hämatoxylin (Thermo Scientific) für 3 Minuten. Anschließend wurden die Proben für eine Minute in angesäuertem Milli-Q (MQ) Wasser und danach 10 Minuten unter dem laufenden Wasserhahn ausgewaschen. Die Dehydratation der Proben erfolgte mit aufsteigenden Konzentrationen von Ethanol (50%, 70%, 95% und 100%), anschließend wurden sie zweimal in 100%igem Xylol gereinigt und die Färbung mit Entellan (Merck, Deutschland) befestigt.

3.4.2. Cytochrom-c-Oxidase(COX)-Succinatdehydrogenase(SDH)-

Doppelfärbung

Um die Funktionalität der beiden Enzyme der Atmungskette COX und SDH sichtbar zu machen erfolgte die sequenzielle COX-SDH-Doppelfärbung der zweiten Hälfte der Gewebsschnitte.

Die Proben wurden für 15 Minuten an der Luft angetaut und getrocknet. Anschließend wurden sie für 20 Minuten in COX-Färbelösung (20mg/ml Katalase, 0.75% Saccharose (Sigma), 0,02% Cytochrom c (reduzierte Form, Sigma) und 0,01% DAB (Sigma) in 50mM Na₂HPO₄, End-pH 7,4) bei 37°C inkubiert und dann in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 2 Minuten gewaschen. Daraufhin fand die Inkubation der Schnitte in SDH-Färbelösung (0,2% w/v NBT (Sigma), 0,2M Natriumsuccinat, 50mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, End-pH 7,4) für 80-90 Minuten bei 37°C statt. Zuletzt wurden die Proben für 2 Minuten in MQ Wasser gewaschen und mit Glycerin-Gelatine (Sigma, #GG1) befestigt.

Muskelzellen mit sowohl funktionierender COX als auch SDH zeigten sich nach der Doppelfärbung braun-grau angefärbt. Bei reduzierter oder fehlender COX-Aktivität und gleichzeitig erhaltener SDH-Funktion nahmen die Zellen eine blaue Farbe an. Blaue Zellen galten somit als Cytochrom-c-Oxidase negative (COX^{neg}) Zellen.

3.5 Quantifizierung der Zellen

Die angefärbten und fixierten Präparate wurden gescannt und digitalisiert, hierzu wurde der Slide Scanner Leica SCN400 (CECAD Einrichtung für bildgebende Verfahren, Köln) verwendet.

Nach der Durchführung der oben beschriebenen Färbeprotokolle und Digitalisierung der Schnitte ergaben sich pro Patient:in 3 Probenpaare. Ein Paar bestand aus einem Gewebsschnitt in HE-Färbung und einem angrenzenden Schnitt in COX-SDH-Enzymfärbung. Da die Ebenen innerhalb der Probenpaare aufeinander folgten, beinhalteten sie die Anschnitte derselben Zellen und konnten somit verglichen werden.

Auf Grund der geringen Größe der Biopsien wurde darauf verzichtet, bestimmte Bereiche zur Betrachtung zu definieren und stattdessen die gesamte Probenfläche ausgezählt. Aus den HE-gefärbten Präparaten ließ sich die Gesamtzellzahl des Myokardgewebes bestimmen und daraus die absolute Anzahl der Kardiomyozyten errechnen. Hierbei stand ein angefärbter Zellkern stellvertretend für eine Zelle. Es wurde davon ausgegangen, dass die Hälfte aller sichtbaren Zellkerne zu Fibroblasten des kardialen Bindegewebes und anderen Zelltypen gehört. So ergab sich aus der Gesamtmenge der gezählten Zellen ein Myozytenanteil von 50%¹¹³. Bei den COX-SDH-gefärbten Schnitten wurde die Anzahl der blau angefärbten, also

mt-DNA defizienten Kardiomyozyten gezählt. Aus diesen beiden Zahlen konnte der Anteil der COX^{neg} Zellen an der Gesamtheit aller Kardiomyozyten in % errechnet werden.

Für jeden Patient:in wurde der Durchschnitt der Auszählungen aller drei Proben errechnet und in Bezug zu den klinischen Daten gesetzt.

3.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung des Datensatzes erfolgte mit GraphPad Prism Version 9.2.0. für macOS. Stetige Variablen wurden für die deskriptive Statistik beim Vorliegen einer Normalverteilung als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) bzw. bei Nichtnormalverteilung als Medianwert mit Minimum (min) und Maximum (max) dargestellt. Kategoriale Variablen wurden mittels absoluter und relativer Häufigkeiten berichtet. Bei allen statistischen Tests wurde ein p-Wert von $<0,05$ als signifikant angenommen.

D'Agostino-Pearson Test

Die Variablen wurden mit dem D'Agostino-Pearson Test auf Normal- bzw. nicht-Normalverteilung überprüft. Entsprechend des Ergebnisses wurden die weiteren Rechnungen durchgeführt.

t-Test

Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden im t-Test für unabhängige Stichproben gezielt die Mittelwerte der gemessenen Anzahl von COX_{neg} Zellen von Subpopulationen der Kohorte auf Unterschiede überprüft. Subpopulationen wurden anhand klinisch relevanter Faktoren gebildet.

Mann-Whitney-U-Test

Bei Vorliegen von nicht normalverteilten Werten wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft, ob sich die zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Gruppen innerhalb der Kohorte im Auftreten von COX_{neg} Zellen unterscheiden.

Univariate lineare Regressionsanalyse

In der univariaten linearen Regressionsanalyse wurde der Einfluss einzelner klinischer Faktoren auf den gemessenen Anteil von COX_{neg} Zellen ermittelt. Da sich hier kein signifikanter Zusammenhang abzeichnete, wurde auf die Durchführung einer multiplen Regressionsanalyse verzichtet.

Korrelationsanalyse

In der Korrelationsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen verschiedenen Variablen und dem Auftreten von COX_{neg} Zellen untersucht und der Korrelationskoeffizient r ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Patient:innenkollektiv

Das Studienkollektiv dieser Untersuchung umfasst 20 Personen und setzt sich aus 4 Frauen und 16 Männern zusammen. Alle Patient:innen stellten sich im Zeitraum von August bis Dezember 2017 in der Kardiologie der Uniklinik Köln zur Ablationstherapie vor. 5 der Patient:innen litten zum Zeitpunkt des Eingriffs an paroxysmalem Vorhofflimmern, 15 an persistierendem Vorhofflimmern. Das mediane Alter der Patient:innen lag bei 68,5 Jahren (Q1 = 57; Q3 = 75,6; min = 50 Jahre; max = 83 Jahre). Die Abbildung 4 und Abbildung 5 veranschaulichen diese Verteilung.

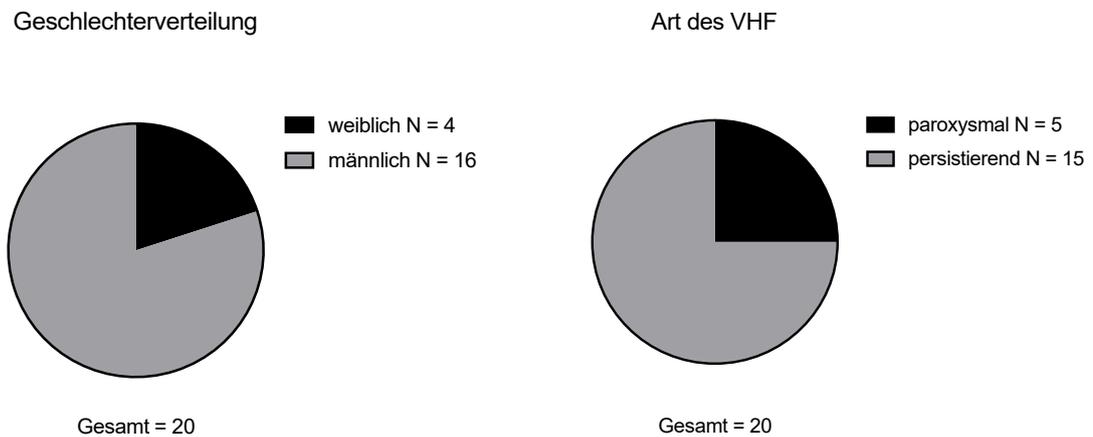


Abbildung 4: Geschlechterverteilung und Art des Vorhofflimmerns (VHF)

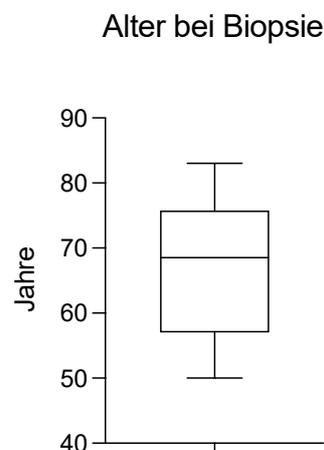


Abbildung 5: Altersverteilung des Patient:innenkollektivs

Wie in Tabelle 1 dargestellt, waren weitere Baseline-Charakteristika des Studienkollektivs ein medianer BMI von 28,50 kg/m² (Q1 = 23,8; Q3 = 29,7; min = 22,57; max = 35,62) und ein medianer CHA₂DS₂-VASc Score von 2,5 (Q1 = 1; Q3 = 4,8; min = 0; max = 6). Der EHRA Score der Kohorte lag im Median bei 3 (Q1 = 1; Q3 = 3; min = 2; max = 4). Hierbei handelt es sich um einen Score der European Heart Rhythm Association, der das Ausmaß des Vorhofflimmerns anhand der Einschränkungen der Patient:innen bei der Ausführung von physischen Aktivitäten beurteilt. Die Patient:innen litten zum Zeitpunkt der Prozedur seit 5 ± 5 (Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD)) Jahren an Vorhofflimmern, die längste Dauer der Vorhofflimmer-Episoden betrug hierbei im Durchschnitt 26,69 ± 80,26 Tage. Im Mittel wies das Patient:innenkollektiv ein linksatriales Volumen von 36,6 ml/m² auf. Die mediane Ejektionsfraktion (EF) betrug 57,5% (Q1 = 55; Q3 = 65), wobei eine minimale Auswurfleistung von 40% und eine maximale von 67% zu messen war.

