

Veikko Lahtinen

MAKROFAGIT JA ETEISVÄRINÄ

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Syyslukukausi 2020

Veikko Lahtinen

MAKROFAGIT JA ETEISVÄRINÄ

Kliininen Laitos

Syyslukukausi 2020

Vastuhenkilö: Tuomas Kiviniemi

*Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä*

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

LAHTINEN, VEIKKO:

MAKROFAGIT JA ETEISVÄRINÄ

-

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kardiologia

Heinäkuu 2020

## Sisällysluettelo

1. Johdanto	S.1
2. Kirjallisuuskatsaus	S.1
2.1 Eteisvärinä	S.1
2.1.1 Eteisvärinän merkitys	S.1
2.1.2 Altistavat tekijät	S.2
2.1.3 Eteisvärinän luokittelu	S.2-3
2.2 Eteisvärinän patofysiologia	S.3
2.2.1 Ektooppinen ammunta	S.3-4
2.2.2 Kiertoaktivaatiot	S.5
2.2.3 Eteisten uudelleen muovautuminen	S.5-6
2.2.3.1 Eteisten sähköinen muovautuminen	S.6
2.2.3.1.1 Muutokset ionivirroissa	S.6-7
2.2.3.1.2 Muutokset soluliitoksissa	S.7-8
2.2.3.2 Eteisten rakenteellinen muovautuminen	S.8
2.2.3.2.1 Autonomisen hermoston muutokset	S.9
2.3 Makrofagit	S.9
2.3.1 M1-makrofagit	S.10
2.3.2 M2-makrofagit	S.10-11
2.4 Makrofagit ja eteisvärinä	S.11
3. Tavoitteet	S.11
4. Aineisto ja menetelmät	S.12
4.1 Tutkimuspopulaatioiden kriteerit ja koot	S.12
4.2 Tutkimusluvut, rekisteröinti ja potilassuostumus	S.12
4.3 Immunohistokemialliset värjäykset	S.12-15
4.4 Värjäysten analysointi	S.15-16
4.5 Statistinen analysointi	S.16

5. Tulokset	S.17
5.1 M1-makrofagit	S.17-19
5.2 M2-makrofagit	S.19-21
6. Pohdinta	S.21-22
7. Lähteet	S.23-27

## 1. Johdanto

## 2. Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Eteisvärinä

Supraventrikulaarisiin rytmihäiriöihin kuuluva eteisvärinä on yleisin sydämen pitkäkestoinen rytmihäiriö, yli 40 vuotiaista noin neljännes (26% miehistä ja 23% naisista) kokee eteisvärinän elämänsä aikana<sup>1</sup>. Eteisvärinän prevalenssin epäillään lisääntyvän, erityisesti väestön ikääntymisestä johtuen<sup>2</sup>.

#### 2.1.1 Eteisvärinän merkitys

Eteisvärinä on yhteiskunnallisesti merkittävä aiheuttaen yli kolmanneksen rytmihäiriöihin liittyvistä sairaalahoitajaksoista, sekä kuormittaen avoterveydenhuoltoa<sup>3</sup>. Eteisvärinä on yhdistetty 1.5-1.9 kertaiseen sydänperäisen kuoleman riskiin verrattuna sinusrytmisissä oleviin ihmisiin<sup>4</sup>. Epäselvää on, johtuuko kuolleisuuden lisääntyminen eteisvärinästä itsestään, vai taustalla usein olevasta muusta kardiovaskulaarisesta sairaudesta. Itsenäisen eteisvärinän esiintyvyyden on tutkittu olevan 30% kaikista eteisvärinätapauksista<sup>5</sup>. Merkittävimpiin komplikaatioihin lukeutuvat tromboemboliset tapahtumat, kuten aivohalvaus, lisäksi eteisvärinä voi aiheuttaa sydämen vajaatoimintaa ja huonontaa elämänlaatua<sup>3</sup>. Eteisvärinäpotilaan elämänlaatu on huonompi kuin sydäninfarktin sairastaneilla ja pallolaajennukseen tulevilla, ollen samaa tasoa kuin sydämen vajaatoimintapotilailla<sup>6</sup>. Ilmeisesti naisten elämänlaatu huononee enemmän kuin miehillä<sup>7</sup>. Sairastuvuus on miehillä suurempaa kuin naisilla<sup>8</sup>.

### 2.1.2 Altistavat tekijät

Eteisvärinän taustalta on usein löydettävissä systeemisairaus tai vaihtoehtoisesti rakenteellinen sydänsairaus. Yleisimpiin kardiovaskulaarisiin altisteisiin kuuluvat hypertensio, sepelvaltimotauti, sydämen läppäviat ja sydämen systolinen vajaatoiminta<sup>3,8</sup>. Ei-sydänperäisiä altisteita on laaja kirjo, muun muassa lihavuus, tupakointi, alkoholin käyttö, diabetes, hypertyreoosi, krooniset keuhkosairaudet kuten COPD, uniapnea ja muut supraventrikulaariset takykardiat kroonistuessaan<sup>3,8</sup>. Pitkään jatkuva kuormittava kestävyysurheilu lisää eteisvärinän riskiä, liikunnalla on kuitenkin sydän- ja verenkiertoelimistön kannalta monia suotuisia vaikutuksia, joten liikunnan lopettamista eteisvärinän ehkäisyssä ei tule suositella<sup>3,9,10</sup>. Alkoholi voi peri- ja myokardiitin, keuhkoembolian, leikkauksen ja akuutin sydäninfarktin tavoin aiheuttaa ohimenevän eteisvärinän, joka usein kääntyy sinusrytmiin aiheuttavan tekijän hoidon myötä<sup>3,8</sup>.

### 2.1.3 Eteisvärinän luokittelu

Eteisvärinä voidaan keston perusteella luokitella neljään päätyyppiin (taulukko 1). Erityisen tärkeä on jako akuuttiin (alle 48 tuntia) ja krooniseen eteisvärinään rytminsiirron suunnittelun kannalta.

Paroksysmaalinen (kohtauksellinen)	Sinusrytmi palautuu itsestään alle 7 vuorokauden kuluessa, tai se palautetaan sähköisesti tai lääkkeellisesti 48 tunnin kuluessa
Jatkuva	Sinusrytmi ei palaudu itsestään 7 vuorokaudessa, tai se palautetaan sähköisesti tai lääkkeellisesti yli 48 tunnin kuluessa
Pitkään jatkunut	Eteisvärinä kestänyt yli vuoden ja potilas ohjataan invasiiviseen hoitoon
Pysyvä (krooninen)	Eteisvärinä hyväksytään vallitsevana rytminä, sillä rytminsiirto ei onnistu tai sitä ei pidetä aiheellisena

Taulukko 1. Eteisvärinän luokittelu ajallisesti<sup>3</sup>.

## 2.2 Eteisvärinän patofysiologia

Eteisvärinässä sydämen normaali sähköinen toiminta häiriintyy. Normaalia sinusrytmissä olevaa sydäntä tahdistaa sinussolmuke, joka johtaa sähköisen aktipotentialin eteisten kolmea johtorataa pitkin eteiskammiosolmukkeeseen. Aktipotentialin kulkiessa sydämen eteisten myokardiumin lihassäikeet supistuvat, johtaen sydämen eteisten supistukseen.

