

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS DES SGLT2-INHIBITORS EMPAGLIFLOZIN
AUF DEN IONENHAUSHALT IM MURINEN UND HUMANEN
KARDIOMYOZYTEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Olivia Wagemann

2022

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS DES SGLT2-INHIBITORS EMPAGLIFLOZIN
AUF DEN IONENHAUSHALT IM MURINEN UND HUMANEN
KARDIOMYOZYTEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Olivia Wagemann

2022

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Wagner

II. Berichterstatter:

Prof. Dr. Frank Schweda

Tag der mündlichen Prüfung:

26.07.2022

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
FORMELVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	7
1.1 KLINISCHE STUDIEN MIT SGLT2-INHIBITOREN.....	7
1.2 DIE RENALE WIRKUNGSWEISE DER SGLT2-INHIBITOREN.....	13
1.2.1 <i>Charakterisierung von Empagliflozin</i>	14
1.3 POSTULIERTE MECHANISMEN DER KARDIOPROTEKTION VON SGLT2-INHIBITOREN.....	15
1.4 STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN EINZELNER KARDIOMYOZYTEN.....	17
1.5 DIE ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG.....	19
1.5.1 <i>Membranpotenzial und Erregung</i>	19
1.5.2 <i>Kontraktion durch die Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung</i>	21
1.5.3 <i>Die Relaxation während der Repolarisierung</i>	22
1.6 KLINIK UND PATHOPHYSIOLOGIE DER HERZINSUFFIZIENZ.....	24
1.6.1 <i>Veränderung des intrazellulären Natriums</i>	26
1.6.2 <i>Die Kalziumdynamik in der Herzinsuffizienz</i>	27
1.6.3 <i>Proarrhythmogene Potenziale</i>	28
1.7 HYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	30
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 VERWENDETE MAUSMODELLE.....	31
2.1.1 <i>C57 Black 6/J Wildtypen</i>	31
2.1.2 <i>Das murine Herzinsuffizienzmodell mit chronischer Nachlasterhöhung</i>	31
2.1.3 <i>Murine Zellisolation</i>	32
2.2 KARDIOMYOZYTEN VON PATIENTEN MIT HERZINSUFFIZIENZ.....	36
2.2.1 <i>Humane Zellisolation</i>	36
2.3 ZELLKULTUR.....	37
2.4 EIGENSCHAFTEN VERWENDETER FLUORESCENZFARBSTOFFE.....	38
2.4.1 <i>FURA2-AM</i>	40
2.4.2 <i>SBF1-AM</i>	42
2.4.3 <i>Fluo4-AM</i>	43
2.5 EPIFLUORESCENZMIKROSKOPIE.....	44
2.5.1 <i>Prinzip</i>	44
2.5.2 <i>Messvorbereitungen</i>	45
2.5.3 <i>Messung des intrazellulären Natriumhaushalts</i>	47
2.5.4 <i>Auswertung der Natriummessungen</i>	49
2.5.5 <i>Untersuchung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen</i>	49
2.5.6 <i>Auswertung der Kalziumtransienten</i>	52
2.5.7 <i>Systolische Sarkomerverkürzung</i>	53
2.5.8 <i>Modulation der Natrium-Kalium-ATPase</i>	54
2.6 KONFOKALMIKROSKOPIE.....	57
2.6.1 <i>Prinzip</i>	57
2.6.2 <i>Vorbereitung der Messung</i>	58
2.6.3 <i>Registrierung und Auswertung von systolischem Kalziumtransienten und diastolischem Kalziumleck</i>	59
2.7 STATISTIK.....	60
3 ERGEBNISSE	62
3.1 BIOMETRISCHE DATEN.....	62
3.1.1 <i>Transverse Aortenkonstriktion des murinen Wildtyps</i>	62

3.1.2	<i>Ventrikelkardiomyozyten der humanen Herzinsuffizienz</i>	62
3.2	EMPAGLIFLOZIN REDUZIERT DAS SPONTANE KALZIUMLECK NACH 24 STUNDEN IM MURINEN UND HUMANEN MODELL	63
3.3	EMPAGLIFLOZIN FÜLLT DEN KALZIUMSPEICHER UND BEEINFLUSST DIE LEAK-LOAD-BEZIEHUNG IM MURINEN KARDIOMYOZYTEN	71
3.4	EMPAGLIFLOZIN ERHÖHT DIE SYSTOLISCHE KALZIUMTRANSIENTENAMPLITUDE IN MURINER UND HUMANER HFREF	74
3.5	DER ZYTOSOLISCHE NATRIUMGEHALT NACH EMPAGLIFLOZIN-KULTUR	81
4	DISKUSSION	84
4.1	EMPAGLIFLOZIN ZEIGT EFFEKTE AUF DEN IONENHAUSHALT VON KARDIOMYOZYTEN IM <i>EX-VIVO</i> -EXPERIMENT UNABHÄNGIG VON EINER DIABETISCHEN STOFFWECHSELLAGE	84
4.2	DIE 30-MINUTEN-INKUBATION MIT EMPAGLIFLOZIN BLEIBT IN ISOLIERTEN MURINEN KARDIOMYOZYTEN OHNE EFFEKT AUF DEN IONENHAUSHALT	85
4.3	EMPAGLIFLOZIN BEGÜNSTIGT DIE DIASTOLISCHE RELAXATION DURCH REGULATION DES KALZIUMHAUSHALTS IM INSUFFIZIENTEN KARDIOMYOZYTEN	87
4.4	KORRELATE EINER VERBESSERTEN SYSTOLISCHEN FUNKTION ZEIGEN SICH UNTER EMPAGLIFLOZIN IM MODELL MURINER UND HUMANER HERZINSUFFIZIENZ	90
4.5	DIE REDUKTION DER INTRAZELLULÄREN NATRIUMKONZENTRATION UNTER EMPAGLIFLOZIN UNTERSTÜTZT DIE „NATRIUM-HYPOTHESE“	91
4.6	DIE NATRIUM-KALIUM-ATPASE IST ALS MECHANISTISCHE ZIELSTRUKTUR UNWAHRSCHEINLICH.....	94
4.7	AUSBLICK	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	LITERATURVERZEICHNIS	98
7	DANKSAGUNG	111

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Isolationstyrode 1-facher Stock
Tab. 2.2	Enzymlösung & Stopplösung der murinen Zellisolation
Tab. 2.3	Kalziumaufbau
Tab. 2.4	Startenzymlösung der humanen Zellisolation
Tab. 2.5	Enzymlösung der humanen Zellisolation
Tab. 2.6	Kulturmedium
Tab. 2.7	Normaltyrode 1-facher Stock
Tab. 2.8	Isoprenalintyrode
Tab. 2.9	FURA-2-AM
Tab. 2.10	SBFI-AM
Tab. 2.11	Messprotokoll SBFI
Tab. 2.12	Messprotokoll SBFI unter Isoprenalin
Tab. 2.13	Messprotokoll FURA2
Tab. 2.14	Messprotokoll FURA2 unter Isoprenalin
Tab. 2.15	Koffeintyrode
Tab. 2.16	Messprotokoll FURA2 unter Koffeinzufuhr
Tab. 2.17	Ouabain-Protokoll
Tab. 2.18	Fluo-4-AM
Tab. 3.1	Biometrische Daten: murines Modell der transversen Aortenkonstriktion
Tab. 3.2	Biometrische Daten: Humane Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1.1 Endpunkte der EMPA-REG-OUTCOME-Studie
- Abb. 1.2.1 Der SGLT2-Transporter im proximalen Tubulus
- Abb. 1.2.1.1 Strukturformel von Phlorizin und Empagliflozin
- Abb. 1.4.1 Schematische Darstellung eines Kardiomyozyten
- Abb. 1.5.1. Die elektromechanische Kopplung
- Abb. 1.5.1.1 Das Membranpotenzial des Kardiomyozyten
- Abb. 1.5.3.1 Schematische Darstellung der Natrium-Kalium-ATPase
- Abb. 2.1.3.1 Ein Blick durchs Mikroskop
- Abb. 2.1.3.2 Die modifizierte Anlage des Langendorff-Apparats
- Abb. 2.4.1.1 Charakterisierung von FURA2-AM
- Abb. 2.4.2.1 Charakterisierung von SBFI-AM
- Abb. 2.4.3.1 Charakterisierung von Fluo4-AM
- Abb. 2.5.1.1 Der Versuchsaufbau des Fluoreszenzmikroskops
- Abb. 2.5.3.1 Originale Registrierung einer Natrium-Messung mittels SBFI
- Abb. 2.5.5.1 Originalabbildung eines Kalziumtransienten mittels FURA2
- Abb. 2.5.6.1 Originale Registrierung eines Kalziumtransienten mittels FURA2
- Abb. 2.5.7.1 Originale Registrierung einer gemittelten Kardiomyozytenverkürzung
- Abb. 2.5.8.1 Originale Registrierung des Ouabain-Protokolls mittels SBFI
- Abb. 2.6.1.1 Das Prinzip der Konfokalmikroskopie
- Abb. 2.6.3.1 Originale Registrierung systolischer Transienten mittels Fluo4-AM
- Abb. 3.2.1 Sparkfrequenz und Kalziumleck nach 30 Minuten Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.2.2 Sparkfrequenz und Kalziumleck nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.2.3 Sparkfrequenz und Kalziumleck unter beta-adrenerger Stimulation nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.2.4 Sparkfrequenz und Kalziumleck nach 30 Minuten Empagliflozin im TAC-Modell
- Abb. 3.2.5 Sparkfrequenz und Kalziumleck nach 24 Stunden Empagliflozin im TAC-Modell

- Abb. 3.2.6 Sparkfrequenz und Kalziumleck nach 24 Stunden Empagliflozin in der humanen Herzinsuffizienz mit reduziertem Auswurf
- Abb. 3.3.1 SR-Kalziumgehalt nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.3.2 Leak-Load-Beziehung nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.3.3 SR-Kalziumgehalt und NCX-Aktivität unter beta-adrenerger Stimulation nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.3.4 Leak-Load-Beziehung unter beta-adrenerger Stimulation nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.4.1 Diastolisches Kalzium nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.4.2 Kalziumtransientenamplitude nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.4.3 Zelluläres Verkürzungsvermögen nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.4.4 SERCA-Aktivität nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.4.5 Kalzium-Handling unter Isoprenalin nach 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.4.6 Diastolische Kalzium nach 24 Stunden Empagliflozin im TAC-Modell
- Abb. 3.4.7 Kalziumtransientenamplitude, zelluläres Verkürzungsvermögen und SERCA-Aktivität nach 24 Stunden Empagliflozin im TAC-Modell
- Abb. 3.4.8 Kalziumtransientenamplitude nach 24 Stunden in der humanen Herzinsuffizienz mit reduziertem Auswurf
- Abb. 3.5.1 Zytosolischer Natriumgehalt nach 30 Minuten und 24 Stunden Empagliflozin im Wildtyp
- Abb. 3.5.2 Das Ouabain-Protokoll im Wildtyp
- Abb. 4.5.1 Potenzielle Mechanismen von Empagliflozin im Kardiomyozyten

Formelverzeichnis

- [2.4.1] Intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Grynkiewicz 1985
- [2.5.6.1] Kalziumtransientenamplitude am Epifluoreszenzmikroskop
- [2.5.7.1] Systolische Verkürzung am Epifluoreszenzmikroskop
- [2.6.3.1] Systolische Transientenamplitude am Konfokalmikroskop
- [2.6.3.2] Sparktransientenamplitude am Konfokalmikroskop
- [2.6.3.3] Kalziumleck am Konfokalmikroskop

1 Einleitung

In Folge mehrerer klinischer Interventionsstudien, die bei kardiovaskulären Endpunkten einen bedeutenden Zusatznutzen von Inhibitoren des Natrium-Glucose-Cotransporters 2 (SGLT2) bei Diabetiker und Nicht-Diabetikern zeigen konnten, ist es in den vergangenen Jahren zu einer explosionsartigen Zunahme an wissenschaftlichen Veröffentlichungen auf diesem Gebiet gekommen.

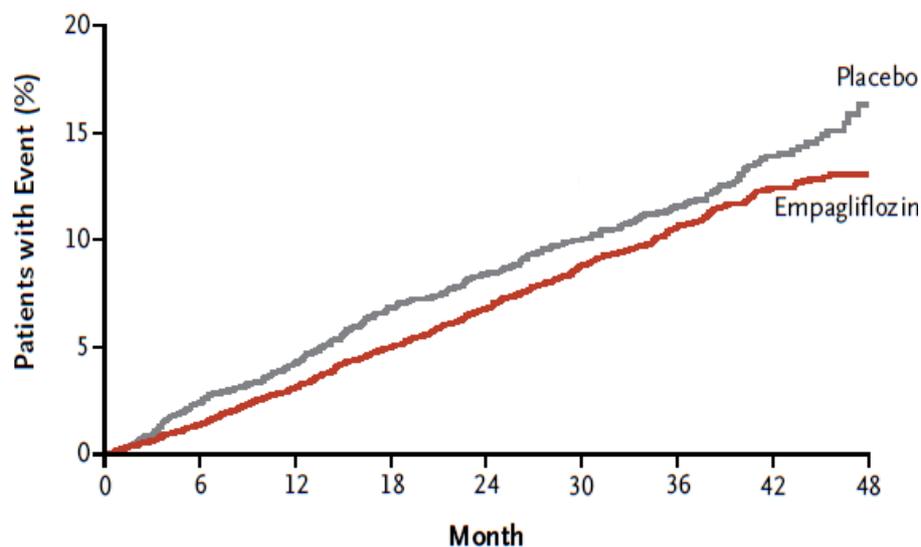
Der SGLT2-Inhibitor Empagliflozin konnte in der 2015 veröffentlichten EMPA-REG-OUTCOME-Studie positive Effekte auf (u.a. kardiovaskuläre) Todesereignisse und Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz in einer Kohorte von Patienten mit Diabetes mellitus II zeigen (Zinman u. a. 2015; Neal u. a. 2017). Der zentrale Mechanismus der Kardioprotektion blieb jedoch unklar.

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit dem Einfluss des SGLT2-Hemmers Empagliflozin in therapeutischer Dosis (1 $\mu\text{mol/L}$) auf die zelluläre Homöostase von Natrium und Kalzium im murinen und humanen Kardiomyozyten beschäftigt.

1.1 Klinische Studien mit SGLT2-Inhibitoren

Die Assoziation von kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus, die u.a. auf die Schädigung des Endothels durch Inflammation und oxidativen Stress zurückzuführen ist (Ceriello 2006), erfordert bei der Entwicklung neuer antidiabetischer Medikamente eine Berücksichtigung potenzieller Folgen für das kardiovaskuläre System. So soll gewährleistet sein, dass Nebenwirkungen, wie z.B. bei den Thiazolidindionen bekannt, bestmöglich vermieden werden (Qaseem u. a. 2017). Klinische Studien zur Anwendungssicherheit von SGLT2-Inhibitoren als Antidiabetikum konnten in jüngster Vergangenheit interessanterweise positive Effekte auf kardiovaskuläre Ereignisse zeigen, was den Anlass für zahlreiche Interventionsstudien zur genaueren Charakterisierung dieser Medikamentenklasse und ihrer Auswirkung auf das Herz-Kreislauf-System gab. In den Jahren 2015-2019 veröffentlichten drei groß angelegte Studien ihre Ergebnisse von rund 34.000

Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, die während ihrer Einnahme eines SGLT2-Inhibitors über einen Zeitraum von bis zu 4,5 Jahren beobachtet worden waren (Zelniker u. a. 2019). Allgemein ließ sich hierbei sowohl eine präventive Wirkung auf die Entwicklung von kardiovaskulären Ereignissen wie auch eine Beeinflussung der Progression bei bereits bestehenden Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems beobachten: Die 2015 publizierte EMPA-REG-Outcome-Studie untersuchte die Effekte von Empagliflozin auf die Herzinsuffizienz in Patienten mit behandlungsbedürftigem Diabetes mellitus sowie einer bestehenden kardiovaskulären Erkrankung oder einem kardiovaskulären Risikoprofil. Die 7020 Studienteilnehmer erhielten dafür über einen mittleren Zeitraum von 3,1 Jahren im 1:1:1 Ratio entweder Placebo oder 10mg bzw. 25mg Empagliflozin zur täglichen Standardmedikation. Den primären Triple-Endpunkt (3-P-MACE) markierten der Tod kardiovaskulärer Ursache, der nicht-tödliche Myokardinfarkt sowie der nicht-tödliche Schlaganfall; den sekundären Endpunkt stellten die Ereignisse des primären in Verbindung mit einer Hospitalisierung aufgrund instabiler Angina (Zinman u. a. 2015).



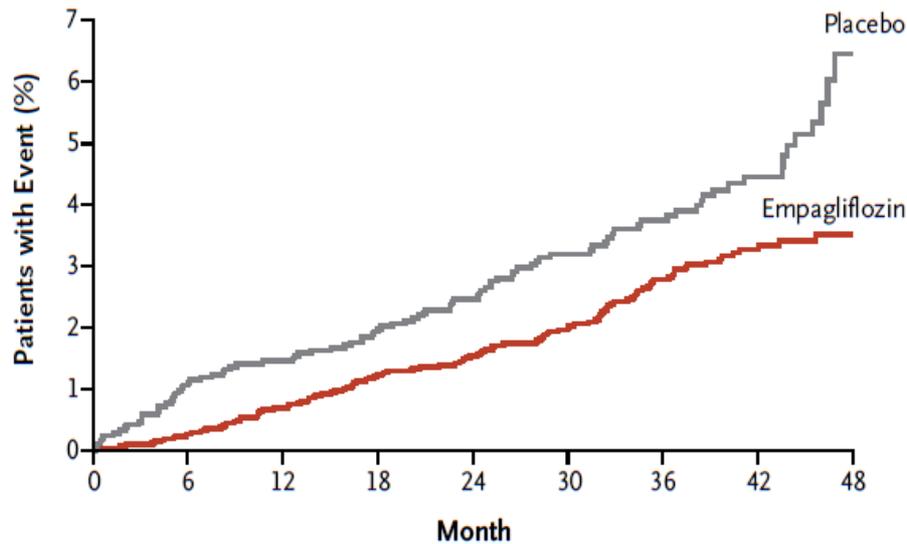


Abb. 1.1.1: vorige Seite: Kumulative Inzidenzen des primären Endziels der Empa-Reg-Outcome-Studie (Tod mit kardiovaskulärer Ursache, nicht-tödlicher Myokardinfarkt, nicht-tödlicher Schlaganfall). Diese Seite: Kumulative Inzidenzen für hospitalisierungspflichtige Herzinsuffizienz. Modifizierte Abbildung; reproduziert nach Zinman u. a. 2015; Copyright Massachusetts Medical Society.

Für den primären Triple-Endpunkt zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Inzidenzen zwischen Empagliflozin (10,5 %) versus Placebo (12,1 %). Während kein relevanter Unterschied zwischen beiden Gruppen für die ischämischen Endpunkte von Myokardinfarkt und Schlaganfall zu beobachten waren, kam es zu einer 38%-igen relativen Risikoreduktion für den kardiovaskulär-bedingten Tod. Darüber hinaus sah man eine Verminderung des Todes jeglicher Ursache um 32%, sowie eine 35%-ige Reduktion des relativen Risikos für die Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz. Dabei waren nur ungefähr 10% der Patienten bereits an einer Herzinsuffizienz erkrankt, womit die Studie sowohl einen therapeutischen wie auch protektiven Effekt durch Empagliflozin suggerierte (Zinman u. a. 2015). Betrachtet man den Endpunkt stratifiziert nach dem Health-ABC-HF-Risiko-Score für Herzinsuffizienz, so zeigt sich sowohl für die Niedrig- als auch Hochrisiko-Patienten eine signifikante Reduktion der Insuffizienz-bedingten Hospitalisierung und somit der Entstehung wie auch Progression der Herzinsuffizienz (David Fitchett u. a. 2018).

Ähnliches zeigte sich für weitere Vertreter dieser Substanzklasse, deren Untersuchungen ebenfalls als 3-P-MACE-Endpunkt-Studien konzipiert waren: So konnte Canagliflozin in der 2017 publizierte Interventionsstudie CANVAS

(*Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study*) das Auftreten der 3-P-MACE im diabetischen Patienten mit kardiovaskulärem Risiko um 14% reduzieren, ebenso bewirkte es eine Reduktion der Rehospitalisierungsrate um 33% (Neal u. a. 2017). Während DECLARE-TIMI-85 (*Dapagliflozin Effect on Cardiovascular Events–Thrombolysis in Myocardial Infarction 58*) unter der Gabe von Dapagliflozin die Inzidenz von kardiovaskulärem Tod, Myokardinfarkt oder ischämischem Schlaganfall als kombinierten MACE-Endpunkt nicht senken konnte, bestätigte sich dennoch die Nichtunterlegenheit des SGLT2-Inhibitors gegenüber dem Placebo und ließ ähnlich zu den Ergebnissen in EMPA-REG-OUTCOME eine signifikante Reduktion im kombinierten Endpunkt aus Hospitalisierung bei Herzinsuffizienz oder kardiovaskulärem Tod um rund 13% beobachten (Wiviott u. a. 2019).

Die 2019 veröffentlichte Interventionsstudie zur Untersuchung von Ertugliflozin, VERTIS-CV (*Evaluation of Ertugliflozin Efficacy and Safety Cardiovascular Outcomes Trial*), konnte ebenfalls keinen Vorteil durch die Behandlung mit dem SGLT2-Inhibitor für den primären Endpunkt der 3-P-MACE zeigen (Cannon u. a. 2020). Als Erklärung für die unerwartete Diskrepanz der Ergebnisse im Vergleich zu bisherigen Studien mit SGLT2-Inhibitoren wurden unter anderem Unterschiede in den rekrutierten Kohorten (Alter, HbA1c, ethnische Hintergründe) wie auch den Einschlusskriterien bezgl. präexistierender kardiovaskulärer Erkrankungsprofile diskutiert (Koufakis u. a. 2020). Die Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz zeigte sich hingegen signifikant um 30% zugunsten Ertugliflozins reduziert (Cannon u. a. 2020).

Der beobachtete Klasseneffekt auf die Reduktion der Hospitalisierungsraten konnte in einer aktuellen Metaanalyse für alle vier SGLT2-Inhibitoren, unabhängig vom initialen kardiovaskulären Risiko und der Nierenfunktion, als Endpunkt mit der größten Konsistenz bestätigt werden; zudem zeigten sich auch hier die 3-P-MACE-Endpunkte für Empagliflozin und Canagliflozin signifikant reduziert (McGuire u. a. 2021). Interessanterweise blieben die ischämischen Endpunkte für Dapagliflozin, Canagliflozin und Ertugliflozin weitgehend unbeeinflusst im Vergleich zum Placebo, was sich als ein weiteres Argument für die direkte Wirkung der SGLT2-Inhibitoren am Myokard diskutieren lässt (McGuire u. a. 2021).

Zuletzt veröffentlichte die SCORED (*Effect of Sotagliflozin on Cardiovascular and Renal Events in Patients With Type 2 Diabetes and Moderate Renal Impairment Who Are at Cardiovascular Risk*)-Studie ihre Ergebnisse, die für Sotagliflozin eine signifikante Risikoreduktion im kombinierten Endpunkt aus kardiovaskulärem Tod,

Hospitalisierung sowie dringende ärztliche Vorstellungen aufgrund von Herzinsuffizienz nachweisen konnte (Bhatt, Szarek, Pitt, u. a. 2021).

Um die beobachtete Wirkung der SGLT2-Inhibitoren genauer auf ihre Sicherheit und Wirkung im Spektrum der manifesten Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion zu untersuchen, erfolgte die Initiierung weiterer Interventionsstudien in einer Kohorte von Patienten mit manifestem Herzversagen und fakultativer diabetischer Grunderkrankung. Die Auswertung konzentrierte sich hier auf den kombinierten primären Endpunkt aus kardiovaskulärem Tod oder Hospitalisierung bzw. notfallmäßige ärztliche Vorstellung aufgrund der Herzinsuffizienz (Packer u. a. 2019; McMurray u. a. 2019). Hintergrund war u.a. die Subgruppenanalyse der TIMI-58-Studie, die einen zunehmenden Effekt von Dapagliflozin auf die Reduktion des kardiovaskulären Todes und der Mortalität jeglicher Ursache in der HFrEF im Vergleich zur Herzinsuffizienz mit erhaltener EF und Patienten ohne Insuffizienz zeigte. Dabei war besonders bei einer EF<30% ein größerer relativer Benefit durch die Behandlung mit Dapagliflozin über alle Endpunkte hinweg zu beobachten (Kato u. a. 2019).

Die EMPEROR-Reduced-Studie schloss zur Intervention mit Empagliflozin Patienten mit einer Ejektionsfraktion unter 40% ein; bei ca. der Hälfte war zudem ein Diabetes mellitus bekannt (Packer u. a. 2019). Untersucht wurde der Einfluss von Empagliflozin auf den kombinierten primären Endpunkt von Hospitalisierung oder kardiovaskulärem Tod in Patienten mit und ohne Diabetes sowie einer HFrEF oder einer reinen reduzierten systolischen Ejektionsfraktion. Dabei konnte bereits innerhalb des ersten Monats von einer Reduktion der Erst- und Rehospitalisierung aufgrund einer Verschlechterung der Herzinsuffizienz berichtet werden, mit einer 30%-igen Reduktion aller Hospitalisierung für Herzinsuffizienz, 22% weniger Hospitalisierungen aufgrund einer kardiovaskulären Ursache, sowie einer Reduktion von 15% für Hospitalisierungen jeglicher Ursache. Dies war entlang eines breiten Spektrums der klinischen Ausprägung der HFrEF und ohne Abhängigkeit von einer diabetischen Grunderkrankung zu berichten (Anker u. a. 2021; Packer u. a. 2021). Unter den gleichen Bedingungen erfolgte in DAPA-HF die Rekrutierung geeigneter Teilnehmer zur Untersuchung von Dapagliflozin (McMurray u. a. 2019). Eine Metaanalyse beider Interventionsstudien ergab für die rund 8500 Probanden eine relative Risikoreduktion im kombinierten primären Endpunkt von 25% bei primärer Hospitalisation bzw. 26% bei wiederholter Notwendigkeit einer Hospitalisierung aufgrund der Herzinsuffizienz (Zannad u. a. 2020). Darüber hinaus zeigte sich eine Reduktion der Rate an

Todesfällen, sowohl kardiovaskulärer wie auch anderer Ursache. 2021 konnte schließlich mit SOLOIST-WHF auch für Sotagliflozin eine Reduktion des kombinierten Endpunktes um 33% nachgewiesen werden. Das Patientengut bestand hierbei aus Probanden mit bereits erfolgter Hospitalisierung aufgrund einer Dekompensation der Herzinsuffizienz in der Vorgeschichte (Bhatt, Szarek, Steg, u. a. 2021).

Insgesamt suggerierten diese Ergebnisse eine Wirkung unabhängig von einer diabetischen Stoffwechsellage und somit einen Mechanismus abseits von der Regulation des Zuckerhaushalts über die SGLT2-Inhibition an der Niere.

Metanalysen der Triple-Endpunktstudien EMPA-REG-OUTCOME, CANVAS, DECLARE-TIMI-85 und VERTIS-CV wiesen neben dem Erfolg in den kardiovaskulären Endpunkten auch einen positiven Einfluss der SGLT2-Inhibitoren auf den Progress chronischer Nierenerkrankungen nach, scheinbar unabhängig von einer initial existierenden kardiovaskulären Erkrankung (Zelniker u. a. 2019; McGuire u. a. 2021). Die gezielte Reproduktion dieser Ergebnisse erfolgte u.a. durch die Interventionsstudien CREDENCE (*Canagliflozin and Renal Endpoints in Diabetes with Established Nephropathy Clinical Evaluation*) und DAPA-CKD (*A Study to Evaluate the Effect of Dapagliflozin on Renal Outcomes and Cardiovascular Mortality in Patients With Chronic Kidney Disease*) (Heerspink u. a. 2020). Zur Untersuchung von Empagliflozin werden in EMPA-KIDNEY (*The Study of Heart and Kidney Protection with Empagliflozin*) Patienten ohne Diabetes mellitus anhand der klinischen Situation ihrer chronischen Niereninsuffizienz eingeschlossen; der kombinierte Endpunkt weist hier neben dem kardiovaskulären Tod den Progress der renalen Insuffizienz als Kenngröße aus (Herrington u. a. 2018).

1.2 Die renale Wirkungsweise der SGLT2-Inhibitoren

Der SGLT2 sitzt vornehmlich im proximalen Tubulus der Niere und ist für 90% der Rückresorption von D-Glukose vor allem durch den Symport mit Natrium verantwortlich (Kanai u. a. 1994). Die restliche Glukose wird anschließend im Pars recta des Tubulussystem über den epithel-ständigen SGLT1 wieder dem Niereninterstitium zugeführt.

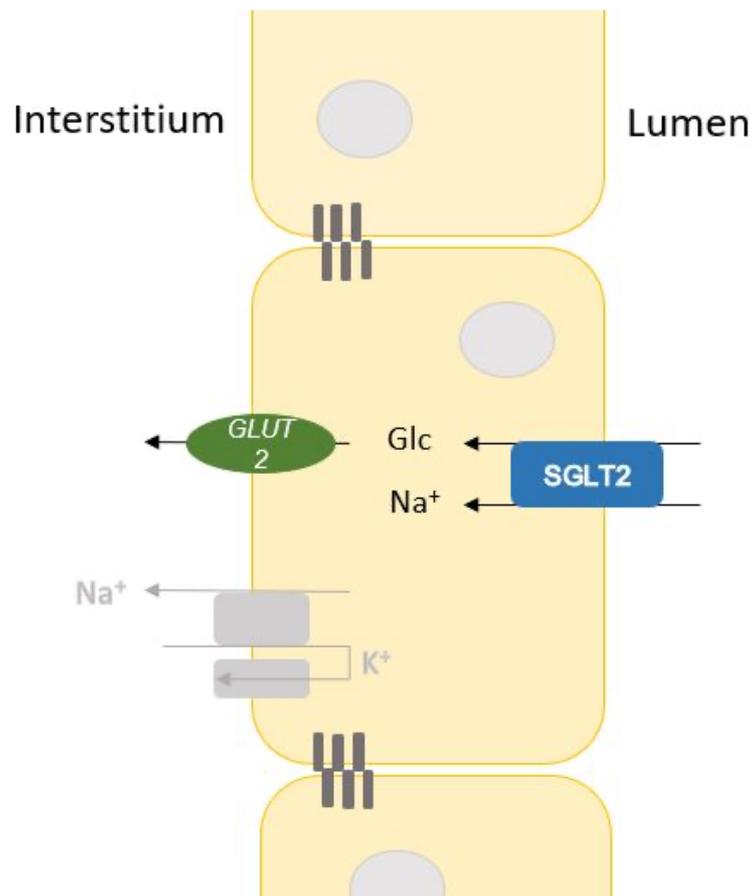


Abb. 1.2.1: Die freie Glukose wird nach Filtration im Glomerulus während ihrer Passage durch den proximalen Tubulus über den SGLT2-Transporter rückresorbiert und gelangt über den Glukosetransporter GLUT2 ins Niereninterstitium. Eine Inhibierung des SGLT2 führt demnach durch die ausbleibende Rückresorption zur vermehrten Ausscheidung der Glukose. Eigene Abbildung nach Nair & Wilding 2010.