Charakteristika	Patient:innen
Gesamtkollektiv, N	20
Geschlecht	
Weiblich, N (%)	4 (20%)
Männlich, N (%)	16 (80%)
Alter, Median (Q1/Q3) [Jahre]	68,5 (57/75,6)
BMI, Median (Q1/Q3) [kg/m ²]	28,5 (23,8/29,7)
Art des Vorhofflimmerns	
Persistierendes VHF, N (%)	15 (75%)
Paroxysmales VHF, N (%)	5 (25%)
CHA ₂ DS ₂ -VASc Score, Median (Q1/Q3)	2,5 (1/4,8)
EHRA Score, Median (Q1/Q3)	3 (2/3)
Bestehen des VHF, MW ± SD [Jahre]	5 ± 5
Längste Dauer der VHF-Episode, MW ± SD [Tage]	26,7 ± 80,3
Volumen des linken Vorhofs, MW ± SD [ml/m ²]	36,6 ± 9,9
Ejektionsfraktion, Median (Q1/Q3) [%]	57,5 (55/65)

Tabelle 1: Baseline-Charakteristika

BMI = Body-Mass-Index, VHF= Vorhofflimmern, Q1 = erstes Quartil, Q3 = drittes Quartil, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Im Rahmen der Vorstellung zur Ablationstherapie wurde bei allen Patient:innen ein EKG zur Dokumentation des aktuell vorliegenden Herzrhythmus angefertigt. Hierbei wurde die folgende Verteilung festgestellt (siehe Abbildung 6). Es befanden sich 14 Patient:innen im Sinusrhythmus (SR), ein Patient wies eine atriale Tachykardie (AT) auf und bei 5 Patient:innen bestand Vorhofflimmern. Unabhängig vom aktuellen Rhythmus am Vortag der Intervention unterzogen sich alle Patient:innen im Anschluss einer PVI.

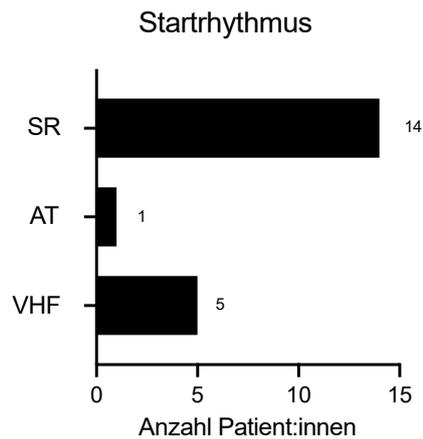


Abbildung 6: präinterventioneller Rhythmus

SR = Sinusrhythmus, AT = Atriale Tachykardie, VHF = Vorhofflimmern

4.1.1. Vorerkrankungen

Die 20 Patient:innen der Studie litten an verschiedenen relevanten kardiologischen Vorerkrankungen. Die häufigste Vorerkrankung war die konzentrische Myokardhypertrophie, diese trat bei 65% der Untersuchten auf. Bei 60% lag eine arterielle Hypertonie vor. Je 25% hatten eine koronare Herzkrankheit oder Niereninsuffizienz. 20% der Patient:innen litten an einem Diabetes mellitus, je 10% an einer Kardiomyopathie oder einem vorausgegangenem Schlaganfall. Zu je 5% lag ein Schlafapnoe-Syndrom, ein Nikotinabusus oder eine vergangene Bypass-Operation vor. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die beschriebenen Vorerkrankungen des Patient:innenkollektivs.

Vorerkrankungen	N	%
Konzentrische Myokardhypertrophie	13	65%
Arterielle Hypertonie	12	60%
Niereninsuffizienz	5	25%
Koronare Herzkrankheit	5	25%
Diabetes Mellitus	4	20%
Z.n. Schlaganfall	2	10%
Kardiomyopathie	2	10%
Schlafapnoe	1	5%
Nikotinabusus	1	5%
Z.n. Bypass-Operation	1	5%

Tabelle 2: Übersicht über die Vorerkrankungen

4.1.2. Vorangegangene Therapien

Tabelle 3 beschreibt, mit welchen Therapiemaßnahmen die Studienteilnehmer:innen bis zum Zeitpunkt der im Rahmen der Studie durchgeführten Vorhofflimmerablation bereits behandelt wurden. So waren 60% der Patient:innen in der Vergangenheit schon ein oder mehrmals ablatiert worden. Eine genaue Übersicht über die verschiedenen Arten der Vorablationen gibt Abbildung 7.

Bei 75% der Patient:innen war anamnestisch bereits mindestens eine elektrische Kardioversion durchgeführt worden. Im Mittel lag die Anzahl der durchgeführten Kardioversionen bei 2 ± 2 . Eine medikamentöse Therapie mit Antiarrhythmika wurde von 45% der Patient:innen berichtet. Dies umfasste die Behandlung mit Amiodaron (N = 6) oder Flecainid (N = 3). 90% der Proband:innen wurden präinterventionell mit Betablockern behandelt.

<u>Therapiemaßnahme</u>	<u>N</u>	<u>%</u>
Z.n. elektrischer Kardioversion	15	75%
Anzahl Kardioversionen, MW \pm SD	2 ± 2	
Z.n. Ablation	12	60%
Einnahme von Betablockern	18	90%
Einnahme von Antiarrhythmika	9	45%

Tabelle 3: Vorangegangene Therapiemaßnahmen

Bei der im Rahmen der Studie durchgeführten Ablation handelte es sich bei 8 von 20 Proband:innen (40%) um die erste Ablation. Von den anderen 12 Personen, die sich zu einer erneuten Ablationstherapie vorstellten, war bei 8 (40%) bereits eine PVI durchgeführt worden. Bei jeweils einer Person (5%) wurde schon die zweite bzw. dritte PVI vorgenommen. 2 Patient:innen (10%) des Studienkollektivs hatten sich im Vorfeld der Studie einer Ablation des cavotrikuspiden Isthmus (CTI) unterzogen (Abbildung 7).

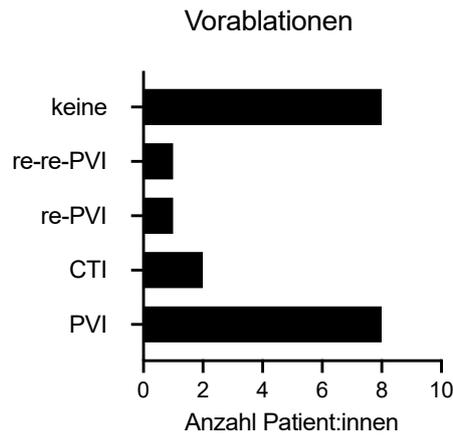


Abbildung 7: Art der Vorablationen

*PVI = Pulmonalvenenisolation, re-PVI = zweifache PVI, re-re-PVI = dreifache PVI,
CTI = Ablation des cavotrikuspidalen Isthmus*

4.2 Komplikationen

Einen zentralen Aspekt der Studie stellte die Entnahme von myokardialem Gewebe der Ablationspatient:innen dar. Für diese zusätzliche Intervention wurde bei der Studienplanung von keinem relevanten zusätzlichen Risiko ausgegangen, da die Biopsie im Rahmen der ohnehin erfolgten PVI durchgeführt wurde. So waren Komplikationen im Bereich der Leiste, Perikardtamponaden oder Lungenarterienembolien im allgemeinen Risiko der Ablationsbehandlung enthalten. Mögliche zusätzliche Belastungen der Patient:innen durch die Myokardbiopsie waren im Studienplan und im Ethikantrag mit einem Wert von 0,01% beschrieben worden.

Intraprozedural kam es bei einem Patienten der Studie zur Verletzung des ventrikulären Myokards mit anschließender Herzbeutelamponade. Noch während der Katheteruntersuchung konnte die Blutung gestoppt und der Patient anschließend in stabilem Zustand verlegt werden. Eine Probengewinnung und Therapie war dennoch möglich.

4.3 Klinische Nachbeobachtung

Die Studienteilnehmer:innen wurden nach erfolgreicher Ablation zu mehreren Zeitpunkten im Rahmen des Follow-Ups untersucht, unter anderem im Hinblick auf Rezidivfreiheit. So wurde zunächst postinterventionell vor der Entlassung aus der stationären Behandlung ein Frührezidiv ausgeschlossen. Bei einer Person konnte bereits hier das Wiedereinsetzen des persistierenden Vorhofflimmerns verzeichnet werden. Im Anschluss an die stationäre Behandlung fand die erste Follow-Up Untersuchung 3 Monate nach der Ablationstherapie statt. Zu diesem Zeitpunkt waren 16 Patient:innen rezidivfrei, bei 3 Patient:innen lag persistierendes Vorhofflimmern und bei einer Person paroxysmales Vorhofflimmern vor. Zur

letzten Kontrolle der Studie nach 12 Monaten erschienen 17 von 20 Patient:innen. Von dieser Gruppe waren 13 Patient:innen rezidivfrei und im Sinusrhythmus und je zwei Patient:innen stellten sich mit persistierendem oder paroxysmalem Vorhofflimmern vor. Einen Überblick über diese Befunde gibt Abbildung 8. Im Anschluss an die, in dieser Studie beschriebene, Ablationstherapie war bei 4 von 17 befragten Studienteilnehmer:innen nach 12 Monaten eine Redo-Prozedur indiziert, bei 3 Personen ist der weitere Verlauf unbekannt.

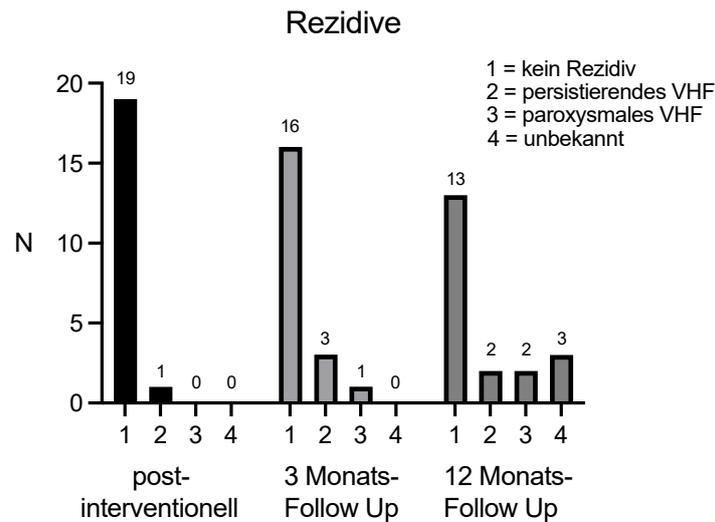


Abbildung 8: Herzfrequenz in der Nachbeobachtung

4.4 Auftreten von mtDNA-Deletionen

Die Gewebeproben der Patient:innen wurden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, histologisch und enzymhistochemisch analysiert. Von zentraler Bedeutung war hierbei die mitochondriale Enzymaktivitätsminderung, die mithilfe der COX/SDH-Enzymfärbung untersucht werden konnte. Zellen mit defizitärer COX-Aktivität aber funktionierender SDH stellten sich nach Durchführung der Färbung blau dar (Abbildung 9).

Um die histochemischen Auffälligkeiten zu quantifizieren, wurde die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl der COX_{neg} Zellen manuell gezählt und in Relation zueinander gesetzt (%-Angabe).