### 2.2.1 Ektooppinen ammunta

Eteisvärinässä sydämessä syntyy kiertoaktivaatioita, johtuen yleisimmin keuhkolaskimoiden tyvialueelta alkunsa saavista toistuvista lisälyönneistä (pesäkealkuinen eteisvärinä)<sup>3,11</sup>, jotka johtavat nopeaan eteisvasteeseen, jopa



350-400 lyöntiä minuutissa. Eteiset eivät tällöin supistu, vaan pikemminkin värähtelevät.

Ektooppinen ammunta voi olla seurausta aikaisesta jälkidepolarisaatiosta (EAD), joka johtuu aktiopotentialajan pitenemisestä; tämä altistaa eteisvärinälle pitkä-QT-aika syndroomassa. Kuitenkin myös lyhentynyt AP aika voi altistaa eteisvärinälle. Ektooppinen ammunta voi johtua myös myöhäisestä jälkidepolarisaatiosta (DAD), jossa ryanodiini reseptorit (RyRs) ovat viallisia sarkoplamisessa retinokulumissa, tai sarkoplasminen retinakulum on liian  $\text{Ca}^{2+}$  täytteenen, jonka ajatellaan voivan johtua liian nopeasta eteisvasteesta<sup>12</sup>. Tällöin  $\text{Ca}^{2+}$  ioneja pääsee virtaamaan SR:stä intrasellulaaritilaan epänormaalisti diastoleissa luoden soluun suuntautuvan lti virran, DAD:ia edesauttavasti. Esimerkiksi kongestiivisessa sydämen vajaatoiminnassa eteisvärinän riski kasvaa DAD:in kautta.

Osa kiertoaktivaatioista läpäisee eteis-kammio-solmukkeen, johtaen usein kohonneeseen ja epäsäännölliseen kammiovasteeseen. Jos kammiovaste on kroonisesti liian nopea, seurauksena voi olla sydämen vajaatoiminta (takykardiomyopatia)<sup>13,14</sup>. Eteisvärinä johtaa sydämen eteisten ja kammioiden yhteistoiminnan heikkenemiseen ja pumppaustehon laskuun, keskimäärin sydämen minuuttitulavuus pienenee 15-30%<sup>15</sup>. Pumppaustehon laskun taustalla on myös eteisten vajavainen supistuminen. Eteisten supistumattomuus altistaa veren seisomiselle, josta voi seurata hyytymän muodostuminen. Tällainen hyytymä voi aiheuttaa embolisaation esimerkiksi aivoihin, josta voi seurata aivohalvaus<sup>14</sup>. Kliinisesti merkityksellistä pumppaustehon lasku on erityisesti sydämen vajaatoiminnan yhteydessä.

## 2.2.2 Kiertoaktivaatiot

Eteisvärinän syntyyn vaikuttavat usein keuhkolaskimoiden tyvialueella (pesäkealkuinen eteisvärinä) syntyvät eksitatoriset impulssit. Eteisvärinän jatkuvuuden kannalta tärkeää on kiertoaktivaatioiden syntyminen ja niiden paluu (re-entry)<sup>3,11</sup>.

Pyörreaktivaatioiden synnystä ja luonteesta on esitetty erilaisia teorioita, esimerkiksi johtavan aallon teoria ja useiden aaltojen hypoteesi. Nykyisten tietokonemallinnusten perusteella nämä mallit eivät yhdessäkään kuvaa tarpeeksi hyvin eteisvärinää; hypoteesiksi on esitetty, että funktionaaliset kiertoaktivaatiot ovat ympyrän sijaan spiraalin mallisia<sup>16</sup>. Spiraalin mallinen aaltorintama voi pyöriä funktionaalisen esteen ympärillä. Tällainen este on kykenemätön eksitoitumaan jatkuvan eksitaation vuoksi. Vastaavasti fibrotisoitunut arpi eteisessä voi luoda anatomisen esteen, jonka ympärille kiertoaktivaation on mahdollista kehittyä. Funktionaalisessa esteessä kiertoaktivaatio valitsee kudoksessa mahdollisimman pienen piirin; spiraalin pituus voidaan laskea kudoksen johtavuuden ja refraktoriajan (aallonpituuden) avulla<sup>17</sup>. Tällaisia spiraalin mallisia kiertoaktivaatioita voi olla eteisissä yksi tai useita riippuen eteisen koosta – eteisen koon kasvu altistaa eteisvärinälle<sup>16</sup>. Kun eteisvärinä kroonistuu ja eteisissä tapahtuu eteisvärinää stabiloivaa uudelleenmuovautumista, voi ektooppisen ammunnan merkitys eteisvärinälle vähentyä.

## 2.2.3 Eteisten uudelleen muovautuminen

Eteisten uudelleen muovautumiseen – mekanismi, joka altistaa pesäkealkuisille lisälyönneille ja kiertoaktivaatioille sekä niiden paluulle kuuluu useita tekijöitä:

eteisten rakenteelliset muutokset, eteisten sähköiset muutokset, autonomisen hermoston toiminnan muutokset, kalsiumionien käsittelyn muutokset, oksidatiivinen stressi ja muutokset mikroRNAiden ekspressiossa. Nämä muutokset edesauttavat eteisvärinää stabiloimalla pyörreaktivaatioita – ja toisaalta eteisvärinä saa aikaan niiden etenemistä. Eteisten uudelleen muovautuminen aiheuttaa sydänkudoksen muuttumista eteisvärinälle alttiiksi ”substraatiksi”: kudokseksi, jossa on eteisvärinälle suotuisat elektrofysikaaliset johtumisominaisuudet. On epäselvää, aiheuttaako eteisten uudelleen muovautuminen suoraan eteisvärinän, vai onko muovautumisen syynä sama tekijä, joka altistaa myös eteisvärinälle.

### 2.2.3.1 Eteisten sähköinen muovautuminen

#### 2.2.3.1.1 Muutokset ionivirroissa

Eteisvärinässä eteisten ionikanavien ekspressio ja toiminta muuttuu eteisvärinää edesauttavalla tavalla. Yleisimpiin muutoksiin kuuluu L-tyypin  $\text{Ca}^{2+}$  kanavien (Lcal) väheneminen, jolloin kalsiumionivirta solun sisään vähenee. Lcal-kanavien downregulaation uskotaan olevan homeostaattinen puolustusmekanismi nopean eteisvasteen aikaansaamalle kalsiumionien kertymiselle<sup>12,18,19</sup>. Lcal-kanavat aukeavat depolarisaatiossa  $\text{Na}^{+}$ -kanavien aukeamisen jälkeen, ja hitaudestaan johtuen ne stabiloivat jännitteen depolarisaation lopussa saaden aikaan plateaun. Sisäänvirtaava  $\text{Ca}^{2+}$  virta ei saa sydänlihassolua itse kontraktoitumaan; sen sijaan se avaa SR:ssä olevat RYR-kanavat vapauttaen paljon kalsiumioneja intrasellulaaritilaan. Lcal-kanavien vähentyminen johtaa vähenevään intrasellulaariseen  $\text{Ca}^{2+}$  virtaan, plateaun ja AP:n lyhenemiseen

kokonaisuudessaan, sekä edelleen eteisvärinän todennäköisyyden kasvuun; lyhyempi AP mahdollistaa aallonpituudelta lyhyemmän kiertoaktivaation<sup>12</sup>.