Da der niedrigaffine, hochkapazitive SGLT2 hochspezifisch für den proximalen Tubulus der Niere ist (Hummel u. a. 2011; Wright 2001), bietet er die Möglichkeit einer Modifikation bei geringem Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen. Im Gegensatz dazu wurde der SGLT1 mit seinem ubiquitären Vorkommen unter anderem in Leber und Herzen (Zhou u. a. 2003; Wright 2001) in der Vergangenheit als eher ungeeignete Zielstruktur betrachtet; klinische Daten zu dem dualen SGLT1- und SGLT2-Inhibitor Sotagliflozin stellen diese Argumentation mittlerweile jedoch in Frage (Bhatt, Szarek, Steg, u. a. 2021).

1.2.1 Charakterisierung von Empagliflozin

Die meisten SGLT2-Inhibitoren sind Glykoside auf struktureller Grundlage des 1835 entdeckten Phlorizins, einem natürlichen O-Glykosid der Wurzelrinde des Apfel-, Kirsch- und Pflaumenbaums, zu dessen beobachteten Wirkungen die Glukosurie zählte (Merck 1885). Mit dem Nachweis einer spezifischen inhibierenden Wirkung an den Transportern der SGLT-Familie (Panayotova-Heiermann u. a. 1995) kam es zur Entwicklung zahlreicher Inhibitoren analoger Konstitution.

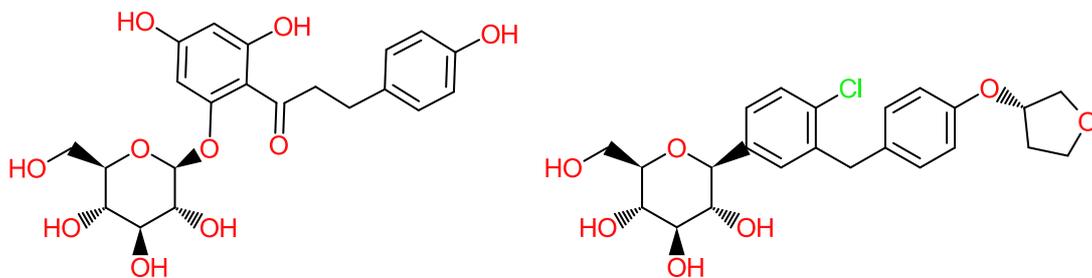


Abb. 1.2.1.1: Strukturformeln von Phlorizin links (O-glykosidische Bindung) und Empagliflozin rechts (C-glykosidische Bindung). Eigene Abbildung nach Washburn 2009.

Empagliflozin bildet mit anderen zeitgleich entwickelten SGLT2-Inhibitoren wie Dapagliflozin und Canagliflozin eine neue Untergruppe: Durch Ersetzen der O- mit einer C-glykosidischen Bindung ergibt sich eine Resistenz gegenüber der β -Glukosidase im Verdauungstrakt (Washburn 2009). Auch konnte gezeigt werden, dass

Empagliflozin mit einer 2500-fachen Selektivität von SGLT2 über SGLT1 im Menschen die höchste Spezifität zur kompetitiven Inhibition des Transporters aufweist (Grempler u. a. 2012), die hohen Konzentrationen von Glucose von 20mmol/l standhält. Mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} von 3,1 nM ergibt sich eine Halbwertszeit von ungefähr 60 Minuten; weitgehend unbeeinflusst durch die Anwesenheit von Glucose. Zusätzlich wurde eine signifikante Reduktion der Bindungskonstante K_{on} unter erhöhten Konzentrationen von Glukose beobachtet, was den kompetitiven Mechanismus der Inhibierung unterstreicht (Grempler u. a. 2012).

1.3 Postulierte Mechanismen der Kardioprotektion von SGLT2-Inhibitoren

Die Ergebnisse der 3-P-MACE-Studien (s.1.1) gaben den Anlass für zahlreiche mechanistische Erklärungsansätze. Dabei stand vor allem zur Diskussion, inwiefern die Beobachtungen mit systemischen Effekten der SGLT2-Inhibitoren und einer diabetischen Grunderkrankung assoziiert sind:

- Patienten mit Diabetes mellitus weisen ein höheres Risiko zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz auf. Darüber hinaus beeinflusst ein dysregulierter Glukosehaushalt als unabhängiger Risikofaktor die Prognose von Herzinsuffizienz wie auch asymptomatischer linksventrikulärer Dysfunktion (Shindler u. a. 1996), sodass die kardiovaskulären Vorteile als sekundäre Folge der antidiabetischen Therapie eingeordnet werden könnten.
- Die SGLT2-vermittelte Natriurese und osmotische Diurese in der Niere (s.1.2) bewirkt über eine Plasmavolumenreduktion eine mechanische Entlastung durch die verringerte Dehnung des Herzmuskels sowie eine Reduzierung der Vorlast. In Verbindung mit einer herabgesetzten arteriellen Steife und somit einer Reduktion der kardialen Nachlast (Chilton u. a. 2015) könnte dies eine Senkung von systolischem und diastolischem Blutdruck verursachen. Es gilt jedoch zu bedenken, dass andere Diuretika mit derartiger Wirkung auf den Natriumhaushalt bisher keine vergleichbaren Effekte auf die Herzinsuffizienz gezeigt haben (Packer 2019).
- Hämatokrit und Hämoglobin zeigten sich unter Empagliflozin erhöht (Zinman u. a. 2015). Ob dies Folge der Volumenabnahme oder etwa eines Klassen-

abhängigen Anstiegs von Erythropoetin (Lambers Heerspink u. a. 2013) ist, bleibt bis dato unklar. Definitiv ist hier jedoch eine verbesserte Oxygenierung des Myokards zu erwarten (Chang u. a. 2016).

- Auch übt Empagliflozin einen protektiven Einfluss auf die Progression chronischer Nierenerkrankungen als relevanten Risikofaktor für die Entstehung der Herzinsuffizienz aus (Cherney u. a. 2014; Wanner u. a. 2016).
- Eine weitere Hypothese behandelt den Wechsel im kardialen Energiemetabolismus von Fettsäuren und Glukose zu Ketonen, bedingt durch die erhöhte hepatische Fettsäureoxidation bei erniedrigtem Glukosespiegel sowie das veränderte Verhältnis von Insulin zu Glukagon. Durch die effizientere Art der Energiegewinnung könnte eine verbesserte myokardiale Funktion bei reduziertem Sauerstoffbedarf resultieren (Mudaliar u. a. 2016). Unterstützend finden sich Berichte über diesen Substratwechsel in humanen und tierischen Experimenten (Ferrannini u. a. 2016; Santos-Gallego, Requena-Ibanez, u. a. 2019). Allerdings sind auch gegensinnige Beobachtungen zu erwähnen (Verma u. a. 2018; Abdurrachim u. a. 2019); unter anderem zeigte unsere Arbeitsgruppe eine gesteigerte Expression des GLUT1 im murinen und humanen insuffizienten Gewebe mit dem Resultat einer erhöhten intrazellulären Glukosekonzentration zur potenziellen Energiegewinnung (Mustroph u. a. 2019a).
- Unter Medikation mit Empagliflozin konnte eine Reduktion von Urat beobachtet werden (Lytvyn u. a. 2015), die potenziell eine Augmentation des oxidativen Stresses auf das Myokard reduzieren könnte.
- Auch wurde eine Abnahme von Körpergewicht und Körperfettanteil beobachtet; in Hinsicht auf die primären Endpunkte wurde dem jedoch eine eher untergeordnete Rolle zugeschrieben (Ribola u. a. 2017).

Da SGLT2-Inhibitoren bis dato als Antidiabetikum Anwendung fanden und eine Großzahl der Untersuchungen in Diabetes-Erkrankten erfolgten, ist die Frage nach der Reproduzierbarkeit der Beobachtungen im nicht-Diabetes-erkrankten Organismus von Interesse; genauso wie die, ob eine systemischer Erklärungsansatz ausreichend ist. Begründet wurde die allgemeine Ablehnung eines direkten zellulären Effekts in der Vergangenheit mit der Abwesenheit des SGLT2-Transporters im kardialen Gewebe (Wright 2001; von Lewinski u. a. 2010). Die Adjustierung der EMPA-REG-OUTCOME-

Ergebnisse für Blutdruck, LDL-C und HbA1c zeigte jedoch bereits eine Unabhängigkeit der kardiovaskulären Effekte von diesen Risikofaktoren (Fitchett u. a. 2018).

1.4 Strukturelle Eigenschaften einzelner Kardiomyozyten

Mit einer Länge von 50-100 μm und einem Durchmesser von ca. 20 μm bilden Kardiomyozyten das Grundgerüst des Myokards. Ihre netzartigen Verbände ermöglichen dabei zum einen die gleichmäßige Kontraktion als mechanische Einheit, zum anderen die chemische und elektrische Kommunikation in der Form von Gap-Junctions (Bers 2001). Kardiomyozyten besitzen meist einen Kern und werden von einer Phospholipiddoppelschicht, dem Sarkolemm, umschlossen. Dieses stülpt sich in regelmäßigen Abständen zu transversalen (T-)Tubuli ins Zytosol. In diesen Abschnitten steht das Sarkolemm in enger räumlicher Beziehung zum sarkoplasmatischen Retikulum (SR) – dem Kalzium-Speicher der Zellen – sodass beide Strukturen eine funktionelle Einheit bilden (Fawcett & McNutt 1969). Nach Ankunft eines elektrischen Aktionspotenzials (AP) wird durch den Einstrom von extrazellulärem Kalzium (Ca) durch das Sarkolemm die Freisetzung von Kalzium aus dem SR getriggert und somit die gleichmäßige mechanische Kontraktion der Zelle ermöglicht (Fabiato 1983). Dieser Vorgang der elektromechanischen Kopplung benötigt eine spezifische Verteilung relevanter Ionen-Kanäle: So ist in den T-Tubuli eine höhere Dichte an spannungsabhängigen L-Typ-Kalzium-Kanälen als im „externen“ Sarkolemm zu finden (Brandt 1985), was eine schnellere Transduktion ermöglicht.

Das SR besteht als eigenständiges Kompartiment aus longitudinalen (L-)Tubuli sowie Zisternen und dient als Kalziumspeicher der Zelle (Fawcett & McNutt 1969). Mittels Anwesenheit des Proteins Calsequestrin vermag es hohe Mengen an Kalzium mit niedriger Affinität zu binden und somit zu puffern (Mitchell u. a. 1988). Für die Funktion während Systole und Diastole sind zwei membranständige Proteine relevant: Die sarkoplasmatische Ca-ATPase (SERCA) und der Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2). Der RyR2 befindet sich in den terminalen Zisternen in enger Nachbarschaft der T-Tubuli zum Dienst der Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung (Fabiato 1983). Nach Beendigung des Kontraktionsvorgangs transportiert die SERCA, unter Verbrauch von

Adenosintriphosphat (ATP), den Großteil des zytosolischen Kalziums wieder ins SR (Bers & Bridge 1989).

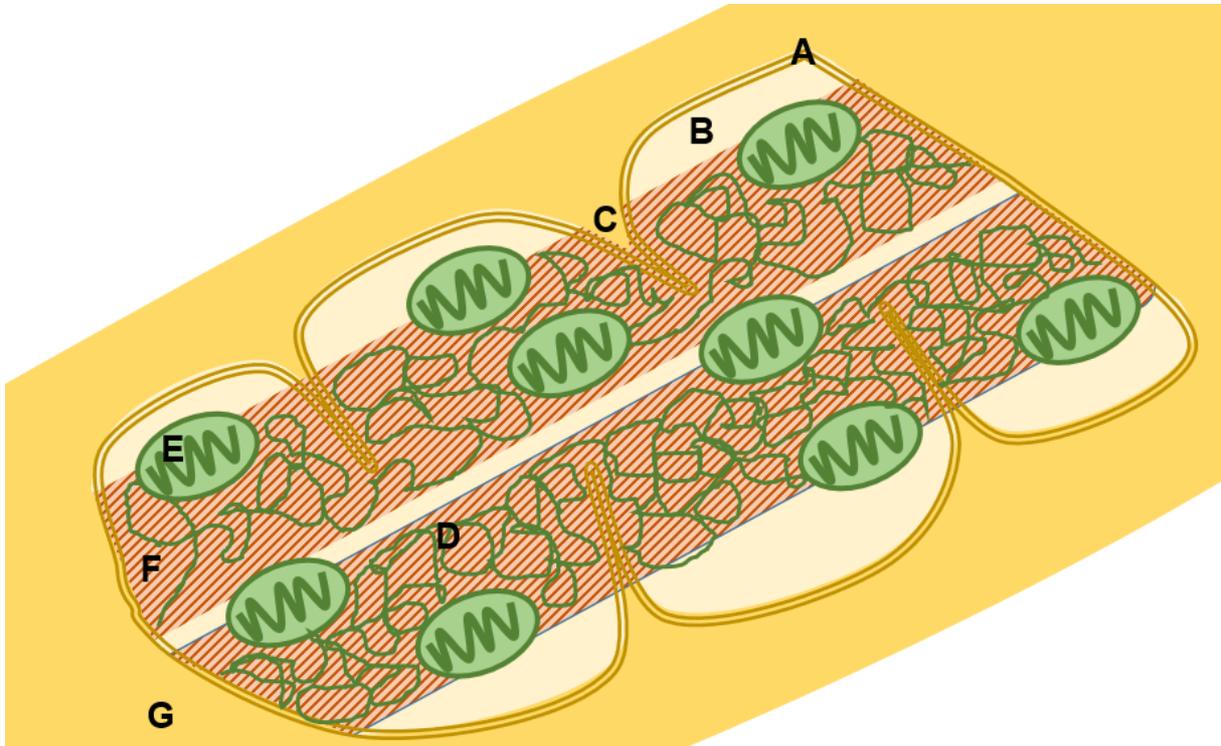


Abb. 1.4.1: Schematische Darstellung eines Kardiomyozyten. A: Sarkolemm mit subsarkolemmalen Zisternen, B: Zytosol, C: T-Tubuli, D: Sarkoplasmatisches Retikulum in enger Nachbarschaft der T-Tubuli, E: Mitochondrien, F: Sarkomere, G: Kardiomyozyt. Eigene Abbildung nach Poche 1996.

Ein bedeutender Anteil der Zelle wird von den Myofilamenten ausgefüllt. Die kleinste funktionelle Einheit bildet das Sarkomer, das aus ineinander verzahnten, dünnen Aktin- und dicken Myosin-Filamenten besteht. Die Verbindung beider ermöglichen dabei die Myosin-Köpfchen, die durch Kalzium-abhängiges Entlangwandern am Aktin - entsprechend der sogenannten Gleitfilamenttheorie - eine Verkürzung der Zelle bewirken (Huxley 1969). Dieser Prozess ist äußerst energieaufwendig; ein Korrelat des resultierenden ATP-Defizits sind u.a. die zahlreichen Mitochondrien, die immerhin 35% des Zellinhalts ausmachen und durch oxidative Phosphorylierung und den Zitratzyklus ihren Beitrag zum Energiehaushalt der Zelle leisten (Bers 2001).

1.5 Die elektromechanische Kopplung

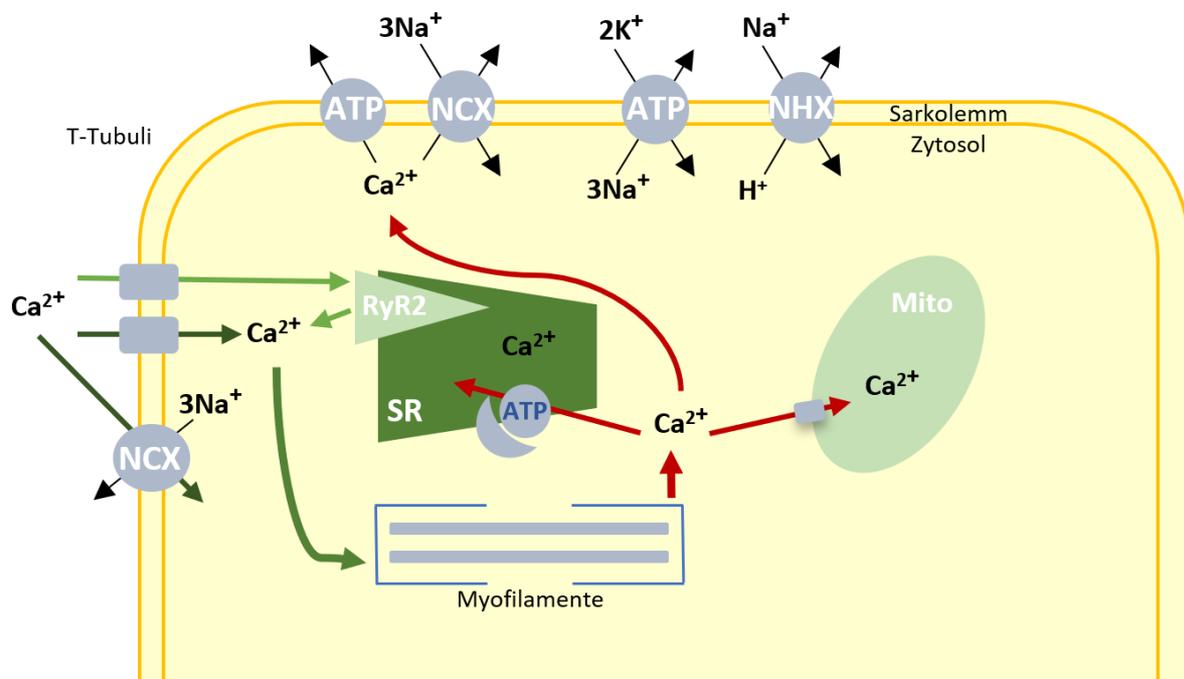


Abb. 1.5.1: Die elektromechanische Kopplung in ventrikulären Kardiomyozyten. Die grünen Pfeile symbolisieren die Bereitstellung von Kalzium während der Systole, die roten Pfeile die Kalziumeliminierung der Diastole. Eigene Abbildung nach Bers 2001.

1.5.1 Membranpotenzial und Erregung

Der Kontraktion der Kardiomyozyten geht eine Veränderung des Membranpotenzials E_m voraus. Essenziell dafür ist die Generierung eines Ruhemembranpotenzials mit charakteristischer Verteilung von Natrium (Na) und Kalium (K) im Intra- und Extrazellulärraum. Eine bedeutende Rolle spielt hierbei die Natrium-Kalium-ATPase (NKA) (Brodie u. a. 1987). Durch den Import von 2 Kalium-Ionen im Tausch für 3 Natrium-Ionen vermag sie es, einen chemischen Gradienten für Kalium aufzubauen und bewirkt so sekundär eine Wanderung dessen durch K-selektive Kanäle nach extrazellulär. Regulierend wirkt vor allem die Na-Konzentration: Mit einer Michaelis-Konstante von 10 mmol/L liegt die NKA sehr nah an $[Na]_i$, was sie sensibel für kleinste Konzentrationsveränderungen macht. Verlässt nun Kalium als positive Ladung die Zelle, wird die Membran negativ aufgeladen, sodass sich der elektrische Gradient dem

Chemischen entgegenstellt. Beschrieben wird dieser Sachverhalt durch die Formel für Gibbs freie Energie. Halten sich beide Gradienten im Fließgleichgewicht die Waage, lässt sich mithilfe der Nernst-Gleichung das neue Membranpotenzial bestimmen, das bei -89 mV liegt. Da das Sarkolemm aber auch selektive Kanäle für Natrium (Membranpotenzial $E_{\text{Na}} = 70\text{ mV}$) und Kalzium (Membranpotenzial $E_{\text{Ca}} = 125\text{ mV}$) besitzt, verschiebt sich das das ruhende Membranpotenzial auf -80 mV (Bers 2001). Dieses Ruhepotenzial wird beibehalten, bis durch eine Depolarisation die schnellen Na-Kanäle des Sarkolemms geöffnet werden. Natrium strömt nun entlang seines chemischen Gradienten in die Zelle und das Membranpotenzial nähert sich E_{Na} . Dies markiert den Beginn eines Aktionspotenzials, das dabei immer in vier Phasen verläuft:

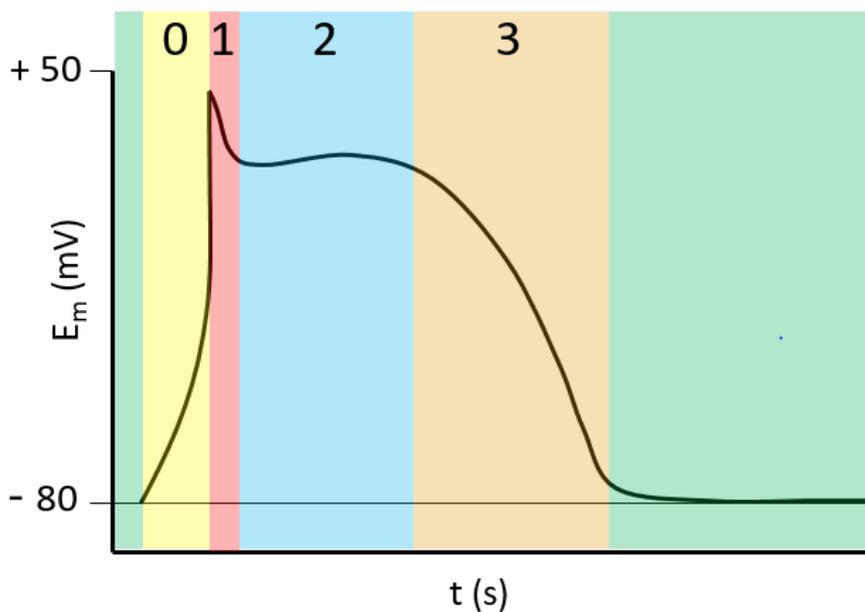


Abb. 1.5.1.1: Schematische Darstellung des Membranpotenzials E_m (in mV) als Funktion der Zeit, unterteilt in die einzelnen Phasen des Aktionspotenzials. Eigene Abbildung.

In der Phase des schnellen Aufstrichs (0) kommt es durch die ankommende Depolarisation zur raschen Öffnung und sofortigem Wieder-Schließen der Na-Kanäle. Der nach intrazellulär gerichtete Natriumstrom I_{Na} überwiegt aufgrund eines temporären positiven Feedbackmechanismus schnell den nach außen gerichteten Kaliumstrom I_K (u. a. I_{K1}), sodass das Membranpotenzial bis zu $+50\text{ mV}$ erreichen kann. Bedingt durch die Depolarisation kommt es zusätzlich zum Einstrom von Kalzium über die spannungsabhängigen L-Typ-Ca-Kanäle (DHPR) im Sarkolemm.

Der Punkt, an dem sich I_{Na} und der Kalziumstrom I_{Ca} mit dem entgegengerichteten I_K die Waage halten, markiert das Maximum der dazugehörigen AP-Funktion (s. Abb. 1.5.1.1).

Die Phase der schnellen Repolarisation (1) beginnt bereits am AP-Maximum, da das positivere Membranpotenzial den elektrischen Gradienten für Kalium erhöht, während der Strom an Natrium aus diesem Grund abnimmt. Dies führt zur schnellen Aktivierung verschiedener K-Kanälen, sodass ein auswärts gerichteter K-Strom $I_{to,fast}$ für eine leichte Senkung des Membranpotenzials sorgt.

1.5.2 Kontraktion durch die Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung

Mit der Plateau-Phase (2) persistiert I_{Ca} durch die sarkolemmalen DHPR, nach initialem Knick, resultierend in der Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung (CICR) aus dem SR. Die DHPR sind, im Gegensatz zu den kürzer leitenden T-Typ-Kalzium-Kanälen (TTCC), ubiquitär vorhanden, im Hinblick auf ihre Funktion in der CICR aber vermehrt in enger Nachbarschaft des RyR2 zu finden (Sun u. a. 1995). So formen sich gegenüberliegende Cluster (s.1.4), die nach extrazellulärem Kalziumeinstrom eine rapide lokale Konzentrationserhöhung des Ions ermöglichen, indem die RyR2 innerhalb weniger Millisekunden mit einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit reagieren (Cannell & Soeller 1997) und Kalzium aus dem SR freisetzen. Dieses bindet an Troponin C am Sarkomer und leitet so den Kontraktionszyklus ein. Zusätzlich kommt es zur langsameren, aber affineren Bindung von Kalzium an einer zweiten Stelle des RyR2, die diesen wieder inaktiviert (Fabiato 1983; Fabiato 1985).

Der kalziumsensitive RyR2 ist ein homogenes Tetramer in der Lipidmembran des SR (Takeshima u. a. 1989) und die häufigste Isoform im Herzen (Inui u. a. 1987). An zytosolischer Seite konnten bereits mehrere Bindungsstellen u.a. für Calmodulin und das FK506-Binding-Protein nachgewiesen werden (Zhang u. a. 2003). Pathophysiologisch sind vor allem temporäre diastolische Öffnungen mit lokalen Ca-Freisetzungen aus dem SR relevant. Diese spontanen Kalziumfreisetzungen – genannt Kalzium-Sparks – dauern nur wenige Millisekunden an und erhöhen die lokale Kalziumkonzentration um bis zu 200 nM (Cheng u. a. 1993). Dabei bilden 6-20 der Rezeptoren eine funktionelle Einheit (Lipp & Niggli 1996). Diese Sparks können bei

erhöhtem Kalziumgehalt im SR durch Sensitivierung der RyR2 verstärkt auftreten (Cheng u. a. 1993) und somit pathologische Vorgänge, wie eine verstärkte Aktivierung des Natrium-Kalzium-Austauschers durch den Leck-bedingten Anstieg des zytosolischen Kalziumgehalts, begünstigen (s.1.6). Auch eine Reihe von Enzymen vermag es, die Offenwahrscheinlichkeit der RyR2 zu beeinflussen. An der Bindestelle von Serin 2809 scheinen sowohl die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) (Marx u. a. 2000) als auch die Kalzium/Calmodulin-Kinase II (CaMKII) (Witcher u. a. 1991; Ai 2005; Neef u. a. 2010) durch Phosphorylierung das Öffnungsverhalten des Rezeptors zu modulieren.

Da sich das Membranpotenzial nun im Zuge der Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung E_{Ca} angenähert hat, bleibt es weiterhin positiv. Dem entgegen stehen jedoch bereits die Ionenflüsse der ausgleichenden K-Kanäle (Bers 2001).

1.5.3 Die Relaxation während der Repolarisierung

In der Phase der langsamen Repolarisation (3) überwiegt der Kaliumstrom dem abnehmenden I_{Ca} , sodass das Membranpotenzial absinkt. Dies erklärt sich durch den sinkenden chemischen Gradienten für Kalzium nach intrazellulär, wie auch den direkten Feedback-Mechanismus durch Calmodulin am DHPR (Qin u. a. 1999; Peterson u. a. 1999). Es kommt wieder zur vollständigen Repolarisation auf ca. -80 mV (Bers 2001).

Voraussetzung für die simultane Relaxation der Myofilamente ist die Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Export des Ions aus dem Zytosol. Dafür stehen hauptsächlich vier Mechanismen zur Verfügung: Die SERCA, der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX), die sarkolemmale Kalzium-Pumpe sowie der Kalzium-Uniporter des Mitochondriums (MCU).

Während die letzten beiden jeweils nur rund 1% des Ca-Effluxes ausmachen (Bassani u. a. 1992), konnte der SERCA im Kaninchen ein Beitrag von beinahe 70% der Ca-Elimination zugesprochen werden (Bers & Bridge 1989); von einer ähnlichen Verteilung im Menschen ist auszugehen. Die im Herzen dominierende Isoform ist die SERCA2a. Neben Phosphorylierungs- und Aktor-Domäne findet sich zudem eine Nucleotid-Domäne zur Bindung von ATP (Toyoshima u. a. 2000). Das Enzym

transportiert so unter Verbrauch eines ATP-Moleküls pro Zyklus zwei Kalziumionen in das SR (Tada u. a. 1982). Neben einer Modulation der Transportrate durch die zytosolische Kalziumkonzentration und, zu einem geringeren Grad, der Energiezufuhr durch ATP, erfolgt eine Regulation über das zytosolische Protein Phospholamban (PLN). Seine Bindung an die SERCA führt zu einer Abnahme der Kalziumaffinität durch Erhöhung der Michaelis-Konstante für Kalzium (LaRaia & Morkin 1974; Hicks u. a. 1979). Wird PLN an Serin 16 phosphoryliert, bewirkt eine Konformationsänderung die Disinhibition der SERCA. Diese Regulation ist bei beta-adrenerger Stimulation über die zyklisches-Adenosinmonophosphat(cAMP)-abhängige PKA möglich (Gustavsson u. a. 2013). Eine weitere Modulation an PLN kann über die Phosphorylierung an Threonin 17 durch die kardiale CaMKII erfolgen, sodass die SERCA eine gesteigerte Affinität gegenüber Ca aufweist (Simmerman u. a. 1986). Der Vorgang ist durch die kardiale Protein-Phosphatase-1 reversibel (Steenart u. a. 1992).

Der zweite relevante Mechanismus der Kalzium-Elimination erfolgt über den Natrium/Kalzium-Austauscher; im Herzen über die Isoform NCX1. Der Antiporter transportiert passiv, entlang des NKA-abhängigen chemischen Gradienten, drei Natrium-Ionen, im Austausch mit einem Kalzium-Ion, ins Zytosol. So wird netto eine positive Ladung in die Zelle befördert. Der Transport ist damit elektrogen und abhängig vom Membranpotenzial sowie den intra- und extrazellulären Konzentrationen von Natrium und Kalzium. Dadurch ergibt sich eine potenzielle Reversibilität des Transporters: Ist $E_m > E_{Na/Ca}$ oder kommt es zu einem übermäßigen Anstieg von zytosolischem Natrium, wechselt der NCX in den „reverse mode“, in dem ein Kalziumion in die Zelle gepumpt wird und dafür 3 Na exportiert werden (Hirota u. a. 2007). Dies ist zum Beispiel auch für einen kurzen Zeitraum während des Aufstrichs im Aktionspotenzial und den damit einhergehenden Veränderungen im Membranpotenzial zu beobachten; der resultierende Kalziumstrom liefert jedoch keinen relevanten Beitrag zum Kalziumstrom in die Zelle (Bers 2001). Lokalisiert scheint der NCX vor allem im Sarkolemm sowie im Bereich der T-Tubuli (Kieval u. a. 1992; Frank 1992; Chen u. a. 1995).

Durch den Vorgang der Kalziumelimination sistiert die Kontraktion der Zelle und mit der simultanen Annäherung des Membranpotenzials an das Ruhemembranpotenzial wird schließlich die Phase der Relaxation eingeleitet. Um dieses nachfolgend aufrechtzuerhalten, bedarf es neben dem einwärts gerichteten Kaliumstrom die Arbeit der NKA, die unter ATP-Aufwendung die Gradienten für K und Na aufrechterhält (s.o.).

Die Ionenpumpe ist vor allem mit ihren α 1-, α 3- und β 1-Isoformen im Herzen vertreten (Allen u. a. 1992).