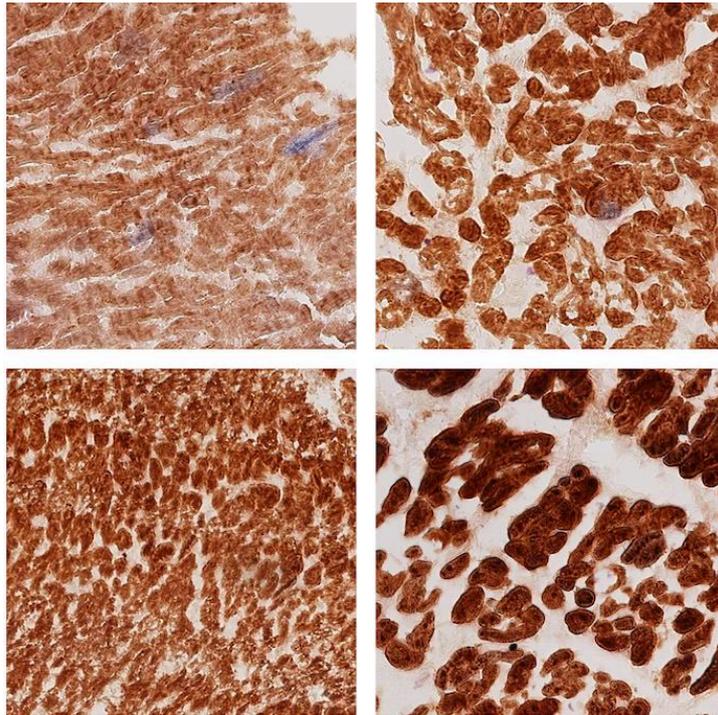


Abbildung 9: COX/SDH-Färbung des Myokardgewebes

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Auszählung. Von den 20 entnommenen Proben konnten 16 nach endgültiger Bearbeitung ausgezählt werden. Gründe für fehlende Verwendbarkeit waren eine zu geringe Biopsie-Größe, ein zu hoher Anteil fibrotischen Gewebes innerhalb der Probe, sodass nicht ausreichend viele Kardiomyozyten zu differenzieren waren, sowie Schäden durch Transport und Lagerung. Der Anteil der COX_{neg} Zellen (nach der enzymhistochemischen Verarbeitung blau angefärbt) an der Gesamtzahl der Myokardzellen ist in Tabelle 4.B für die Patient:innenproben (p1 bis p16) in % dargestellt. Der mittlere Anteil der COX_{neg} Zellen betrug 0,36% mit einer Standardabweichung von 0,51. Das Minimum der deletierten Zellen lag bei 0%, maximal konnte ein Anteil von 1,97% ermittelt werden. Bei der Aufteilung des Kollektivs in drei Gruppen anhand eines Trennwerts von 0,2% COX_{neg} Zellen wiesen 4 Proben keine (0%) COX_{neg} Zellen, 4 wenige (<0,2%) und 8 Proben viele ($\geq 0,2\%$) der mutierten Zellen auf (Tabelle 4.A).

A		B			
	N	ID	% COXneg Zellen		
Gesamtkollektiv	20	p1	0		
verwendbar	16	p2	0	Median	0,17
nicht verwendbar	4	p3	0	Q1	0,01
		p4	0	Q3	0,53
		p5	0,04	min	0
Anzahl COXneg Zellen		p6	0,05	max	1,97
keine	4	p7	0,06		
wenige	4	p8	0,12	MW	0,36
viele	8	p9	0,21	SD	0,51
		p10	0,33		
		p11	0,38		
		p12	0,41		
		p13	0,57		
		p14	0,6		
		p15	0,98		
		p16	1,97		

Tabelle 4: Rohdaten der Auszählung COXneg Zellen

(A) zeigt die Anzahl der ausgezählten Proben und die Einteilung anhand des Trennwerts von 0,2% blaue Zellen (in: keine, wenige, viele); unter (B) sind die Rohdaten der Auszählung in %-Anteil COXneg Zellen am Gesamtanteil der Kardiomyozyten für die Patient:innen p1-p16 sowie deren deskriptive Statistik dargestellt

4.4.1. Einfluss des Alters

Wie in Absatz 2.4.3 beschrieben, wird dem zellulären Alterungsprozess eine große Bedeutung für die Entstehung von mtDNA Deletionen zugesprochen. So war ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit, das Auftreten von Myokardzellen mit deletierter mitochondrialer DNA in Abhängigkeit vom Patient:innenalter zu betrachten. Bei den entsprechenden Regressions- und Korrelationsanalysen zwischen dem Alter der Proband:innen und dem Anteil der COX_{neg} Zellen konnte hierfür kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Korrelationskoeffizient (r) = 0,141; p = 0,604) (Tabelle 5, Abbildung 10).

	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	R-Quadrat	Korrelationskoeffizient
Konstante	-0,115	0,899	0,604	0,02	0,141
Alter	0,007	0,013			

Tabelle 5: Regressions- und Korrelationsanalyse Alter

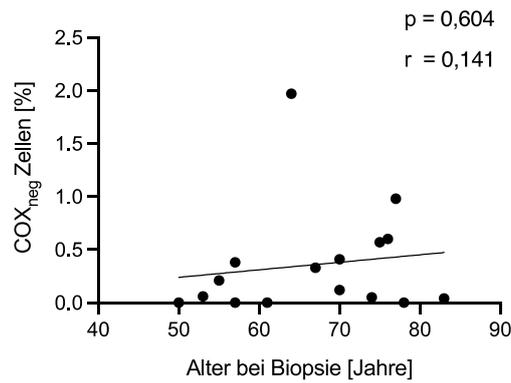


Abbildung 10: Regressionsgerade Alter – COXneg Zellen

Nach Unterteilung des Patient:innenkollektivs in zwei Gruppen anhand eines Trennwertes in „alt“ und „jung“ wurden die Mittelwerte der Subpopulationen bezüglich des Auftretens COX_{neg} Zellen in % miteinander verglichen. Auch hierbei konnte im Mann-Whitney-U-Test bzw. t-Test kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p = 0,2532 bei Trennwert 60 Jahre; p = 0,9130 bei Trennwert 66 Jahre; p = 0,6512 bei Trennwert 72 Jahre). Bei dem direkten Vergleich der beiden Kollektive konnte festgestellt werden, dass die Patient:innen im höheren Lebensalter tendenziell stärker von multiplen Deletionen betroffen waren (Abbildung 11). Allerdings waren diese Untersuchungen bei geringer Größe des Kollektivs (N = 16) stark beeinflusst von ausreißenden Werten einzelner Proband:innen.

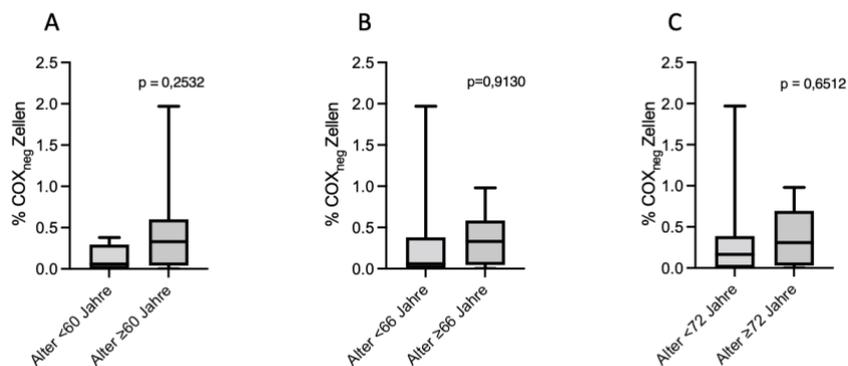


Abbildung 11: Subgruppenanalyse nach Alter

4.4.2. Einfluss des Geschlechts

Bei der Untersuchung des Einflusses des Geschlechts auf die Anzahl der COX_{neg} Zellen ergab sich eine signifikante Korrelation ($p = 0,003$; $r = -0,692$). So kam es bei Vorliegen des weiblichen Geschlechts zu einer erhöhten Anzahl COX_{neg} Zellen. Dabei kann nach Cohen, 1992¹¹⁴ von einem starken Effekt gesprochen werden. Bei der geringen Populationsgröße ($N = 16$) muss jedoch die Güte dieses Ergebnisses kritisch diskutiert werden.

	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	R-Quadrat	Korrelationskoeffizient
Konstante	1,27	0,272	0,003	0,48	-0,692
Geschlecht	-1,043	0,29			

Tabelle 6: Regressions- und Korrelationsanalyse Geschlecht

4.4.3. Einfluss der Schwere des Vorhofflimmerns

Es ist anzunehmen, dass mit zunehmender Schwere der Erkrankung des Vorhofflimmerns die unter 2.2.5 beschriebenen Veränderungen des Herzens eintreten. So ergab sich die Fragestellung, ob auch die Anzahl der COX_{neg} Zellen mit den messbar unterschiedlichen Ausprägungen des Vorhofflimmerns korreliert. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen beschrieben.

So ließ das Patient:innenkollektiv sich anhand der Anzahl der Jahre mit bereits bestehendem Vorhofflimmern in zwei Subgruppen unterteilen. Hierbei gab es bei Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,6909$) im Auftreten von COX_{neg} Zellen zwischen den Mittelwerten der Populationen mit weniger als 5 Jahren und 5 oder mehr Jahren Erkrankungsdauer (Abbildung 12.A). Auch in der Korrelationsanalyse ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Erkrankungsdauer und der Anzahl deletierter Zellen feststellen ($p = 0,755$; $r = 0,085$).

Im untersuchten Kollektiv litten 25% an paroxysmalem und 75% an persistierendem Vorhofflimmern (Absatz 4.1). Der t-Test zum Vergleich der Mittelwerte dieser beiden Subgruppen in Bezug auf das Auftreten COX_{neg} Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,0745$) (Abbildung 12.B), ebenso wenig die Korrelationsanalyse ($p = 0,075$; $r = -0,458$).

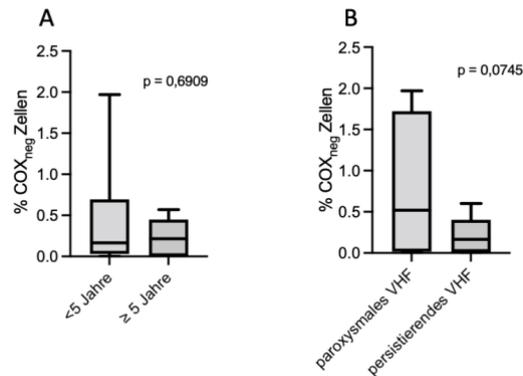


Abbildung 12: Subgruppenanalyse nach Erkrankungsdauer (A) und Art des VHF (B)

Als eine weitere Kenngröße für die Schwere des Vorhofflimmerns wurde die Rezidivfreiheit als Maß für den Therapieerfolg gewertet. Bei den entsprechenden Regressions- und Korrelationsanalysen wurde kein Zusammenhang zwischen einem aufgezeichneten Rezidiv im 3 Monats Follow-Up und der Anzahl der COX_{neg} Zellen gefunden ($p = 0,487$; $r = 0,187$). Des weiteren zeigte sich keine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Deletionslast des Gewebes und dem Volumen des linken Atriums (LA) als Maß für die vorangeschrittene Dilatation der Vorhöfe ($p = 0,343$; $r = 0,064$). Auch die Untersuchung der Korrelation zwischen ermitteltem CHA₂DS₂-VASc Score und der Menge COX_{neg} Zellen erwies sich nicht als statistisch signifikant ($p = 0,539$; $r = 0,028$).