Kaliumkanavissa tapahtuu useita muutoksia eteisvärinän kroonistuessa. Ohimenevä kaliumin ulosvirtaus Ito faasi 1:ssä vähenee jopa 50-60%<sup>18-20</sup>, jolla voi olla kliinistä merkitystä AP:n pituuden muutoksien kautta<sup>21</sup>. Sisäsuuntaisen kaliumkanavan agonistiriippuvaisen version IKACH:in on useissa tutkimuksissa todettu aliekspressoituvan kroonisessa eteisvärinässä. Sen sijaan konstitutiivinen muoto IKACHc sekä sisäsuuntaisen Ik1 kaliumvirta yliekspressoituvat, lisäten eteisvärinän todennäköisyyttä eteistakykardian, Ca<sup>2+</sup> ylitäytön ja AP-ajan lyhentymisen kautta<sup>22-24</sup>. Ik1 ja IKACH ovat merkityksellisiä loppurepolarisaatiossa. IKACH:in ekspressoitumisen alassäätely voi olla AP:n pidentymisen kautta eteisvärinältä suojaava mekanismi. Sydämen M2 muskariinireseptorien stimulaatiolla on todettu olevan IKACH virtausta vahvistava vaikutus, joka altistaa eteisvärinälle<sup>25</sup>.

#### 2.2.3.1.2 Muutokset soluliitoksissa

Soluliitosten ionikanavat huolehtivat sydämessä sydänlihassolujen sähköisestä parinmuodostuksesta. Pääasialliset soluliitosten alayksiköt eteisissä ovat konneksiini 40 ja konneksiini 43, jälkimmäistä esiintyy koko sydänkudoksessa. Konneksiini 40 ekspressoituu myös sinus- ja eteiskammisolmukkeessa, Purkinjen säikeissä ja endoteelisoluissa<sup>26</sup>.

Normaalissa sydänkudoksessa impulssi kulkee nopeammin longitudinaalisessa suunnassa kuin transversaalisisessa suunnassa, jossa sen täytyy ylittää enemmän solurajoja. Kroonisessa eteisvärinässä CX40 ja CX43 ekspressio lateralisoituu johtaen nopeutuvaan impulssinjohtumiseen transversaalisuunnassa sydämessä<sup>27</sup>. Ilmeisesti ainakin CX40:n lateralisaatiota

voidaan estää metoprololihoidolla<sup>27</sup>. Kroonista eteisvärinää sairastavilla potilailla sekä kohonneita että alentuneita CX40:n ekspressioita on raportoitu<sup>28,29</sup>.

Mahdollisesti muutokset konneksiineissa ja huono solujen sähköinen pariutuminen vaikuttavat paikallisiin johtumisen häiriöihin ja edelleen kiertoaktivaatioiden paluuseen muokkaamalla eteisten substraattia.

#### 2.2.3.2. Eteisten rakenteellinen muovautuminen

Eteisten rakenteellinen muovautuminen on etenevä prosessi, jonka karakteristisia piirteitä ovat eteisten (etenkin vasemman) laajeneminen ja kudoksen fibrotisoituminen. Vaikuttaisi, että eteisten rakenteellisen muovautumisen ja eteisvärinän välillä on suhde, mutta tämän kausaalisuuden selvitys vaatii lisää tutkimusta.

Eteisten laajentuminen mahdollistaa entistä suurempia ja useampia kiertoaktivaatiota eteisten kudospinta-alan laajentumisen myötä<sup>30</sup>. Vasemman eteisen laajuus on yhteydessä eteisvärinän etenemiseen ja sen pysyvyyteen<sup>31</sup>.

Eteisten fibrotisoitumisessa kollageenin määrä eteisissä kasvaa. Interstitiaalinen fibrotisoituminen on tavallinen löydös eteisvärinäpotilailla<sup>32</sup>, sekä itsenäistä eteisvärinää sairastavilla potilailla<sup>33</sup>. Koirilla eteiskudoksen fibrotisoituminen saa aikaan kudoksen johtavuuden heterogeenisyyttä luoden substraattia eteisvärinälle<sup>34</sup>; esimerkiksi vuohilla tässä kroonisen eteisvärinän mallissa taas fibrotisoitumista ei havaittu<sup>35</sup>. Interstitiaalisen fibrotisoitumisen synty on monimutkainen prosessi, johon kuuluu monia profibroottisia tekijöitä kuten angiotensiini II ja TGF-B1<sup>36</sup>. Monet profibroottiset tekijät voivat olla potentiaalisia lääkehoidon kohteita.

### 2.2.3.2.1 Autonomisen hermoston muutokset

Autonominen hermosto hermottaa ja vaikuttaa vahvasti sydämen toimintaan sopeuttaen verenkiertoa ulkoisiin ja sisäisiin ärsykkeisiin. Autonominen hermoston toiminnalla voi olla kuitenkin arytmogeenistä vaikutusta, jota tukee havainnot paroksysmaalisen eteisvärinän sirkadiaanisesta esiintymisestä<sup>37</sup>, sekä sydämen sympaattisen hermoston vaikutusten estämisestä seuraava antiarytmisen vaikutus<sup>38</sup>. Parasympaattisen hermoston aktivaatiolla vaikuttaa olevan supraventrikulaarisia rytmihäiriöitä estävä vaikutus<sup>39</sup>.

Eteisvärinässä autonominen hermosto muovautuu sympaattista hermotusta eteisissä lisäävällä tavalla. Koirilla on todettu eteisvärinässä lisääntynyt eteisen sympaattinen hermotus<sup>40</sup>. Kroonista eteisvärinää sairastavilla potilailla on havaittu eteisen sympaattisen hermotuksen lisääntyminen samalla kun muu hermotus säilyi muuttumattomana<sup>41</sup>.

## 2. Makrofagit

Makrofagit ovat elimistön immuunipuolustuksen soluja, joita esiintyy lähes kaikissa kudoksissa (kudosmakrofagit) ja lisäksi verenkierrassa hematopoieettisista kantasoluista erilaistuneina monosyytteinä. Makrofagit voidaan tehtäviensä ja aktivaationsa mukaan jakaa kahteen pääpopulaatioon: M1 ja M2 makrofageiksi<sup>42</sup>. Viimeaikaisissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että makrofageja on todellisuudessa useita alaluokkia M1 ja M2 pääluokkien välissä<sup>42</sup>. Jo erilaistuneet makrofagit kykenevät mikroympäristön muuttuessa vaihtamaan fenotyyppiä eli polarisoitumaan proinflammatoriseen M1 tai anti-inflammatoriseen M2 suuntaan<sup>43</sup>.

### 2.3.1 M1-makrofagit

Klassisesti aktivoituvat M1 makrofagit ovat proinflammatorisia. Niillä on bakterisidisiä, antiviraalisia ja antitumoraalisia vaikutuksia. *In vivo* niitä aktivoiviin sytokiineihin kuuluvat T-auttajasoluista ja NK-soluista erittyvä IFN-gamma, sekä antigeenia esittelevien solujen erittämä TNF. Yleensä näitä molempia vaaditaan M1 makrofagien aktivaatioon. *In vitro* M1-makrofagit voidaan aktivoida TLR-ligandeilla, kuten bakteerien lipopolysakkarideilla (LPS) ja lipoteikohapolla (LTA). Näitä esiintyy mm. grampositiivisissa ja gramnegatiivisissa bakteereissa<sup>44,45</sup>.