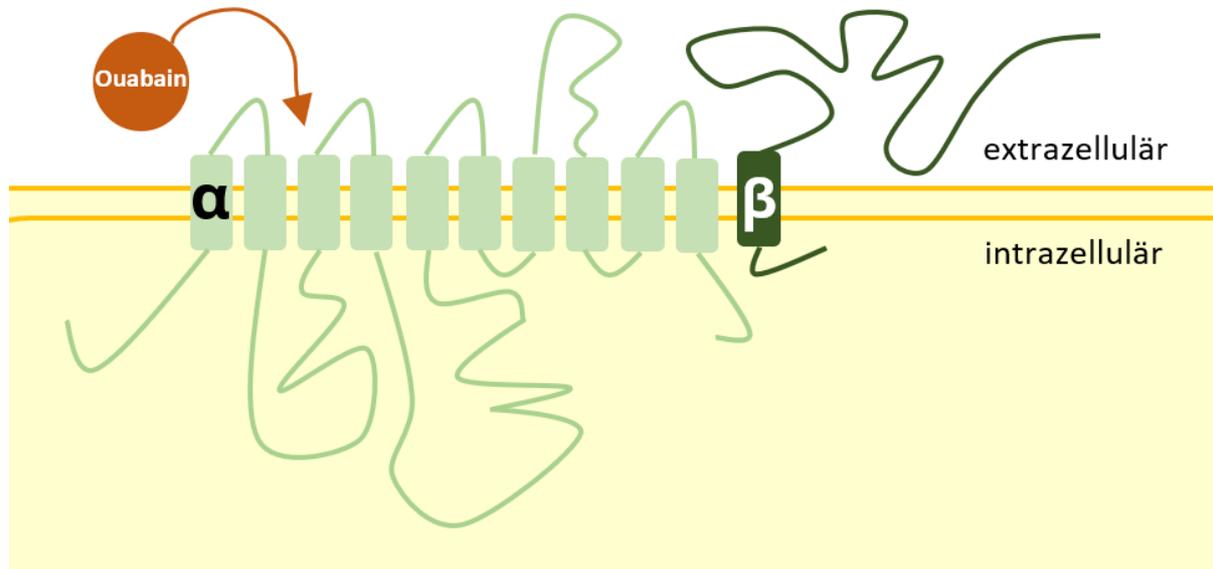


Abb. 1.5.3.1: Schematische Darstellung der Natrium-Kalium-ATPase mit ihren 10 transmembranen Domänen der alpha-Untereinheit. Eigene Abbildung nach Benarroch 2011.

Während die α -Untereinheit Bindungsstellen für das energieliefernde ATP, Phosphorylierungsenzyme und Inhibitoren wie Digitoxin oder Ouabain beherbergt, wird für die β -Untereinheit eine Funktion u.a. in der Lokalisation des Proteins vermutet; in der Herzinsuffizienz konnte bereits für beide eine Reduktion in der Expression beobachtet werden, mit potenziell negativen Auswirkungen auf die Ionenhomöostase der Zelle (Schwinger u. a. 1999).

1.6 Klinik und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz definiert sich als Unvermögen des Herzens zur adäquaten Versorgung des Körpergewebes mit sauerstoffreichem Blut (McMurray u. a. 2012). Im klinischen Alltag kann sich dies als Atemnot, progredienter Leistungsabfall und, durch einen Rückstau des Bluts in das Niederdrucksystem des Kreislaufs, mit pulmonalen und peripheren Ödemen präsentieren. Sowohl in Behandlung als auch Prävention stellt sie noch heute eine große Herausforderung für die Medizin dar. In Deutschland

steht die Herzinsuffizienz seit Jahren an dritter Stelle der häufigsten Todesursachen; 2015 verstarben daran 47.414 Menschen (Statistisches Bundesamt 2017b). In einer Zeit des demografischen Wandels gewinnt darüber hinaus die steigende Prävalenz und Hospitalisierungsrate aufgrund von Herzinsuffizienz im höheren Alter dramatisch an Relevanz (McMurray & Stewart 2000). So waren 2016 von den 455.680 Hospitalisierungen aufgrund von Herzversagen rund 89% der Patienten über 65 Jahre alt (Statistisches Bundesamt 2017a).

Pathophysiologisch ist die kardiale Insuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion unter 40% (HFrEF/heart failure with reduced ejection fraction) von einem reduzierten Leistungsvermögen trotz erhaltener Auswurfs (HFpEF/heart failure with preserved ejection fraction) zu unterscheiden, wobei eine mögliche Progredienz der HFrEF über die HFpEF nicht auszuschließen ist. Während diese Unterteilung im Sinne der Ätiologie und der klinischen Präsentation ihre Berechtigung trägt, betont sie vor allem die fortbestehende Diskrepanz in Therapiemöglichkeiten: Während für die HFrEF eine evidenzbasierte Therapie bereits Praxis ist, ist es bislang nicht gelungen, eine Therapie der HFpEF über die Behandlung der Ursachen und Komorbiditäten hinaus zu entwickeln (Laufs u. a. 2017). Dies ist besonders problematisch vor dem Hintergrund der steigenden Inzidenz der Herzinsuffizienzen mit erhaltener Ejektionsfraktion (Bhatia u. a. 2006).

Pathomechanistisch lässt sich diese Unterteilung ebenfalls nachvollziehen: So konnte anhand des Biomarker-Profiles beider Entitäten eine vermehrte Assoziation der HFpEF mit inflammatorischen Prozessen gezeigt werden, während mechanische Vorgänge wie die Dehnung des Myokards mit resultierender kontraktile Dysfunktion in der HFrEF zu beobachten sind (Tromp u. a. 2017). In der Tat ist die Aktivierung neurohormonaler Signalwege der initiale Mechanismus zur Aufrechterhaltung einer abnehmenden Auswurfleistung in der HFrEF. Es kommt zur verstärkten Aktivierung des Sympathikus sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), um durch periphere Vasokonstriktion und Volumenretention die herabgesetzte Auswurfleistung zu kompensieren (Swedberg u. a. 1990; Leimbach u. a. 1986). Im Verlauf bewirkt ersteres jedoch durch Überstimulierung eine verminderte Oberflächenexpression der beta-Rezeptoren im Myokard, sodass RAAS und Sympathikus noch weiter gesteigert werden, um nun das verminderte Ansprechen auf Adrenalin zu kompensieren (Fowler u. a. 1986). Es entsteht ein Teufelskreis, der die Progression der Herzinsuffizienz unterhält.

Zusätzlich kann die exzessive Stimulation des Sympathikus die Aktivierung von PKA und CaMKII bewirken (Grimm & Brown 2010). Letztere scheint dabei nicht nur wie lange vermutet durch erhöhte Kalziumspiegel (Curran u. a. 2007), sondern auch durch beta-adrenerg assoziierte Signalwege, wie zum Beispiel eine Nitrid-Oxid-abhängige Aktivierung, in ihrer Aktivität gesteigert (Curran u. a. 2014). Dieser Sachverhalt ist aufgrund der CaMKII-vermittelten Modulation Kalzium-regulierender Proteine in der Herzinsuffizienz von hohem pathophysiologischen Interesse.

Darüber hinaus werden Veränderungen auf zellulärer Ebene initiiert, sodass es im Rahmen des Remodelings der Kardiomyozytenstruktur zu einem erhöhten Gehalt an Kollagenfasern der Extrazellulärmatrix in Verbindung mit einer gesteigerten Proliferation der kardialen Fibroblasten kommt (Weber 1989). Dieser strukturelle Integritätsverlust ist mit der beobachteten kontraktile Dysfunktion und funktionellen Versteifung des kardialen Gewebes in Verbindung zu bringen (Diez 2002).

1.6.1 Veränderung des intrazellulären Natriums

Einer der zentralen Mechanismen in Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz ist die Dysregulation des Natriumhaushalts im einzelnen Kardiomyozyten.

Eine Erhöhung des intrazellulären Natriums im insuffizienten Gewebe ist bekannt (Pieske u. a. 2002; Despa u. a. 2002), Despa et al sahen einen erhöhten Tetrodotoxin-sensitiven Natrium-Influx bei unveränderter Aktivität der NKA. Es finden sich jedoch auch Berichte über eine reduzierte Expression und Aktivität der NKA in der Herzinsuffizienz (Schwinger u. a. 1999) mit dem Resultat einer erhöhten zytosolischen Natriumkonzentration als Folge einer verminderten Extrusion (Swift u. a. 2008). Als weitere Ursache wird der erhöhte Einstrom via des späten Natriumstroms diskutiert, dessen Steigerung in der Herzinsuffizienz bereits gezeigt werden konnte (Valdivia u. a. 2005; Sossalla u. a. 2008). Auch ist ein erhöhter Influx des Ions über eine gesteigerte Aktivität oder Expression des Natrium-Protonen-Tauschers (NHE) in der Herzinsuffizienz möglich (Yokoyama u. a. 2000; Trum u. a. 2020), wodurch ein Anstieg im zytosolischen Natrium begründet werden kann (Baartscheer, Schumacher, Van Borren, u. a. 2003). Für diesen Transporter konnte bereits eine Modulation durch die kardiale CaMKII gezeigt werden (Vila-Petroff u. a. 2010). Dieses Vermögen birgt im Kontext der Herzinsuffizienz mit einer gesteigerten Aktivität der CaMKII eine

pathomechanistische Relevanz und eröffnet Möglichkeiten der therapeutischen Intervention mit dem NHE als Zielstruktur.

Auch lässt sich als Resultat der erhöhten Natriumkonzentration der insuffizienten Kardiomyozyten ein thermodynamisch bedingter Wechsel des NCX in den Reverse-Mode beobachten, sodass Natrium nach extrazellulär transportiert wird. Dieser Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Kontraktilität führt zu einem erhöhten Kalziumangebot in der Zelle. Dies mag sich anfangs noch positiv auf die Inotropie auswirken, birgt jedoch im Verlauf, durch eine übermäßige Erhöhung des diastolischen Kalziums, die Gefahr der kontraktile Dysfunktion (Baartscheer, Schumacher, Beltermann, u. a. 2003). Darüber hinaus steigt mit erhöhtem Kalziumgehalt des SR die Wahrscheinlichkeit für diastolische Kalzium-Sparks (Shannon u. a. 2002) und somit die Gefahr proarrhythmogener Potenziale.

Des Weiteren erhöht der gesteigerte zytosolische Natriumgehalt dessen chemischen Gradienten über die Mitochondrienmembran. Über den mitochondrialen Natrium-Kalzium-Austauscher (mNCX) kommt es durch den vermehrten Export von Kalzium ins Zytosol zu einer Depletion des dortigen Speichers. Da Kalzium ein relevanter Bestandteil der Atmungskette ist, wird die Regeneration von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) beeinträchtigt. Es resultiert ein gestörter Energiehaushalt sowie ein unzureichender Oxidationsschutz (Maack u. a. 2006), der über die gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies die Progression der Herzinsuffizienz weiter fördern und Arrhythmien begünstigen kann (Wagner u. a. 2013).

1.6.2 Die Kalziumdynamik in der Herzinsuffizienz

Der Kalziumhaushalt zeigt sich in der Herzinsuffizienz mit verminderter systolischer Kalziumfreisetzung aus dem SR und Beeinträchtigung des zellulären Kontraktionsvermögens (Pogwizd u. a. 2001).

Eine Vermutung dafür ist ein verminderter Kalziumstrom I_{Ca} durch die DHPR, über deren reduzierte Dichte (Chen 2002) und Expression (Takahashi u. a. 1992) im insuffizienten Myokard bereits berichtet wurde, sodass es zu einer reduzierten Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung aus dem SR kommt. Darüber hinaus könnte ein reduzierter SR-Gehalt durch verminderte Aufnahme bzw. reduziertes Angebot von

Kalzium im Zytosol während der Relaxation (Pogwizd u. a. 2001) oder durch ein erhöhtes SR-Leck verursacht sein (Maier 2003; Curran u. a. 2007). Letzteres wird u.a. der Aktivität der CaMKII zugeschrieben, die bei chronischer beta-adrenerger Stimulation in der Herzinsuffizienz zur vermehrten Phosphorylierung des RyR2 aktiviert wird, sodass dessen erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit das diastolische Kalziumleck aus dem SR steigert. Pathomechanistisch wird darüber hinaus eine Kalzium-unabhängige Aktivierung des Enzyms über Stickstoffmonoxid diskutiert (Curran u. a. 2014; Gutierrez u. a. 2013).

Für die SERCA konnte in der Vergangenheit eine verminderte Aktivität und Expression in der Herzinsuffizienz gezeigt werden (Schmidt u. a. 1998; Hasenfuss u. a. 1994), während beide Eigenschaften für den NCX als erhöht nachgewiesen wurden (Studer u. a. 1994; Pogwizd u. a. 1999). So könnte ein verminderter diastolischer Rücktransport des Kalziums via SERCA nicht nur zu einer Reduktion der SR-Kalzium-Speicher führen, sondern durch die gesteigerte Forward-Funktion des NCX auch eine sukzessive Kalziumdepletion der Zelle fördern (Belevych u. a. 2007) mit dem Korrelat einer Reduktion der systolischen Kalziumtransientenamplituden und damit der Kontraktionskraft (Maier 2003), die durch eine Hyperphosphorylierungs-bedingte Funktionsstörung (Marx u. a. 2000) oder veränderte Genexpression (Arai u. a. 1993) des RyR2 noch weiter beeinträchtigt sein kann. Somit wird durch das erhöhte Kalziumleck des SRs nicht nur dessen Speicher weiter geleert; auch kann ein Anstieg des diastolischen Kalziums durch eine Sensitivierung des RyR2 zu weiteren Sparks führen (Maier 2003). Im Falle einer nicht-kompensierten Kalzium-Überladung der Zelle ist hier darüber hinaus eine Beeinträchtigung der diastolischen Funktion im Sinne einer gestörten Relaxationsfähigkeit möglich (Hasenfuss 1998).

1.6.3 Proarrhythmogene Potenziale

Die kontraktile Dysfunktion als Resultat des gestörten Kalziumhaushalts bewirkt über die Aktivierung des Sympathikus eine Phosphorylierung von PLN mit dem Ziel der Zunahme des SR-Kalziumgehalts, um so der Kalzium-Depletion entgegenzuwirken (Gustavsson u. a. 2013). Aufgrund der Leak-Load-Beziehung (Shannon u. a. 2002) kommt es durch den erhöhten Kalziumgehalt des SR aber auch zu vermehrten spontanen Kalziumfreisetzungen aus diesem, die in Verbindung mit der erhöhten Aktivität des NCX eine Transport-abhängige Depolarisation bewirken. Der dabei

entstehende, nach innen gerichtete Ionenstrom I_{ti} favorisiert die Entstehung getriggelter arrhythmischer Aktivität. Begünstigt wird dies weiterhin durch ein destabilisiertes Membranpotenzial aufgrund eines verminderten I_{K1} (Beuckelmann u. a. 1993; Pogwizd u. a. 2001), sodass stärkere „delayed after-depolarizations“ (DAD) durch I_{ti} möglich werden, die als getriggerte Aktivität mit einer gewissen Latenz nach der Rückkehr zum Ruhemembranpotenzial zu verstehen sind (Bers 2001). Die resultierenden ventrikulären Arrhythmien werden durch die Pathophysiologie des Herzversagens in bedeutendem Maße begünstigt, sodass in fast 100% der non-ischämischen und ca. der Hälfte der ischämischen Herzinsuffizienzen Arrhythmien ausgelöst werden (Pogwizd u. a. 2001). Darüber hinaus leisten sie den größten ursächlichen Beitrag an den rund 35% der herzinsuffizienten Patienten, die am plötzlichen Herztod im Rahmen ihrer Grunderkrankung versterben (Packer 1985).

1.7 Hypothesen und Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung des SGLT2-Inhibitors Empagliflozin auf isolierte Herzmuskelzellen genauer zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Modulation von Natrium- und Kalziumhaushalt sowie deren Interaktion zur vorteilhaften Beeinflussung systolischer und diastolischer Messgrößen im einzelnen Kardiomyozyten. Diese Wirkungen könnten eine potenzielle Relevanz für die klinische Anwendung von Empagliflozin in der humanen Herzinsuffizienz nach sich ziehen.

Analog zum Forschungsstand zu Beginn der Arbeit wurden folgende Hypothesen zur Überprüfung formuliert:

1. Empagliflozin kann eine direkte Wirkung auf den Natrium- und Kalziumhaushalt einzelner isolierter Kardiomyozyten ausüben, die unabhängig vom Glukosestoffwechsel des Organismus ist
2. Empagliflozin senkt den intrazellulären Natriumspiegel in gesunden Wildtyp-Kardiomyozyten der Maus
3. Empagliflozin beeinflusst den Kalziumhaushalt im Sinne einer verbesserten Kontraktionsvermögen in der Systole in gesunden Wildtyp-Kardiomyozyten der Maus
4. Empagliflozin beeinflusst die intrazelluläre diastolische Kalziumkonzentration und die spontanen diastolischen Kalziumfreisetzungen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in gesunden Wildtyp-Kardiomyozyten der Maus
5. Die mechanistische Wirkweise wird durch die Empagliflozin-vermittelte Modulation der kardiomyozytären Natrium-Kalium-ATPase vermittelt
6. Die beobachteten Effekte im murinen Wildtyp lassen sich im Mausmodell der HFrEF mittels artifizieller Nachlasterhöhung sowie in isolierten Kardiomyozyten der humanen HFrEF reproduzieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mausmodelle

2.1.1 C57 Black 6/J Wildtypen

Für die nachfolgend beschriebenen murinen Zellkulturexperimente wurden isolierte Ventrikelkardiomyozyten vom männlichen C57-Black6/J-Wildtyp-Mäusen im Alter von 8 – 12 Wochen der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld) verwendet. Bis zum Beginn des Experiments, das die Verwendung der Zellen für Isolation, Kultur und nachfolgende Messungen am Konfokal- und Fluoreszenzmikroskop vorsah, erfolgte eine artgerechte Haltung und Versorgung im zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Regensburg.

2.1.2 Das murine Herzinsuffizienzmodell mit chronischer Nachlasterrhöhung

Um die Wirkung von Empagliflozin auf die elektromechanische Kopplung im herzinsuffizientem Myokard zu untersuchen, wurde ein murines Modell der chronischen Nachlasterrhöhung verwendet. Da humanes Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz nur sehr eingeschränkt verfügbar ist, sind Experimente zur Evaluation der Empagliflozinwirkung in Modellen der murinen Herzinsuffizienz von großer Bedeutung. Mittels der etablierten Methode der transversen Aortenkonstriktion (TAC) erfolgte eine Teilligatur der Aorta zur Reduktion des transversalen Gefäßdurchmessers. Die resultierende artifizielle Nachlasterrhöhung führte somit, über einen Zeitraum von zwei Wochen, zu einer linksventrikulären Hypertrophie und konsekutiv, bei Dekompensation des linken Ventrikels, zur dilatierten Herzinsuffizienz (Rockman u. a. 1991).

Dafür wurde den ca. 12 Wochen alten Mäusen zwei Tage vor bis sieben Tage nach dem Eingriff Metamizol (1,33 mg/mL) zum Trinkwasser gegeben, um eine adäquate Analgesie zu gewährleisten. Zusätzlich erfolgte eine Stunde vor der Operation die subkutane Applikation von Buprenorphin (60 µg/kg Körpergewicht), sowie kurz vor Beginn die intraperitoneale Gabe von Medetomidin (0,5 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg)

und Fentanyl (0,05 mg/kg Körpergewicht) zur Narkoseeinleitung. Nach Wirkungseintritt der Substanzen wurde die Maus auf einer Wärmeplatte fixiert, um bei konstanter Temperatur um 37°C einem Abfall der Körperkerntemperatur durch die Narkose-bedingte Vasodilatation entgegenzuwirken. Im Anschluss wurde mit einem circa 1,5 cm weiten Schnitt über dem Sternum der Aortenbogen dargestellt. Nach Identifikation der transversalen Aorta zwischen Truncus Brachiocephalicus und Abgang der A. Carotis sinistra konnte diese mit einem chirurgischen 6.0 Faden umschlungen werden; eine stumpfe 27G-Kanüle auf der Aorta diente dabei als Leitstruktur für den gewünschten Durchmesser der Stenose. Anschließend wurde die Haut mittels Knopfnähten wieder verschlossen. Nach intraperitonealer Antagonisierung der Narkose mit Atipamezol (2,5 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht) wurden die Tiere bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins zur Überwachung auf der Wärmeplatte behalten.

Zur Verifizierung der eingetretenen Herzinsuffizienz durch Nachlasterhöhung erfolgte nach einem Zeitraum von 5 Wochen eine echokardiographische Untersuchung der kardialen Pumpfunktion. Dies wurde unter Isofluran-Anästhesie mit konstantem Monitoring von Atemfrequenz, Körpertemperatur und Herzaktivität im EKG durchgeführt. Die untersuchten Parameter umfassten die Septumdicke zwischen beiden Kammern, die anteriore und posteriore Myokardwanddicke der Herzens, den linksventrikulären enddiastolischen Druck, die linksventrikuläre Kavität in Diastole und Systole, die maximale linksventrikuläre Länge sowie das systolische und diastolische Volumen des linken Ventrikels mit daraus abgeleiteter Ejektionsfraktion (s. 3.1.1).

2.1.3 Murine Zellisolation

Die Isolierung der murinen Ventrikelkardiomyozyten erfolgte nach dem etablierten Protokoll des Labors der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maier.

Vor der Tötung wurden die Mäuse in einem Narkosekäfig mit einer körperrgewichtsadaptierten Menge an Isofluran betäubt. Nach Beurteilung einer erfolgreichen Sedierung anhand von flacher Atmung und fehlendem Lidreflex, wurde durch eine zervikale Dislokation die Blutzufuhr zum Gehirn unterbrochen und somit der sofortige Tod des Tieres herbeigeführt. Es erfolgte die v-förmige Eröffnung des Sternums zur Identifizierung und Präparation des Herzens.

Isolationstyrode	1x	
	NaCl (Sigma-Aldrich)	113,00 mM
	KCl (Merck)	4,70 mM
	KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,60 mM
	MgSO ₄ x7H ₂ O (Sigma-Aldrich)	1,20 mM
	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O (Merck)	0,60 mM
	NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich)	12,00 mM
	KHCO ₃ (Sigma-Aldrich)	10,00 mM
	HEPES (Sigma-Aldrich)	10,00 mM
	Taurin (Sigma-Aldrich)	30,00 mM
	Phenol-Red (Sigma-Aldrich)	0,032 mM
	Glukose (Merck)	5,50 mM
	BDM Stock (Sigma-Aldrich)	10,00 mM

Tab. 2.1: Gelöst in Aqua Pura (Braun); mit NaOH auf pH 7,42 bei 36,5 °C eingestellt.

Dieses wurde, auf Höhe der Aorta ascendens von den umgebenden Gefäßen abgetrennt, dem Thorax entnommen, in einer umgebungswarmen Tyrodenlösung (s. Tab. 2.1) sanft ausgedrückt, um Blutresiduen zu entfernen und Thromben vorzubeugen, und zuletzt gewogen. Anschließend folgte die Kanülierung auf eine 10G-Spritze durch das Lumen der Aorta.

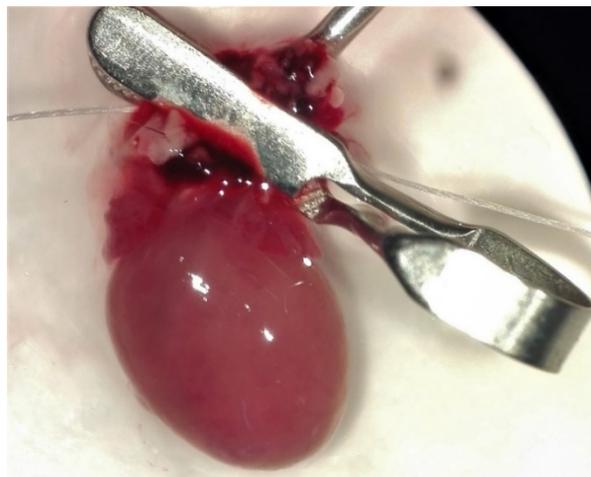


Abb. 2.1.3.1: Ein Blick durch das Licht-Mikroskop nach Kanülierung der Aorta. Eigene Abbildung.

Nach erneuter Spülung des Herzens mit Isolationstyrode, bis zur Entfärbung der Herzkranzgefäße, wurde das Herz samt Kanüle an einem Langendorff-Apparat angebracht und für 7,5 min von einer Trypsin- und Liberase-haltigen Enzymlösung durchspült (s. Tab 2.2), um die Loslösung einzelner Zellen aus dem Gewebeverband zu erreichen.

Enzymlösung		
Liberase TM		140 μ L
Trypsin 10x	2,5 %	85 μ L
CaCl ₂ (Sigma-Aldrich)	0,0125 mM	25 μ L
Stopplösung		
BCS (Sigma-Aldrich)		250 μ L
CaCl ₂ (Sigma-Aldrich)	0,0125 mM	3,125 μ L

Tab. 2.2: Enzymlösung gelöst in 20 mL Isolationstyrode 1x. Stopplösung gelöst in 2,25 mL Isolationstyrode 1x.

Die Tyrode floss dabei unter Sauerstoffanreicherung und optimalen Druckverhältnissen über die Aorta in die Koronarien und gelangte durch das Myokard in die Ventrikel, um letztlich über die untere Hohlvene wieder auszutreten (Langendorff 1895).

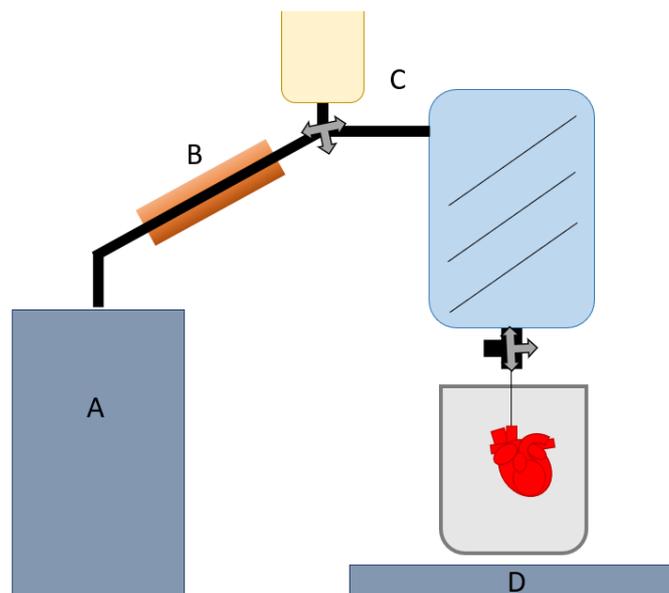


Abb. 2.1.3.2: Die modifizierte Apparatur nach Langendorff. A: Behältnis mit Enzymlösung; B: Heizung; C: Blasenfalle; D: Auffangbehältnis. Eigene Abbildung nach Langendorff 1895.

Nach Ablauf der Zeit wurde das Herz vom Apparat genommen, die Ventrikel vorsichtig von den Vorhöfen separiert und in eine Stopplösung mit bovinem Kalb-Serum (BCS) (s. Tab. 2.2) gegeben, um einen weiteren Verdau der Zellmembranen zu verhindern. Anschließend konnten die einzelnen Zellen durch leichte mechanische Manipulation endgültig aus ihrem Verband gelöst werden. Um die vitalen von den avitalen Zellen und anderen ungewollten Bestandteilen der erhaltenen Suspension zu trennen, erfolgten mehrere Aufreinigungsschritte sowie ein simultaner Kalziumaufbau mit Kalziumchlorid (CaCl_2) auf 1 mM (s. Tab. 2.3), um die physiologische Kalziumkonzentration im kardialen Gewebe aufrechtzuerhalten (Allen u. a. 1984).

Kalziumaufbau		
0,1 mM	BCS (Sigma-Aldrich)	250 μL
	CaCl_2 (Sigma-Aldrich)	100 mM 5 μL
	Isol.-Tyrode 1x	4,75 mL
0,2 mM	BCS (Sigma-Aldrich)	250 μL
	CaCl_2 (Sigma-Aldrich)	100 mM 10 μL
	Isol.-Tyrode 1x	4,75 mL
0,4 mM	BCS (Sigma-Aldrich)	250 μL
	CaCl_2 (Sigma-Aldrich)	100 mM 20 μL
	Isol.-Tyrode 1x	4,75 mL
0,8 mM	BCS (Sigma-Aldrich)	500 μL
	CaCl_2 (Sigma-Aldrich)	100 mM 80 μL
	Isol.-Tyrode 1x	9,50 mL

Tab. 2.3: Kalziumaufbau nach erfolgreicher Zellisolation.

Um die Effektivität der Reinigungsschritte zu überprüfen, wurden die erhaltenen vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop beurteilt, bevor sie weiteren Experimenten zugeführt wurden.

2.2 Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz

Die Arbeit mit humanen ventrikulären Myozyten wurde durch die großzügige Spende von Patienten in terminaler Herzinsuffizienz mit bevorstehender Herztransplantation ermöglicht. Dafür wurden die Beteiligten mit ausreichend zeitlichem Abstand zum Eingriff über die geplante Verwendung ihres explantierten Herzens aufgeklärt, um nach ausreichend Bedenkzeit dem Vorhaben schriftlich zuzustimmen. Die Zusammenarbeit mit dem herzchirurgischen Team des Universitätsklinikums Regensburg ermöglichte die nahtlose Übergabe der entnommenen Herzen im Rahmen des Transplantationsvorgangs. Noch im OP wurde das Herz direkt nach Entnahme in einer Custodiol und 2,3-Butanedione-Monoxime-(BDM)-50x-haltigen Lösung auf Eis gelagert und die entsprechenden Gewebestücke aus dem linken Ventrikel entnommen. Die Angaben über den Spender, die zugrundeliegende Ätiologie sowie die Befunde der echokardiographischen Voruntersuchungen wurden anonymisiert dokumentiert (s. 3.1.2).

2.2.1 Humane Zellisolation

Das gewonnene humane Biomaterial wurde vor Beginn der Isolation von umgebenden Fett- und Bindegewebsstrukturen befreit und anschließend gewogen. Erwünscht war ein Gewicht des Gewebestücks von mindestens 100 mg. Danach erfolgte die Teilung in einzelne 1-2 cm große Stücke sowie die Überführung in Joklik-Minimal-Essential-Medium-(JMEM-)haltige Falcons (s. Tab. 2.4) zur Aufreinigung des Gewebes.

Für die Enzym-vermittelte Isolation der humanen Kardiomyozyten wurde das Material in einem Isolationsgefäß mit der Startenzymlösung aus einer Kollagenase Typ 5 (C5) und Trypsin in Kontakt gebracht, um unter konstanter Agitation 45 Minuten bei 37°C verdaut zu werden (s. Tab. 2.4).

Startenzymlösung		
JMEM (gibco)		20 mL
Trypsin 10x	2.5 %	ca. 1 mL (je nach Gewebsqualität)
Kollagenase 5 *		10 mg

Tab. 2.4: Startenzymlösung humaner Zellisolation. *(Worthington; Collagenase V; LS005283; Lot: SX4D14878; 5g; 520 U/mg)

Nach Ablauf der Zeit erfolgte eine erneute Aufreinigung zur Entfernung avitaler Zellen und anschließend die Zugabe einer zweiten Kollagenase-5-haltigen Enzymlösung (s. Tab. 2.5).

Enzymlösung	
JMEM (gibco)	40 mL
Kollagenase 5 *	40 mg

Tab. 2.5: Enzymlösung humaner Zellisolation, *(Worthington; Collagenase V; LS005283; Lot: SX4D14878; 5g; 520 U/mg)

Nach zehn Minuten wurde der avitale zelluläre Überstand nochmals verworfen und die restlichen Zellen durch einen Sieb in einen neuen Behälter überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 700 Umdrehungen pro Minute konnte das erhaltene Pellet aus isolierten Zellen unter dem Mikroskop auf Qualität und Quantität überprüft und dann nachfolgenden Experimenten zugeführt werden.