4.4.4. Einfluss von Vorerkrankungen

In einem weiteren Schritt wurden lineare Regressionsanalysen für als relevant eingestufte Vorerkrankungen der untersuchten Patient:innen durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Myokardhypertrophie und dem Auftreten von mitochondrial deletierten Kardiomyozyten bestand ($p = 0,401$; $r = -0,225$). Auch für den erhobenen BMI ließ sich in der entsprechenden Korrelationsanalyse kein signifikanter statistischer Zusammenhang mit der Anzahl der COX_{neg} Zellen ermitteln ($p = 0,244$; $r = -0,309$).

5. Diskussion

5.1 Überblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen dem menschlichen Alterungsprozess sowie den damit einhergehenden zellulären Veränderungen und dem Auftreten von Herzrhythmusstörungen zu untersuchen. Als eine der relevantesten Herzrhythmusstörungen des alten Menschen wurde hierfür das Vorhofflimmern anhand eines Kollektivs aus 20 Patient:innen genauer betrachtet. Mittels einer Biopsie gewonnene Gewebeproben des Ventrikelmyokards der Proband:innen wurden auf das Vorliegen von Deletionen der mitochondrialen DNA der Zellen untersucht. Diese Veränderung der Mitochondrien galt hierbei als Maß für das Zellalter und konnte anhand einer enzymhistochemischen Färbung visualisiert und quantifiziert werden. Von zentraler Rolle waren dabei die SDH (nukleär codiert) und die COX (mitochondrial codiert), beides Enzyme der Atmungskette. Zellen mit Mutationen der mtDNA, bei denen es zur Funktionseinschränkung der COX kam, wurden als COX_{neg} bezeichnet. Die erhobenen Daten der histologischen Untersuchung wurden anschließend mit verschiedenen klinischen Kriterien korreliert und auf deren möglichen Einfluss überprüft. Die Regressions- und Korrelationsanalysen ergaben keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von COX_{neg} Zellen und dem Patient:innenalter, der Schwere des Vorhofflimmerns oder den dokumentierten Vorerkrankungen. Gründe für die fehlende Signifikanz der Ergebnisse könnten durch die geringe Stichprobengröße oder Schwächen des Studiendesigns erklärt werden.

Diese Aspekte und die Einordnung der Studienergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext sollen Inhalt des folgenden Kapitels sein.

5.2 Auswahl des Patient:innenkollektivs

Die Teilnehmer:innen der vorliegenden Studie waren im Median 68,5 Jahre alt und litten an verschiedenen kardialen Vorerkrankungen. Der Altersschnitt entspricht in etwa vergleichbaren Studienpopulationen zur Epidemiologie und Entstehung von Vorhofflimmern^{6,18,19,115}. Allerdings ist die Spannweite im Alter des Kollektivs zwischen dem jüngsten Patienten mit 50 Jahren und dem ältesten mit 83 Jahren bei einer Anzahl von N = 20 sehr groß. Da es sich um Patient:innen zur Ablationstherapie handelte, konnte von einer länger bestehenden Erkrankungsdauer (hier im Mittel 5±5 Jahre) und dem Vorliegen von Komorbiditäten ausgegangen werden. Diese Annahme beruht auf den Leitlinien zur Indikationsstellung einer Ablationstherapie⁷². So handelt es sich dabei um eine Therapie bei symptomatischem paroxysmalem oder persistierendem Vorhofflimmern, insbesondere wenn die medikamentöse Therapie wirkungslos war oder nicht vertragen wurde⁷². Dass viele unterschiedliche

Vorerkrankungen zu verzeichnen waren, lässt wiederum die Frage aufkommen, inwieweit auch andere Erkrankungen wie Myokardhypertrophie oder arterieller Hypertonus die Mutationslast des kardialen Gewebes bedingen können und die Ergebnisse der zellulären Untersuchungen nicht nur auf das Alter der Proband:innen zurückzuführen sind.

Bei den Aspekten des Geschlechts und der Art des Vorhofflimmerns konnte eine Ungleichverteilung innerhalb der Studienpopulation festgestellt werden. Die Geschlechterverteilung mit einem Anteil von 20% Probandinnen und 80% Probanden entspricht nicht den Ergebnissen anderer epidemiologischer Untersuchungen von Vorhofflimmerpatient:innen. Hier waren beispielsweise 55,5% bzw. 49,4% der Proband:innen männlich^{115,116}. Die in der Literatur beschriebene Verteilung von paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern innerhalb der untersuchten Kohorten unterliegt großen Schwankungen. Der Anteil an Patient:innen mit paroxysmalem Vorhofflimmern variiert hier zwischen 25% und 62%¹¹⁷. Die in unserer Studie vorliegende Zusammensetzung mit 25% paroxysmalem und 75% persistierendem Vorhofflimmern (Absatz 3.1) spiegelt somit in etwa das Bild neuerer epidemiologischer Studiendaten wider.

Die untersuchte Gruppe setzte sich ausschließlich aus Ablationspatient:innen zusammen. Studienergebnisse am Mausmodell legen nahe, dass aufgrund der Vorhofflimmererkrankung und des hohen Alters der Patient:innen mit dem Vorliegen von mtDNA Deletionen gerechnet werden konnte¹⁵. Um eine zufällige Korrelation auszuschließen, wäre die Untersuchung von jungen und gesunden Proband:innen hilfreich gewesen. So kann bisher nicht ausgeschlossen werden, dass auch unabhängig von Alter und Erkrankung Deletionen der mtDNA auftreten und dieser Sachverhalt nicht kausal mit der Vorhofflimmerentstehung zusammenhängt. Eine Gewebeentnahme gesunder Proband:innen ist aus ethischer Sicht in Anbetracht der gegebenen Risiken und Invasivität einer Herzkatheteruntersuchung ausgeschlossen, wodurch sich im Rahmen dieser Studie keine Möglichkeit einer gesunden Kontrollgruppe bot.

5.3 Korrelation klinischer Daten mit mtDNA-Deletionen

Vorhofflimmern ist eine komplexe Herzrhythmusstörung, deren Pathomechanismus nicht hinreichend geklärt ist. Bedeutend für die Entstehung scheinen Reentry-Mechanismen und fokale Trigger zu sein, ebenso wie atriale Fibrose und das Remodeling der Vorhöfe^{11,112}. Es besteht eine Vergesellschaftung mit hohem Alter, Komorbiditäten und strukturellen Herzerkrankungen der Patient:innen. In welchem Umfang auch extra-atriale Prozesse die Pathologie der Vorhöfe beeinflussen, ist bisher kaum verstanden¹¹⁸.

Um weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Entstehung von Vorhofflimmern zu erlangen, wurden die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchung an myokardialem Gewebe in Zusammenhang zu verschiedenen klinischen Parametern der Proband:innen gesetzt. Die

unter 4.4 beschriebenen Ergebnisse sollen im Folgenden kritisch hinsichtlich Aussagekraft und Stellenwert im Kontext der aktuellen Forschung diskutiert werden.

5.3.1. Aussagekraft der Altersanalysen

Dass der Alterungsprozess des Menschen mit Schäden der mtDNA einhergeht, ist in der Literatur vielfach beschrieben. So konnten besonders bei altersabhängigen Krankheiten wie degenerativen Erkrankungen, Karzinomen und bei Diabetes mellitus pathologische Veränderungen innerhalb der Mitochondrien gefunden werden^{96,99}. Über den Einfluss auf verschiedene Erkrankungen hinaus wurden ebenso unterschiedliche Organsysteme und Zelltypen bezüglich mtDNA Deletionen untersucht. Neben Kardiomyozyten sind auch Skelettmuskelzellen, das Kolon und Neurone des Gehirns von defizienter mtDNA betroffen¹⁴. Dabei wurde außerdem beobachtet, dass nicht alle Zellen innerhalb des Gewebeverbandes im selben Ausmaß von Deletionen der mtDNA betroffen sind. Die COX_{neg} Zellen liegen mosaikförmig innerhalb gesunder Zellen (Kapitel 2.4.3)^{14,15}, eine Beobachtung, die auch in unserer Studie gemacht werden konnte (Abbildung 9). Hieraus ergibt sich die Frage, inwieweit es innerhalb des Zellverbandes zu einer klonalen Anhäufung der deletierten mtDNA kommt und welche Rolle die deletierten Zellen in der Pathogenese von Krankheiten spielen.

Baris et al. untersuchten 2015 den Zusammenhang zwischen mtDNA deletierten Kardiomyozyten und der Entstehung von Herzrhythmusstörungen während des Alterungsprozesses bei Mäusen. Hierzu wurde ein Mausmodell generiert, das durch die Expression einer mutierten mitochondrialen Helikase mtDNA Deletionen in Kardiomyozyten ansammelte, was den natürlichen Alterungsvorgang beim Menschen imitieren sollte. Bei den mutierten Tieren wurden nach 12 Monaten 0,17%±0,12% mitochondrial defiziente Zellen gefunden, nach 18 Monaten waren es 0,56%±0,34% der Gesamtzellzahl an Kardiomyozyten. Die gezählte Anzahl von COX_{neg} Zellen in unsere Studie von 0,36%±0,51% entspricht dabei in etwa den erhobenen Daten der Arbeitsgruppe von Baris et al. In der Untersuchung des Mausmodells konnte die beobachtete mitochondriale Dysfunktion in COX_{neg} Kardiomyozyten durch die Akkumulation von mtDNA Deletionen erklärt werden¹⁵. Damit entspricht die beobachtete Entstehung eines Mosaiks von mtDNA deletierten Zellen innerhalb des gesunden Zellverbandes den Erkenntnissen vorausgegangener Studien^{106,111}. Bei den 18 Monate alten Mäusen wurde anschließend die Vulnerabilität für Herzrhythmusstörungen untersucht. Es wurde die Neigung zu spontanen ventrikulären Extrasystolen und das Auftreten von AV-Block-Bildern beobachtet. Dabei war die Menge der COX_{neg} Zellen in den Gebieten der Reizentstehung und -weiterleitung nicht signifikant höher und es lagen keine Veränderungen der grundlegenden elektrophysiologischen Signalübertragung vor. Dass die kardialen Symptome dennoch auf die Menge an COX_{neg} Zellen zurückzuführen waren, wurde im

Vergleich zu den 12 Monate alten Tieren klar. Bei ihnen war die Anzahl an deletierten Zellen nur ein Drittel so hoch und es fehlte in Ruhe gänzlich an kardialen rhythmologischen Veränderungen. Dieses Erkenntnis legt nahe, dass mtDNA Deletionen erst ab einem bestimmten Schwellenwert zu klinischen Veränderungen führen¹⁵.

Darüber hinaus ergab eine Untersuchung von Cottrell et al., 2001, dass es einen Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von COX_{neg} Neuronen und Alzheimer Demenz gibt. Im Vergleich zu den Erkrankten wurden in der altersentsprechenden Kontrollgruppe weniger der mtDNA deletierten Zellen gefunden¹¹⁹. Das wiederum lässt darauf schließen, dass nicht das Patient:innenalter allein für die Entstehung von mtDNA Deletionen verantwortlich sein könnte. Fraglich bleibt die Vergleichbarkeit von Neuronen mit Myokardzellen.