Makrofagit polarisoituvat M1-makrofageiksi etenkin akuutissa tulehduksessa. M1-makrofagit fagosytoivat tuottaen typpioksidia (NO). Ne fagosytoivat patogeenejä, kuten intra- ja ekstrasellulaarisia bakteereja<sup>44</sup>. M1-makrofagit vapauttavat proinflammatorisia sytokiineja, kuten IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 ja TNF-alfaa, sekä myös anti-inflammatorista IL-27 sytokiinia<sup>44</sup>. M1-makrofagien dysregulaatiolla voi olla vaikutusta autoimmuunisairauksien patofysiologiassa<sup>44</sup>.

### 2.3.2. M2-makrofagit

Anti-inflammatoriset M2-makrofagit aktivoituvat vaihtoehtoista reittiä; esimerkiksi basofiilien ja syöttösolujen erittämä IL-4 lisää M2 makrofagien aktivaatiota kudosisäilytyksen yhteydessä<sup>44</sup>. Th2-auttajasolut puolestaan aktivoivat M2-makrofageja IL-13 avulla limakalvovaurioissa ja parasiittien yhteydessä.

M2-makrofageilla on monia tehtäviä. Ne edesauttavat haavojen paranemista, fibroblastien ja myofibroblastien proliferaation lisääntymistä ja proinflammatoristen sytokiinien tuoton inhibitiota<sup>44,46</sup>. M2-makrofageilla voi olla

vaikutusta interstitiaaliseen fibrotisoitumiseen ja moniin sairauksiin, kuten allergiseen astmaan<sup>44,47</sup>.

### 2.3 Makrofagit ja eteisvärinä

Eteisvärinästä kärsivillä potilailla on todettu olevan makrofagilisää eteisissä<sup>48</sup>. Eteisvärinällä ja tulehduksella vaikuttaisi olevan yhteys; monien proinflammatoristen makrofagien erittämien sytokiinien, kuten TNF-alfan ja IL-6:n, on todettu liittyvän eteisvärinään<sup>48,49</sup>. Tässä tutkimuksessa eteisvärinäpotilaiden makrofagilisän havaittiin olevan proinflammatorista<sup>48</sup>. Makrofageilla voi siis olla yhteys eteisvärinän syntyyn ja sen stabiiliuteen eteisten uudelleenmuovautumisen kautta.

### 3. Tavoitteet

Makrofagien esiintymistä eteisvärinässä ihmisillä ei ole tutkittu paljoa. Halusimme tutkimuksellamme saada selkoa, onko eteisvärinä- ja eteiskardiomyopatiapotilailla enemmän makrofagi-infiltraattia sydämen eteiskorvakkeissa kuin sinusrytmissä olevilla verrokeilla. Luokittelimme immunohistokemiallisesti makrofagit M1 ja M2 luokkiin niissä esiintyvien pintaantigeenien perusteella.



## 4. Aineisto ja menetelmät

### 4.1 Tutkimuspopulaatioiden kriteerit ja koot

Tutkimuksessa käytettiin CAREBANK:in potilasaineistoa, johon on rekrytoitu TYKS:ssä sydänleikattuja potilaita ja näiltä saatuja oikean sydänkorvakkeen (RAA) paloja. Potilaat on luokiteltu leikkausta edeltäneen rytmin perusteella sinusrytmiaineistoon (N=20), eteisvärinäaineistoon (N=14), uudesta eteisvärinästä kärsineiden potilaiden aineistoon (N=11) ja eteiskardiomyopatia-aineistoon (N=18) 12-kytkentäisen EKG:n ja potilaan diagnoosien perusteella. Eteiskardiomyopatiapotilaat jaettiin edelleen sinusrytmiläisiin (N=11) ja uudesta eteisvärinästä kärsineisiin (N=6). Luokittelun jälkeen jokaisen potilaan tietoja käsiteltiin erikseen. Kaikki uudesta eteisvärinästä kärsineet potilaat kuuluivat sattumalta samalla kardiomyopatia-aineistoon.

### 4.2 Tutkimusluvut, rekisteröinti ja potilassuostumus

Jokaiselta potilaalta edellytettiin kirjallinen suostumus ja heitä informoitiin tutkimuksesta sekä heidän tietojensa käsittelystä kirjallisesti. Tutkimus noudattaa Helsingin julistusta lääketieteellisen etiikan suhteen. Tutkimusprotokollan hyväksyi Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin eettinen toimikunta sekä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen eettinen toimikunta.

### 4.3 Immunohistokemialliset värjäykset

Tutkimuksessa käytettiin jäädytettyjä kudospaloja potilaiden oikeista eteiskorvakkeista (RAA). Ensin eteiskorvakkeista leikattiin 6 mikrometrin

paksuisia näytteitä kryostaatilla, jotka implantoitiin peitinlaseille. Tämän jälkeen suoritettiin immunohistokemialliset värjäykset niin, että sekä M1 että M2 makrofagit paljastavat värjäykset tehtiin erikseen jokaisesta potilaasta saaduille näytteille (1-3 näytelasille per värjäys).

M1-makrofageille käytettiin CD68-pintaproteiinin värjäävää värjäystä (51), alla protokolla.

#### CD68-värjäys makrofageille

1. Näytelasien sulatus ad 10 min
2. +4 asteinen asetonikäsittely näytelaseille ad 5 min
3. Näytelasien kuivatus ad 10 min
4. 2 tippaa blocking solution/näytelasi ad 15 min
5. PBS käyttöliuos suhteella 1:1 pesu ad 5 min
6. Vectastain ABC-kit: mouse pk-6102
  - 6.1 20 mikrolitraa hevosen seerumia + 1 ml PBS (1:1)
  - 6.2 Pipetoidaan laseille näytteiden päälle
  - 6.3 Inkubaatio ad 30 min 30min kosteuskammion sisällä
7. CD68 abcam ab845
  - 7.1 Inkubaatio 1h 30min kosteuskammion sisällä
8. Lasien pesu PBS (1:1) 5 min + 5 min (välissä puhtaan pesunesteen vaihto)
9. Vectastain ABC-kit
  - 9.1 1ml PBS + 5 ul biot.sele.va + 15 ul norm. serum
  - 9.2 Inkubaatio 30min 30min kosteuskammion sisällä
10. Pesu PBS (1:1) 5min + 5min
11. Vectastain ABC-kit: mouse pk-6102
  - 11.1 ml PBS (1:1) + 9 ul reag A + 9 ul reag B

- 11.2 Inkubaatio 30min kosteuskammion sisällä
- 12.5+5min pesu PBS (1:1)
- 13.DAB 7min (abcam ab64238)
- 14.5+5min pesu PBS (1:1)
- 15.Meyerin hematoxylin 10sek
- 16.Juokseva alkoholisarja
- 17.Fiksaatio

M2- makrofagien värjäyksessä käytettiin CD206:n (mannoosi-reseptorin) värjäävää värjäystä, värjäysprotokolla alla (52).