2.3 Zellkultur

Zur Kultivierung der gewonnenen Kardiomyozyten erfolgte direkt nach erfolgreicher Isolation ein gradueller intrazellulärer Kalziumaufbau auf 1 mmol/L, um physiologische Ionenkonzentrationen zu gewährleisten. Gleichzeitig wurde unter sterilen Bedingungen an der Werksicherheitsbank das benötigte Kulturmedium (s. Tab. 2.6) angefertigt. Dies beinhaltete, neben einem Minimal-Essential-Medium, bovines Serum-Albumin (BSA) zur Stabilisierung der Zell-Enzyme, L-Glutamin und Insulin-Transferrin-Selenium zur Ernährung der Zellen, Penicillin/Streptomycin zur

antibakteriellen Prophylaxe sowie 2,3-Butanedion-Monoxim (BDM) zur Inhibition der Aktin-Myosin-Interaktion am Sarkomer der Kardiomyozyten.

Kulturmedium			
	Penicillin/Streptomycin 100x (life technologies)		1 mL
	Insulin-Transferrin-Selenium G 100x (life technologies)		1 mL
	L-Glutamin 100x	2 mM	1 mL
	BDM 50x (Sigma Aldrich)	10 mM	2 mL
	BSA (Sigma Aldrich)	0,1 %	1,33 mL
<i>Intervention:</i>	Empagliflozin Stock (Cayman Chemical Company)	10 mM	10,0 µL
<i>Kontrolle:</i>	DMSO (Roth)		10,0 µL

Tab. 2.6: Gelöst in Minimal-Essential-Medium (gibco) auf 100 mL.

Darüber hinaus wurde jeweils 1 µmol/L des SGLT2-Inhibitors Empagliflozin oder eines Dimethylsulfoxids (DMSO) als Vehikelsubstanz hinzugegeben. Die gewählte Dosierung garantierte dabei einerseits die Sättigung des SGLT2-Rezeptors (Grempler u. a. 2012), andererseits befand sie sich aufgrund der korrespondierenden Dosis von 50 mg Empagliflozin pro Tag (resultierende Plasmakonzentration: 0.951-1.970 µmol/L) im klinisch relevanten Bereich von Dosen bis zu 800 mg/Tag (Scheen 2014). 20 mL der hergestellten Medien konnten im Anschluss vorsichtig mit jeweils der Hälfte der isolierten Zellen in sterilen 30 mL Kulturschalen zusammengeführt und für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-gesättigter Raumluft kultiviert werden.

2.4 Eigenschaften verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Untersuchung der kardialen Natrium- und Kalziumhomöostase erfolgte der Einsatz von Farbstoffen, die durch selektive Bindung freier intrazellulärer Ionen die Absorptions- und Emissionsspektren ihrer Fluoreszenz verändern; sodass Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen ohne Integritätsverlust der

Zellmembran sichtbar werden. Die Farbstoffe fungieren hier als Chelatoren, um mit freien Ionen Komplexe eingehen zu können (Gryniewicz u. a. 1985).

Die Korrelation von Fluoreszenz und Ionenkonzentration beruht auf der Absorptionbereitschaft für hochenergetische Photonen der freien Elektronen der Farbstoffe. Diese werden somit auf ein höheres Energieniveau angehoben und verweilen dort kurz, um sich dann wieder auf die energetisch niedrigste Stufe zu begeben und dabei ein nieder-energetischeres Photon freizusetzen. Folglich besitzt das emittierte Teilchen eine längere Wellenlänge als die des imittierten Photons (Albani 2008). Diese Verschiebung in den rotwelligen Bereich wird auch als Stokes-Shift bezeichnet und bildet die Grundlage für die Anwendung der Fluoreszenz in der Darstellung von intrazellulären Ionenverhältnissen (Stokes 1852). Die für die Fluoreszenz unabdingbaren Anionen erschweren die Farbstoffbeladung der Zellen erheblich, sodass Acetoxymethylester eingesetzt werden. Die Veresterung sorgt für eine Neutralisierung der negativen Ladung, sodass die Farbstoffmoleküle weitgehend ungehindert durch die Zellmembran diffundieren. Im Zytosol angekommen werden sie von unspezifischen Esterasen zu aktivem Farbstoff gespalten und somit am Austritt aus der Zelle gehindert. Dies ermöglicht nach Auswaschen des extrazellulären Farbstoffes eine spezifische Untersuchung zytosolischer Ionenverhältnisse.

Generell sind die ratiometrischen von den nicht-ratiometrischen Farbstoffen zu unterscheiden. Erstere weisen sowohl in An- als auch in Abwesenheit der entsprechenden Ionen eine Fluoreszenz bei Exzitation mit einer bestimmten Wellenlänge auf; durch die Bindung kommt es lediglich zur Verschiebung der Absorptions- oder Emissionsmaxima. Dies erlaubt es, Quotienten aus beiden Emissionsspektren zu bilden. Bestrahlt man z.B. bei dem Farbstoff FURA2 Zellen erst mit einer Wellenlänge von 340 nm, wird nur der Farbstoff mit gebundenem Kalzium zur Emission angeregt. Die anschließende Bestrahlung mit 380 nm wiederum interagiert nur mit ungebundenem FURA2. Der Quotient der Fluoreszenzemission unter 340 nm und 380 nm liefert somit eine repräsentative und konstante Ratio für den Kalziumgehalt der Zelle, die nicht von der absoluten Farbstoffbeladung derer abhängig ist. Verständlich wird dies mit der von Gryniewicz 1985 formulierten Gleichung:

$$[Ca^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad [2.4.1]$$

[Ca²⁺]: intrazelluläre Kalziumkonzentration; K_d: Dissoziationskonstante; R: errechnetes Ratio aus Numerator und Denominator; R_{min}: minimales Ratio bei nahezu Ca²⁺-freier Eichlösung; R_{max}: maximales Ratio bei gesättigter Ca²⁺-Eichlösung; S_{f2}: Fluoreszenz in Ca²⁺-freier Eichlösung; S_{b2}: Fluoreszenz in gesättigter Ca²⁺-Eichlösung.

Die nicht-ratiometrischen Farbstoffe hingegen ändern bei Bindung die Intensität der Emissionsfluoreszenz, es kommt zu keinen nennenswerten Verschiebungen von Absorptions- oder Emissionsmaxima (Gee u. a. 2000). Daraus folgt, dass die Farbstoffe ohne Bindung effektiv kein Signal abgeben, weshalb hier die Beladung der Zellen untereinander mehr ins Gewicht fällt.

2.4.1 FURA2-AM

Die Charakterisierung der zellulären Kalziumhomöostase unter Empagliflozin erfolgte u.a. mit dem ratiometrischen Farbstoff FURA2-AM.

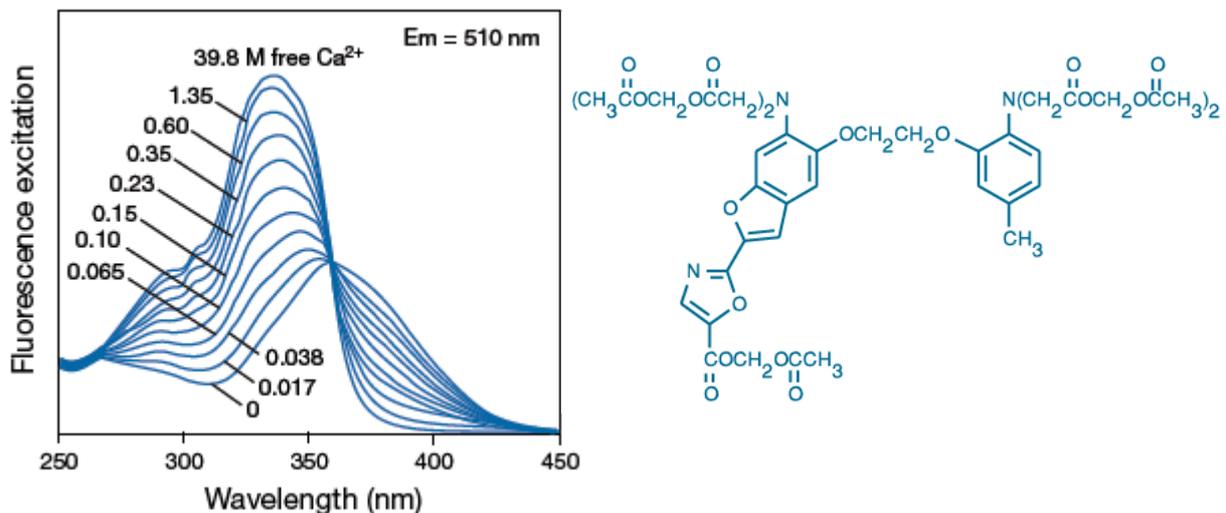


Abb. 2.4.1.1: Links: Reaktive Emissionsfluoreszenz bei 510 nm von FURA2 in Ca²⁺-haltiger Lösung. Rechts: Strukturformel von FURA2. Abbildung aus Thermo Fisher Scientific 2010a.

Durch seine hohe Selektivität für Kalzium im physiologischen Bereich (K_d = 140 nmol/L in Magnesium-freier Lösung) ist der Farbstoff ideal zur Beobachtung der intrazellulären

Kalziumdynamik sowie dessen Verteilung in den einzelnen Kompartimenten. Aufgrund der hohen Affinität des Indikators für andere divalente Kationen wie Magnesium ($K_d = 224 \text{ nmol/L}$ in 1 mmol/L-Mg^{2+} Lösung) oder Zink gilt es, deren Beeinträchtigung des Signals trotz niedriger Zytosolkonzentrationen zu berücksichtigen (Thermo Fisher Scientific 2010a). Durch die selektive Detektion von ausgeprägten Kalziumsignalen im $\mu\text{molaren}$ Bereich eignet sich FURA-2 dennoch ideal, um die Ionendynamik bereits im nanomolaren Bereich festzuhalten. Unter Kalziumbindung erfolgt eine strukturelle Veränderung des Farbstoffes, sodass sich dessen Absorptionsspektrum von 380 nm nach 340 nm verschiebt (Grynkiewicz u. a. 1985). Durch die alternierende Exzitation mit den beiden Wellenlängen ergibt sich mittels Erfassung der jeweiligen Emission bei 510 nm die Ratio F_{340}/F_{380} als Verhältnis der Werte von gebundenem („Numerator“ bei 340 nm) zu ungebundenem („Denominator“ bei 380 nm) Farbstoff. Die grafische Darstellung dieser Rohwerte ermöglicht eine Veranschaulichung in Form von Kalziumtransienten.

2.4.2 SBFI-AM

Die intrazellulären Natriumkonzentration in isolierten Kardiomyozyten erfolgte mit dem ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff SBFI-AM.

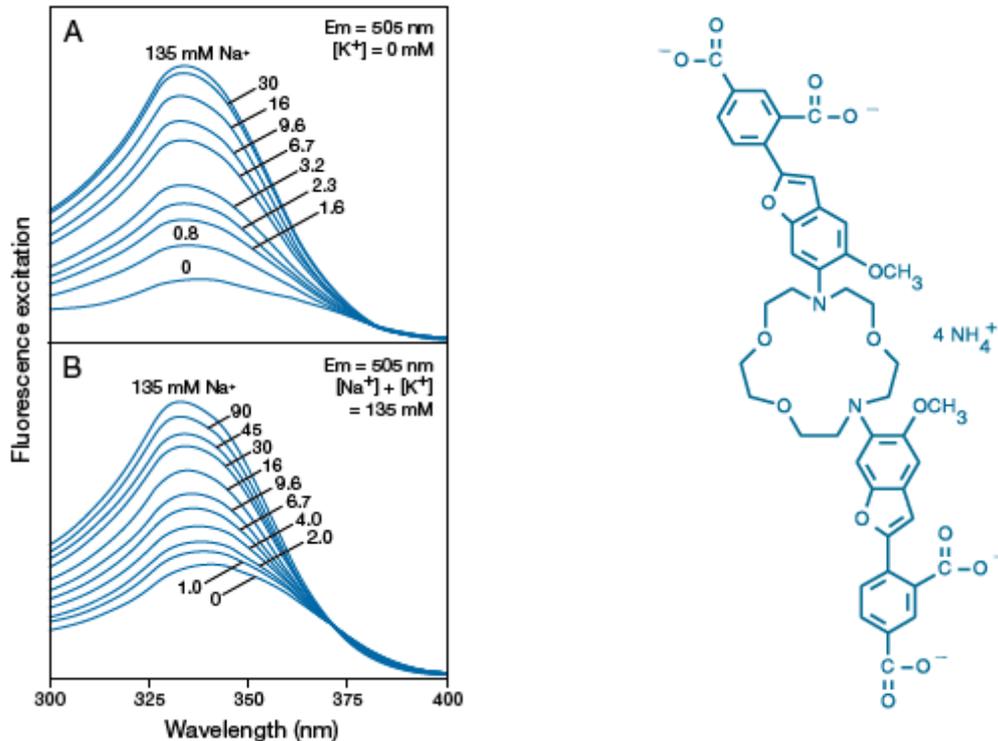


Abb. 2.4.2.1: Links: Reaktive Emissionsfluoreszenz bei 505 nm von SBFI in K^+ -freier Lösung (oben) sowie unter physiologischen Ionenverhältnissen (unten). Rechts: Strukturformel von SBFI. Abbildung aus Thermo Fisher Scientific 2010b.

Mit einer K_d von 3.8 mmol/L (in K^+ -freier Lösung) und einer 18-fachen Selektivität von Natrium über Kalium birgt auch SBFI eine gewisse Limitation in seiner Sensitivität; dennoch ist eine Beobachtung im physiologischen Bereich gut möglich (Thermo Fisher Scientific 2010b). Ähnlich wie bei FURA-2 werden Änderungen in der intrazellulären Ionenkonzentration durch eine Veränderung im Verhältnis der Emissionen von Licht bei 505 nm unter Anregung mit 340 und 380 nm registriert. Da wie bei FURA2 der Numerator einen konstanten Wert abbildet, während der Denominator mit steigender Anzahl an gebundenen Farbstoffmolekülen sinkt, steigt das erhaltene Ratio F_{340}/F_{380} aus Numerator und Denominator mit steigendem Natriumgehalt der Zelle an (Donoso u. a. 1992).

2.4.3 Fluo4-AM

Der nicht-ratiometrische Kalzium-Farbstoff Fluo4-AM ist ein Analogon des Vorgängers Fluo-3-AM, der durch die Substitution zweier Chlorid-Reste mit Fluor-Atomen eine Verschiebung des Absorptionsspektrums zu 488 nm aufweist. Es resultiert eine intensivere Fluoreszenz bei 510 nm unter Kalziumbindung nach Anregung mit einem Argonlaser (Thermo Fisher Scientific 2010a).

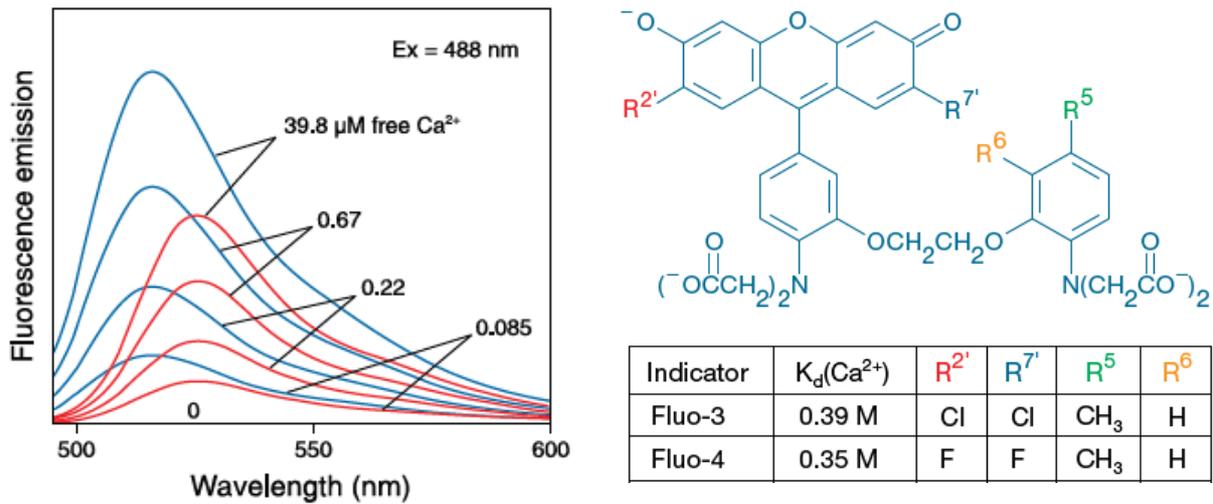


Abb. 2.4.3.1: Links: Dargestellt sind Emissionen von Licht nach Anregung mit 488 nm von Fluo-3 (rot) und Fluo-4 (blau). Fluo-4 zeigt gegenüber Fluo-3 eine Verschiebung des Spektrums in den blauen Bereich mit einem Emissionsmaximum bei 510 nm. Rechts: Strukturformel von Fluo-3 und Fluo-4 mit alternierenden Substituenten. Abbildung aus Thermo Fisher Scientific 2010a.

Der inaktive Farbstoff passiert als Hydroxylester die Zellmembran und wird im Zytosol durch intrazelluläre Esterasen in seine aktive Form gespalten. Ein Austritt in den Extrazellulärraum ist aufgrund der polaren Eigenschaften des aktiven Farbstoffes fortan nicht mehr möglich. Bei Bindung von freiem Ca kommt es zu einer ausgeprägten Steigerung der Fluoreszenzemission; die K_d beträgt dabei 345 nM. Da das emittierte Signal von Fluo-4 eine 60%-ige Steigerung gegenüber Fluo-3 zeigt, ergibt sich bei ersterem eine geringere Menge an benötigtem Kalzium, um ein registrierbares Signal zu erzeugen. Zusätzlich wird eine verkürzte Beleuchtungszeit durch den Laser ermöglicht, was die Phototoxizität für die Zelle minimiert (Gee u. a. 2000). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde Fluo-4 für die konfokale Registrierung von spontanen

diastolischen Kalziumfreisetzungen, den sogenannten Kalziumsparks aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der Kardiomyozyten, verwendet.

2.5 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht als Weiterentwicklung der konventionellen Lichtmikroskopie durch Bestrahlung des Untersuchungsobjekts mit hochenergetischen Photonen kurzer Wellenlänge die Registrierung einer reaktiven Emission von Licht längerer Wellenlängen.

2.5.1 Prinzip

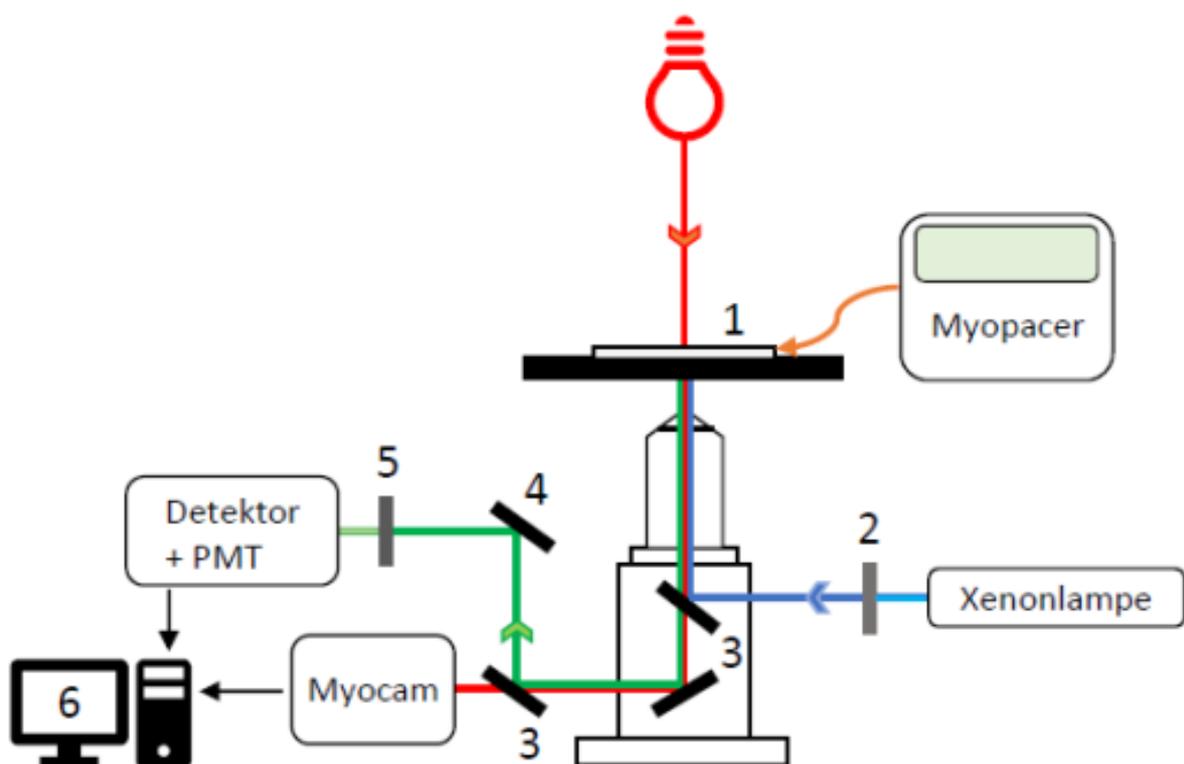


Abb. 2.5.1.1: 1: Objektisch mit Objektträger. 2: Exzitationsfilter. 3: dichroitische Spiegel, welche zum einen den Laserstrahl zum Objektträger umlenken, zum anderen den Rotlichtstrahl zur Myocam und das Emissionslicht des Farbstoffes Richtung PMT leiten. 4: reflektierender Spiegel. 5: Emissionsfilter, der sicherstellt, dass nur die emittierte Wellenlänge des Farbstoffes den Detektor erreicht. 6: Die lichtmikroskopische Darstellung der Zellen über die Myocam sowie die detektierte fluoreszenzmikroskopische Information werden am PC mithilfe des Programm IonWizard abgebildet. Eigene Abbildung nach IonOptix LLC 2010.

Die lichtmikroskopisch dargestellten Zellen auf dem Objektträger werden durch eine Myocam™ (IonOptix) aufgezeichnet, die diese wiederum als Echtzeit-Aufnahme am Bildschirm wiedergibt. Zur Anregung der fluoreszierenden Farbstoffe generiert eine hochenergetische Xenonlampe gleichzeitig eine Lichtquelle von charakteristischer kurzer Wellenlänge. Dieses kurzwellige Licht trifft auf einen unmittelbar nachgeschalteten Exzitationsfilter, der lediglich die den Farbstoff anregende Wellenlänge passieren lässt. Der gefilterte Lichtstrahl wird beim Zusammentreffen mit dem dichroitischen Spiegel nach oben auf das Objekt reflektiert, andere Wellenlängen treten durch den Spiegel hindurch. Der Farbstoff innerhalb der Zellen reagiert auf die Exzitation mit einer Emission von länger-welligerem Licht, welches durch einen Barrierefilter, der andere Lichtsignale blockiert, um Streulicht zu minimieren, vom Photomultiplier (IonOptix Corp, Milton, Mass.) detektiert und in ein digitales Signal umgewandelt wird (s. Abb. 2.5.1.1; IonOptix LLC 2010).

2.5.2 Messvorbereitungen

Direkt nach dem Kalziumaufbau (s. 2.1.3) oder nach einer Kultivierung für 24 Stunden wurden die vitalen isolierten Kardiomyozyten auf die Glasböden der Messkammern transferiert. Um eine Haftung der Zellen während der Messung zu gewährleisten, waren die Kammern vorab mit 2,5 µL des Glykoproteins Laminin („Zellkleber“) benetzt worden. Nach Übertragung der Zellen wurde ein Zeitraum von 15 Minuten gewährt, um deren Verbindung mit dem Untergrund sicherzustellen („Zellsettling“). Währenddessen konnte im Messraum das Epifluoreszenz-Set-Up von IonOptix hochgefahren, das Programm IonWizardAcquire (IonOptix) zur Registrierung der Messung gestartet, sowie Absaugpumpe und Heizsystem eingeschaltet werden. Die Messtyroden (s. Tab. 2.7) wurden in den Superfusionssystemen angebracht und auf eine Flussrate von 80mL/h eingestellt. Ein Frequenz-Filter entsprechend dem verwendeten Farbstoff (FURA-2 und SBFI: 340nm/380nm) wurde am Mikroskop angebracht.

Normaltyrode 1x		
NaCl (Sigma Aldrich)	140,00	mM
KCl (Merck)	4,00	mM
MgCl ₂ (Merck)	1,00	mM
HEPES (Sigma Aldrich)	5,00	mM
Glukose (Roth)	10,00	mM
CaCl ₂ (Sigma Aldrich)	1,00	mM

Tab. 2.7: Gelöst in ddH₂O; mit NaOH auf pH 7,4 bei Raumtemperatur eingestellt.

Isoprenalintyrode	
Isoprenalin (Sigma-Aldrich)	10 ⁻⁷ mM

Tab. 2.8: Gelöst in 100 mL Normaltyrode.

Nach Ablauf des Zellsettlings wurden das verbliebene Zellmedium sowie avitale Kardiomyozyten auf den Kammern vorsichtig mittels Pasteurpipette abgezogen und verworfen. Danach folgte die Inkubation mit dem Farbstoff (FURA-2: 20 min; SBFI: 90 min) bei Raumtemperatur im abgedunkelten Messraum. Nach Ablauf der Zeit wurde der überschüssige Farbstoff verworfen und die Messkammer am Mikroskop in die vorgesehene Halterung eingespannt. Sofort wurde der Zufluss der Tyrode ermöglicht, schräg gegenüber davon erfolgte die Befestigung der Absaugung. Zusätzlich wurde die Stimulationselektrode zur Anregung der Zellen befestigt. Die Spannung betrug hierbei stets 20 Volt mit Stimulationsfrequenzen im Bereich von 0,5 bis 2,0 Hertz. Nach einer Auswaschperiode von drei bis fünf Minuten, zur Entfernung extrazellulär verbliebenen Farbstoffs, konnte mit der Messung begonnen werden.

FURA-2-AM (Sigma-Aldrich)	
	50 µg
DMSO (Sigma-Aldrich)	49,9 µL
Pluronic Acid (life technologies)	4,99 µL
Normaltyrode1x	4,94 mL

Tab. 2.9: Davon je 200 µL zur Inkubation einer Kammer für 20 min.

SBFI-AM (Sigma-Aldrich)	
	50 µg
DMSO (Sigma-Aldrich)	44,4 µL

Tab 2.10: Davon 5 µL mit 1 µL Pluronic Acid (life technologies) und 500 µL Normaltyrode zur Inkubation von zwei Kammern mit jeweils 250 µL für 90 min.

2.5.3 Messung des intrazellulären Natriumhaushalts

Mittels des Natrium-bindenden Benzofuranisophalal SBFI wurde der intrazelluläre Natriumgehalt der Kardiomyozyten nach Zugabe von Empagliflozin oder Kontrollsubstanz untersucht. Um eine ausreichende Beladung der Zellen mit dem Farbstoff zu gewährleisten (Levi u. a. 1994), wurde jede Messkammer für 90 Minuten inkubiert.

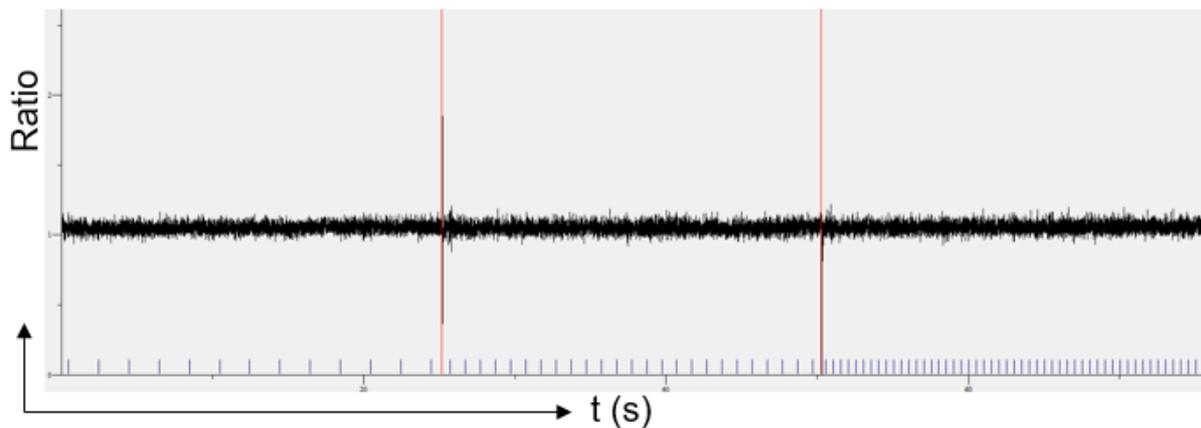


Abb. 2.5.3.1: Originale Abbildung einer Aufnahme der SBFi-Ratio als Funktion der Zeit einer mit Empagliflozin behandelten Zelle.

Durch alternierende Bestrahlung der Zellen mit 340 nm als „Numerator“ und 380 nm als „Denominator“ ergeben sich, je nach Beladung, jeweils unterschiedliche Emissionsspektren, die miteinander verrechnet die Darstellung als SBFi-Ratio erlauben. Bei steigender Natriumbindung des Farbstoffes – also steigender Natriumkonzentration in der Zelle – nimmt die Ratio gleichermaßen zu (Donoso u. a. 1992). Zur Minimierung verfälschender Eigenfluoreszenz der Kammer wurde nach

jeder Messung zusätzlich die Hintergrundfluoreszenz aufgenommen und von der Ratio der Zellfluoreszenzmessung subtrahiert, um eine möglichst genaue Darstellung der Natriumverhältnisse zu gewährleisten.

Die Messung am Epifluoreszenz-Mikroskop wurde unter Rotlicht in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um Interferenzen mit dem registrierten Wellenlängenbereich des Experiments zu minimieren. Hier erfolgte während der Auswahl einer geeigneten Kardiomyozyte die Einschlagphase von 5 min bei 1 Hz und 20 Volt bis zur gleichmäßigen Kontraktion aller Zellen und vollendeten Auswaschung extrazellulären Farbstoffs. Geeignet bedeutete hierbei morphologisch repräsentativ für die Kammer, nicht primär arrhythmisch und frei von Kontakt zu anderen Zellen, um Streuungseffekte zu vermeiden. Dies konnte noch weiter sichergestellt werden, in dem Blenden um die Zelle positioniert wurden. Nach Ablauf der Zeit erfolgte eine Messung nach Tab. 2.11 von 3 – 5 Zellen pro Kammer.

Normaltyrode	37°C
0.5 Hz	30 s ab <i>steady state</i>
1.0 Hz	30 s ab <i>steady state</i>
2.0 Hz	30 s ab <i>steady state</i>
Hintergrund	20 s

Tab. 2.11: Messprotokoll für SBF1 unter basalen Bedingungen.

In einer weiteren Messreihe (s. Tab. 2.12) wurde durch Zugabe des selektiven β -Agonisten Isoprenalin der Einfluss von beta-adrenerger Stimulation untersucht.

Isoprenalintyrode (10^{-7} mM)	37°C
0.5 Hz	30 s ab <i>steady state</i>
1.0 Hz	30 s ab <i>steady state</i>
2.0 Hz	30 s ab <i>steady state</i>
Hintergrund	20 s

Tab. 2.12: Messprotokoll für SBF1 unter 10^{-7} mM Isoprenalin (s. Tab. 2.8).

Diese Protokolle wurden zum einen an frisch isolierten Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit Empagliflozin (1 $\mu\text{mol/L}$) oder Vehikel (1 $\mu\text{mol/L}$ DMSO) durchgeführt, zum anderen erfolgten Messungen nach 24-stündiger Kultivierung (siehe 2.3) isolierter Kardiomyozyten mit Empagliflozin oder Vehikel, analog zu den oben beschriebenen Akutmessungen.

Während allen Messungen erfolgte stets die kontinuierliche Gabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ Empagliflozin oder Vehikel über die Superfusion der Messtyrode.