Der Einfluss des Alters auf das menschliche Herz wurde bereits unter vielen verschiedenen Gesichtspunkten untersucht. Dabei war das Ausmaß der beobachteten strukturellen und elektrischen Veränderungen jedoch oft nicht ausreichend, um die mit dem menschlichen Alterungsprozess einhergehende erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern zu erklären¹¹. Darauf basierend sollte in dieser Arbeit die Hypothese getestet werden, inwieweit es einen Zusammenhang zwischen der kardiologischen Anamnese, insbesondere bezogen auf die Vorhofflimmererkrankung, dem Patient:innenalter und dem Vorliegen von mtDNA defizienten Zellen gibt. Dabei konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Patient:innenalter und dem Auftreten von mtDNA Deletionen verzeichnet werden. Die Ergebnisse der Regressions- und Korrelationsanalysen sind kritisch zu betrachten, da es sich bei einer Anzahl von N = 16 Proband:innen um eine kleine Population handelt und ein signifikantes Ergebnis bei einer größeren Anzahl an Proben gegeben sein könnte. Eine größer angelegte Studie mit mehr Proband:innen soll Anregung für weitergehende Untersuchungen sein.

Um Gruppenvergleiche wie den t-Test und den Mann-Whitney-U-Test durchführen zu können, erfolgte die unter 4.4.1 beschriebene Einteilung des Kollektivs in „alt“ und „jung“. Hierbei wurden die Studienteilnehmer:innen anhand von Trennwerten in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Auswahl dieser Trennwerte orientierte sich am Durchschnittsalter des Kollektivs, da es keine klare Grenze gibt, ab der Patient:innen als „alt“ gelten und auch keine etablierte Einteilung aus anderen Studien übernommen werden konnte. Die Subgruppenvergleiche zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten der jungen und alten Kohorten. In der graphischen Darstellung der Verteilung in Abbildung 11 lässt sich eine tendenziell höhere Anzahl an COX_{neg} Zellen in der jeweils älteren Gruppe ablesen. Eine Aussage, die mangels statistischer Signifikanz mit Vorsicht zu betrachten ist. Hier wird außerdem die starke Abhängigkeit von einzelnen Individuen deutlich. Eine Probandin (p16) mit einem sehr hohen

Anteil an COX_{neg} Zellen von 1,97% war zum Zeitpunkt der Untersuchung 64 Jahre alt. Dieser Wert beeinflusste die Analysen stark. Der Mittelwert der jeweiligen Subgruppe, in der p16 eingeschlossen war, unterlag dem deutlichen Einfluss des hohen Prozentwertes dieser Patientin. Auch hier wäre die erneute Untersuchung eines größeren Kollektivs von Interesse.

5.3.2. Aussagekraft der geschlechterabhängigen Analysen

Wie unter 5.2 beschrieben, entspricht die Geschlechterverteilung mit 20% Probandinnen und 80% Probanden nicht den epidemiologischen Daten von Vorhofflimmererkrankten. Ob das Geschlecht der Vorhofflimmererkrankten einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So haben einige Risikofaktoren wie Diabetes mellitus oder arterielle Hypertonie einen geschlechterabhängig unterschiedlich hohen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen. Groß angelegte Studien ergaben, dass Männer eine höhere Morbidität und ein höheres Lebenszeitrisiko für die Entstehung von Vorhofflimmern haben¹²⁰. In einer Untersuchung des unterschiedlichen Ablationserfolgs der Vorhofflimmertherapie zwischen den Geschlechtern konnte festgestellt werden, dass bei weiblichen Patientinnen signifikant mehr Punkte außerhalb der Pulmonalveneneinmündungen ablatiert werden mussten¹²¹. Das könnte für eine elektrophysiologische Heterogenität der Vorhöfe zwischen den Geschlechtern sprechen. Inwieweit es geschlechterabhängige Unterschiede im elektrischen Remodeling der Vorhöfe gibt, ist bisher kaum erforscht¹²².

In Studien bezüglich des Auftretens mitochondrial defizienter Zellen spielte das Geschlecht der Untersuchten oft eine untergeordnete Rolle. In einer Untersuchung von Herbst et al., 2021 zum Auftreten von mtDNA Deletionen in Skelettmuskelbiopsien des Menschen wurde dieser Aspekt allerdings untersucht. Hier konnte eine tendenziell geringere Anzahl an mtDNA Deletionen bei weiblichen Probandinnen beobachtet werden. Weitere Analysen der Forschungsgruppe ergaben eine signifikant geringere Anzahl an mtDNA deletierter Zellen bei weiblichen Mäusen. Gleichzeitig verlief der altersabhängige Anstieg der Deletionen bei Frauen langsamer¹²³.

Bei der Auswertung der Daten unserer Studie wurde zunächst im Auftreten von COX_{neg} Zellen kein Unterschied zwischen den Geschlechtern erwartet. Dass sich hier in der linearen Regression und der Korrelationsanalyse ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,003$; $r = - 0,692$) zeigte, muss kritisch betrachtet werden. Bei einer Stichprobengröße von $N = 16$ sind die statistischen Untersuchungen fehleranfällig und stark durch einzelne Individuen beeinflusst.

Bei zwei weiblichen Probandinnen konnte die Anzahl der deletierten Zellen nicht erhoben werden, sodass sich die Subgruppe der weiblichen Patient:innen in der statistischen Analyse auf eine Größe von $N = 2$ beschränkte. Innerhalb des Kollektivs gab es eine weibliche Probandin (p16), mit einem sehr hohen Anteil an COX_{neg} Zellen von 1,97%. Das entspricht einer deutlichen Abweichung von 1,61% vom Mittelwert der Kohorte, der bei 0.36% liegt.

Dieser hohe Wert beeinflusst stark die statistischen Ergebnisse. Unser Ergebnis wie auch die oben beschriebenen Studien können einen Einfluss des Geschlechts auf die Entstehung von mtDNA Deletionen nicht ausschließen, weshalb der Zusammenhang in einer Studie mit größerer Proband:innenanzahl erneut zu betrachten ist.

5.3.3. Auswirkung der Schwere des Vorhofflimmerns

Vorhofflimmern ist eine progressive Erkrankung, die im zeitlichen Verlauf von kurzen, sich selbst limitierenden Episoden zum permanenten Auftreten fortschreiten kann^{11,84}. Die aktuelle Einteilung des Vorhofflimmerns in paroxysmal und persistierend basiert auf dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung und ist möglicherweise nicht repräsentativ für die zugrundeliegenden zellulären Prozesse³¹. Von besonderem Interesse war deshalb die Frage, ob mtDNA Deletionen bei Patient:innen mit paroxysmalem oder persistierendem Vorhofflimmern in unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen. Aufgrund des fortgeschritteneren Stadiums der Erkrankung, wäre ein höherer Anteil COX_{neg} Zellen bei Patient:innen mit persistierendem Vorhofflimmern zu erwarten. Der Mann-Whitney-U-Test ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Subgruppen mit paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern ($p = 0,0745$). Es kann entgegen der oben genannten Vermutung in Abbildung 12.B ein tendenziell höherer Mittelwert an % COX_{neg} Zellen im Kollektiv mit paroxysmalem Vorhofflimmern beobachtet werden. Da diese Subgruppe nur $N = 4$ Proband:innen umfasste, ist allerdings auch hier die Aussagekraft des statistischen Ergebnisses unsicher und nicht abschließend zu treffen.

Neben der Unterteilung nach der Art des Vorhofflimmerns wurden auch zwei Subgruppen mit unterschiedlich langer Erkrankungsdauer miteinander verglichen. Diese Einteilung beruht auf der Annahme, dass die Umbauprozesse und zellulären Veränderungen im Vorhof progredient sind und mit anhaltender Erkrankungsdauer zunehmen¹¹. Darum war von Interesse, ob hier ein Einfluss auf die Menge an mtDNA Deletionen vorliegt. Das Studienkollektiv wurde in eine Gruppe mit weniger als 5 Jahren seit Erstdiagnose und eine Gruppe mit 5 oder mehr Jahren seit Beginn der Erkrankung unterteilt. Im Mann-Whitney-U-Test konnte kein Unterschied im Mittelwert dieser beiden Subgruppen ermittelt werden ($p = 0,6909$). Auch ein direkter Einfluss der Erkrankungsdauer in Jahren auf die Anzahl der COX_{neg} Zellen ließ sich in der linearen Regression nicht aufzeigen ($p = 0,755$). Weitere im Studiendesign festgelegte Kenngrößen für die Schwere des Vorhofflimmerns waren die Rezidivfreiheit nach 3 Monaten und das LA-Volumen. Auch hier stellten sich in der linearen Regression keine signifikanten Zusammenhänge dar (Kapitel 4.4.3). Fraglich bleibt, inwieweit diese Kenngrößen ein sinnvolles Maß für die Charakterisierung der Vorhofflimmererkrankung sind.

Die Rezidivrate bei Patient:innen nach PVI zur Vorhofflimmertherapie variiert in der Literatur zwischen 60% und 90%¹²⁴. In unserer Untersuchung waren postinterventionell 95%

erwiesenermaßen rezidivfrei, nach 3 Monaten 80% und nach 12 Monaten 65%. Damit entsprachen unsere Beobachtungen denen vergleichbarer Studien. Die Hypothese, dass eine erhöhte Anzahl COX_{neg} Zellen proarrhythmogen wirkt und dadurch mit einer Rezidivneigung einhergeht, konnte in unserer Studie nicht belegt werden. Es ist gut untersucht, dass anhaltendes Vorhofflimmern zum strukturellen Remodeling des Herzens führt (Kapitel 2.2.5). Als ein wichtiger Faktor für die Entstehung arrhythmogener Erkrankungen konnte der fibrotische Umbau des Myokards mit steigendem Alter identifiziert werden^{67,125}. Das LA-Volumen dient in diesem Kontext als Maß für die Dilatation der Vorhöfe, die mit steigender Erkrankungsdauer beobachtet werden kann¹³. Die Bestimmung des LA Volumens erfolgt echokardiographisch und ist stark Untersucher:innen abhängig, was beim Vergleich in wissenschaftlichen Analysen beachtet werden sollte.

5.3.4. Zusammenhang zu Komorbiditäten

Vorhofflimmern geht mit verschiedensten Komorbiditäten einher, die das Auftreten und das Fortschreiten der Erkrankung beeinflussen (Kapitel 2.2.3). Auch in unserem Patient:innenkollektiv lagen verschiedene Vorerkrankungen vor, wie in Tabelle 2 dargestellt. In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass das Vorliegen von mtDNA Deletionen die Entstehung von Krankheiten beeinflusst^{119,126,127}. So ergab sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, inwieweit das Auftreten von mtDNA Deletionen und damit COX_{neg} Zellen neben dem Vorhofflimmern auch mit anderen Vorerkrankungen der Studienteilnehmer:innen korreliert. Bei Adipositas handelt es sich um einen nachgewiesenen Risikofaktor für die Entstehung von Vorhofflimmern¹²⁸. Hierbei diente der BMI als quantifizierbarer Marker für das Übergewicht der Patient:innen innerhalb der Studie. In der linearen Regressionsanalyse des Einflusses des BMIs auf die Anzahl der COX_{neg} Zellen ergab sich kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,244$; $r = -0,309$).