- 1. Näytelasien sulatus ad 10 min
- 2. +4 asteinen asetonikäsittely näytelaseille ad 5 min
- 3. Näytelasien kuivatus ad 10 min
- 4. Vectastain ABC-kit: rabbit pk-6101
  - 4.118 mikrolitraa vuohen seerumia + 1 ml PBS (1:1)
  - 4.2Pipetoidaan laseille näytteiden päälle
  - 4.3Inkubaatio ad 60 min
- 5. Cell signaling #12981 Mannose receptor antibody
  - 5.1 1 ml PBS + 1 mikrolitra Cell signaling #12981 Mannose receptor antibody
  - 5.3Pipetoidaan näytteiden päälle
  - 5.3 Inkubaatio 12 h RT kosteuskammion sisällä
- 6. Lasien pesu PBS (1:1) 5 min + 5 min (välissä puhtaan pesunesteen vaihto)
- 6. Vectastain ABC-kit: rabbit pk-6101
  - 6.1 11ml PBS + 5 ul biot.sele.va + 15 mikrolitraa rabbit norm. serum
  - 6.2 inkubaatio 30min
- 10.Pesu PBS (1:1) 5min + 5min

11. Vectastain ABC-kit: rabbit pk-6101
  - 11.1 PBS (1:1) + 9 ul reag A + 9 ul reag B
  - 11.2 11.3 Inkubaatio 30min
  - 11.3.1 11.4 Seos valmistettava 30 min ennen käyttöä
12. 5+5min pesu PBS (1:1)
13. DAB (abcam ab64238)
  - 13.1 Inkubaatio 7 min RT kosteuskammiossa
14. 5+5min pesu aqua
15. Meyerin hematoxylin 10sek
16. Juokseva alkoholisarja
17. Xyleeni 2 x 5 min
18. Fiksaatio DPX mountant
19. Peitto peitinlasilla

#### 4.4 Näytteen analysointi

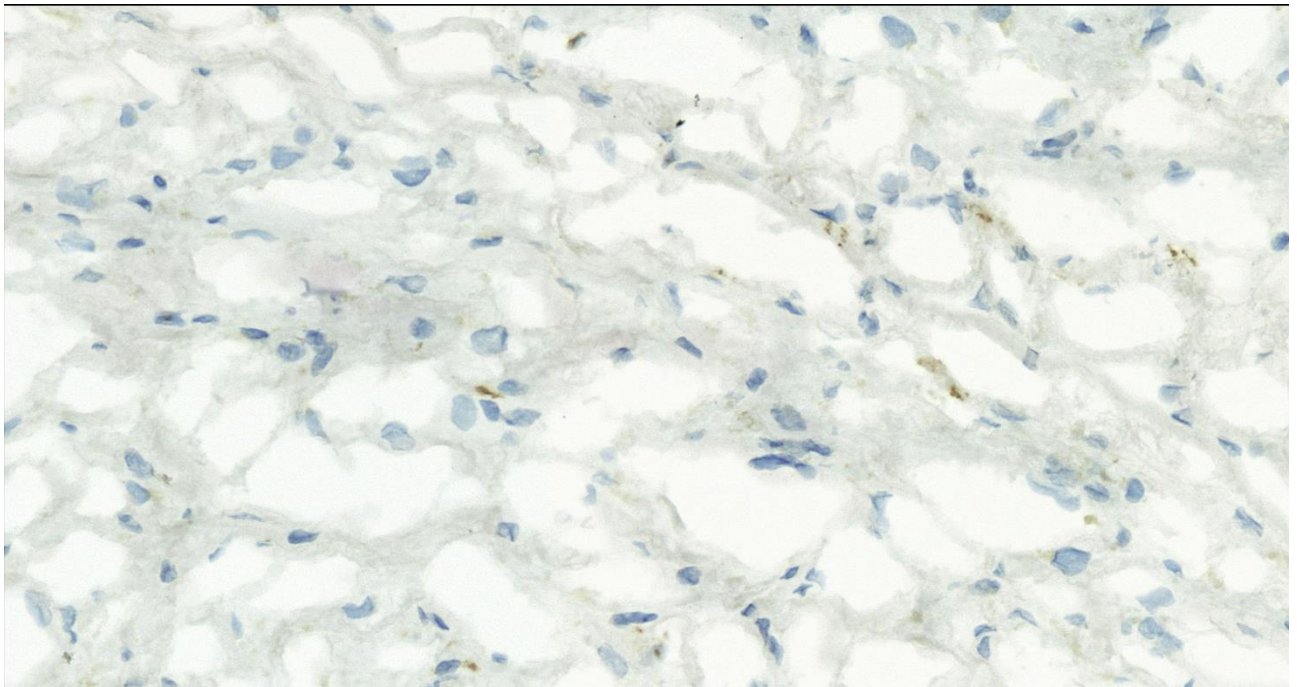
Immunohistokemiallisesti värjättyjen kudoksenäytteen laatu tarkastettiin valomikroskoopilla. Tämän jälkeen näytteet skannattiin digitaaliseen muotoon. ImageJ ohjelman avulla laskettiin käsin sekä värjäytyneet solut jokaisesta näytteestä että kokonaistumamäärä. Jokaisen peitinlasin makrofagimäärä jaettiin kokonaistumamäärällä saaden näin makrofagien osuus kaikista soluista.

M2 makrofagien värjäykseen käytetty CD206 antigeeni oli spesifi. M1 makrofageilla käytetty CD68 antigeeni esiintyy sekä M1 että mahdollisesti myös M2 makrofageissa. Laskimme keskiarvon potilaan CD68 värjäytyistä näytelaseista saaduille M1-makrofageille sekä CD206 värjäytyistä näytelaseista saaduille M2-makrofageille. Tämän jälkeen M1 keskiarvosta vähennettiin saman potilaan M2

keskiarvo, jolloin jokaiselle potilaalle saatiin näytelasien keskiarvoinen määrä oikeita M1-makrofageja.

#### 4.4 Statistinen analysointi

Statistiseen analyysiin käytettiin Microsoft Exceliä ja Prism 8 sovellusta. Prism 8:lla tehtiin tulosten kuvaajat ja statistiset ajot. Vertailimme tuloksissa positiivisten solujen suhdetta kokonaistumamäärään, sillä kudoksen määrä eri leikkeissä vaihteli, joka olisi voinut aiheuttaa harhaa tuloksiin. Eri populaatioiden vertailussa käytimme t-testiä, sekä yhdensuuntaista varianssianalyysiä (ANOVA).



(Kuva 1.) Eteiskorvakekudosta värjättyinä CD68 pinta-antigeenivärjäysprotokollalla. Ruskealla värjäytyneet ovat CD68 positiivisia M1-makrofageja

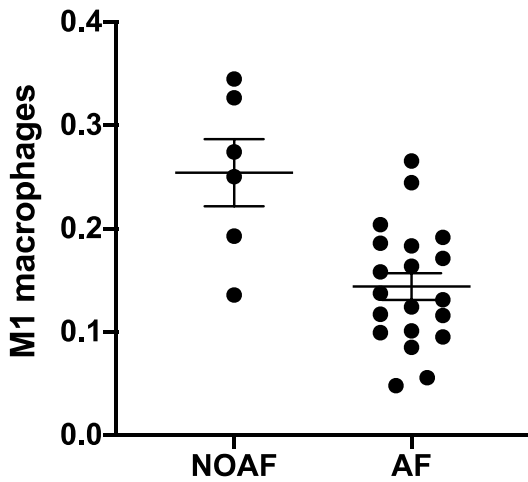
## 5. Tulokset

### 5.1 M1-makrofagit

CD68 positiivisten makrofagien ja näytteiden kokonaistumamäärien suhteiden vertailussa vertailtiin kaikkia ryhmiä keskenään.