2.5.4 Auswertung der Natriummessungen

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm IonWizard 6.4 (IonOptix Corp, Milton, Mass.). Bei einer jeden Messung wurde nach Abzug der Hintergrundstrahlung ein Ratio-Wert eines rund 20 s langen Abschnitts im steady state unter Stimulation mit 0,5, 1,0 oder 2,0 Hertz ermittelt und statistischen Tests zugeführt.

2.5.5 Untersuchung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen

Zur Darstellung der dynamischen zytosolischen Kalziumveränderungen während eines Kontraktionsvorgangs wurde der Farbstoff FURA2 verwendet. Durch die wechselnde Anregung des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 340 bzw. 380 nm gelang die Erfassung der Ratio, die sich als Kalziumtransient veranschaulichen ließ. Es zeigte sich der repräsentative Vorgang der zellulären Kalziumdynamik während des systolischen Aufstrichs sowie des diastolischen Abfalls des Graphen.

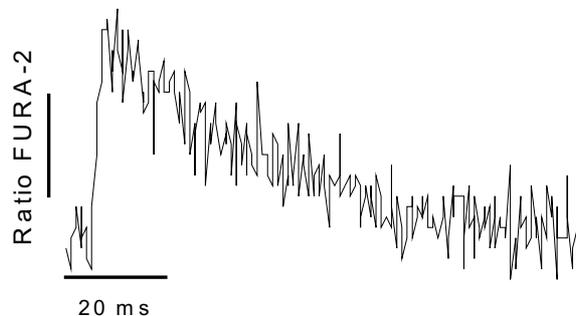


Abb. 2.5.5.1: Originalabbildung eines Kalziumtransienten unter Intervention mit Empagliflozin bei einer Stimulation von 1 Hertz mittels FURA2.

Abgesehen von einer abweichenden Inkubationszeit der Zellen mit FURA2 von 20 min erfolgten die Vorbereitung wie in 2.4.2 beschrieben, der Messablauf war analog den Vorgängen in 2.4.3. Das Messprotokoll war hierbei ähnlich dem der Natriummessungen (s. Tab. 2.13).

Normaltyrode	37°C
0.5 Hz	30 s ab steady state
1.0 Hz	30 s ab steady state
2.0 Hz	30 s ab steady state
Hintergrund	20 s

Tab. 2.13: Messprotokoll für FURA2 unter basalen Bedingungen.

Auch wurden die Experimente um Messungen mit Isoprenalin ergänzt. Das Protokoll wurde beibehalten (s. Tab. 2.14):

Isoprenalintyrode (10^{-7} mM)	37°C
0.5 Hz	30 s ab steady state
1.0 Hz	30 s ab steady state
2.0 Hz	30 s ab steady state
Hintergrund	20 s

Tab. 2.14: Messprotokoll für FURA2 unter 10^{-7} mM Isoprenalin.

Bei der dynamischen Untersuchung der Kalziumkonzentrationen wurde auch die Kapazität des SRs zur Speicherung von Kalzium beurteilt. Da es beim Menschen den Großteil des kontraktionsrelevanten Kalziums in der Systole bereitstellt (Bers 2001), lässt der gespeicherte Kalziumgehalt eine Annäherung an das erreichbare Kontraktionsvermögen der Zelle zu. Es bedarf dazu eine dauerhafte Entleerung des SRs. Durch eine andauernde Stimulation der zur Öffnung zuständigen Ryanodinkanäle kommt es zum Einstrom des gespeicherten Kalziums in das Zytosol; gleichzeitig gelangt ins SR zurücktransportiertes Kalzium durch die geöffneten Kanäle sogleich wieder ins Zytoplasma. Die persistierende Öffnung der RyR wurde durch die stimulierende Wirkung von Koffein ermöglicht, das über eine Senkung der

Aktivierungsschwelle des RyR gegenüber luminal vorhandenem Kalzium zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit führt (Kong u. a. 2008).

Koffeintyrode	
Koffein (Sigma-Aldrich)	10 mM

Tab. 2.15: Gelöst in 100 mL Normaltyrode.

Unter Koffein (s. Tab. 2.15) wurde bereits eine Zunahme der Kalziumtransientenamplitude und somit des systolisch verfügbaren intrazellulären Kalziums beobachtet (Fabiato 1983; Fabiato 1985). Somit konnten die SR-Gehalte an gespeichertem Kalzium zwischen verschiedenen Gruppen verglichen und Rückschlüsse auf das Kontraktionsvermögen gezogen werden.

Diese Intervention erfolgte nach Messung der Kalziumtransienten (s. Tab. 2.16):

Normaltyrode	37°C
0.5 Hz	30 s ab steady state
Stimulationspause	(entsprechend der Stimulationsfrequenz)
Koffein	
Hintergrund	20 s

Tab. 2.16: Messprotokoll für FURA2 unter Intervention mit 10 mM Koffein.

2.5.6 Auswertung der Kalziumtransienten

Die Auswertung der Kalziumtransienten erfolgte ebenfalls mit IonWizard 6.4 von IonOptix. Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz wurden die Transienten über einen Zeitraum von ungefähr 20 Sekunden im steady state gemittelt.

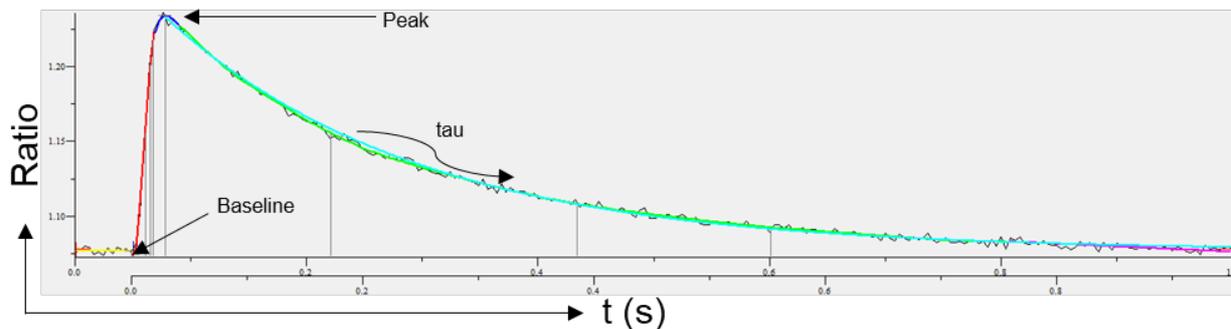


Abb. 2.5.6.1: Originale Abbildung eines Kalziumtransienten mit Darstellung der systolischen Kontraktion einer Zelle, aufgetragen gegen die Zeit.

Mithilfe der Grundlinie oder Baseline (F_0), die die Ratio des diastolischen Kalziumgehalts angibt, kann die Amplitudenhöhe der nachfolgenden systolischen Kalziumfreisetzung aus dem SR ermittelt werden und somit der maximale systolische Kalziumgehalt oder Peak (F) im Zytosol:

$$\text{Kalziumtransientenamplitude} = F - F_0 \quad [2.5.6.1]$$

F_0 : Ratio der Fluoreszenz der Baseline, F : Ratio der Fluoreszenz des Peaks

Darüber hinaus wurde mit dem Abfall („tau“) der Amplitude die Kinetik der Kalziumwiederaufnahme ins SR beurteilt. Hierfür wurde anhand einer an den Transienten angepasste „tau-Kurve“ die Zeit bis zur 50%-igen Abnahme der zytosolischen Kalziumkonzentration im Vergleich zur Baseline bestimmt. Interessant sind diese Parameter in Hinblick auf die Tatsache, dass die SERCA im Menschen postsystolisch den größten Anteil an Kalzium aus dem Zytosol entfernt (Bers 2001). Im Gegensatz dazu ermöglicht die Untersuchung des tau der Koffeintransienten, durch funktionelle Ausschaltung der SERCA bei dauergeöffneten RyR, eine Aussage über den Beitrag des NCX zur Kalziumelimination in der Zelle, sodass hier die RT50 eine Annäherung an die funktionalen Kapazitäten des NCX beschreibt.

In Zusammenhang damit stand auch die Bestimmung des residualen diastolischen Kalziums, das nach Rückkehr des Transienten zur Baseline als Ratio registriert und somit zwischen den Gruppen verglichen werden konnte.

2.5.7 Systolische Sarkomerverkürzung

Mit dem Epifluoreszenzmikroskop als Durchlichtungsquelle wurden die Myozyten über die IonOptix Myocam, nach optimaler Ausrichtung zur Messapparatur, im Programmfenster kontinuierlich in ihrem Kontraktionsvorgang gefilmt, sodass eine Auswertung der Verkürzung der Sarkomerlänge möglich war.

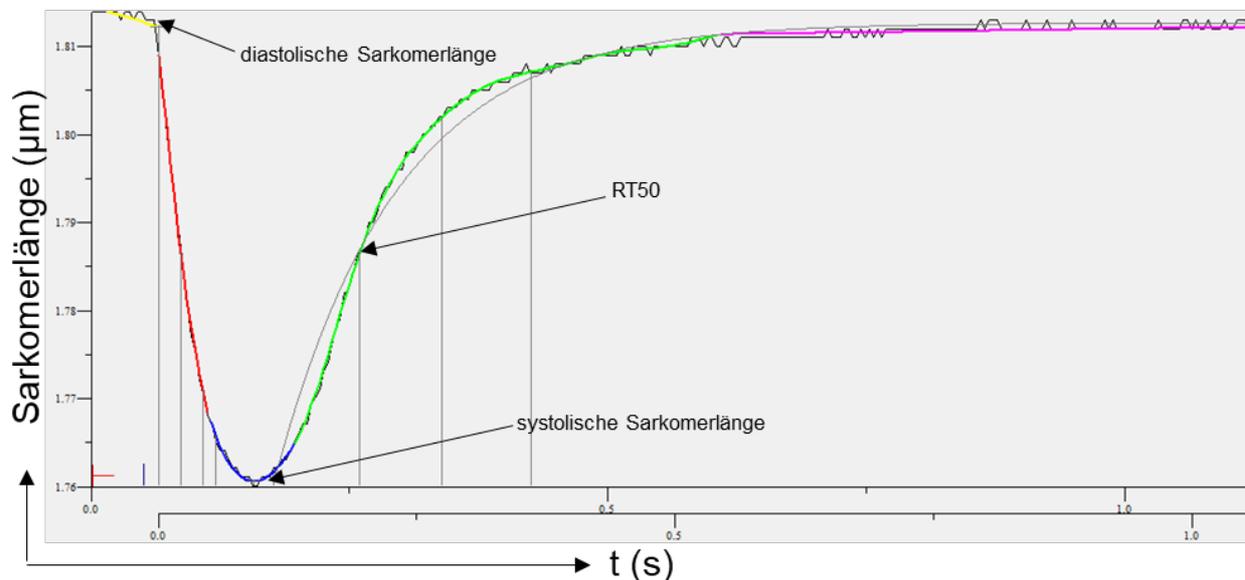


Abb. 2.5.7.1 Originale Abbildung einer gemittelten Kardiomyozytenverkürzung der Sarkomere in μm als Funktion der Zeit.

Die relative Verkürzung des Sarkomers wurde durch die Differenz von diastolischer und systolischer Sarkomerlänge ermittelt:

$$\text{Systolische Verkürzung in \%} = \frac{SL_{dia} - SL_{sys}}{SL_{dia}} \times 100 \quad [2.5.7.1]$$

SL_{dia} : diastolische Sarkomerlänge, SL_{sys} : systolische Sarkomerlänge

Das Ausmaß dieser Verkürzung ist eng mit dem Kalziumhaushalt verknüpft und erlaubt Rückschlüsse auf dessen Gehalt und Bereitstellung durch das SR in der Zelle (Zhu u. a. 2005). Zusätzlich wurde rechnerisch die Zeit bis zur postsystolischen Relaxation auf 50% der präsysstolischen Sarkomerlänge (RT50) ermittelt. Die Dauer der Relaxation gibt Hinweise auf die Fähigkeit der Zelle, Kalzium zum Beginn der Diastole aus dem Zytosol zu eliminieren.

2.5.8 Modulation der Natrium-Kalium-ATPase

Um den zugrundeliegenden Mechanismus von Empagliflozin am Kardiomyozyten genauer zu charakterisieren, wurde die Veränderung der Natriumhomöostase unter Intervention mit dem NKA-Inhibitor Ouabain (1 mmol/L) nach 24-stündiger Kultur untersucht (Tab 2.17). Durch die selektive Inhibition der NKA trat diese als Transporter für Natrium in den Hintergrund und erlaubte die Veranschaulichung ihres Beitrags zur Dynamik der intrazellulären Natriumkonzentration unter Empagliflozin im Vergleich zum Vehikel, indem diese zu den Ionenverhältnissen ohne Inhibierung der NKA verglichen wurde. Innerhalb einer Gruppe ließen sich so Natriuminflux und Eliminierung mit und ohne Beitrag der NKA untersuchen, genauso wie die Geschwindigkeit der Vorgänge und etwaige Unterschiede in der Natriumkonzentration. Zwischen den Gruppen von Empagliflozin (1 µmol/L) und Vehikel (1 µmol/L DMSO) ließen sich darüber hinaus mögliche Auswirkungen auf den Natriumhaushalt, sowohl mit als auch ohne Inhibition der NKA untersuchen.

Tyroden-Protokoll	37°C
Normaltyrode (140 mM Na, 4,0 mM K)	3 min wash-in, 1x Messung
145/0 für 15 min	Alle 60 sec Messung
0/4 für 15 min	Alle 20 sec Messung
145/0 + Ouabain für 15 min	Alle 60 sec Messung
0/4 + Ouabain für 15 min	Alle 20 sec Messung

Tab. 2.17: Messprotokoll für Natrium-Messungen unter Ouabain-Intervention (1 mmol/L). Auch hier wurde im Anschluss die Hintergrundfluoreszenz zur Bereinigung des gemessenen Signals bestimmt.

Die erste Messung mit Normaltyrode mit 140 mM Natrium und 4 mM Kalium diente der Ermittlung der basalen Natriumkonzentration des Zytosols als Baseline (s. Tab. 2.16). Anschließend wurde eine Tyrode mit 145 mM Natrium und 0 mM Kalium superfundiert. Durch diese drastische Erhöhung des ohnehin schon ausgeprägten chemischen Gradienten für Natrium (extrazellulär 145 mmol/L, intrazellulär 14 mmol/L) kam es zum Einstrom des Ions ins Zellinnere, was sich durch regelmäßige Messungen einer steigenden Ratio F_{340}/F_{380} bestätigt ließ. Durch die Kalium-freie Lösung blockiert, war ein Efflux von Natrium über die NKA nicht mehr möglich und es akkumulierte in der Zelle. Nach 15 min wurde auf eine Tyrode mit 0 mM Na und 4 mM K gewechselt, sodass mit der Reaktivierung der NKA Natrium entlang seines Gefälles wieder in den Extrazellularraum transportiert werden konnte und die Ratio F_{340}/F_{380} folglich abnahm. Da der Vorgang der zytosolischen Natriumeliminierung beim Menschen zum größten Teil über die NKA geschieht (s. 1.5.3) wurde sie im nächsten Schritt durch die Superfusion einer Ouabain-haltigen Lösung (1 mmol/L Ouabain) vollständig blockiert (Despa 2005). Von Interesse war die Dynamik des intrazellulären Natriumabfalls unter Superfusion mit der 0/4-Tyrode, da dies nun ohne den Beitrag der NKA geschah. Wieder wurde mit der 145/0-Messlösung ein Einstrom des Natriums in die Zellen provoziert, um anschließend auf die 0/4-Tyrode zu wechseln und das Exportverhalten von Natrium, diesmal unter Ausschaltung der NKA, zu registrieren.

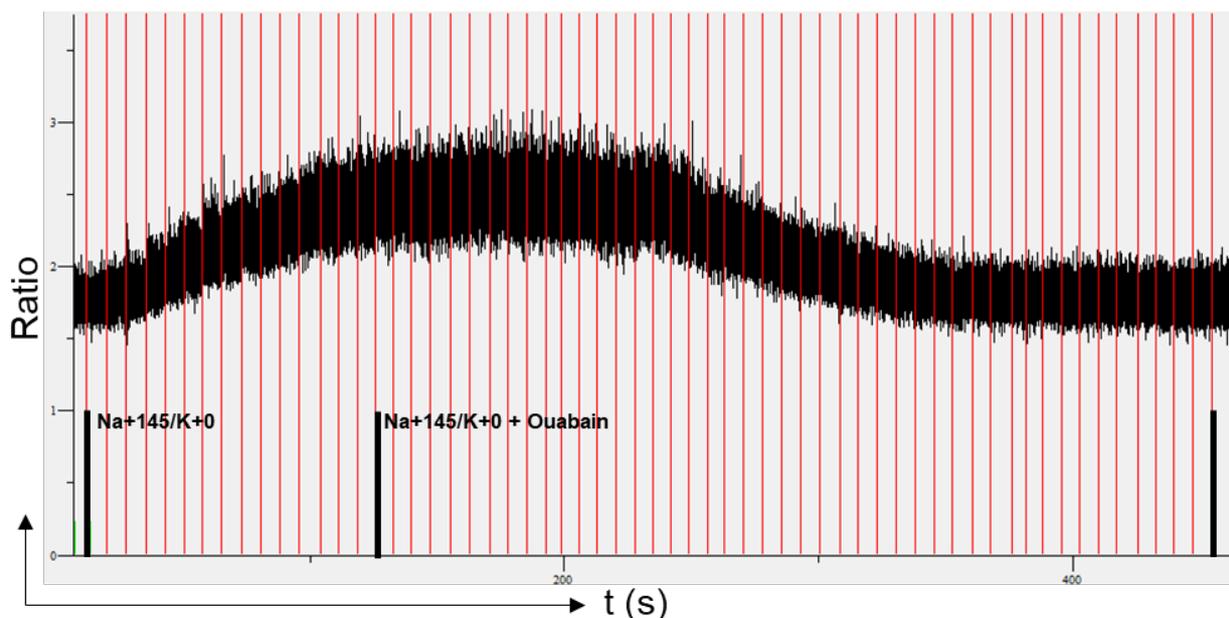


Abb. 2.5.8.1: Originale Registrierung der dynamischen Natriumkonzentrationen eines ventrikulären Kardiomyozyten (Vehikel) mit Ouabain.

Die Auswertung beinhaltete neben den Rohwerten der Ratio eine differenzierte Betrachtung des Natriumabfalls. Dabei wurde innerhalb einer Gruppe die negative Steigung mit und ohne den Einfluss von Ouabain untersucht. Zusätzlich erfolgte die vergleichende Analyse der Natriumeliminierung zwischen Vehikel und Empagliflozin, um einen potenziellen Einfluss des Medikaments auf die Tätigkeit der NKA zu charakterisieren, sowie mögliche Modulationen der Dynamik des Natriumabfalls nach Ausschaltung der NKA zu erfassen. Die maximale negative Steigung eines jeden Graphen wurde dabei mittels einer Slope-Fit-Analyse in GraphPad Prism berechnet, um anschließend Vergleiche zwischen den Gruppen zu ermöglichen.

2.6 Konfokalmikroskopie

Die Technik der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie ist eine spezielle Form der Fluoreszenzmikroskopie. Sie ermöglicht, Objektteile außerhalb der Fokusebene auszublenden und somit Streulichtanteile zu verringern. Die resultierende Tiefendiskriminierung resultiert in einer besseren Auflösung von sich überlagernder Strukturen und einer höheren Qualität der entstehenden Aufnahmen (Engelhardt & Knebel 1993).

2.6.1 Prinzip

Durch die punktförmige Bestrahlung des Objekts mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm erfolgt die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo4-AM zur Emission fluoreszierenden Lichts.

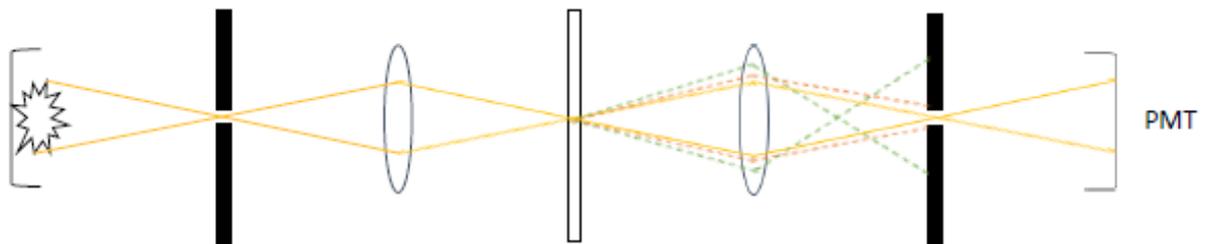


Abb. 2.6.1.1: Die Bildgebung wird durch eine konfokale Positionierung von Objektiven und Lochblenden sowohl vor als auch hinter dem Objekt erreicht. Der Strahl aus der Lichtquelle wird an der ersten Lochblende fokussiert und durchquert dann das Objektiv, wobei ein Lichtkegel entsteht, der mit seiner Spitze den zu examinierenden Punkt auf dem Objekt beleuchtet. Die zweite Linse sammelt die emittierte Fluoreszenz aus dem fokussierten Bereich des Objekts, die die zweite Lochblende passiert und den Detektor erreicht. Der kleine Durchmesser der Lochblenden garantiert somit, dass nur das Licht aus der Brennebene am Detektor scharf fokussiert und erkannt wird. Bereiche des Objekts außerhalb der Brennebene, wie hier exemplarisch der rote und grüne Lichtstrahl, werden ausgeblendet (Minsky 1988). Eigene Abbildung nach Minsky 1988.

Dieses wurde auch hier über den Photomultiplier detektiert und als elektrisches Signal vervielfältigt, um mit einem nachgeschalteten Analog/Digital-Wandler in ein digitales Bild umgewandelt zu werden. Der Laser konnte sowohl in x- als auch in y-Richtung bewegt werden, um so verschiedene Punkte des Objekts zu fokussieren; die

Bewegungsfreiheit entlang der z-Achse schafft die Möglichkeit von dreidimensionalen Aufnahmen. Vor- und nachgeschaltete Lochblenden garantierten, dass jeweils nur die Photonen im Fokus den Detektor erreichten, andere Bereiche darüber und darunter wurden nicht erfasst. Das wiederholte serielle Scannen entlang eines Vektors innerhalb der Zelle erzeugte somit einzelne Bildpunkte, die am Computer zu einer Aufnahme zusammengesetzt werden konnten und durch Dokumentation der dynamischen Fluoreszenzintensität eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung ermöglichen (Wilhelm u. a. 2003).

2.6.2 Vorbereitung der Messung

Die isolierten Kardiomyozyten wurden entweder direkt nach Kalziumaufbau oder nach 24h-Kultur auf die Laminin-bedeckten Messkammern aufgetragen. Nach 15 min konnte von einer adäquaten Haftung der Zellen ausgegangen und, nach Abpipettieren des Überstands, der Farbstoff zugegeben werden. Dabei handelte es sich um Fluo-4 mit einer Inkubationszeit von 12 Minuten bei völliger Dunkelheit und Raumtemperatur (s. Tab. 2.18).

Fluo-4 AM (Molecular Probes)	
	50 µg
DMSO (Sigma-Aldrich)	44,4 µL

Tab. 2.18: Davon 5 µL mit 1 µL Pluronic Acid (life technologies) und 500 µL Normaltyrode zur Inkubation von zwei Kammern mit jeweils 250 µL für 12 min.

Derweil konnten Konfokalmikroskop und Laser gestartet sowie Myopacer, Heizung und Absaugung angeschaltet werden. Den Messtyroden wurde eine Laufrate von 80mL/h vorgegeben, auch hier wurde 1µmol/L Empagliflozin bzw. DMSO hinzugegeben. Die restlichen Vorgänge geschahen analog zu 2.5.2.

2.6.3 Registrierung und Auswertung von systolischem Kalziumtransienten und diastolischem Kalziumleck

Die Messung der systolischen Transienten und der spontanen diastolischen Kalziumfreisetzungen aus dem SR wurde an einem LSM 700 Mikroskop von Zeiss mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm als Lichtquelle durchgeführt.

Nach abgeschlossener Inkubation mit Fluo-4 erfolgte eine 5-minütige Einschlagperiode der Zellen mit 1 Hertz bei 20 Volt, um eine gleichmäßige Kontraktion der Zellen zu gewährleisten und überflüssigen Farbstoff auszuwaschen. Während eines Messvorgangs wurde nach Aufsuchen einer vitalen Zelle diese im continuous-frame-scan durch Anregung der Fluoreszenz des intrazellulären Farbstoffes konfokal dargestellt. Anschließend wurde im Line-Scan-Mode eine Linie durch die Zelle entlang deren Achse gezogen. Nach Normierung der Linie erfolgte an dieser das serielle Abscannen der Bildpunkte. Der einmalige Scan besaß dabei eine Geschwindigkeit von 0,389 ms und wurde 10.000-mal wiederholt. Dieser Vorgang wurde entlang einer x-Achse aufgetragen, sodass die veränderten Kalziumkonzentrationen – veranschaulicht mithilfe des Farbstoffs – 10.000-mal untereinander dargestellt wurden. Der gleiche Ablauf folgte im unstimulierten Zustand der Zelle, sodass für jede Kardiomyozyte jeweils eine Aufnahme in Systole und Diastole entstand.

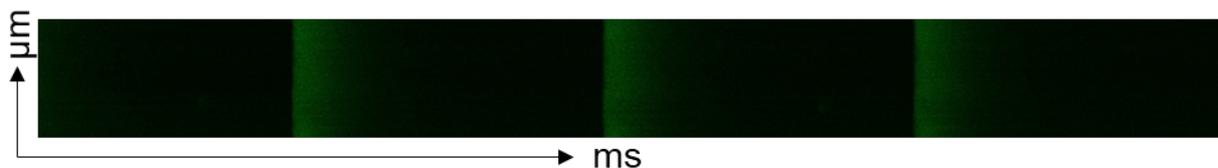


Abb. 2.6.3.1: In dieser originalen Aufnahme ist die Veränderung der systolischen Kalziumkonzentration unter Stimulation dargestellt. Kommt es zur getriggerten Kontraktion, steigt der Kalziumspiegel in der Zelle, was wiederum die Zelle veranlasst, zusätzliches Kalzium aus ihrem SR freizusetzen. Dadurch ist vermehrt Kalzium für die Bindung an Fluo-4 verfügbar und dessen Fluoreszenz steigt, die in diesem Zeitabschnitt gescannten Linien stellen sich heller dar. Ähnliche Transienten können auch ungetriggert in der Stimulationspause entstehen. Zusätzlich ist es möglich, durch SR-Lecks entstandene Kalzium-Sparks zu beobachten.

Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms ImageJ 1.50i und dem Plugin Sparkmaster.

Für die Transienten der systolischen Kalziumfreisetzungen erfolgte eine Auswertung der registrierten Amplituden, bei denen die Fluoreszenz des systolischen Maximums F mit der Fluoreszenz der diastolischen Kalziumkonzentration F_0 in Relation gesetzt wird:

$$\text{Systolische Transientenamplitude} = \frac{F}{F_0} \quad [2.6.3.1]$$

Die diastolischen Kalziumsparks wurden anhand der Fluoreszenzamplitude, der halbmaximalen Breite FWHM (in μm) sowie der halbmaximalen Dauer FDHM (in ms) ausgewertet. Die Fluoreszenzamplitude berechnete sich damit wie folgt:

$$\text{Sparktransientenamplitude} = \frac{F}{F_0} \quad [2.6.3.2]$$

F_0 : Fluoreszenz der diastolischen Kalziumkonzentration, F : Fluoreszenz des Maximums der Sparkamplitude

Aus den erhaltenen Daten konnte das halbmaximale Kalziumleck berechnet werden:

$$\text{HM Leak} = \text{FDHM} * \text{FWHM} * \frac{F}{F_0} \quad [2.6.3.3]$$

Zusammen mit der Sparkfrequenz, die aus der Anzahl der Sparks pro Zelle ermittelt werden konnte, war so eine vergleichbare Aussage über das Ausmaß der Kalziumfreisetzung zwischen den untersuchten Gruppen möglich.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung in dieser Arbeit entstand mit GraphPad Prism.

Die Untersuchung auf Normalverteilung erfolgte via Shapiro-Wilk-Test und/oder visuell mittels Q-Plot bei geringer n-Zahl. Zur Analyse der statistischen Signifikanz wurden entsprechend der gepaarte oder ungepaarte Student's T-Test, der Wilcoxon-Test oder

der Mann-Whitney-Test verwendet. Bei der Untersuchung mehrerer Einfluss-Variablen wurde der 2-Wege-ANOVA eingesetzt; die Post-Hoc-Testung erfolgte mittels Sidak. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die untersuchten Mittelwerte ergaben sich aus den Messwerten von Mittelwert/Maus ($n=Zellen$ [n *Mäuse*]) bzw. Mittelwert/Patient ($n=Zellen$ [n *Patienten*]), sofern nicht anders angegeben; Abweichungen sind als Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Biometrische Daten

3.1.1 Transverse Aortenkonstriktion des murinen Wildtyps

	Prä-OP	5 Wochen nach TAC-OP
Körpergewicht (g)	23.39 ± 0.13	26.46 ± 0.47*
Herzfrequenz (Schläge/min)	433 ± 6	446 ± 5
Ejektionsfraktion (%)	53.88 ± 2.47	31.82 ± 3.24*
Fraktionelle Verkürzung (%)	27.65 ± 1.53	15.11 ± 1.68*
Schlagvolumen (µl)	33.38 ± 1.31	22.45 ± 1.85*
LV-AWThd (mm)	1.0 ± 0.06	1.2 ± 0.04*
LV-PWThd (mm)	0.88 ± 0.04	1.1 ± 0.05*
LVIDs (mm)	2.89 ± 0.08	3.62 ± 0.14*
LVIDd (mm)	3.79 ± 0.05	4.09 ± 0.12*

Tab. 3.1: Biometrische Daten der Wildtyp-Mäuse jeweils vor und nach artifizierter Nachlasterrhöhung mittels transverser Aortenkonstriktion. LV-AWThd=anteriore Myokardwanddicke des linken Ventrikels, LV-PWThd=posteriore Myokardwanddicke des linken Ventrikels, LVIDs= linksventrikulärer innerer Durchmesser in Systole, LVIDd=linksventrikulärer innerer Durchmesser in Diastole. Alle Werte als arithmetisches Mittel ± SEM.

3.1.2 Ventrikelkardiomyozyten der humanen Herzinsuffizienz

Patient	1	2	3	4
Ätiologie	ICM	DCM	ICM	DCM
LVEDD (mm)	88	49	70	68
Alter (Jahre)	56	22	67	59
Geschlecht	m	m	m	m
BMI (kg/m ²)	26.5	22.1	31.3	25.5
Ejektionsfraktion (%)	9	20	14	13
Rhythmus	SR	SR	SR	SR
Vorab OP	CABG	-	-	-

Klappenvitien	MI II°	None	MI I°, TI I°	MI III°, TI II°
Diabetes / HbA1c%	n	n	j/6.4	n
Koronare Erkrankung	j	n	j	n
art. Hypertension	j	j	j	j
Nierenerkrankung	j	j	j	j
Kreatinin (mg/dl)	0.85	1.38	2.21	1.69
GFR (ml/min)	97	72	30	43
NT-pro-BNP (pg/ml)	3638	11341	4017	14872

Tab. 3.2: Klinische Charakteristika der eingeschlossenen Patienten (explantierte Herzen im Endstadium der Herzinsuffizienz). ICM=ischämische Kardiomyopathie, DCM=Dilatative Kardiomyopathie, j=ja, n=nein, LVEDD=linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, m=männlich, BMI=Body Mass Index, SR=Sinusrhythmus, CABG=Koronararterien-Bypass, MI=Mitralinsuffizienz, TI=Trikuspidalinsuffizienz, x°=Schweregrad des Vitiums, GFR=glomeruläre Filtrationsrate, NT-pro-BNP=B-natriuretisches Peptid.