Als ein weiterer Faktor, der über strukturelles Remodeling der Vorhöfe zur Entstehung von Vorhofflimmern beiträgt, gilt die arterielle Hypertonie. Der genaue Pathomechanismus ist dabei noch nicht hinreichend erforscht, bei den Erkrankten mit arterieller Hypertonie konnten jedoch Myozytenhypertrophie und Myolysen verzeichnet werden¹²⁹. Eine konzentrische Myokardhypertrophie lag bei 65% der Patient:innen des untersuchten Studienkollektivs vor und war damit die häufigste Vorerkrankung. Bei der linearen Regression konnte allerdings auch hier kein signifikanter Zusammenhang zur deletierten mtDNA festgestellt werden ($p = 0,401$; $r = -0,225$).

5.4 Stärken und Limitationen der Arbeit

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive Studie mit klinischem und experimentellem Anteil. So wurden gezielt Patient:innen in die Studie eingeschlossen, die bereit waren sich für die Zeit des Follow-Ups weiteren Untersuchungen zu unterziehen. Für das Studiendesign spricht die sehr ausführliche kardiologische Anamnese und Untersuchung, die bei allen Patient:innen durchgeführt werden konnte, sowie die Vielzahl an anamnestischen und elektrophysiologischen Parametern. So umfasste die erstellte Datenbank vielfältige Parameter, die im Rahmen der klinischen Aufnahme erfasst werden konnten. Damit gelang die Verknüpfung von experimentellen Analysen an Patient:innengewebe bei gleichzeitig genauer klinischer Charakterisierung der Proband:innen. Die so gesammelten Daten konnten mit den Ergebnissen der enzymhistochemischen Analysen verglichen und auf Zusammenhänge überprüft werden. Stärken und Schwächen der einzelnen Schritte der Methodik werden in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

Die größte Limitation der vorliegenden Arbeit besteht in der geringen Größe des untersuchten Patient:innenkollektivs. Aufgrund der nicht gänzlich risikofreien Durchführung einer Myokardbiopsie war es nicht möglich, eine größere Studienkohorte zu bilden. Eine Patient:innenanzahl von $N = 20$ mit $N = 16$ verwendbaren Gewebeproben war besonders für die statistische Auswertung möglicherweise zu gering.

5.4.1. Güte der Proben

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Studie wurden Gewebeproben des Ventrikelmyokards von Vorhofflimmerpatient:innen verwendet. Die Proben wurden im Rahmen der Ablationstherapie mittels einer kathetergesteuerten Biopsie gewonnen und anschließend histologisch und enzymhistochemisch aufgearbeitet und untersucht. Für die Verarbeitung der Proben fand eine Kooperation zwischen der Klinik III für Innere Medizin und dem Institut für Physiologie der Universität zu Köln statt, um allen klinischen und labortechnischen Anforderungen gerecht zu werden. Die damit einhergehenden logistischen Hindernisse in Transport und Lagerung von Materialien und Proben wurden bestmöglich überwunden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Zeitverzögerung von der Entnahme bis zum Einfrieren der Probe die endgültige Qualität derer beeinflusste.

5.4.2. Biopsie-Verfahren

Die Myokardbiopsie ist ein etabliertes Verfahren zur differentialdiagnostischen Untersuchung kardialer Erkrankungen. Das Risiko für mögliche Komplikationen wie vasovagale Synkopen, Ventrikelperforationen, Perikardtamponaden oder Arrhythmien liegt bei 1,17%. Die Biopsie kommt besonders bei Untersuchungen nach Herztransplantationen zum Einsatz, um

Abstoßungsreaktionen und antikörpervermittelte Inflammationsprozesse auszuschließen. Darüber hinaus hat diese Methode auch im wissenschaftlichen Zusammenhang an Bedeutung gewonnen, vor allem wenn bildgebende Verfahren an ihre Grenzen geraten¹³⁰.

Die Gewebegewinnung mittels einer Myokardbiopsie war im Kontext der hier vorgestellten Untersuchung von zentraler Bedeutung. Da sie im Rahmen der vorgesehenen Ablationstherapie durchgeführt wurde, konnte die Biopsie mit nur minimal höherem Komplikationsrisiko und ohne die Notwendigkeit einer weiteren Strahlenbelastung erfolgen. Grundlage hierfür bildet der Einsatz von 3D-Mapping-Programmen, welche die anatomischen und elektrophysiologischen Gegebenheiten des Herzens aufzeichnen und so ohne zusätzliche Röntgenstrahlung die notwendige Orientierung für die Biopsieentnahme bieten⁸⁷.

Bei Vorhofflimmern handelt es sich um eine Erkrankung, die ihren Ursprung im linken Vorhof hat (Kapitel 2.2.4). Auf Grund der geringen Wanddicke des Vorhofmyokards und der damit verbundenen Perforationsgefahr war es nach klinischer Einschätzung nicht vertretbar, an dieser Stelle eine Biopsie zu entnehmen. Etablierter Ort für die Gewebeentnahme ist der rechte Ventrikel¹³⁰, die Durchführung der Biopsie gelang an dieser Stelle. In der vorliegenden Arbeit wurden das Myokardgewebe des Ventrikels stellvertretend für die Gesamtsituation des kardialen Muskels betrachtet und der Zusammenhang zu einer den Vorhof betreffenden Erkrankung untersucht. Fraglich ist, inwieweit die Veränderungen des Ventrikelmyokards repräsentativ für die Prozesse innerhalb der Vorhöfe sind. Diese Frage bildet die Grundlage für genauere Untersuchungen in weiteren Studien.

Ein weiterer Kritikpunkt des Verfahrens ist die fehlende Steuerbarkeit der Biopsiezange während des Entnahmeprozesses. Die Ergebnisse der histologischen Aufarbeitung ergaben, dass einige Proben einen höheren Anteil fibrotischen Gewebes oder Bindegewebsstränge enthielten. Diese Teile der Präparate waren für die Frage nach mtDNA defizienten Myokardzellen unbrauchbar, verfahrenstechnisch aber nicht zu vermeiden. Um eine bessere Kontrolle über die Qualität der Proben zu haben und das Zielgewebe gezielter auswählen zu können, würde sich die Verwendung reiner Operationspräparate anbieten. Bestenfalls wäre dabei auch die Untersuchung der Vorhöfe selbst möglich.

5.4.3. Färbemethode

Die COX/SDH-Enzymfärbung ist ein gut etabliertes Verfahren zur Visualisierung von Zellen mit mitochondrialer Funktionseinschränkung^{131,132}. Durch das spezifische Anfärben der Enzyme der Atmungskette, können Enzymdefekte einfach nachgewiesen und quantifiziert werden. In unseren Untersuchungen konnte diese Methode übernommen und komplikationslos durchgeführt werden. Da die Konzentration und Einwirkdauer der enzymatisch aktiven Färbemittel von Gewebeart und Schnittdicke abhängig sind, mussten zur genauen Anpassung des Laborprotokolls einige Probefärbungen an überschüssigen

Gewebeschnitten durchgeführt werden. Diese Proben sind nicht unter den Ergebnissen aufgeführt und nicht in die Auswertungen eingeflossen.

In vielen vergleichbaren Studien zur Untersuchung von mtDNA-Mutationen erfolgten die Analysen nicht nur visuell sondern auch mittels einer Polymerase Kettenreaktion (PCR)¹⁰⁷. Bei der PCR können auch kleinste Defekte verlässlich detektiert werden und beispielsweise Unterscheidungen zwischen Deletionen und Punktmutationen in der Schädigung der mtDNA gemacht werden¹⁴. So wäre es hinsichtlich Genauigkeit und Sicherheit der Ergebnisse bei Vorliegen größerer Gewebeproben sinnvoll, die enzymhistochemische Färbung um die PCR-Untersuchung zu ergänzen.

5.4.4. Auszählverfahren

Bei der Quantifizierung der Anzahl an Zellen mit mtDNA Deletionen wurde in unserer Untersuchung die gesamte Fläche der angeschnittenen Proben betrachtet. Üblich ist die Auswahl einer genormten Fläche pro Probe (mehrere 500µmx500µm Sichtfelder), um auch bei unterschiedlich großen Proben die ungefähr gleiche Zellanzahl zu betrachten¹⁵. Diese Vorgehensweise erwies sich in unserem Fall angesichts der geringen Größe der Probe als nicht zielführend. Bei ungleich großen Gewebeproben herrschte hier eine Heterogenität im Umfang der betrachteten Zellmasse. Da die COX_{neg} Zellen in Relation zur gesamten Zellanzahl gesetzt wurde, sollte zwischen den dokumentierten relativen Anteilen an deletierten Zellen der Proband:innen trotzdem eine Vergleichbarkeit gegeben sein.

5.5 Ausblick

Trotz vielfacher Untersuchungen und unterschiedlicher Erklärungsansätze ist der Pathomechanismus der Vorhofflimmerentstehung bisher größtenteils ungeklärt³¹. Die Erkrankung betrifft vor allem ältere Menschen, was bei zunehmendem Durchschnittsalter der Bevölkerung eine große medizinische Tragweite bedeutet.

Viele der durchgeführten Studien am Tiermodell ergaben signifikante und für den Mensch potenziell relevante Ergebnisse. Eine Reproduktion an humanem Material könnte weitreichende Folgen für Prävention und Therapie des Vorhofflimmerns haben, weshalb weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet von großem Interesse sind.

Die Erkenntnis, dass die Akkumulation von mtDNA Deletionen innerhalb des Alterungsprozesses am Mausmodell zu Herzrhythmusstörungen führte, bietet hierbei einen interessanten Ansatz. Nach Wiederholung dieser Untersuchung an humanem kardialen Gewebe im Rahmen unserer Studie konnten diese Ergebnisse allerdings nicht reproduziert werden. Es lässt sich dennoch die Aussage treffen, dass die Methodik für die Untersuchung

des menschlichen Herzens geeignet ist und bei einem größeren Studienkollektiv durchaus zu signifikanten Aussagen führen könnte.

Um spezifischer auf die Charakteristika atrialer Myozyten eingehen zu können, untersucht ein Anschlussprojekt aktuell den Anteil an deletierter mtDNA in operativ gewonnenen atrialen Biopsien aus dem linken Vorhof. Diese Ergebnisse könnten womöglich einen spezifischen Einblick in die atrialen Alterungsprozesse und den Zusammenhang mit dem Vorliegen von Vorhofflimmern geben und die vorgestellten Daten der vorliegenden Arbeit ergänzen.