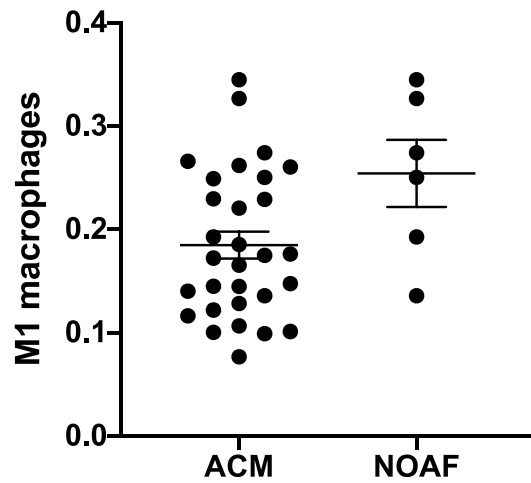
NOAF (uusi eteisvärinä) ja AF (eteisvärinä) potilaiden välillä oli merkitsevä ero ( $P=0.0009944$ ): NOAF potilailla oli enemmän M1-makrofageja. ACM (eteiskardiomyopatia) ja NOAF potilaiden välillä oli merkitsevä ero ( $P=0.03952$ ): NOAF potilailla oli enemmän M1-makrofageja. NOAF ja SR (sinusrytmi) potilaiden välillä oli merkitsevä ero ( $P=0.003205$ ): NOAF potilailla oli enemmän M1-makrofageja. ACM ja AF potilaiden välillä oli merkitsevä ero ( $P=0.03761$ ): ACM potilailla oli enemmän M1 makrofageja. ACM(SR) (sinusrytmissä olevat eteiskardiomyopatiapotilaat) ja ACM(NOAF) (uudesta eteisvärinästä kärsivät eteiskardiomyopatiapotilaat) välillä oli merkitsevä ero ( $P=0.07517$ ): ACM(NOAF) potilailla oli enemmän M1-makrofageja.

**CD68 NOAF v AF**



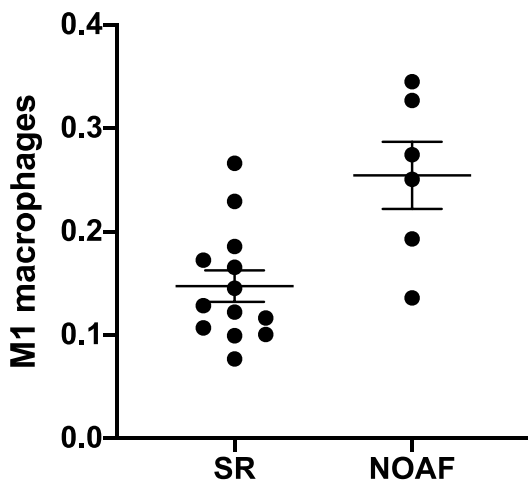
P=0.0009944

**CD68 NOAF v ACM**



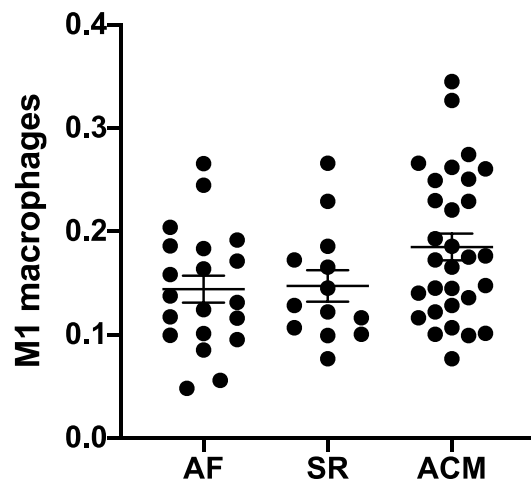
P=0.03952

**CD68 NOAF v SR**



P=0.003205

**CD68**



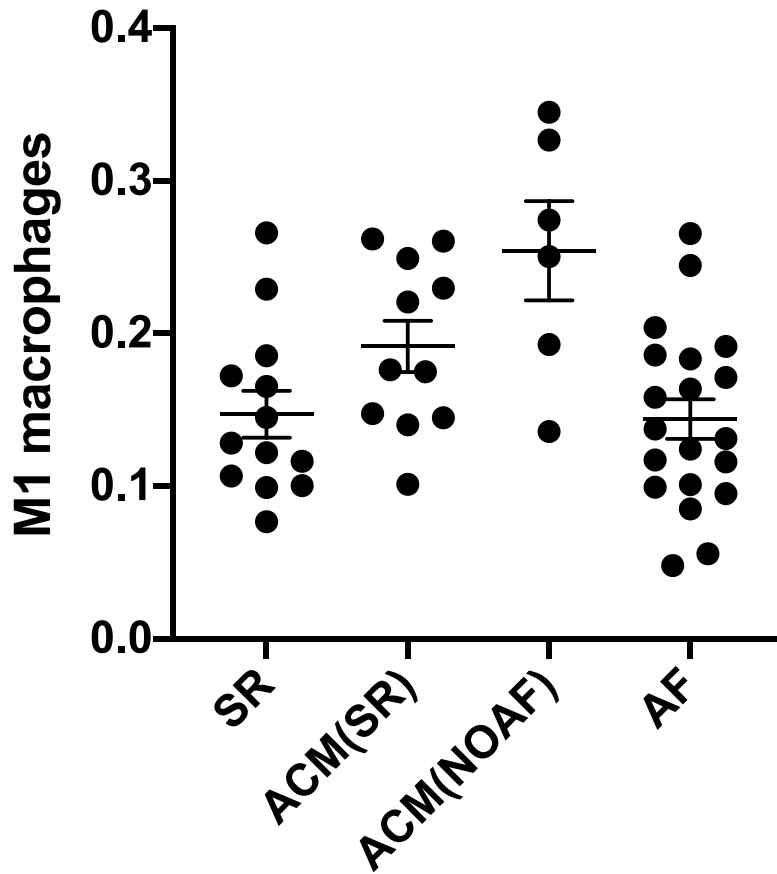
ACM v AF p=0.03761

ACM v SR p=0.09679

SR v AF p=0.8754

(taulukko 1.) AF, SR, ACM ja NOAF ryhmien vertailun tulokset M1 makrofagien suhteen.