3.2 Empagliflozin reduziert das spontane Kalziumleck nach 24 Stunden im murinen und humanen Modell

Die Untersuchung nach 30-minütiger Inkubation mit 1 $\mu\text{mol/L}$ Empagliflozin zeigte in ventrikulären Wildtyp-Kardiomyozyten der Maus keinen signifikanten Unterschied in der Sparkfrequenz im Vergleich zu DMSO ($V: 0,9214 \pm 0,1400, n=60$ [6] vs. $E: 1,004 \pm 0,2464, n=42$ [6], $p=>0,05$, Wilcoxon-Test). Die Analyse der Kalziumsparks wies eine signifikant verringerte Sparkamplitude F/F_0 unter Empagliflozin auf ($V: 1,783 \pm 0,01997, n=60$ [6] vs. $E: 1,6665 \pm 0,01620, n=42$ [6], $p=<0,05$; gepaarter T-Test). Die räumliche Ausdehnung der Sparks als halbmaximale Weite (FWHM; $V: 1,304 \pm 0,05314, n=60$ [6] vs. $E: 1,230 \pm 0,06696, n=42$ [6], $p=>0,05$; gepaarter T-Test) sowie die benötigte Zeit als halbmaximale Dauer im Abfall der Amplituden-Funktion (FDHM; $V: 13,11 \pm 0,7697, n=60$ [6] vs. $E: 12,90 \pm 0,5343, n=42$ [6], $p=>0,05$; gepaarter T-Test) zeigten sich genauso wie die daraus berechnete Größe der Sparks (Size HM; $V: 33,05 \pm 3,232, n=60$ [6] vs. $E: 27,10 \pm 1,301, n=42$ [6], $p=>0,05$; gepaarter T-Test) nicht signifikant verändert.

Bei Betrachtung des diastolischen Kalziumlecks, berechnet aus der Sparkfrequenz und der räumlichen Ausdehnung der Sparks, zeigte sich unter Kurzinkubation mit Empagliflozin keine signifikante Veränderung ($V: 80,55 \pm 10,62, n=60 [6]$ vs. $E: 73,77 \pm 16,94, n=42 [6]$, $p=>0,05$; gepaarter *T-Test*).

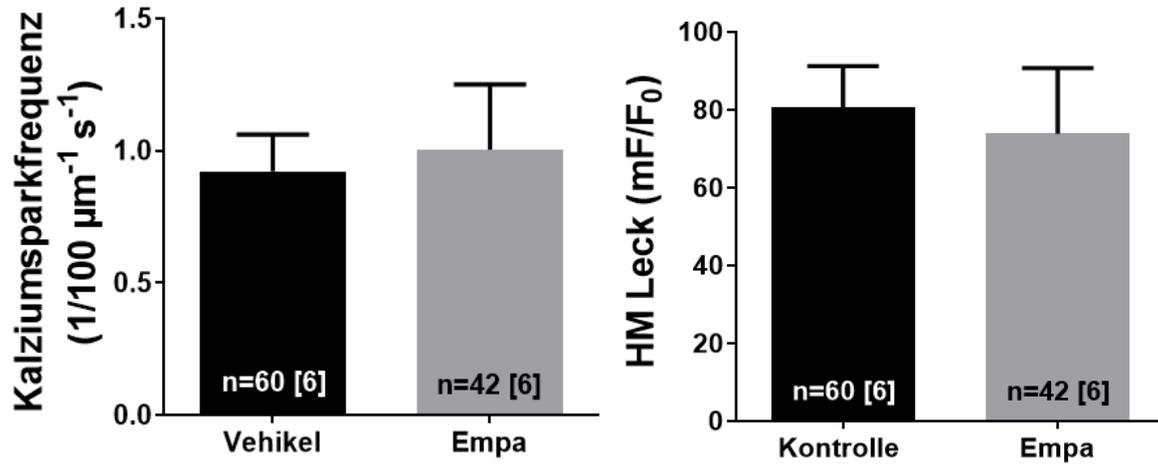


Abb. 3.2.1: Wildtyp, 30-Minuten-Kultur. Links: Die Frequenz spontaner diastolischer Kalzium-Sparks von Vehikel vs. Empagliflozin. Rechts: Das halbmaximale Kalziumleck unter Empagliflozin vs. Vehikel.

Im Anschluss wurden die obigen Experimente in murinen Wildtyp-Kardiomyozyten nach 24-h-Kultur mit Empagliflozin oder Vehikel DMSO wiederholt, um die Effekte einer längerfristigen Exposition mit dem SGLT2-Inhibitor zu untersuchen.

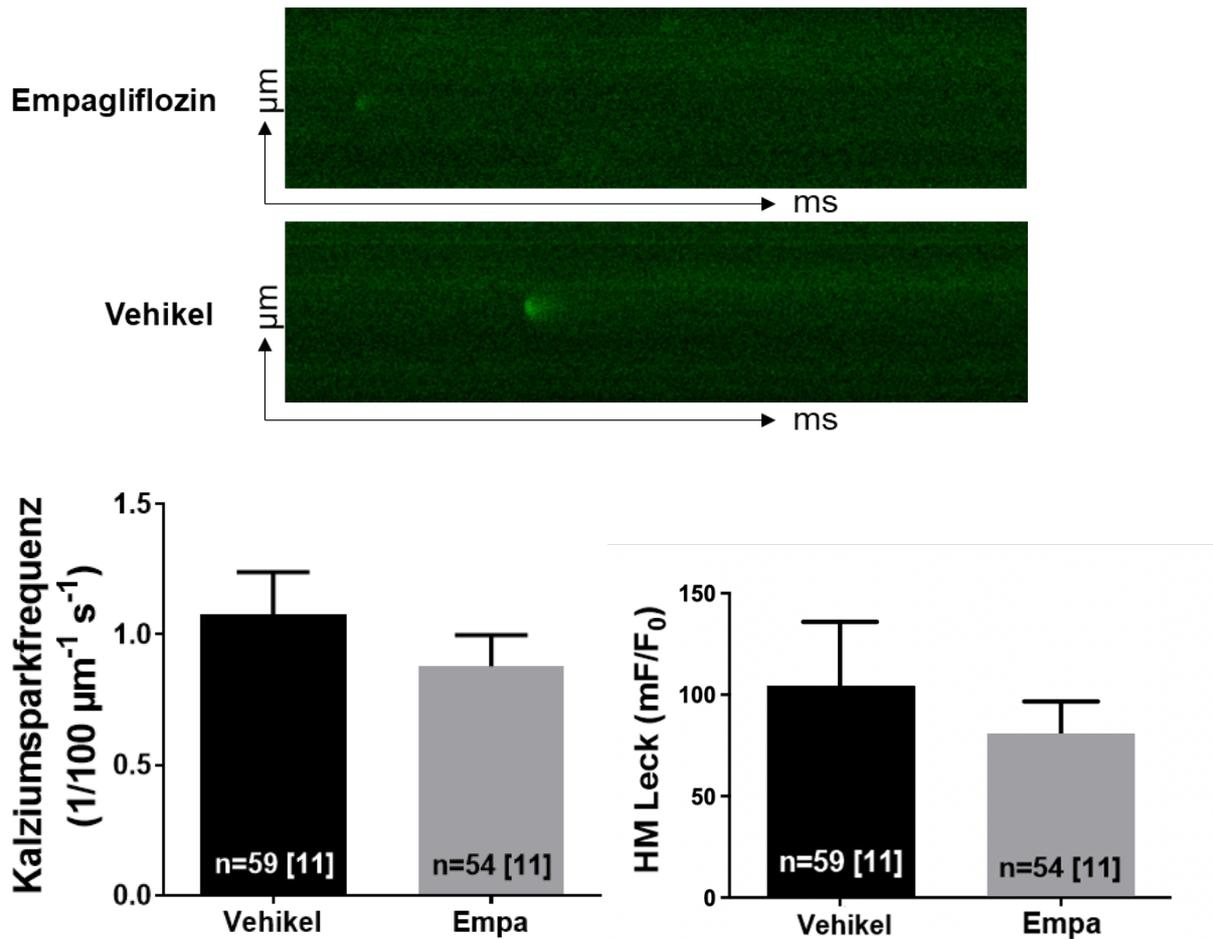


Abb. 3.2.2: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur. Oben: Originale Scans der Kalziumsparks bei 1,0 Hz unter Empagliflozin (oben) und Vehikel (unten). Links unten: Frequenz spontaner Kalzium-Sparks unter Vehikel bzw. Empagliflozin. Rechts unten: halbmaximales Kalziumleck unter Empa vs. Vehikel.

Dabei erwiesen sich die Sparkeigenschaften FWHM ($V: 1,19 \pm 0,0507, n=59 [11]$ vs. $E: 1,33 \pm 0,0915, n=54 [11]$, $p > 0,05$; gepaarter *T-Test*), FDHM ($V: 12,87 \pm 1,0371, n=59 [11]$ vs. $E: 13,11 \pm 0,9763, n=54 [11]$, $p > 0,05$; gepaarter *T-Test*) und Size HM ($V: 31,30 \pm 0,0507, n=59 [11]$ vs. $E: 31,29 \pm 3,6208, n=54 [11]$, $p > 0,05$; gepaarter *T-Test*) auch nach 24 Stunden als nicht signifikant unterschiedlich. Die Sparkamplitude F/F_0 hingegen zeigte sich unter Intervention mit Empagliflozin signifikant reduziert ($V: 1,862 \pm 0,06514, n=59 [11]$ vs. $E: 1,680 \pm 0,04094, n=54 [11]$, $p < 0,05$; gepaarter *T-Test*). Die Analyse der Sparkfrequenz offenbarte im Gegensatz zur Kurz-Inkubation bereits einen nicht-signifikanten Trend zur reduzierten Sparkfrequenz um rund 18% unter Empagliflozin ($0,8787 \pm 0,1191, n=54 [11]$) im Vergleich zum Vehikel ($1,075 \pm 0,1645, n=59 [11]$; $p > 0,05$, gepaarter *T-Test*). Das abzuleitende Kalziumleck war unter diesen Bedingung nicht signifikant verändert, dennoch ließ sich unter

Empagliflozin eine Reduktion des diastolisch freigesetzten Kalziums um 23% beobachten ($V: 104,657 \pm 31,3286, n=59$ [11] vs. $E: 80,7541 \pm 15,9247, n=54$ [11], $p=>0,05$; *Wilcoxon-Test*).

Bei beginnender Dekompensation des Herzens reagiert der Körper mit der Aktivierung des Sympathikus (s.1.6), um u.a. durch eine Erhöhung der Herzfrequenz die kardiale Auswurfsleistung und somit die Sauerstoffversorgung der Endstromgebiete aufrechtzuerhalten. Auf der Ebene einzelner Kardiomyozyten kommt es zudem zu Veränderungen im Kalziumhandling. Interessant ist somit, ob eine zusätzliche Therapie mit Empagliflozin synergistische Effekte erzeugt oder keine additive Wirkung zu beobachten ist. Zur Simulation dieser chronischen Aktivierung wurde Isoprenalin mit einer Konzentration von 10^{-7} mmol/L zu den kultivierten Kardiomyozyten mit Empagliflozin oder DMSO gegeben.

Bei Betrachtung der Spark-Transientenamplitude F/F_0 war kein Unterschied zwischen beiden Gruppen zu beobachten ($V: 1,920 \pm 0,1030, n=77$ [9] vs. $E: 2,026 \pm 0,04459, n=64$ [9], $p=>0,05$; *ungepaarter T-Test*). Und auch die restlichen Parameter der spontanen Kalzium-Sparks zeigten sich mit FWHM ($V: 1,380 \pm 0,08611, n=77$ [9] vs. $E: 1,309 \pm 0,04501, n=64$ [9], $p=>0,05$; *ungepaarter T-Test*), FDHM ($V: 14,09 \pm 1,207, n=77$ [9] vs. $E: 13,37 \pm 0,7718, n=64$ [9], $p=>0,05$; *ungepaarter T-Test*) und Size HM ($V: 44,40 \pm 7,299, n=77$ [9] vs. $E: 38,28 \pm 4,479, n=64$ [9], $p=>0,05$; *ungepaarter T-Test*) nicht signifikant verändert. Die Erhebung des diastolischen Kalzium-Lecks ließ einen Trend zur Verringerung unter Empagliflozin-Kultur beobachten ($V: 238,9 \pm 50,42, n=77$ [9] vs. $E: 138,6 \pm 28,89, n=64$ [9], $p=>0,05$; *ungepaarter T-Test*); die Kalzium-Sparkfrequenz zeigte sich unter dem SGLT2-Inhibitor sogar signifikant reduziert ($V: 1,873 \pm 0,1677, n=77$ [9] vs. $E: 1,224 \pm 0,1803, n=64$ [9], $p=<0,05$; *ungepaarter Test*).

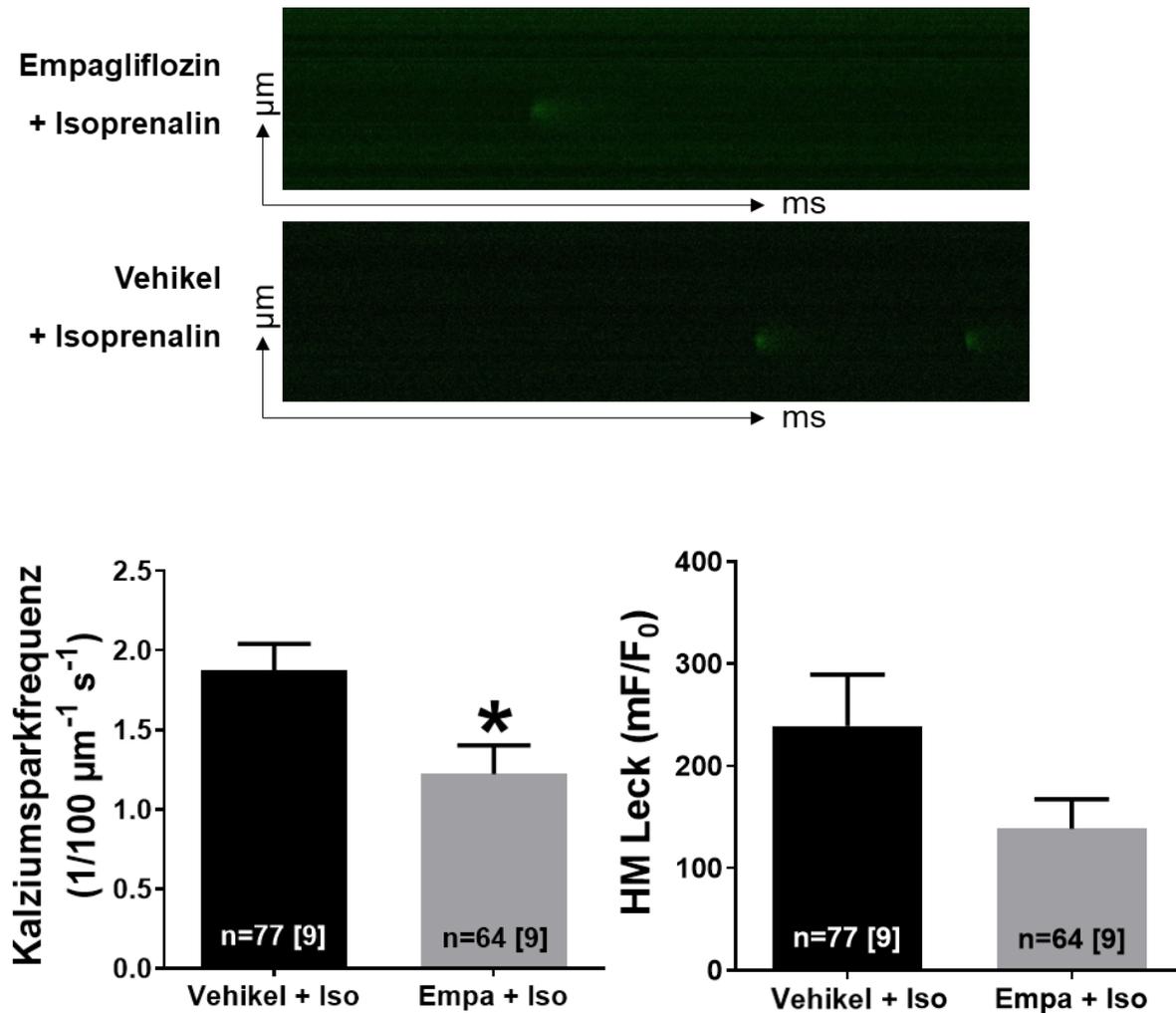


Abb. 3.2.3: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur, Isoprenalin 10^{-7} mmol/l. Oben: Originale Registrierung der spontanen Kalzium-Sparks mit Empagliflozin bzw. Vehikel. Links unten: Frequenz spontaner Ca-Sparks der Vehikel-Gruppe bzw. Empagliflozin-Gruppe. Rechts unten: Halbmaximales Kalziumleck.

Im murinen TAC-Modell zeigte die Charakterisierung der spontanen diastolischen Kalzium-Freisetzen aus dem SR nach 30-minütiger Inkubation mit Empagliflozin oder Vehikel ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in F/F_0 (V: $1,82057 \pm 0,0724$, $n=35$ [4] vs. E: $1,92965 \pm 0,1448$, $n=31$ [4], $p=>0,05$; gepaarter T-Test), FDHM (V: $14,98 \pm 1,012$, $n=35$ [4] vs. E: $16,36 \pm 0,7591$, $n=31$ [4], $p=>0,05$; gepaarter T-Test), FWHM (V: $1,450 \pm 0,05144$, $n=35$ [4] vs. E: $1,591 \pm 0,02184$, $n=31$ [4], $p=>0,05$; gepaarter T-Test) und Size HM (V: $40,869 \pm 5,5389$, $n=35$ [4] vs. E: $53,537 \pm 5,4250$, $n=31$ [4], $p=>0,05$; gepaarter T-Test). Bei Betrachtung der Frequenz der spontanen Kalziumfreisetzungen ließ sich kein signifikanter Unterschied unter Einfluss des SGLT2-Inhibitors feststellen (V: $2,12964 \pm 0,4237$, $n=35$ [4] vs. E: $2,37591 \pm 0,4009$,

$n=31$ [4], $p=>0,05$, Wilcoxon-Test). Das diastolische Kalziumleck zeigte sich unter Empagliflozin ebenfalls nicht beeinflusst (V: $253,755 \pm 87,5444$, $n=35$ [4] vs. E: $363,282 \pm 91,9703$, $n=31$ [4], $p=>0,05$; Wilcoxon-Test).

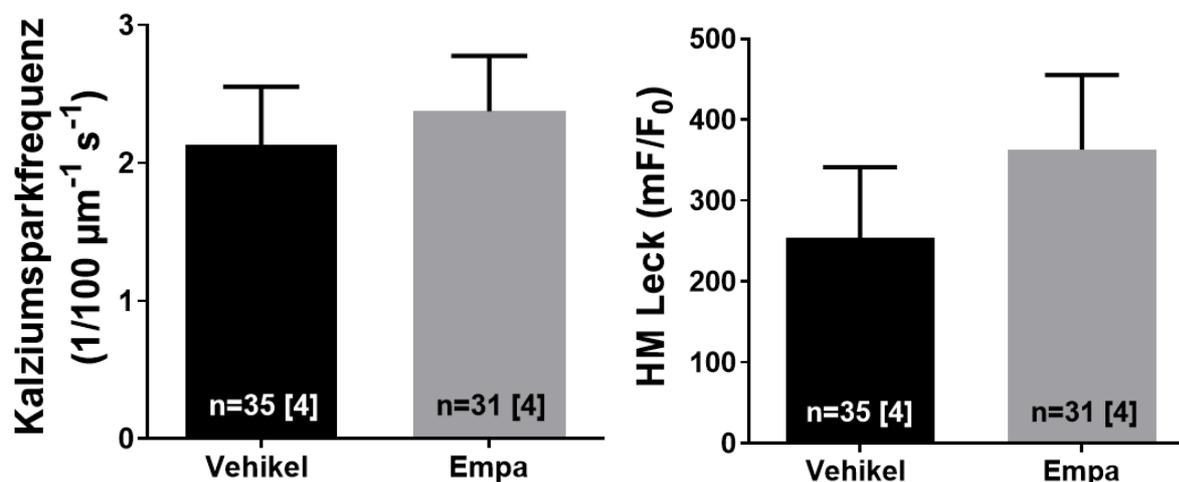


Abb. 3.2.4: TAC-Modell, 30-Minuten-Kultur. Links: Frequenz spontaner Ca-Sparks der Kontrollgruppe bzw. Empagliflozin. Rechts: Halbmaximales Kalziumleck mit Vehikel oder Empagliflozin.

Auch hier erfolgten zusätzliche Experimente nach 24-stündiger Inkubation mit Empagliflozin oder Vehikel. Die Parameter der spontanen Kalziumfreisetzung blieben ohne signifikanten Effekt (V: $n=28$ [4] vs. E: $n=33$ [4]; F/F_0 : $1,923 \pm 0,09238$ vs. $2,091 \pm 0,09720$, $p=>0,05$; FWHM: $1,555 \pm 0,08947$ vs. $1,546 \pm 0,06329$, $p=>0,05$; FDHM: $16,76 \pm 1,219$ vs. $15,90 \pm 1,428$, $p=>0,05$; Size HM: $51,91 \pm 1,066$ vs. $58,97 \pm 13,77$, $p=>0,05$; jeweils gepaarter T-Test). Die Betrachtung der Kalzium-Sparkfrequenz offenbarte unter Empagliflozin-Kultur eine signifikante Reduktion um $\sim 32\%$ (V: $2,50799 \pm 0,3610$; $n=28$ [4] vs. E: $1,70742 \pm 0,3157$; $n=33$ [4]; $p<0,05$; gepaarter T-Test). Auch zeigte sich in der Untersuchung des SR-Kalzium-Lecks ein Trend zur Reduktion unter dem SGLT2-Inhibitor im Vergleich zum Vehikel (V: $355,415 \pm 53,6770$; $n=28$ [4] vs. E: $263,842 \pm 53,4922$; $n=33$ [4]; $p=>0,05$; gepaarter T-Test) um rund 25%.

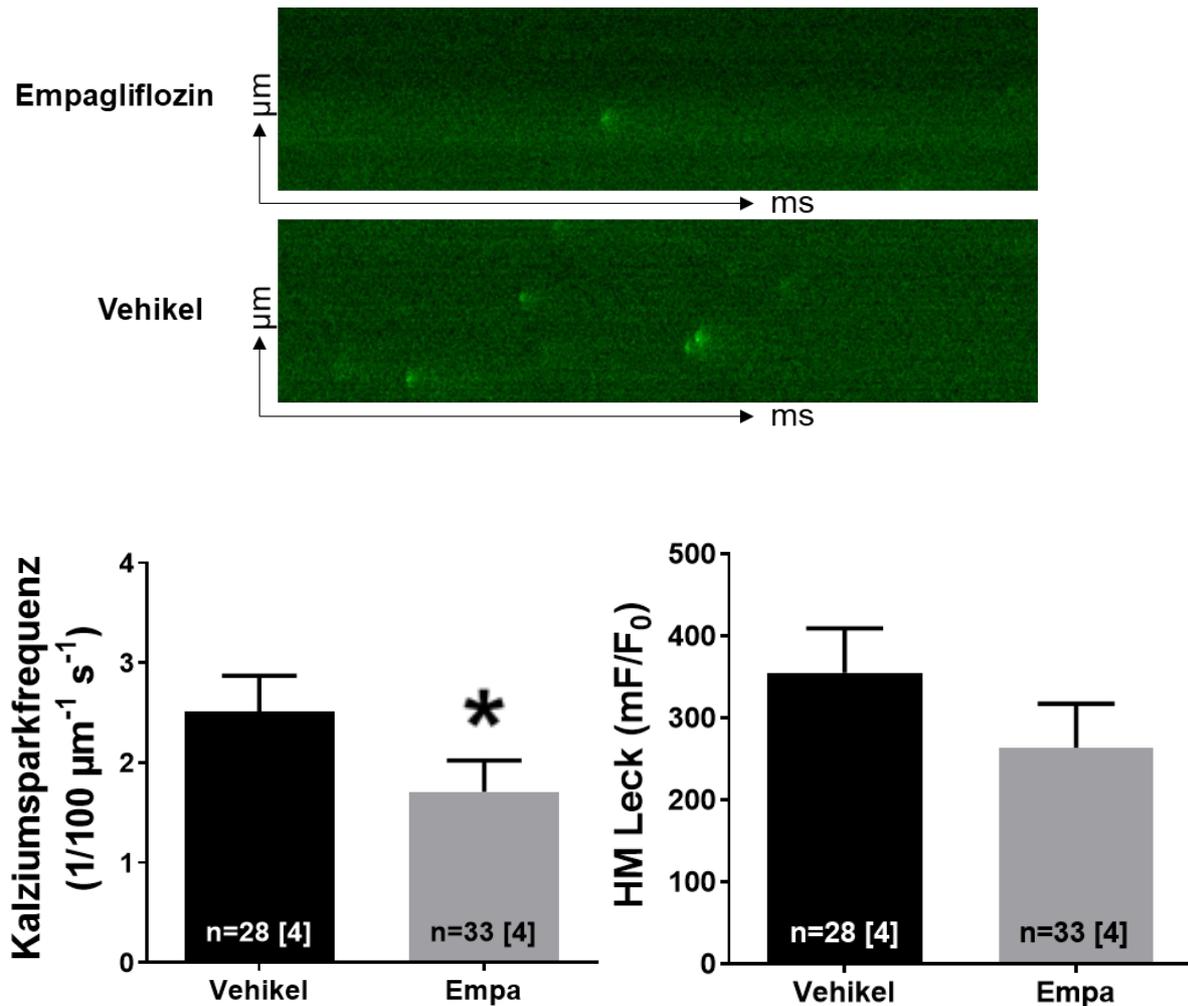


Abb. 3.2.5: TAC-Modell, 24-Stunden-Kultur. Oben: Original der Kalziumsparkaufzeichnungen während der Stimulationspause mit Empagliflozin vs. Vehikel. Unten links: Frequenz spontaner Ca-Sparks. Unten rechts: Halbmaximales Kalziumleck.

Für eine gelungene Translation in die klinische Anwendung ist die Reproduktion der Ergebnisse des Tierversuchs entscheidend. Deshalb erfolgte die Untersuchung der Wirkung von Empagliflozin in isolierten Zellen des humanen insuffizienten Myokards. Verwendet wurden dafür isolierte Ventrikelkardiomyozyten von Patienten mit einer HFrEF (s. 3.1.2). Die durchgeführten Experimente erfolgten nach Isolation und Kultur der humanen Kardiomyozyten (s. 2.2.1 und 2.3).

Hierbei zeigte sich nach 24-stündiger Kultur mit Empagliflozin eine signifikant erhöhte Kalziumsparkamplitude unter Empagliflozin ($V: 1,690 \pm 0,01800; n=16 [4]$ vs. $E: 2,301 \pm 0,1140; n=11 [4]; p < 0,05; \text{Mann-Whitney-Test}$) im Vergleich zum Vehikel. Alle weiteren Parameter der Spark-Charakterisierung zeigten keine Beeinflussung durch

Empagliflozin (V: $n=16$ [4] vs. E: $n=11$ [4]; FWHM: $1,407 \pm 0,05712$ vs $1,425 \pm 0,1325$, $p=>0,05$; FDHM: $16,93 \pm 0,9564$ vs $14,09 \pm 2,022$, $p=>0,05$; Size HM: $50,42 \pm 4,906$ vs $63,79 \pm 18,50$, $p=>0,05$; jeweils Mann-Whitney-Test). Die Analyse der Kalzium-Sparkfrequenz ließ eine signifikante Reduktion unter Kultur mit Empagliflozin beobachten. Es zeigte sich eine ca. 70%ige Reduktion der Frequenz der spontanen Kalziumfreisetzungen (V: $3,25521 \pm 0,9266$; $n=16$ [4] vs. E: $1,00032 \pm 0,2376$; $n=11$ [4]; $p=<0,05$; Mann-Whitney-Test). Bei Betrachtung des halbmaximalen Kalziumlecks war eine rund 62%ige Reduktion, jedoch kein signifikanter Unterschied, zwischen Intervention und Vehikel festzustellen (V: $447,491 \pm 135,9435$; $n=16$ [4] vs. E: $173,968 \pm 85,1235$; $n=11$ [4], $p=>0,05$; Mann-Whitney-Test).

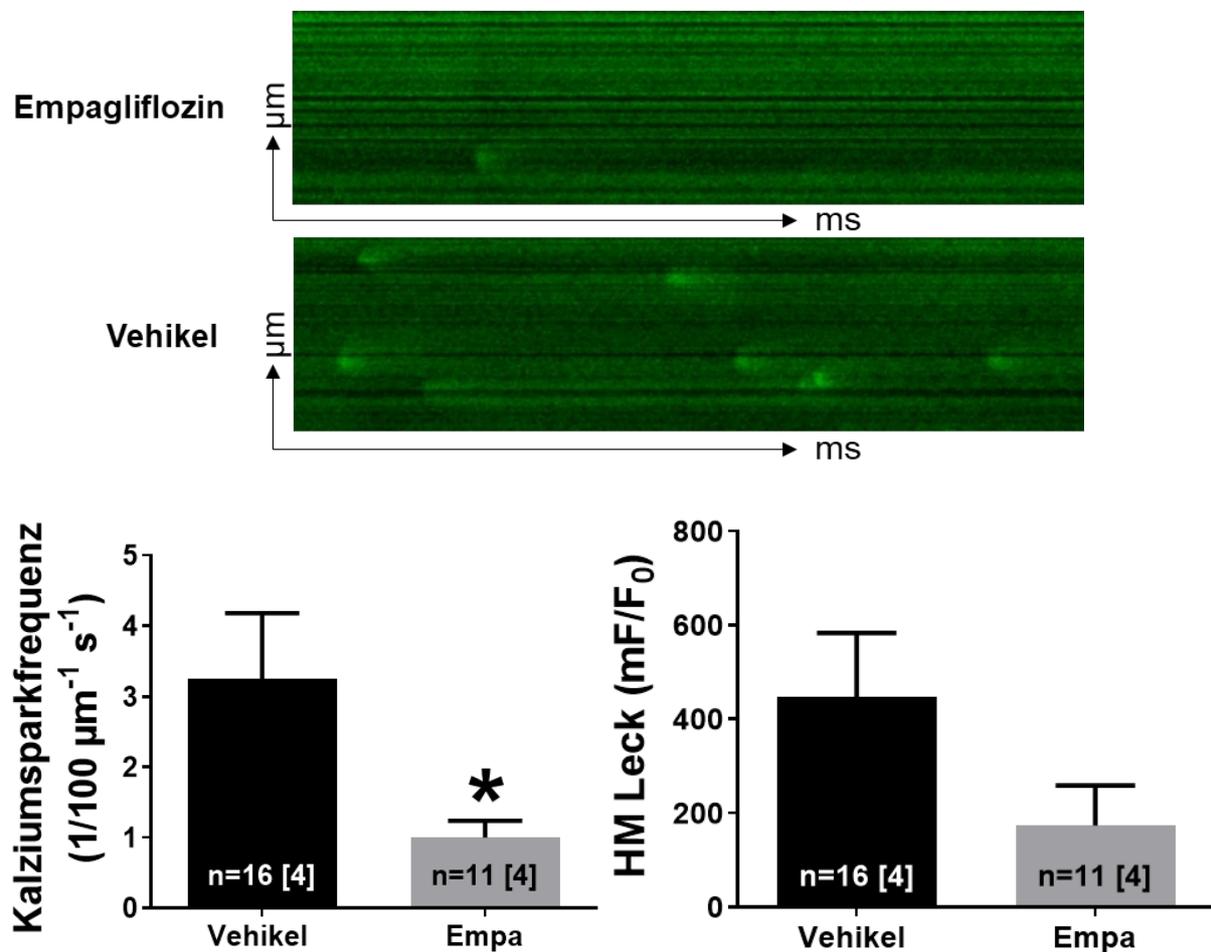


Abb. 3.2.6: Humane HFrEF, 24-Stunden-Kultur. Oben: Originaler Line-Scan der spontanen Kalziumfreisetzungen repräsentativ der ermittelten Sparkfrequenz. Unten links: Frequenz spontaner Ca-Sparks der Vehikel-Gruppe bzw. Empagliflozin. Unten rechts: Halbmaximales diastolisches Kalziumleck humaner Kardiomyozyten unter Vehikel und Empagliflozin. Mittelwerte/gesamt-n.