Inwieweit die Erkenntnisse über den Zusammenhang von Patient:innenalter, Deletionen der mtDNA und Herzrhythmusstörungen die Basis für neue Therapieoptionen bieten, soll Frage weitergehender Studien sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2012; **33**(21): 2719-47.
2. Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006; **27**(8): 949-53.
3. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 2001; **285**(18): 2370-5.
4. Naccarelli GV, Varker H, Lin J, Schulman KL. Increasing prevalence of atrial fibrillation and flutter in the United States. *Am J Cardiol* 2009; **104**(11): 1534-9.
5. Dabrowski R, Smolis-Bak E, Kowalik I, Kazimierska B, Wojcicka M, Szwed H. Quality of life and depression in patients with different patterns of atrial fibrillation. *Kardiol Pol* 2010; **68**(10): 1133-9.
6. Freeman JV, Simon DN, Go AS, et al. Association Between Atrial Fibrillation Symptoms, Quality of Life, and Patient Outcomes: Results From the Outcomes Registry for Better Informed Treatment of Atrial Fibrillation (ORBIT-AF). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2015; **8**(4): 393-402.
7. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 2014; **129**(8): 837-47.
8. Andrade J, Khairy P, Dobrev D, Nattel S. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ Res* 2014; **114**(9): 1453-68.
9. Gehi AK, Sears S, Goli N, et al. Psychopathology and symptoms of atrial fibrillation: implications for therapy. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2012; **23**(5): 473-8.
10. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, 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): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J* 2021; **42**(5): 373-498.
11. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 2011; **91**(1): 265-325.
12. Krishnan A, Chilton E, Raman J, et al. Are Interactions between Epicardial Adipose Tissue, Cardiac Fibroblasts and Cardiac Myocytes Instrumental in Atrial Fibrosis and Atrial Fibrillation? *Cells* 2021; **10**(9).
13. Schotten U, Neuberger HR, Allesie MA. The role of atrial dilatation in the domestication of atrial fibrillation. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; **82**(1-3): 151-62.
14. Larsson NG. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem* 2010; **79**: 683-706.
15. Baris OR, Ederer S, Neuhaus JF, et al. Mosaic Deficiency in Mitochondrial Oxidative Metabolism Promotes Cardiac Arrhythmia during Aging. *Cell Metab* 2015; **21**(5): 667-77.
16. Lubitz SA, Benjamin EJ, Ruskin JN, Fuster V, Ellinor PT. Challenges in the classification of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol* 2010; **7**(8): 451-60.
17. Morin DP, Bernard ML, Madias C, Rogers PA, Thihalolipavan S, Estes NA, 3rd. The State of the Art: Atrial Fibrillation Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2016; **91**(12): 1778-810.
18. Chugh SS, Blackshear JL, Shen WK, Hammill SC, Gersh BJ. Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2001; **37**(2): 371-8.
19. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med* 1995; **155**(5): 469-73.

20. 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.
21. Vaidya K, Semsarian C, Chan KH. Atrial Fibrillation in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Heart Lung Circ* 2017; **26**(9): 975-82.
22. Stevenson IH, Teichtahl H, Cunnington D, Ciavarella S, Gordon I, Kalman JM. Prevalence of sleep disordered breathing in paroxysmal and persistent atrial fibrillation patients with normal left ventricular function. *Eur Heart J* 2008; **29**(13): 1662-9.
23. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol* 1998; **82**(8A): 2N-9N.
24. Wang TJ, Parise H, Levy D, et al. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* 2004; **292**(20): 2471-7.
25. Dzeshka MS, Shantsila A, Shantsila E, Lip GYH. Atrial Fibrillation and Hypertension. *Hypertension* 2017; **70**(5): 854-61.
26. Ball J, Carrington MJ, McMurray JJ, Stewart S. Atrial fibrillation: profile and burden of an evolving epidemic in the 21st century. *Int J Cardiol* 2013; **167**(5): 1807-24.
27. Ahmad Y, Lip GY, Lane DA. Recent developments in understanding epidemiology and risk determinants of atrial fibrillation as a cause of stroke. *Can J Cardiol* 2013; **29**(7 Suppl): S4-s13.
28. Boyle PM, Del Álamo JC, Akoum N. Fibrosis, atrial fibrillation and stroke: clinical updates and emerging mechanistic models. *Heart* 2021; **107**(2): 99-105.
29. Abe Y, Takahashi Y, Shibata T. Looking into the Mechanistic Link Between Mitral Regurgitation and Atrial Fibrillation. *Cardiol Clin* 2021; **39**(2): 281-8.
30. Ruddox V, Sandven I, Munkhaugen J, Skattebu J, Edvardsen T, Otterstad JE. Atrial fibrillation and the risk for myocardial infarction, all-cause mortality and heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol* 2017; **24**(14): 1555-66.
31. Lau DH, Linz D, Schotten U, Mahajan R, Sanders P, Kalman JM. Pathophysiology of Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation: Rotors, Foci and Fibrosis. *Heart Lung Circ* 2017; **26**(9): 887-93.
32. Moe GK, Abildskov JA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am Heart J* 1959; **58**(1): 59-70.
33. Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A Computer Model of Atrial Fibrillation. *Am Heart J* 1964; **67**: 200-20.
34. Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**(2): 204-16.
35. Haissaguerre M, Gaita F, Marcus FI, Clementy J. Radiofrequency catheter ablation of accessory pathways: a contemporary review. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994; **5**(6): 532-52.
36. Jaïs P, Haïssaguerre M, Shah DC, et al. A focal source of atrial fibrillation treated by discrete radiofrequency ablation. *Circulation* 1997; **95**(3): 572-6.
37. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998; **339**(10): 659-66.
38. Ho SY, Sanchez-Quintana D, Cabrera JA, Anderson RH. Anatomy of the left atrium: implications for radiofrequency ablation of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999; **10**(11): 1525-33.
39. Saito T, Waki K, Becker AE. Left atrial myocardial extension onto pulmonary veins in humans: anatomic observations relevant for atrial arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; **11**(8): 888-94.
40. Weiss C, Gocht A, Willems S, Hoffmann M, Risius T, Meinertz T. Impact of the distribution and structure of myocardium in the pulmonary veins for radiofrequency ablation of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2002; **25**(9): 1352-6.
41. Jones SA, Yamamoto M, Tellez JO, et al. Distinguishing properties of cells from the myocardial sleeves of the pulmonary veins: a comparison of normal and abnormal pacemakers. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008; **1**(1): 39-48.

42. Perez-Lugones A, McMahon JT, Ratliff NB, et al. Evidence of specialized conduction cells in human pulmonary veins of patients with atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; **14**(8): 803-9.
43. Arora R, Verheule S, Scott L, et al. Arrhythmogenic substrate of the pulmonary veins assessed by high-resolution optical mapping. *Circulation* 2003; **107**(13): 1816-21.
44. Chen YJ, Chen SA, Chang MS, Lin CI. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2000; **48**(2): 265-73.
45. Chen YJ, Chen SA, Chen YC, et al. Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **104**(23): 2849-54.
46. Hocini M, Ho SY, Kawara T, et al. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation* 2002; **105**(20): 2442-8.
47. Calkins H, Kuck KH, Cappato R, et al. 2012 HRS/EHRA/ECAS expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: recommendations for patient selection, procedural techniques, patient management and follow-up, definitions, endpoints, and research trial design. *J Interv Card Electrophysiol* 2012; **33**(2): 171-257.
48. Jalife J. Rotors and spiral waves in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; **14**(7): 776-80.
49. Nademanee K, Lockwood E, Oketani N, Gidney B. Catheter ablation of atrial fibrillation guided by complex fractionated atrial electrogram mapping of atrial fibrillation substrate. *J Cardiol* 2010; **55**(1): 1-12.
50. Nademanee K, McKenzie J, Kosar E, et al. A new approach for catheter ablation of atrial fibrillation: mapping of the electrophysiologic substrate. *J Am Coll Cardiol* 2004; **43**(11): 2044-53.
51. Coumel P. Paroxysmal atrial fibrillation: a disorder of autonomic tone? *Eur Heart J* 1994; **15 Suppl A**: 9-16.
52. Coumel P. Autonomic influences in atrial tachyarrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996; **7**(10): 999-1007.
53. Scherlag BJ, Yamanashi W, Patel U, Lazzara R, Jackman WM. Autonomically induced conversion of pulmonary vein focal firing into atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2005; **45**(11): 1878-86.
54. Patterson E, Lazzara R, Szabo B, et al. Sodium-calcium exchange initiated by the Ca²⁺ transient: an arrhythmia trigger within pulmonary veins. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**(6): 1196-206.
55. Patterson E, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation. *Heart Rhythm* 2005; **2**(6): 624-31.
56. Iwasaki YK, Nishida K, Kato T, Nattel S. Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management. *Circulation* 2011; **124**(20): 2264-74.
57. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995; **92**(7): 1954-68.
58. Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation* 1997; **96**(11): 4027-35.
59. Elvan A, Wylie K, Zipes DP. Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs. Electrophysiological remodeling. *Circulation* 1996; **94**(11): 2953-60.
60. Daoud EG, Bogun F, Goyal R, et al. Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation* 1996; **94**(7): 1600-6.
61. Attuel P, Childers R, Cauchemez B, Poveda J, Mugica J, Coumel P. Failure in the rate adaptation of the atrial refractory period: its relationship to vulnerability. *Int J Cardiol* 1982; **2**(2): 179-97.
62. Fareh S, Vilellaire C, Nattel S. Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation* 1998; **98**(20): 2202-9.
63. Nattel S. Atrial electrophysiological remodeling caused by rapid atrial activation: underlying mechanisms and clinical relevance to atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; **42**(2): 298-308.