## CD68



ACM(SR) v SR  $p=0.06233$

ACM(NOAF) v SR  $p=0.003205$

AF v SR  $p=0.8754$

ACM(NOAF) v ACM(SR)  $p=0.07517$

ACM(SR) v AF  $p=0.03455$

ACM(NOAF) v AF  $p=0.0009944$

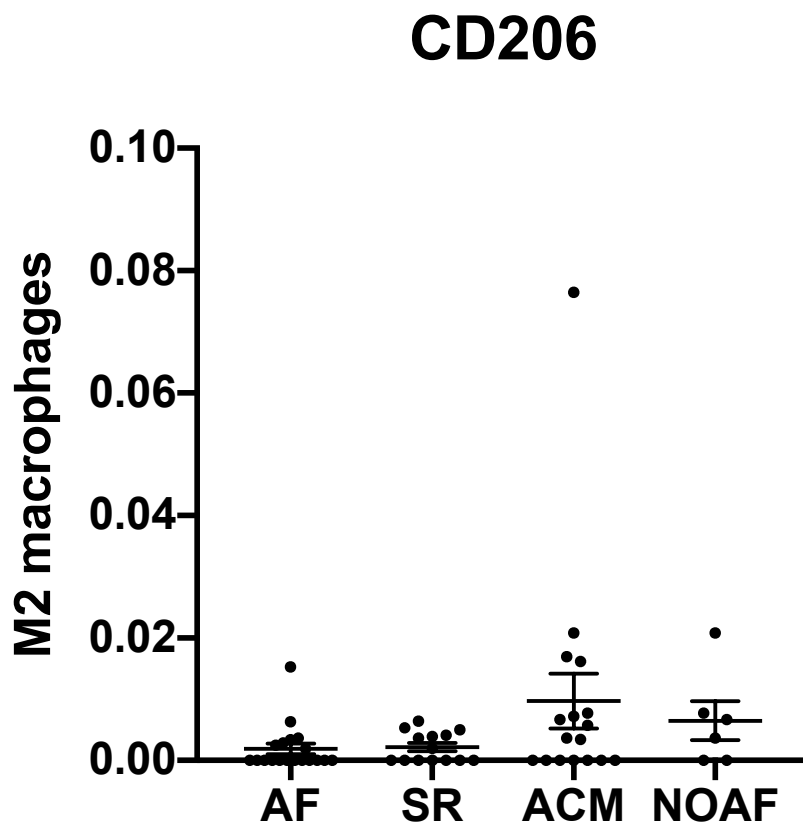
(Taulukko 2.) ACM(NOAF) ja ACM(SR) ryhmien vertailun tulokset M1-makrofagien suhteen.

### 5.2 M2-makrofagit

CD206 positiivisten M2-makrofagien ja näytteiden kokonaistumamäärien suhteiden vertailussa vertailtiin kaikkia ryhmiä keskenään.

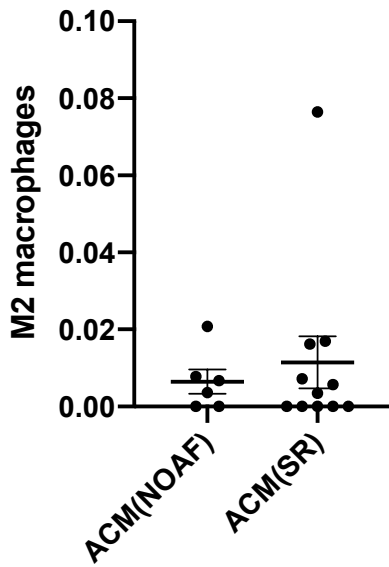


NOAF ja AF potilaiden välillä ei ollut merkitsevää eroa M2-makrofagien suhteellisessa esiintymisessä ( $P=0.0562$ ). SR ja NOAF potilaiden välillä ei ollut merkitsevää eroa ( $P=0.0699$ ). ACM ja AF potilaiden välillä ei ollut merkitsevää eroa ( $P=0.0794$ ). ACM ja SR potilaiden välillä ei ollut merkitsevää eroa ( $P=0.1471$ ). NOAF ja ACM potilaiden välillä ei ollut merkitsevää eroa ( $P=0.6863$ ). SR ja AF potilaiden välillä ei ollut merkitsevää eroa ( $P=0.8030$ ). ACM(NOAF) ja ACM(SR) potilaiden välillä ei ollut merkitsevää eroa ( $P=0.6115$ ).



(Taulukko 3.) AF, SR, ACM ja NOAF ryhmien vertailu M2-makrofagien suhteen.

## CD206 ACM(NOAF) V ACM(SR)



(Taulukko 4.) ACM(NOAF) ja ACM(SR) ryhmien vertailun tulokset M2-makrofagien suhteen.

## 6. Pohdinta

Tutkimuksessa selvisi, että uudesta eteisvärinästä ja eteiskardiomyopatiasta kärsivillä potilailla on eteiskudoksessa tilastollisesti merkittävästi suurempi tulehduksellinen M1-makrofagi-infiltraatti. Eteisvärinäpotilaiden tulehduksellinen M1-makrofagi-infiltraatti on havaittu aikaisemminkin<sup>48</sup>. Olemme nyt jatkona pystyneet selvittämään, että proinflammatorisia makrofageja on enemmän uudesta eteisvärinästä kärsivillä, eikä niinkään kroonisesta eteisvärinästä kärsivillä. Tämä tarkoittaa, että eteisvärinän kroonistumiseen vaikuttava eteisten muovautuminen on ainakin osittain tulehduksellinen prosessi. Mielenkiintoista on, että proinflammatorinen makrofagi-infiltraatti vähenee eteiskudoksessa eteisvärinän kroonistuessa. Sykkeen hallinta todennäköisesti vähentää tulehduksellista reaktiota ja M1-makrofagi-infiltraattia eteiskudoksessa kroonisilla eteisvärinäpotilailla. M1-makrofageja tutkimalla voisi selvittää erilaisten

jo olemassa olevien lääkkeiden sekä uusien lääkkeiden vaikutuksia eteisten tulehduksellisiin prosesseihin ja johtumiseen. Aihe kaipaa lisää tutkimusta.

Emme onnistuneet osoittamaan merkitseviä eroja M2-makrofagien esiintymisessä potilailla. Hypoteesimme oli, että non-inflammatoristen makrofagien määrä olisi ollut suurempi eteiskardiomyopatiasta kärsivillä ja kroonista eteisvärinää sairastavilla potilailla, mikä olisi voinut selittää eteisten fibrotisoitumista, sekä vähentyneitä M1-makrofagimääriä. Näin voi todellisuudessa olla, sillä P-arvot eivät jääneet kauas merkitsevistä. Aihe kaipaa lisää tutkimusta suuremmilla otoksilla.

## 7. Viitteet

1. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: The framingham heart study. *Circulation*. 2004;110(9):1042-1046. doi:10.1161/01.CIR.0000140263.20897.42
2. Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, et al. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation*. 2006;114(2):119-125. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595140
3. Seuran SK. Eteisvärinä. Published online 2021:1-56.
4. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998;98(10):946-952. doi:10.1161/01.CIR.98.10.946
5. Lévy S. Factors predisposing to the development of atrial fibrillation. *PACE - Pacing Clin Electrophysiol*. 1997;20(10 II):2670-2674. doi:10.1111/j.1540-8159.1997.tb06115.x
6. Van Den Berg MP, Hassink RJ, Tuinenburg AE, et al. Quality of life in patients with paroxysmal atrial fibrillation and its predictors: Importance of the autonomic nervous system. *Eur Heart J*. 2001;22(3):247-253. doi:10.1053/euhj.2001.2180
7. Paquette M, Roy D, Talajic M, et al. Role of gender and personality on quality-of-life impairment in intermittent atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2000;86(7):764-768. doi:10.1016/S0002-9149(00)01077-8
8. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: A global burden of disease 2010 study. *Circulation*. 2014;129(8):837-847. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005119
9. Mont L, Sambola A, Brugada J, et al. Long-lasting sport practice and lone atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2002;23(6):477-482. doi:10.1053/euhj.2001.2802
10. Turagam MK, Flaker GC, Velagapudi P, Vadali S, Alpert MA. Atrial fibrillation in athletes: Pathophysiology, clinical presentation, evaluation and management. *J Atr Fibrillation*. 2015;8(4). doi:10.4022/jafib.1309
11. Haïssaguerre M, Jaïs 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):659-666. doi:10.1056/nejm199809033391003
12. Nattel S, Harada M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: Recent advances and translational perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(22):2335-