3.3 Empagliflozin füllt den Kalziumspeicher und beeinflusst die Leak-Load-Beziehung im murinen Kardiomyozyten

Die Untersuchung des SR-Kalzium-Gehalts erfolgte nach 24h-Kultur mittels der Applikation von Koffein. Durch die reversible Bindung an den RyR2 bewirkt es eine permanente Öffnung des Rezeptors, sodass sich mit einem Schlag der gesamte Kalzium-Gehalt des SR ins Zytosol entleert. Da somit auch jegliches durch die SERCA rücktransportierte Kalzium wieder dort landet, gleichen sich die Ionenkonzentrationen beider Kompartimente an.

Im murinen Wildtyp zeigte sich als Maß der gesteigerten systolischen Kalziumfreisetzung aus dem SR eine signifikant erhöhte, Koffein-induzierte Kalziumtransientenamplitude um ca. 50% ($p < 0,05$; ungepaarter *T*-Test) in den Kardiomyozyten der Empagliflozin-Kultur ($1,257 \pm 0,1781$; $n=11$ [7]) im Vergleich zum Vehikel ($0,6458 \pm 0,1040$; $n=12$ [7]).

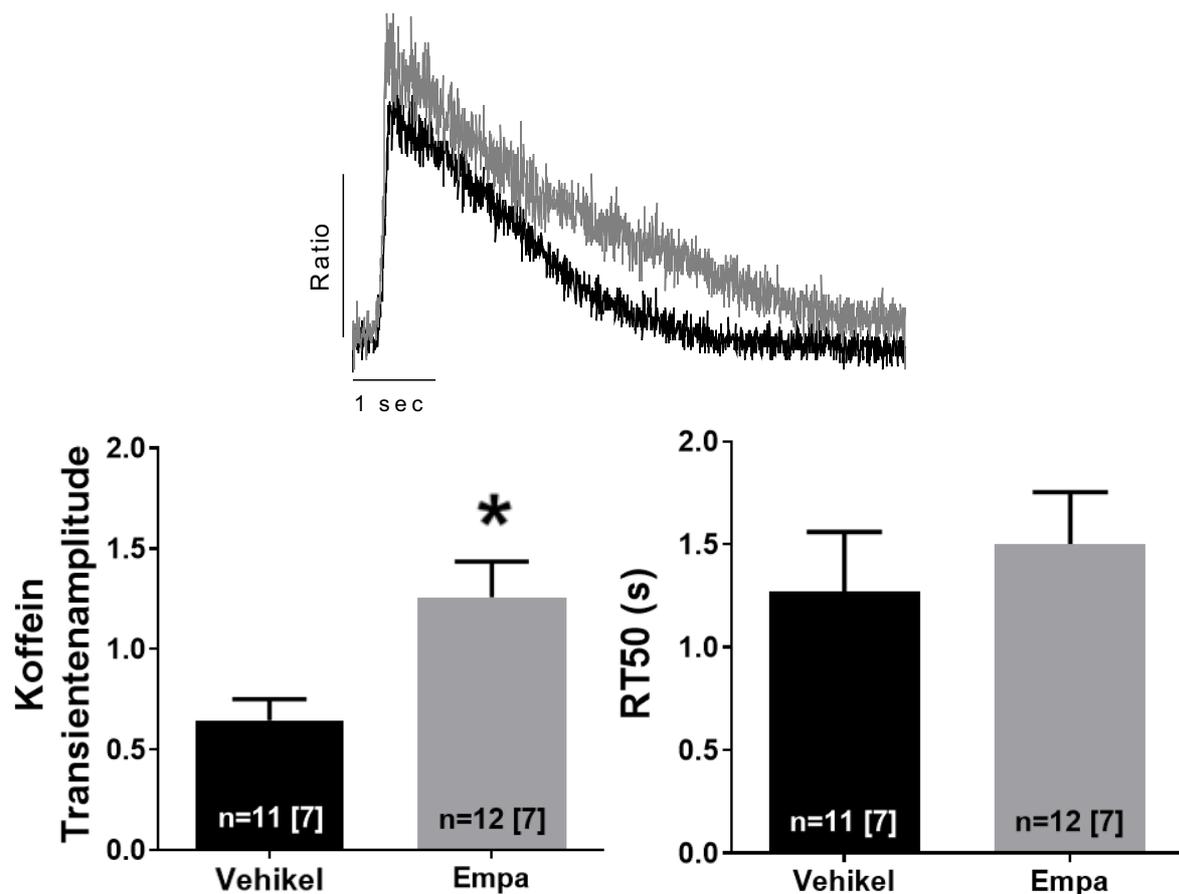


Abb. 3.3.1: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur. Oben: Originale Registrierung eines Kalziumtransienten nach Koffeinstimulation (grau: Empa, schwarz: Vehikel). Unten links: SR-Gehalt gemessen an der Koffein-

induzierten Kalzium-Freisetzung unter Empagliflozin bzw. Vehikel. Unten rechts: Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination unter Vehikel und Empa.

Durch die persistierende Öffnung des RyR2 bleibt jeglicher Rücktransport zytosolischen Kalziums mithilfe der SERCA ohne Effekt (s.o.), sodass die sinkende Ionenkonzentration lediglich durch die Aktivität des NCX bestimmt wird. Die RT50, als Dauer zu der nach stattgehabter Koffeinausschüttung 50% des zytosolischen Kalziums wieder annähernd aus dem Zytosol entfernt wurden, zeigte sich ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($V: 1,271 \pm 0,2896, n=12$ [7] vs. $E: 1,501 \pm 0,2534, n=11$ [7], $p=>0,05$; ungepaarter *T-Test*).

Die Leak-Load-Beziehung beschreibt das Verhältnis von SR-Leck zu SR-Kalziumgehalt. Der Quotient aus diastolischen Kalziumsparks und dem Kalziumgehalt des SR kann Hinweise geben, ob Speicherung oder Verlust überwiegen. Somit sind Rückschlüsse auf die systolische Kontraktionsvermögen und diastolische Relaxationskompetenz der Zellen zu ziehen. Es zeigte sich ein signifikant reduzierter Wert des Quotienten unter Empagliflozin, sodass das spontane Kalziumleck nach 24h Empagliflozin im Verhältnis zum SR-Kalzium-Gehalt um ~ 60% verringert war ($V: 162,1 \pm 48,51; n=59$ [11] vs. $E: 64,24 \pm 12,67; n=54$ [11], $p=<0,05$; *Mann-Whitney-Test*).

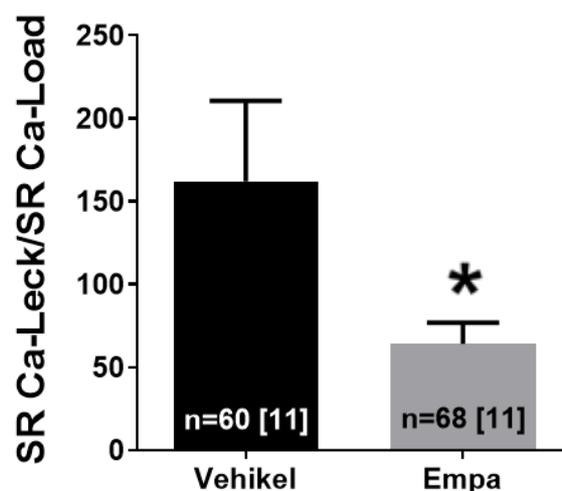


Abb. 3.3.2: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur. Quotient aus SR-Leck und gespeichertem Kalzium im SR. Es zeigt sich bei einer signifikant erhöhten Speicherung von Kalzium im SR gleichzeitig eine signifikante Erniedrigung der Leak-Load-Beziehung zugunsten einer Mehrspeicherung im SR unter Empagliflozin im Vergleich zum Vehikel.

Analog erfolgten diese Experimente auch unter dem Einfluss von Isoprenalin.

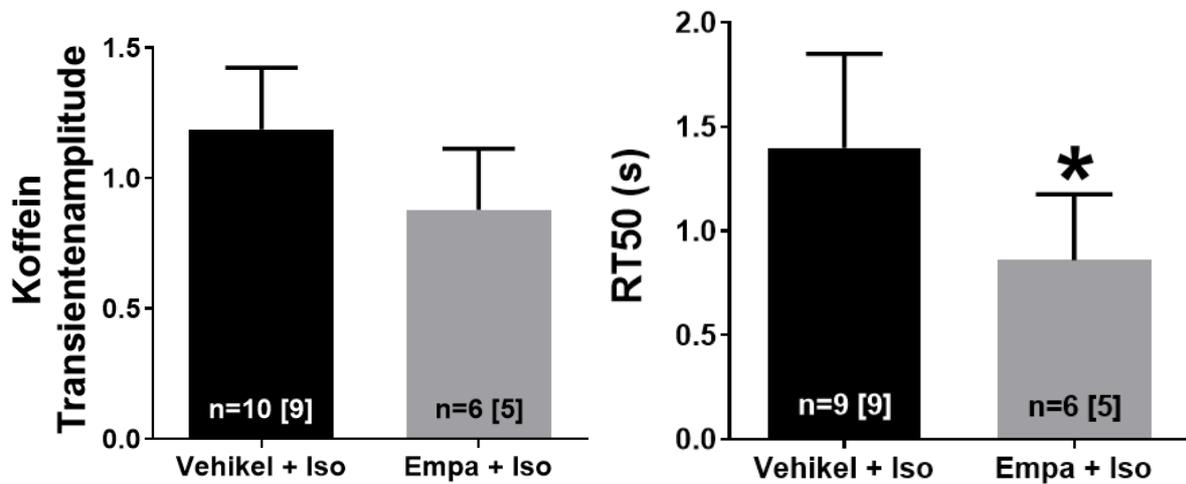


Abb. 3.3.3: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur, Isoprenalin 10^{-7} mmol/l. Links: Mittelwerte der Kalziumtransienten nach Koffeinstimulation unter Empagliflozin oder Vehikel. Rechts: NCX-Aktivität unter Sympathikus-Simulation und Empagliflozin oder Vehikel. Mittelwerte/gesamt-n.

Interessanterweise zeigte sich kein signifikanter Einfluss zwischen den Gruppen bei Betrachtung des Kalziumgehalts des SRs im Koffeinversuch ($V: 1,18767 \pm 0,7094, n=10 [9]$ vs. $E: 0,8791 \pm 0,5227, n=6 [5], p=>0,05, ungepaarter T-Test$), es zeichnete sich eher eine Tendenz der verminderten Speicherung unter Empagliflozin-Kultur ab.

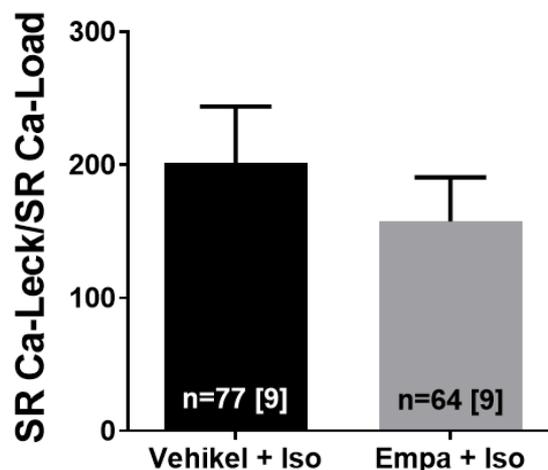


Abb. 3.3.4: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur, Isoprenalin 10^{-7} mmol/l. SR-Gehalt gemessen an der Koffein-induzierten Kalzium-Freisetzung aus dem intrazellulären Speicher, jeweils unter Empagliflozin oder Vehikel.

Die Betrachtung der NCX-Aktivität anhand der RT50 ergab eine signifikant erniedrigte Zeitspanne bis zur 50%-igen Elimination des zytosolischen Kalziums unter Empagliflozin im Vergleich zur Kontrolle (V: $1,39711 \pm 0,4526$, $n=9$ [9] vs. E: $0,8599 \pm 0,3158$, $n=6$ [5], $p<0,05$, ungepaarter T-Test). Die aus SR-Leck und SR-Gehalt ermittelte Leak-Load-Beziehung zeigte sich unter Empagliflozin nur leicht verringert (V: $201,291 \pm 42,48$, $n=77$ [9] vs. E: $157,659 \pm 32,87$, $n=64$ [9], $p>0,05$, ungepaarter T-Test).

3.4 Empagliflozin erhöht die systolische Kalziumtransientenamplitude in muriner und humaner HFrEF

Nach 24-Stunden-Kultur mit Empagliflozin zeigte sich im murinen Wildtyp eine signifikante Reduktion des diastolischen Kalziumgehalts im Vergleich zum Vehikel (V: $n=37$ [11] vs. E: $n=38$ [11], $p<0,05$; 0,5 Hertz: $1,4960 \pm 0,0782$ vs. $1,3547 \pm 0,0773$; 1,0 Hertz: $1,5441 \pm 0,0857$ vs. $1,4098 \pm 0,0837$; 2,0 Hertz: $1,5928 \pm 0,0915$ vs. $1,4579 \pm 0,0901$; 2-Wege-ANOVA RM; Sidak für alle Frequenzen $p<0,05$).

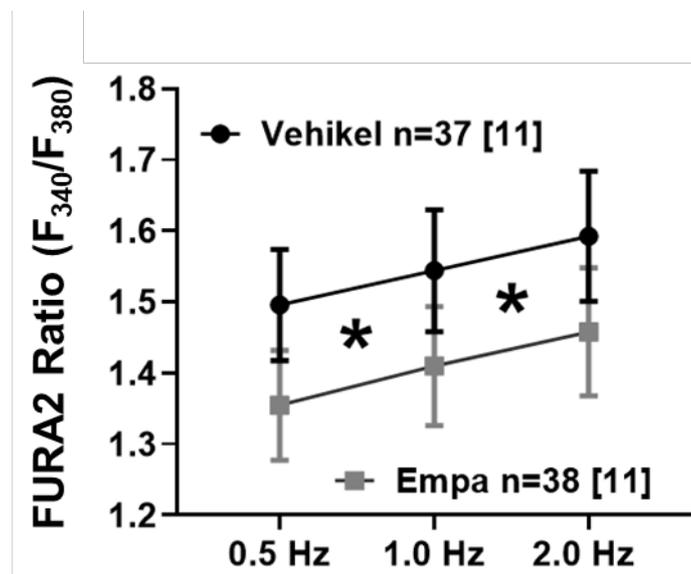


Abb. 3.4.1: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur. Mittlerer diastolischer Kalziumgehalt des Zytosols nach 24-h-Kultur unter Empagliflozin oder Vehikel DMSO.

Die systolische Transientenamplitude als Maß der Kalziumfreisetzung aus dem SR zeigte sich in beiden Gruppen nach 24 Stunden über die Stimulationsfrequenzen hinweg progredient zunehmend. Darüber hinaus war insgesamt eine signifikante Differenz zwischen Empagliflozin und Kontrolle zu beobachten (V: $n=40/40/37$ [13/13/12] vs. E: $n=41$ [13]; 0,5 Hertz: $0,3142 \pm 0,0401$ vs. $0,4115 \pm 0,0680$; 1,0 Hertz: $0,3343 \pm 0,0436$ vs. $0,4386 \pm 0,0718$; 2,0 Hertz: $0,3694 \pm 0,0533$ vs. $0,4779 \pm 0,0673$; $p < 0,05$; 2-Wege-ANOVA; Sidak $p \Rightarrow 0,05$).

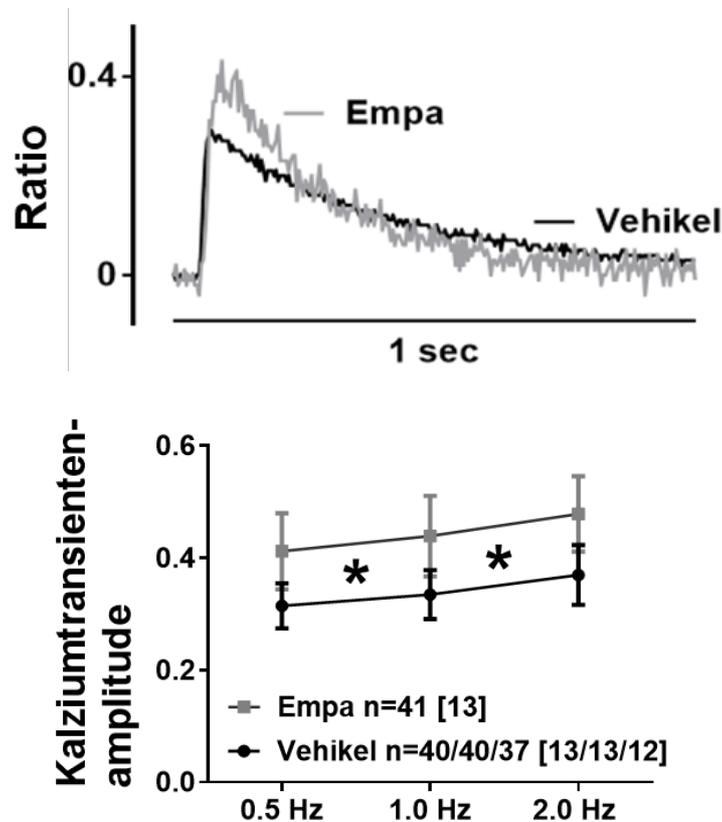


Abb. 3.4.2: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur. Oben: Originale Abbildung registrierter Kalziumtransienten unter Empagliflozin und Kontrolle (normierte Darstellung). Unten: Kalziumtransientenamplitude in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenzen unter Empa oder Vehikel.

Das systolische Kontraktionsvermögen wurde anhand der Sarkomerverkürzung der isolierten Zellen nach 24h-Kultur mit Empagliflozin oder Vehikel ausgewertet. In beiden Gruppen zeigte sich als Korrelat einer frequenzabhängigen Kontraktionssteigerung eine Zunahme des Verkürzungsvermögens der Sarkomere bei einer Stimulationsfrequenz von 2,0 Hertz. Die Empagliflozin-behandelten Zellen erreichten

unter 0,5 wie auch 1,0 Hertz ein größere, nicht signifikant unterschiedliche, Kontraktion. Mit steigender Stimulationsfrequenz näherten sich die prozentualen Sarkomerverkürzungen von Empagliflozin und Vehikel an; somit war kein signifikanter Unterschied festzustellen ($V: n=22 [9]$ vs. $E: n=27 [9/8/8]$, 0,5 Hertz: $2,013 \pm 0,390$ vs. $2,802 \pm 0,653$; 1,0 Hertz: $1,949 \pm 0,305$ vs. $2,527 \pm 0,606$; 2,0 Hertz: $2,723 \pm 0,429$ vs. $3,082 \pm 0,420$; $p > 0,05$; 2-Wege-ANOVA).

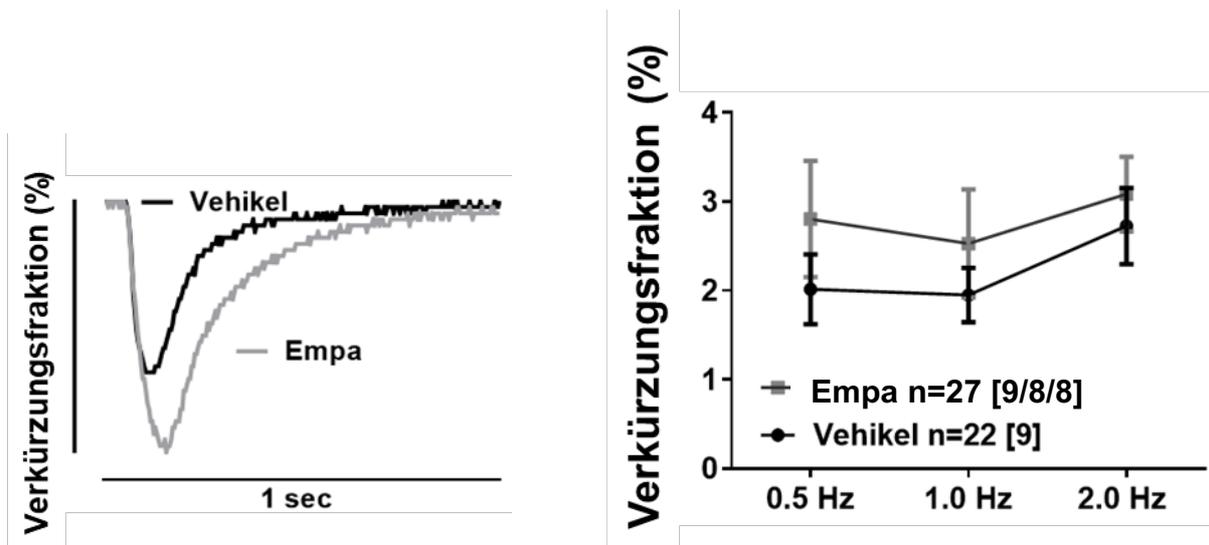


Abb. 3.4.3: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur. Links: Originale Abbildung einer systolischen Kontraktion (normierte Darstellung) von Empagliflozin und Vehikel DMSO. Rechts: Verkürzung der Sarkomer als prozentualer Anteil der diastolischen Länge nach 24 Stunden Kultivierung mit Empa oder DMSO.

Die Betrachtung der Zeit bis zum 50%igen Abfalls des zytosolischen Kalziumtransienten (RT50), erlaubt durch Darstellung der Abfalls-Geschwindigkeit Rückschlüsse auf die diastolische Kalziumelimination durch die SERCA sowie auf eventuelle Störungen in der diastolischen Relaxation aufgrund eines erhöhten Kalziumangebots am Ende des Kontraktionsvorgangs.

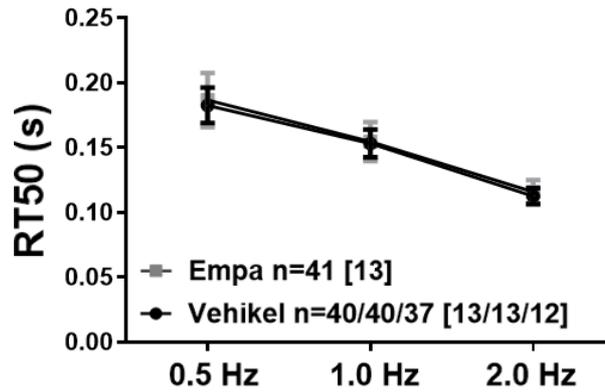


Abb. 3.4.4: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur. Benötigte Zeit bis zum 50%igen Abfall der Kalziumtransientenamplitude der Kardiomyozyten in Sekunden.

Es ließ sich eine frequenzabhängige Beschleunigung der benötigten Zeit, bis die Zelle 50% des Kalziums eliminiert hatte und somit die Hälfte der Relaxation erfolgt war, beobachten. In der Kalziumelimination zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen Empagliflozin und Vehikel (*V*: $n=40/40/38$ [13/13/12] vs. *E*: $n=41$ [13], 0,5 Hertz: $0,1827 \pm 0,0137$ vs. $0,1868 \pm 0,0208$; 1,0 Hertz: $0,1533 \pm 0,0107$ vs. $0,1547 \pm 0,0151$; 2,0 Hertz: $0,1127 \pm 0,0061$ vs. $0,1160 \pm 0,0092$; $p > 0,05$; 2-Wege-ANOVA).

Die Untersuchungen unter Simulation einer beta-adrenergen Stimulation ergab im Wildtyp keine Veränderung im diastolischen Kalzium (*V*: $n=43$ [14] vs. *E*: $n=46$ [14]; 0,5 Hertz: $1,454 \pm 0,068$ vs. $1,378 \pm 0,051$; 1,0 Hertz: $1,496 \pm 0,072$ vs. $1,433 \pm 0,055$; 2,0 Hertz: $1,542 \pm 0,078$ vs. $1,486 \pm 0,061$; $p > 0,05$; 2-Wege-ANOVA).

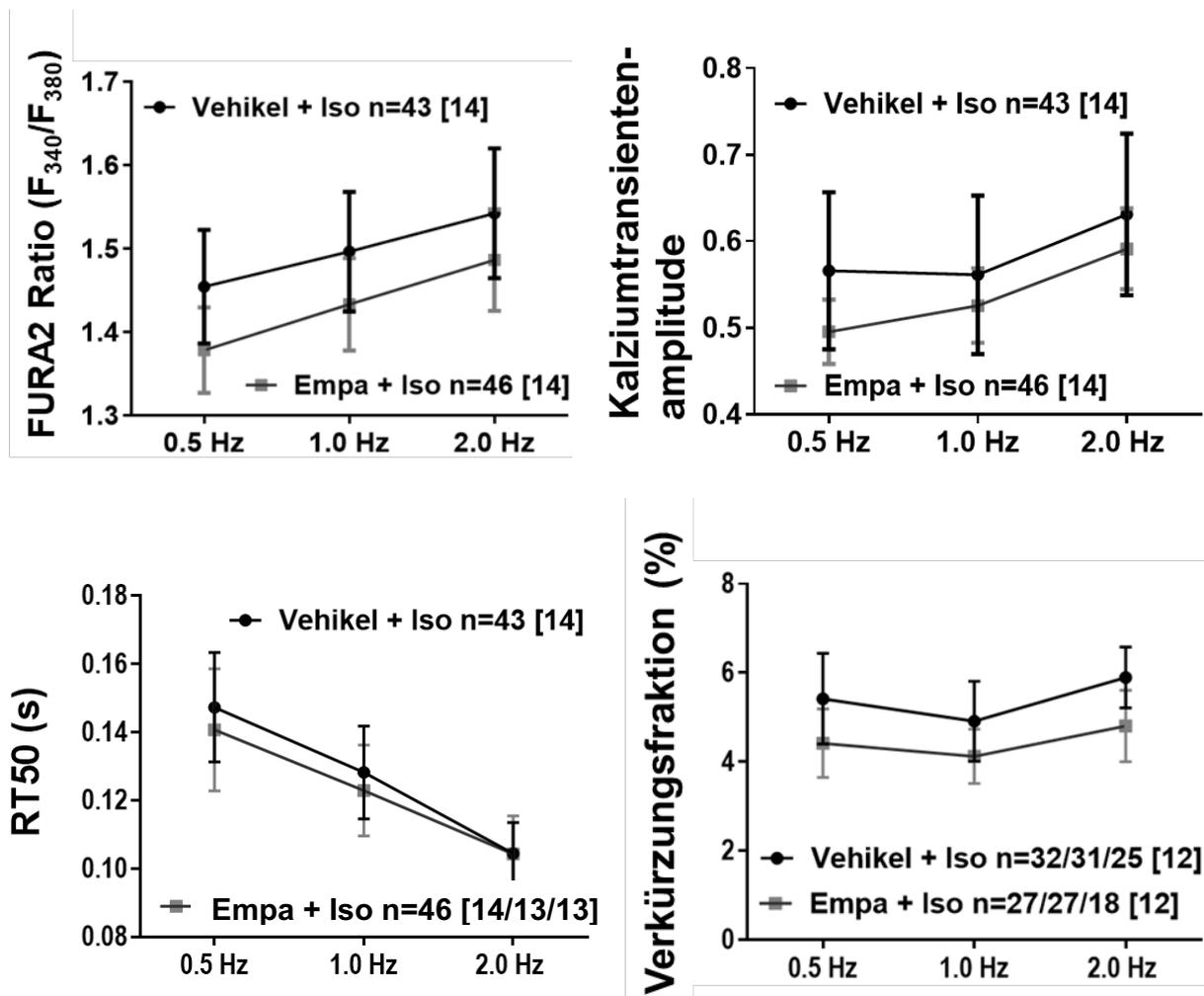


Abb. 3.4.5: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur, Isoprenalin 10^{-7} mmol/l. Links oben: diastolischer Kalziumgehalt beta-adrenerg-stimulierter Kardiomyozyten unter Empagliflozin oder Vehikel. Rechts oben: Untersuchung der systolischen Kalziumtransientenamplitude von Empagliflozin vs. Vehikel. Links unten: Verkürzungsvermögen unter Isoprenalin und Vehikel vs. Empagliflozin. Rechts unten: Geschwindigkeit des Kalziumrücktransports nach Empagliflozin oder DMSO.

Die systolische Transientenamplitude zeigte sich unter Empagliflozin im Vergleich zum Vehikel nicht mehr signifikant erhöht (V: $n=43$ [14] vs. E: $n=46$ [14], 0,5 Hertz: $0,5658 \pm 0,0906$ vs. $0,4952 \pm 0,0372$; 1,0 Hertz: $0,5612 \pm 0,0917$ vs. $0,5256 \pm 0,0432$; 2,0 Hertz: $0,6310 \pm 0,0935$ vs. $0,5911 \pm 0,0467$; $p > 0,05$; 2-Wege-ANOVA). Bei Betrachtung der RT50 als Maß der SERCA-Aktivität ergab sich eine allgemeine Beschleunigung des Kalzium-Rücktransports unter Isoprenalin. Zwischen der Empagliflozin- und der Vehikel-Kultur zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied (V: $n=43$ [14] vs. E: $n=46$ [14], 0,5 Hertz: $0,1473 \pm 0,0160$ vs. $0,1407 \pm 0,0179$; 1,0 Hertz: $0,1282 \pm 0,0136$ vs. $0,1229 \pm 0,0133$; 2,0 Hertz: $0,1044 \pm 0,0091$ vs. $0,1043 \pm$

0,0111; $p > 0,05$; 2-Wege-ANOVA). Ähnlich ließ sich in der Sarkomerverkürzung unter beta-adrenergem Stress keine Signifikanz in der prozentualen Verkürzung nachweisen (V: $n=32/31/25$ [12] vs. E: $n=27/27/18$ [12/12/10]; 0,5 Hertz: $5,418 \pm 1,018$ vs. $4,417 \pm 0,771$; 1,0 Hertz: $4,912 \pm 0,900$ vs. $4,122 \pm 0,609$; 2,0 Hertz: $5,895 \pm 0,684$ vs. $4,807 \pm 0,803$; $p > 0,05$; 2-Wege-ANOVA).

Die Betrachtung des diastolischen Kalziums in Kardiomyozyten des TAC-Mausmodells zeigte keine signifikante Veränderung unter Empagliflozin (V: $n=13$ [4] vs. E: $n=17$ [4], 0,5 Hertz: $1,287 \pm 0,070$ vs. $1,365 \pm 0,037$; 1,0 Hertz: $1,370 \pm 0,090$ vs. $1,399 \pm 0,053$; 2,0 Hertz: $1,441 \pm 0,114$ vs. $1,483 \pm 0,047$; $p > 0,05$; 2-Wege-ANOVA).