64. Allesie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**(2): 230-46.
65. Sanfilippo AJ, Abascal VM, Sheehan M, et al. Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study. *Circulation* 1990; **82**(3): 792-7.
66. Habibi M, Lima JA, Khurram IM, et al. Association of left atrial function and left atrial enhancement in patients with atrial fibrillation: cardiac magnetic resonance study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2015; **8**(2): e002769.
67. De Jong AM, Maass AH, Oberdorf-Maass SU, Van Veldhuisen DJ, Van Gilst WH, Van Gelder IC. Mechanisms of atrial structural changes caused by stretch occurring before and during early atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2011; **89**(4): 754-65.
68. Hagedorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 1999; **99**(11): 1508-15.
69. Verheule S, van Batenburg CA, Coenjaerts FE, Kirchhoff S, Willecke K, Jongsma HJ. Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999; **10**(10): 1380-9.
70. Chaldoupi 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.
71. Ausma J, van der Velden HM, Lenders MH, et al. Reverse structural and gap-junctional remodeling after prolonged atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 2003; **107**(15): 2051-8.
72. European Heart Rhythm A, European Association for Cardio-Thoracic S, Camm AJ, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2010; **31**(19): 2369-429.
73. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2014; **383**(9921): 955-62.
74. Chao TF, Liu CJ, Lin YJ, et al. Oral Anticoagulation in Very Elderly Patients With Atrial Fibrillation: A Nationwide Cohort Study. *Circulation* 2018; **138**(1): 37-47.
75. Ingrassiotta Y, Crisafulli S, Pizzimenti V, et al. Pharmacokinetics of new oral anticoagulants: implications for use in routine care. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2018; **14**(10): 1057-69.
76. Connolly S, Pogue J, Hart R, et al. Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; **367**(9526): 1903-12.
77. Vamos M, Erath JW, Benz AP, Lopes RD, Hohnloser SH. Meta-Analysis of Effects of Digoxin on Survival in Patients with Atrial Fibrillation or Heart Failure: An Update. *Am J Cardiol* 2019; **123**(1): 69-74.
78. Kirchhof P, Camm AJ, Goette A, et al. Early Rhythm-Control Therapy in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med* 2020; **383**(14): 1305-16.
79. Pedersen OD, Bagger H, Keller N, Marchant B, Køber L, Torp-Pedersen C. Efficacy of dofetilide in the treatment of atrial fibrillation-flutter in patients with reduced left ventricular function: a Danish investigations of arrhythmia and mortality on dofetilide (diamond) substudy. *Circulation* 2001; **104**(3): 292-6.
80. Hakalahti A, Biancari F, Nielsen JC, Raatikainen MJ. Radiofrequency ablation vs. antiarrhythmic drug therapy as first line treatment of symptomatic atrial fibrillation: systematic review and meta-analysis. *Europace* 2015; **17**(3): 370-8.
81. Wazni OM, Marrouche NF, Martin DO, et al. Radiofrequency ablation vs antiarrhythmic drugs as first-line treatment of symptomatic atrial fibrillation: a randomized trial. *JAMA* 2005; **293**(21): 2634-40.
82. Blomström-Lundqvist C, Gizurarson S, Schwieler J, et al. Effect of Catheter Ablation vs Antiarrhythmic Medication on Quality of Life in Patients With Atrial Fibrillation: The CAPTAF Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019; **321**(11): 1059-68.

83. Packer DL, Mark DB, Robb RA, et al. Effect of Catheter Ablation vs Antiarrhythmic Drug Therapy on Mortality, Stroke, Bleeding, and Cardiac Arrest Among Patients With Atrial Fibrillation: The CABANA Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019; **321**(13): 1261-74.
84. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. [2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS]. *Kardiol Pol* 2016; **74**(12): 1359-469.
85. Kuck KH, Brugada J, Fürnkranz A, et al. Cryoballoon or Radiofrequency Ablation for Paroxysmal Atrial Fibrillation. *N Engl J Med* 2016; **374**(23): 2235-45.
86. Luik A, Radzewitz A, Kieser M, et al. Cryoballoon Versus Open Irrigated Radiofrequency Ablation in Patients With Paroxysmal Atrial Fibrillation: The Prospective, Randomized, Controlled, Noninferiority FreezeAF Study. *Circulation* 2015; **132**(14): 1311-9.
87. Lau DH, Linz D, Sanders P. New Findings in Atrial Fibrillation Mechanisms. *Card Electrophysiol Clin* 2019; **11**(4): 563-71.
88. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, et al. Electrophysiological end point for catheter ablation of atrial fibrillation initiated from multiple pulmonary venous foci. *Circulation* 2000; **101**(12): 1409-17.
89. Holmes DR, Jr., Monahan KH, Packer D. Pulmonary vein stenosis complicating ablation for atrial fibrillation: clinical spectrum and interventional considerations. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; **2**(4): 267-76.
90. Nilsson B, Chen X, Pehrson S, et al. Acute fatal pulmonary vein occlusion after catheter ablation of atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol* 2004; **11**(2): 127-30.
91. Gupta A, Perera T, Ganesan A, et al. Complications of catheter ablation of atrial fibrillation: a systematic review. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013; **6**(6): 1082-8.
92. Stavrakis S, Nakagawa H, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R, Jackman WM. The role of the autonomic ganglia in atrial fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol* 2015; **1**(1-2): 1-13.
93. Haïssaguerre M, Sanders P, Hocini M, et al. Catheter ablation of long-lasting persistent atrial fibrillation: critical structures for termination. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; **16**(11): 1125-37.
94. Naniwadekar A, Koruth J. Impact of Technique and Technology on Mitral Isthmus Ablation. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2019; **21**(9): 46.
95. Inoue K, Hikoso S, Masuda M, et al. Pulmonary vein isolation alone vs. more extensive ablation with defragmentation and linear ablation of persistent atrial fibrillation: the EARNEST-PVI trial. *Europace* 2021; **23**(4): 565-74.
96. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; **283**(5407): 1482-8.
97. Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012; **379**(9828): 1825-34.
98. von Kleist-Retzow JC, Hornig-Do HT, Schauen M, et al. Impaired mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels. *Exp Cell Res* 2007; **313**(14): 3076-89.
99. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; **39**: 359-407.
100. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005; **6**(5): 389-402.
101. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; **290**(5806): 457-65.
102. Capaldi RA. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 1990; **59**: 569-96.
103. Scheffler IE. Molecular genetics of succinate:quinone oxidoreductase in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; **60**: 267-315.
104. Trainor KJ, Wigmore DJ, Chrysostomou A, Dempsey JL, Seshadri R, Morley AA. Mutation frequency in human lymphocytes increases with age. *Mech Ageing Dev* 1984; **27**(1): 83-6.
105. Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 1999; **48**(4): 427-34.

106. 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**(11): 2434-41.
107. Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(16): 7370-4.
108. Parikh S, Goldstein A, Karaa A, et al. Patient care standards for primary mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genet Med* 2017; **19**(12).
109. Lok NS, Lau CP. Prevalence of palpitations, cardiac arrhythmias and their associated risk factors in ambulant elderly. *Int J Cardiol* 1996; **54**(3): 231-6.
110. Tresch DD, Thakur RK. Ventricular arrhythmias in the elderly. *Emerg Med Clin North Am* 1998; **16**(3): 627-48, ix.
111. Muller-Hocker J. Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart--an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. *Am J Pathol* 1989; **134**(5): 1167-73.
112. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res* 2014; **114**(9): 1483-99.
113. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **293**(3): H1883-91.
114. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull* 1992; **112**(1): 155-9.
115. Schnabel RB, Wilde S, Wild PS, Munzel T, Blankenberg S. Atrial fibrillation: its prevalence and risk factor profile in the German general population. *Dtsch Arztebl Int* 2012; **109**(16): 293-9.
116. Wilke T, Groth A, Mueller S, et al. Incidence and prevalence of atrial fibrillation: an analysis based on 8.3 million patients. *Europace* 2013; **15**(4): 486-93.
117. Lip GYH, Hee FLLS. Paroxysmal atrial fibrillation. *QJM: An International Journal of Medicine* 2001; **94**(12): 665-78.
118. Wijesurendra RS, Casadei B. Mechanisms of atrial fibrillation. *Heart* 2019; **105**(24): 1860-7.
119. Cottrell DA, Blakely EL, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM. Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD. *Neurology* 2001; **57**(2): 260-4.
120. Tian XT, Xu YJ, Yang YQ. Gender Differences in Arrhythmias: Focused on Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc Transl Res* 2020; **13**(1): 85-96.
121. Takigawa M, Kuwahara T, Takahashi A, et al. Differences in catheter ablation of paroxysmal atrial fibrillation between males and females. *Int J Cardiol* 2013; **168**(3): 1984-91.
122. Westerman S, Wenger N. Gender Differences in Atrial Fibrillation: A Review of Epidemiology, Management, and Outcomes. *Curr Cardiol Rev* 2019; **15**(2): 136-44.
123. Herbst A, Prior SJ, Lee CC, et al. Skeletal muscle mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion mutation frequency as predictors of physical performance in older men and women. *Geroscience* 2021; **43**(3): 1253-64.
124. Berruezo A, Tamborero D, Mont L, et al. Pre-procedural predictors of atrial fibrillation recurrence after circumferential pulmonary vein ablation. *Eur Heart J* 2007; **28**(7): 836-41.
125. Stein M, Noorman M, van Veen TA, et al. Dominant arrhythmia vulnerability of the right ventricle in senescent mice. *Heart Rhythm* 2008; **5**(3): 438-48.
126. Bates MG, Bourke JP, Giordano C, d'Amati G, Turnbull DM, Taylor RW. Cardiac involvement in mitochondrial DNA disease: clinical spectrum, diagnosis, and management. *Eur Heart J* 2012; **33**(24): 3023-33.
127. Fratter C, Gorman GS, Stewart JD, et al. The clinical, histochemical, and molecular spectrum of PEO1 (Twinkle)-linked adPEO. *Neurology* 2010; **74**(20): 1619-26.
128. Magnussen C, Niiranen TJ, Ojeda FM, et al. Sex Differences and Similarities in Atrial Fibrillation Epidemiology, Risk Factors, and Mortality in Community Cohorts: Results From the BiomarcARE Consortium (Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment in Europe). *Circulation* 2017; **136**(17): 1588-97.

129. Kistler PM, Sanders P, Dodic M, et al. Atrial electrical and structural abnormalities in an ovine model of chronic blood pressure elevation after prenatal corticosteroid exposure: implications for development of atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2006; **27**(24): 3045-56.
130. Francis R, Lewis C. Myocardial biopsy: techniques and indications. *Heart* 2018; **104**(11): 950-8.
131. Ross JM. Visualization of mitochondrial respiratory function using cytochrome c oxidase/succinate dehydrogenase (COX/SDH) double-labeling histochemistry. *J Vis Exp* 2011; (57): e3266.
132. Cottrell DA, Blakely EL, Johnson MA, Ince PG, Borthwick GM, Turnbull DM. Cytochrome c oxidase deficient cells accumulate in the hippocampus and choroid plexus with age. *Neurobiol Aging* 2001; **22**(2): 265-72.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung fokaler Trigger im Vorhof.....	14
Abbildung 2: Entstehung des Gewebsmosaiks	22
Abbildung 3: Übersicht über das Patient:innkollektiv	25
Abbildung 4: Geschlechterverteilung und Art des Vorhofflimmerns (VHF).....	31
Abbildung 5: Altersverteilung des Patient:innenkollektivs	31
Abbildung 6: präinterventioneller Rhythmus	33
Abbildung 7: Art der Vorablationen	35
Abbildung 8: Herzfrequenz in der Nachbeobachtung.....	36
Abbildung 9: COX/SDH-Färbung des Myokardgewebes	37
Abbildung 10: Regressionsgerade Alter – COXneg Zellen	39
Abbildung 11: Subgruppenanalyse nach Alter	39
Abbildung 12: Subgruppenanalyse nach Erkrankungsdauer (A) und Art des VHF (B)	41

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Baseline-Charakteristika	32
Tabelle 2: Übersicht über die Vorerkrankungen	33
Tabelle 3: Vorangegangene Therapiemaßnahmen.....	34
Tabelle 4: Rohdaten der Auszählung COXneg Zellen	38
Tabelle 5: Regressions- und Korrelationsanalyse Alter	38
Tabelle 6: Regressions- und Korrelationsanalyse Geschlecht.....	40