2345. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.555
13. Mordi IR, Santema BT, Kloosterman M, et al. Prognostic significance of changes in heart rate following uptitration of beta-blockers in patients with sub-optimally treated heart failure with reduced ejection fraction in sinus rhythm versus atrial fibrillation. *Clin Res Cardiol*. 2019;108(7):797-805. doi:10.1007/s00392-018-1409-x
  14. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJV. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-Year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med*. 2002;113(5):359-364. doi:10.1016/S0002-9343(02)01236-6
  15. Clark DM, Plumb VJ, Epstein AE, Kay GN. Hemodynamic effects of an irregular sequence of ventricular cycle lengths during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(4):1039-1045. doi:10.1016/S0735-1097(97)00254-4
  16. Waks JW, Josephson ME. Mechanisms of Atrial Fibrillation – Reentry, Rotors and Reality. *Arrhythmia Electrophysiol Rev*. 2014;3(2):90. doi:10.15420/aer.2014.3.2.90
  17. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: A translational appraisal. *Physiol Rev*. 2011;91(1):265-325. doi:10.1152/physrev.00031.2009
  18. Bosch RF, Scherer CR, Rüb N, et al. Molecular mechanisms of early electrical remodeling: Transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces I<sub>Ca,L</sub> and I<sub>to</sub> in rapid atrial pacing in rabbits. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(5):858-869. doi:10.1016/S0735-1097(02)02922-4
  19. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999;44(1):121-131. doi:10.1016/S0008-6363(99)00178-9
  20. Lee HC. Electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(12):2380-2383. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20130546
  21. Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: Insights from a mathematical model. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1998;275(1 44-1). doi:10.1152/ajpheart.1998.275.1.h301
  22. Dobrev D, Graf E, Wettwer E, et al. Molecular basis of downregulation of G-protein -coupled inward rectifying k<sup>+</sup> current (i<sub>k,ach</sub>) in chronic human atrial fibrillation decrease in GIRK4 mrna correlates with reduced I<sub>K,ACh</sub> and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation*. 2001;104(21):2551-2557. doi:10.1161/hc4601.099466
  23. Dobrev D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schuler S, Ravens U. *Human Inward Rectifier Potassium Channels in Chronic and Postoperative Atrial Fibrillation*. Vol 54.; 2002. Accessed February 21, 2021.

www.elsevier.com/locate/cardiores

24. Makary S, Voigt N, Maguy A, et al. Differential protein kinase c isoform regulation and increased constitutive activity of acetylcholine-regulated potassium channels in atrial remodeling. *Circ Res*. 2011;109(9):1031-1043. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253120
25. Kneller J, Zou R, Vigmond EJ, Wang Z, Leon LJ, Nattel S. Cholinergic atrial fibrillation in a computer model of a two-dimensional sheet of canine atrial cells with realistic ionic properties. *Circ Res*. 2002;90(9). doi:10.1161/01.res.0000019783.88094.ba
26. Van Veen TAB, Van Rijen HVM, Jongsma HJ. Physiology of cardiovascular gap junctions. *Adv Cardiol*. 2006;42:18-40. doi:10.1159/000092560
27. Dhein S, Rothe S, Busch A, et al. Effects of metoprolol therapy on cardiac gap junction remodelling and conduction in human chronic atrial fibrillation. *Br J Pharmacol*. 2011;164(2 B):607-616. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01460.x
28. Gemel J, Levy AE, Simon AR, et al. Connexin40 abnormalities and atrial fibrillation in the human heart. *Curr Ther Res - Clin Exp*. 2014;76:159-168. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.08.021
29. Wilhelm M, Kirste W, Kuly S, et al. Atrial distribution of connexin 40 and 43 in patients with intermittent, persistent, and postoperative atrial fibrillation. *Hear Lung Circ*. 2006;15(1):30-37. doi:10.1016/j.hlc.2005.06.011
30. Zou R, Kneller J, Leon LJ, Nattel S. Substrate size as a determinant of fibrillatory activity maintenance in a mathematical model of canine atrium. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2005;289(3 58-3). doi:10.1152/ajpheart.00252.2005
31. Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, et al. Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation*. 1976;53(2):273-279. doi:10.1161/01.CIR.53.2.273
32. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res*. 2002;54(2):361-379. doi:10.1016/S0008-6363(02)00273-0
33. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*. 1997;96(4):1180-1184. doi:10.1161/01.CIR.96.4.1180
34. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: Atrial remodeling of a different sort. *Circulation*. 1999;100(1):87-95. doi:10.1161/01.CIR.100.1.87
35. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: A translational appraisal. *Physiol Rev*. 2011;91(1):265-325. doi:10.1152/physrev.00031.2009
36. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, et al. Mice with cardiac-restricted

- angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol*. 2004;165(3):1019-1032. doi:10.1016/S0002-9440(10)63363-9
37. Viskin S, Golovner M, Malov N, et al. Circadian variation of symptomatic paroxysmal atrial fibrillation; Data from almost 10,000 episodes. *Eur Heart J*. 1999;20(19):1429-1434. doi:10.1053/euhj.1999.1632
  38. Richer LP, Vinet A, Kus T, Cardinal R, Ardell JL, Armour JA.  $\alpha$ -adrenoceptor blockade modifies neurally induced atrial arrhythmias. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(4). doi:10.1152/ajpregu.00840.2007
  39. Shen MJ, Shinohara T, Park HW, et al. Continuous low-level vagus nerve stimulation reduces stellate ganglion nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmias in ambulatory canines. *Circulation*. 2011;123(20):2204-2212. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.018028
  40. Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. *Circulation*. 2000;101(10):1185-1191. doi:10.1161/01.CIR.101.10.1185
  41. Nguyen BL, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS, Masroor S. Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans. *Heart Rhythm*. 2009;6(4):454-460. doi:10.1016/j.hrthm.2009.01.010
  42. Perdiguero EG, Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol*. 2016;17(1):2-8. doi:10.1038/ni.3341
  43. Malyshev I, Malyshev Y. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: Intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage "switch" phenotype. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/341308
  44. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-969. doi:10.1038/nri2448
  45. Dale DC, Boxer L, Conrad Liles W. The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112(4):935-945. doi:10.1182/blood-2007-12-077917
  46. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7). doi:10.3390/ijms18071545
  47. Wang YY, Jiang H, Pan J, et al. Macrophage-to-myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(7):2053-2067. doi:10.1681/ASN.2016050573
  48. Sun Z, Zhou D, Xie X, et al. Cross-talk between macrophages and atrial myocytes in atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(6). doi:10.1007/s00395-016-0584-z

49. Saba S, Janczewski AM, Baker LC, et al. Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2005;289(4 58-4). doi:10.1152/ajpheart.00733.2004