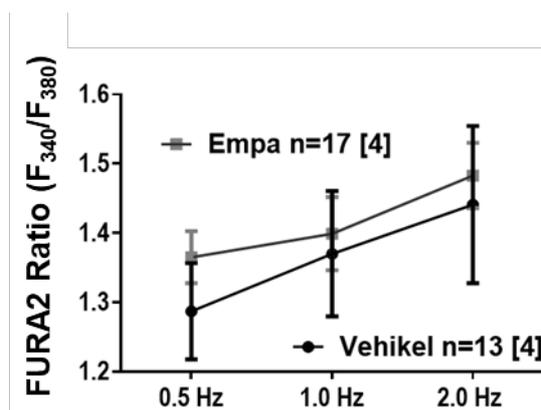


Abb. 3.4.6: TAC-Modell, 24-Stunden-Kultur. Diastolischer Kalziumgehalt insuffizienter muriner Kardiomyozyten unter Empagliflozin oder Vehikel ohne signifikanten Unterschied nach 24-h-Kultur.

Die systolischen Kalziumtransienten ließen jedoch insgesamt einen signifikanten Unterschied nach Kultur mit dem SGLT2-Inhibitor im Vergleich zum Vehikel beobachten (V: $n=13$ [4] vs. E: $n=17$ [4]; 0,5 Hertz: $0,2288 \pm 0,0707$ vs. $0,3997 \pm 0,0569$; 1,0 Hertz: $0,2268 \pm 0,0628$ vs. $0,3618 \pm 0,0713$; 2,0 Hertz: $0,2442 \pm 0,0600$ vs. $0,3878 \pm 0,0600$; $p\text{-Wert} < 0,05$; 2-Wege-ANOVA; Sidak $p > 0,05$). Zusätzlich zeigte sich in der Varianz-Analyse eine signifikant verstärkte prozentuale Verkürzung der Sarkomere unter Empagliflozin (V: $n=6/5/4$ [2] vs. E: $n=7$ [3], $p < 0,05$; 2-Wege-ANOVA; Sidak $p > 0,05$). Die RT50 als Maß für die Aktivität der SERCA zeigte sich im Gruppenvergleich unter Empagliflozin bei 0.5 Hertz signifikant in ihrer Aktivität erhöht

(V: $n=14$ [4] vs. E: $n=18$ [4], 0,5 Hertz: $0,4207 \pm 0,0668$ vs. $0,2578 \pm 0,0125$; 1,0 Hertz: $0,2478 \pm 0,0154$ vs. $0,1989 \pm 0,0054$; 2,0 Hertz: $0,1700 \pm 0,0110$ vs. $0,1389 \pm 0,0018$; $p < 0,05$; 2-Wege-ANOVA; Sidak $p < 0,05$ bei 0,5 Hertz; näherte sich jedoch bei höheren Frequenzen wieder der Kontrollgruppe an (Sidak $p > 0,05$ bei 1,0 Hertz und 2,0 Hertz).

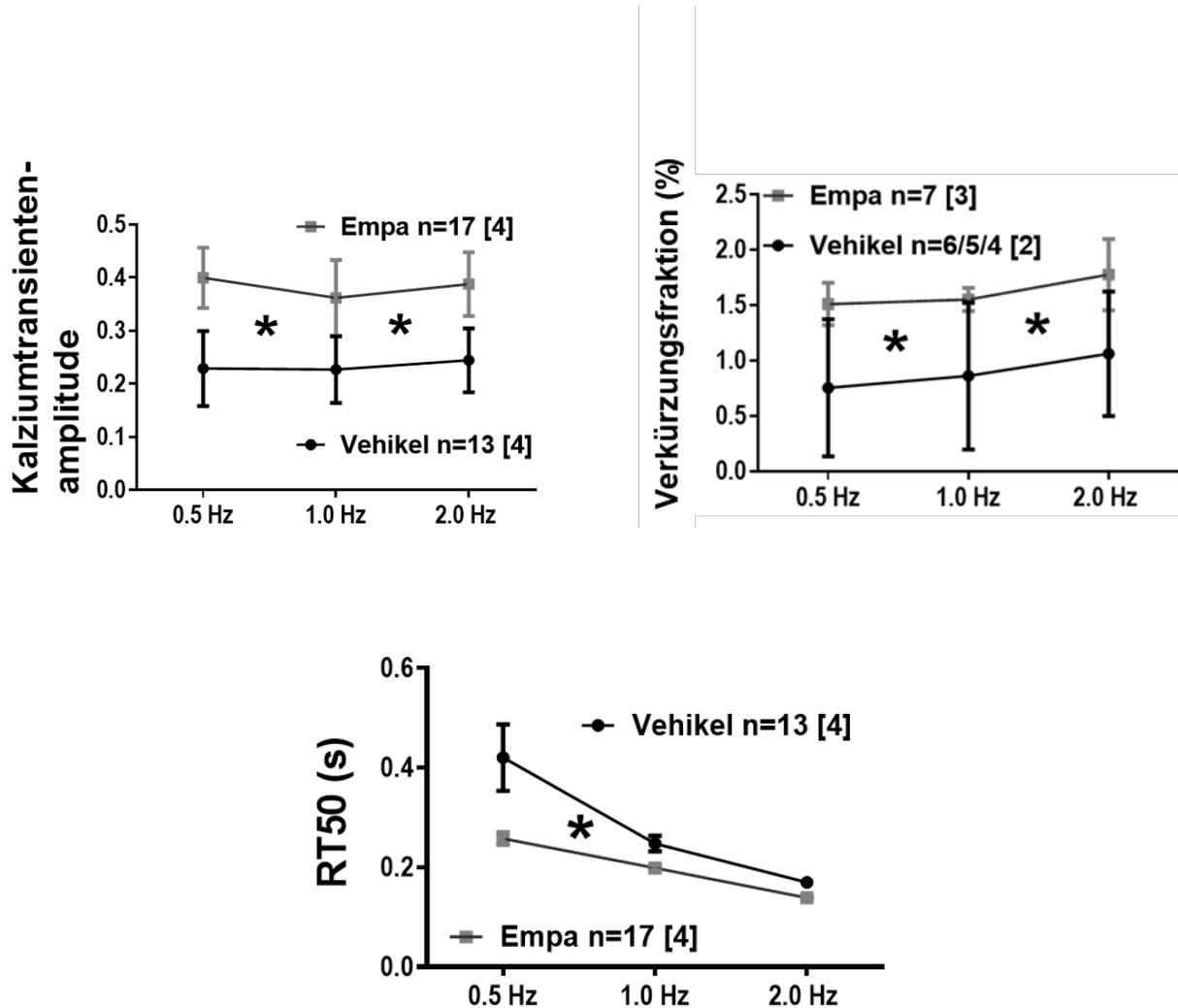


Abb. 3.4.7: TAC-Modell, 24-Stunden-Kultur. Oben links: Untersuchung der systolischen Kalziumtransientenamplitude mit Empagliflozin vs. Vehikel. Oben rechts: Verkürzungsvermögen unter Vehikel oder Empagliflozin. Unten: Geschwindigkeit des Kalziumrücktransports nach SGLT2-Inhibitor oder DMSO.

In den Kardiomyozyten der humanen Herzinsuffizienz schließlich zeigte sich eine signifikante Steigerung der systolischen Kalziumamplitude unter Empagliflozin-Kultur (V: $1,35827 \pm 0,0206$, $n=12$ [3] vs. E: $1,56542 \pm 0,0133$, $n=13$ [3]; $p < 0,05$; gepaarter *T-Test*), die RT50 blieb unbeeinflusst (V: $487,61 \pm 60,8263$, $n=10$ [3] vs. E: $450,22 \pm 7,0679$, $n=12$ [3]; $p > 0,05$).

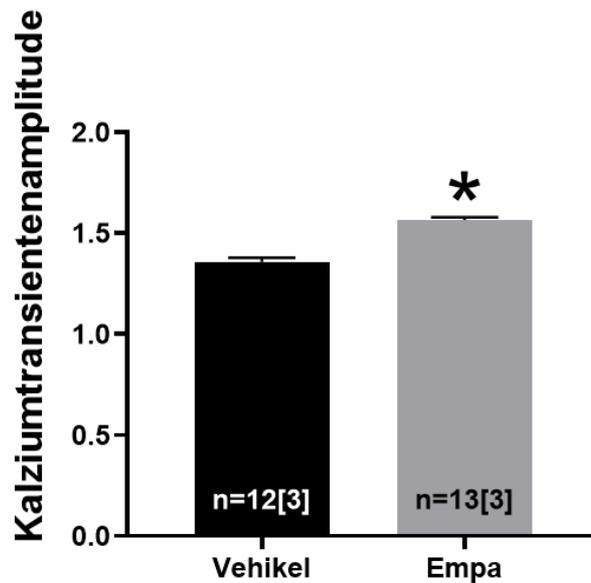


Abb.3.4.8: Humane HFrEF, 24-Stunden-Kultur. Mittelwerte der konfokalmikroskopischen systolischen Kalziumtransientenamplituden mit Empagliflozin oder Vehikel.

3.5 Der zytosolische Natriumgehalt nach Empagliflozin-Kultur

Die zytosolische Kalzium- und Natrium-Homöostase stehen über den sarkolemmalen NCX in enger Verbindung. Dieser transportiert Natrium nach intrazellulär, um im Austausch Kalzium aus der Zelle zu mobilisieren (s.1.6.1). Da dieser Transport abhängig vom lokalen chemischen und elektrischen Gradienten ist, kann ein erhöhter Natriumspiegel in der Zelle die Transportrichtung umkehren. Folglich würde Natrium exportiert, dadurch aber auch mehr Kalzium in die Zelle importiert, mit dem Resultat einer Kalziumüberladung im Zytosol. Da dieser Sachverhalt in der Herzinsuffizienz einen relevanten Einfluss auf das intrazelluläre Kalzium nehmen kann, wurde der Natrium-Gehalt der Kardiomyozyten nach Kurz-Inkubation und Kultur mit Empagliflozin oder Vehikel DMSO untersucht.

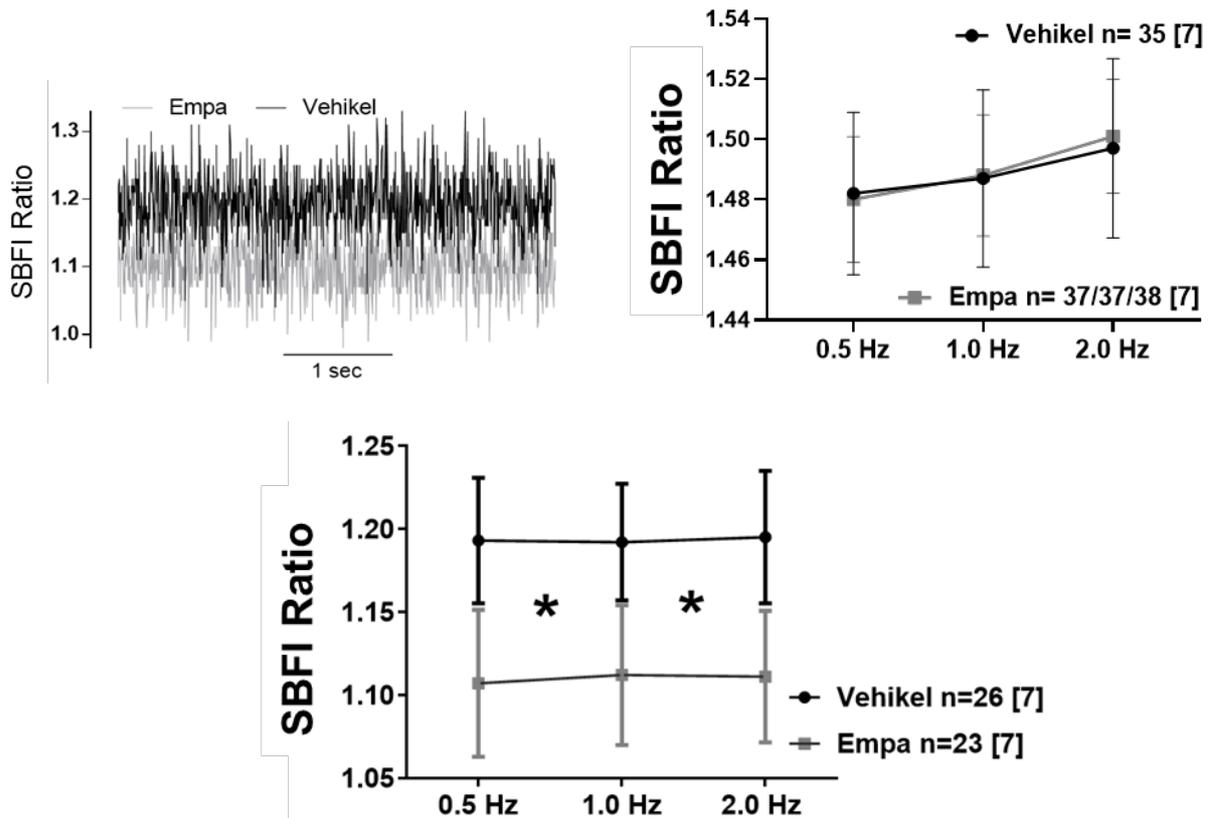


Abb. 3.5.1: Wildtyp, 30-Minuten- & 24-Stunden-Kultur. Links oben: Originale Registrierung des SBF I-Signals als Korrelat des intrazellulären Natriumgehalts. Rechts oben: Intrazelluläre Natriumkonzentrationen nach 30 Minuten Inkubation mit Vehikel oder Empagliflozin. Unten: Natrium-Gehalt unter Vehikel versus Empagliflozin nach 24h, je mit Stimulationsfrequenzen von 0,5, 1,0 und 2,0 Hertz.

Die intrazelluläre Natriumkonzentration zeigte sich nach 30-minütiger Inkubation mit Empagliflozin unbeeinflusst ($V n=35 [7]$ vs. $E: n=37/37/38 [7]$, 0,5 Hertz: $1,48 \pm 0,020$ vs. $1,49 \pm 0,0137$; 1,0 Hertz: $1,49 \pm 0,0203$ vs. $1,494 \pm 0,0133$; 2,0 Hertz: $1,499 \pm 0,0203$ vs. $1,504 \pm 0,0130$; $p=>0,05$; 2-Wege-ANOVA); nach 24-Stunden-Kultur ließ sich im gruppierten Vergleich unter Empagliflozin ein signifikant reduzierter Natriumgehalt beobachten ($V n=26 [7]$ vs. $E: n=23 [7]$, $p=<0,05$; 0,5 Hertz: $1,193 \pm 0,038$ vs. $1,107 \pm 0,044$; 1,0 Hertz: $1,192 \pm 0,035$ vs. $1,112 \pm 0,042$; 2,0 Hertz: $1,195 \pm 0,040$ vs. $1,111 \pm 0,040$; 2-Wege-ANOVA; Sidak $p=>0,05$)

Aufgrund des fein abgestimmten Zusammenspiels von Natrium- und Kalziumhaushalt wurde im Anschluss die Natrium-Kalium-ATPase als mögliche Zielstruktur des SGLT2-Inhibitors mithilfe eines Ouabain-Protokolls (s. 2.5.8) untersucht.

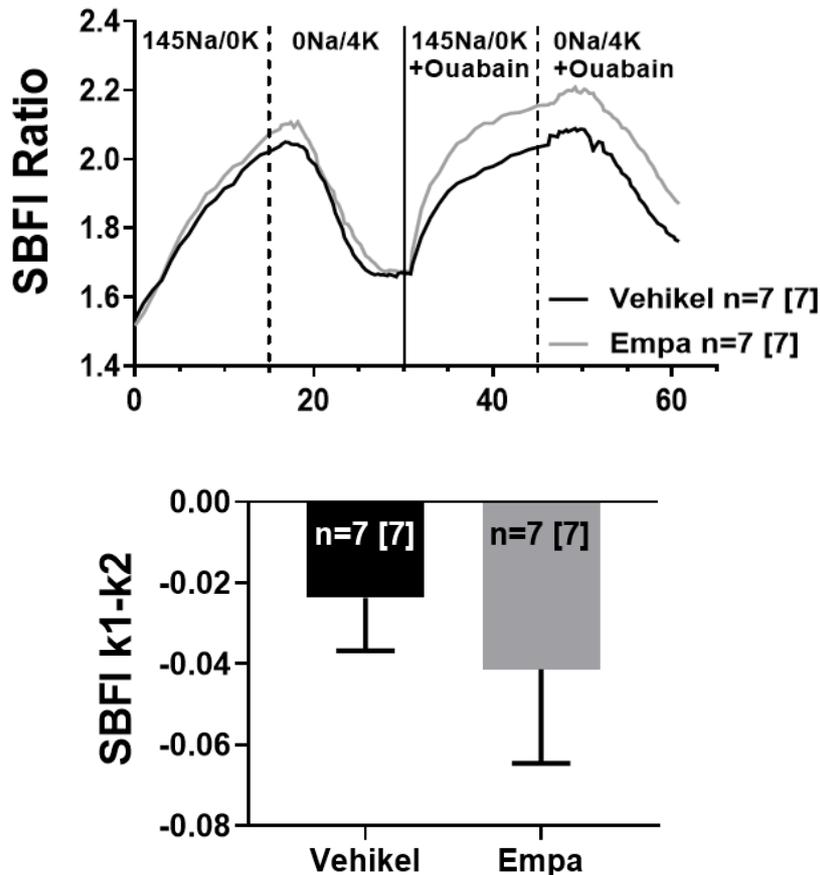


Abb. 3.5.2: Wildtyp, 24-Stunden-Kultur. Oben: Mittelwerte des Natriumgehalts unter Empagliflozin oder Kontrolle im Verlauf des 60-minütigen Protokolls. Unten: Slope-Fit-Differenz der Natriumkonzentrationen vor Ouabain abzüglich der Natriumgehalte nach Blockade der NKA, wodurch die reine Aktivität der NKA in beiden Gruppen abgebildet wird. Mean/n-gesamt.

Bei Betrachtung der Differenz der negativen Steigung vor und nach NKA-Blockierung ließ sich, durch Subtraktion des Natrium-Abfalls unter Inhibition der NKA vom Abfall unter Aktivität aller vorhandenen Transporter, die reine NKA-Aktivität ermitteln. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der ermittelten Annäherung an die Kurve (Slope-Fit) unter Empagliflozin im Vergleich zum Vehikel (V: $-0,02369 \pm 0,01307$; $n=7$ [7] vs. E: $-0,04135 \pm 0,02325$; $n=7$ [7], $p=>0,05$; gepaarter T-Test).

4 Diskussion

Die EMPA-REG-OUTCOME-Studie zeigte unter Einnahme des SGLT2-Inhibitors Empagliflozin eine Reduktion von Herzinsuffizienz-assoziiierter Hospitalisierung sowie dem Tod kardiovaskulärer Ursache und Tod jeglicher Ursache in Patienten mit Diabetes mellitus (Zinman u. a. 2015). Die vorliegende Arbeit nahm dies zum Anlass, die Wirkung von Empagliflozin auf Natrium- und Kalziumhaushalt im isolierten Kardiomyozyten des gesunden Mausmodells sowie im murinen und humanen Modell der HFrEF, jeweils unabhängig von einer diabetischen Grunderkrankung, zu untersuchen.

4.1 Empagliflozin zeigt Effekte auf den Ionenhaushalt von Kardiomyozyten im *Ex-vivo*-Experiment unabhängig von einer diabetischen Stoffwechsellage

In dieser Arbeit konnten *ex-vivo* Effekte von Empagliflozin auf den zellulären Ionenhaushalt im gesunden murinen Wildtyp, im Mausmodell der HFrEF sowie in Kardiomyozyten der humanen HFrEF gezeigt werden, stets unabhängig von einer diabetischen Stoffwechsellage.

Die Hypothese einer rein systemischen Wirkung des SGLT2-Inhibitors scheint somit unwahrscheinlich. Auch Baartscheer et al. sahen zelluläre Effekte nach transientser Empagliflozin-Exposition durch Beeinflussung des Natrium- und Kalziumhandlings im murinen Kardiomyozyten (Baartscheer u. a. 2017; Uthman u. a. 2018). Darüber hinaus mehrten sich die Berichte über Modulationen der zellulären Proteinexpression: So konnte in Kardiomyozyten diabetischer Ratten nach 5-wöchiger Empagliflozingabe neben einer Beeinflussung der kardiomyozytären Trophik und der Ultrastruktur intrazellulärer Mitochondrien eine reduzierte Expression profibrotischer Proteine, einhergehend mit einer Verbesserung der diastolischen Funktion *in vivo*, beobachtet werden (Habibi u. a. 2017). Nach dreimonatiger Gabe von Empagliflozin sah eine weitere Arbeitsgruppe eine relative Hochregulation von SERCA- und RyR2-Expression mit positiver Beeinflussung des Kalzium- und Natriumhaushalts im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lee u. a. 2019). Ebenfalls ließ sich nach drei Monaten in isolierten Ratten-Kardiomyozyten eine gesteigerte Expression der anti-

apoptotischen Proteine IAP und BIRC5 unter Empagliflozin beobachten; die resultierende Reduktion des Zelltods war hierbei unabhängig von einer Komorbidität mit Diabetes mellitus (Iborra-Egea u. a. 2019). Dass sich die Effekte nicht nur auf den Ionenhaushalt beschränken, konnte auch unsere Arbeitsgruppe unlängst zeigen: In isolierten murinen und humanen Kardiomyozyten wurde nach 24-stündiger Empagliflozin-Kultur eine gesteigerte Expression des GLUT1 beobachtet (Mustroph u. a. 2019b).

Interessanterweise zeigen sich Effekte der SGLT2-Inhibitoren zudem in humanen Vorhof-Myofibroblasten, in denen eine Empagliflozin-vermittelte regulatorische Wirkung auf zelluläres Remodeling und antifibrotische Vorgänge gezeigt werden konnte (Kang u. a. 2020), sowie im humanen Endothel, für das in einer klinischen Interventionsstudie mit Dapagliflozin an diabetischen Patienten Korrelate einer Reduktion der endothelialen Dysfunktion beobachtet wurden (Solini u. a. 2017).

Da die initialen Studien zur Charakterisierung der SGLT2-Inhibitoren in EMPA-REG-OUTCOME, CANVAS und DECLARE-TIMI-85 in Patienten mit Diabetes mellitus erfolgten (Zinman u. a. 2015; Neal u. a. 2017; Wiviott u. a. 2019), stellte sich darüber hinaus die Frage, in welcher Beziehung die beobachtete Wirkung zum Glukose-Stoffwechsel des Organismus zu verstehen ist. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse klinischer Studien wie DAPA-HF, die zeigte, dass ein signifikanter Effekt auf den kardiovaskulären Tod und die Herzinsuffizienz-bedingte Hospitalisierung durch Dapagliflozin unabhängig von einer diabetischen Stoffwechsellage zu beobachten ist (McMurray u. a. 2019), oder EMPEROR-Reduced, die, in einer Kohorte von Patienten mit und ohne Diabetes, für Empagliflozin frühe Effekte auf das Risiko sowie die absolute Anzahl an Hospitalisierungen aufgrund einer Herzinsuffizienz nachweisen konnte (Packer u. a. 2021).

4.2 Die 30-Minuten-Inkubation mit Empagliflozin bleibt in isolierten murinen Kardiomyozyten ohne Effekt auf den Ionenhaushalt

Untersuchungen nach 30-minütiger Inkubation mit Empagliflozin erfolgten zur Exploration unmittelbarer Effekte auf den Ionenhaushalt der Zellen.

In den isolierten Kardiomyozyten des murinen Wildtyps zeigte sich nach 30-minütiger Inkubation mit Empagliflozin kein signifikanter Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration von Natrium, das Ausmaß des spontanen Kalziumlecks aus dem SR oder die Frequenz der diastolischen Kalziumfreisetzungen, die einen bedeutenden pathomechanistischen Beitrag zur Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz darstellen (Shannon u. a. 2005). Hingegen berichteten Baartscheer et al. von einem in Wildtyp-Zellen von Maus und Ratte beobachtetem akuten Effekt durch Empagliflozin auf den zytosolischen Natrium- und Kalziumgehalt sowie den Kalziumspeicher des SR und den der Mitochondrien. Dabei wurde eine direkte Modulation des NHE nach wenigen Minuten der Exposition durch Empagliflozin beschrieben (Baartscheer u. a. 2017). Während diese Beobachtungen von derselben Gruppe später im Sinne eines SGLT2-Klassen-Effekts reproduziert wurden (Uthman u. a. 2018), gibt es auch gegensinnige Studien (Chung u. a. 2020). In der vorliegenden Arbeit konnte kein unmittelbarer Effekt auf den zellulären Natrium- und Kalziumhaushalt beobachtet werden. Möglicherweise liegt dies an methodischen Unterschieden, da die Gruppe um Baartscheer et al. die explantierten Herzen für 30 Minuten mit den SGLT2-Inhibitoren perfundierte, anschließend bei -80°C lagerte und nach erneutem Auftauen der Zellisolation zuführte. Die hier beschriebenen Experimenten erfolgten jedoch direkt nach Isolation und Inkubation, für entweder 30 Minuten oder 24 Stunden, der Zellen mit Empagliflozin oder Vehikel. Zudem ist ein Unterschied in den n-Zahlen der untersuchten Zellen und Tiere zu erwähnen.

In der vorliegenden Arbeit hielten die Ergebnisse im Wildtyp der Reproduktion im murinen HFrEF-Modell stand. Zwar zeigte sich nach 30-minütiger Inkubation mit Empagliflozin ein erhöhtes Kalziumleck wie auch eine gesteigerte Sparkfrequenz im Vergleich zum basalen Wildtyp; dies ist bei kardialer Insuffizienz zu erwarten (s. 1.6.2). Zwischen Empagliflozin und Vehikel war im TAC-Modell jedoch ebenfalls kein signifikanter Unterschied der spontanen diastolischen Kalziumfreisetzungen zu beobachten.

Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe unlängst nach Kurz-Inkubation mit Empagliflozin eine Modulation auf Proteinebene durch Hemmung der NHE-Aktivität in humanen Kardiomyozyten beobachten (Trum u. a. 2020). Gleichzeitig zeigten Untersuchungen des Kalziumhaushalts im humanen insuffizienten Gewebe in diesem Zeitraum keine Empagliflozin-vermittelte Auswirkung auf den Ionenhaushalt, genauer

die Kalziumtransienten, diastolisches Kalzium oder den Rücktransport der Ionen ins SR (Pabel u. a. 2018).

Vor diesem Hintergrund gilt es die unmittelbare Wirkung von Empagliflozin, zum Beispiel auf Kalzium-regulierende Transportproteine und modulierende Enzyme wie PKA oder CaMKII, mit weiteren Experimenten genauer zu untersuchen.

4.3 Empagliflozin begünstigt die diastolische Relaxation durch Regulation des Kalziumhaushalts im insuffizienten Kardiomyozyten

Der Kalziumhaushalt ließ nach 24-stündiger Empagliflozin-Kultur im murinen Wildtyp eine außerordentliche Erhöhung des SR-Kalziumgehalts beobachten. Gemäß der Leak-Load-Beziehung des SR (Shannon u. a. 2002) wäre folglich ein verstärktes diastolisches Leck zu erwarten. Ganz im Gegenteil zeigten sich die Kalziumsparkfrequenz wie auch das diastolische Kalziumleck unter Empagliflozin nicht erhöht, sondern sogar tendenziell reduziert; in Verbindung mit einer signifikant kleineren Sparkamplitude. Der Leak-Load-Quotient zeigte sich zugunsten der Mehrspeicherung um ca. 60% signifikant reduziert. Im murinen Modell der HFrEF konnte dieses Verhältnis nicht aufrechterhalten werden; das spontane Kalziumleck zeigte sich erwartungsgemäß erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Dennoch ließ sich durch Empagliflozin im TAC-Modell eine signifikante Reduktion der Frequenz der diastolischen Kalziumfreisetzungen - wie bereits unter basalen Bedingungen bei sympathischem Stress – beobachten, sowie eine nicht-signifikante Reduktion des Kalziumlecks um rund 25%. In der humanen HFrEF ließ sich sogar eine bemerkenswerte Reduktion der diastolischen Sparkfrequenz um 70% beobachten. Zusätzlich zeigte sich das Kalziumleck um 62% reduziert. Zu berücksichtigen ist hierbei die geringe n-Zahl aufgrund der Rarität von humanem insuffizientem Gewebe, sodass mit einer steigenden Anzahl an untersuchten Herzen eine Signifikanz des Kalziumlecks unter Empagliflozin durchaus erwartet werden kann.

Diesen Ergebnissen könnte eine direkte oder indirekte Modulation des RyR2 durch Empagliflozin zugrunde liegen, dessen Öffnungswahrscheinlichkeit das Vorkommen

von spontanen Kalziumsparks maßgeblich beeinflusst (Cheng u. a. 1993). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die CaMKII-abhängige Phosphorylierung des RyR2 unter Empagliflozin signifikant reduziert wird – unabhängig von einer diabetischen Stoffwechsellage (Moellmann u. a. 2020; Mustroph u. a. 2018), wodurch ein Einfluss auf das Ausmaß des diastolischen Kalziumlecks zu erwarten ist. Ebenso konnte in einem diabetischen Modell der Ratte eine Reduktion der RyR2-Phosphorylierung nach 4-wöchiger Empagliflozin-Gabe nachgewiesen werden; hier zeigte sich ein erhöhter SR-Kalzium-Gehalt sowie eine reduzierte Sparkfrequenz in der Diastole (Lee u. a. 2019). Der Forward-Mode der NCX-Funktion zeigte sich im murinen Wildtyp nicht signifikant reduziert. Eine erhöhte Aktivität des Reverse-Mode ließ sich interessanterweise bereits beobachten (Lee u. a. 2019). Dies könnte durch einen erhöhten Kalziuminflux den gesteigerten Kalziumspeicher des SR mitbegründen. Sekundär wäre dabei jedoch eine Reduktion des intrazellulären Natriums zu erwarten (s. 3.5), was nicht untersucht wurde.

In Zusammenhang mit der herabgesetzten Frequenz der spontanen Kalziumsparks zeigte sich das diastolische Kalzium im Wildtyp nach Empagliflozin-Kultur signifikant reduziert. Diese Beobachtungen könnten, im Sinne einer verbesserten diastolischen Funktion, die echokardiografisch gemessene Erhöhung von Compliance und Relaxationsvermögen in Mäusen (Hammoudi u. a. 2017) und Ratten (Habibi u. a. 2017) mitbegründen. Habibi et al. attribuierten die verbesserte diastolische Funktion mit Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie und der myokardialen Fibrose auch einer Empagliflozin-vermittelten Modulation der Proteinexpression von Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 und dem epithelialen Natriumkanal, die beide mit dem pathophysiologischen Prozess des Remodelings assoziiert sind (Habibi u. a. 2017). Zudem könnten die vorliegenden Ergebnisse die erniedrigten BNP-Werte in nicht-diabetischen Schweinen miterklären, die mit einer verminderten diastolischen Dehnung und somit einem verbesserten Relaxationsvermögen des Myokards assoziiert sind (Santos-Gallego, Requena-Ibanez, u. a. 2019).

Ebenso wurde in Tiermodellen der Herzinsuffizienz von einer Verbesserung der diastolischen Relaxationskompetenz unter Empagliflozin berichtet: In einem Maus-Modell der infarzierten HFrEF konnte eine Reduktion des enddiastolischen Durchmessers (Connelly u. a. 2020), in der HFrEF im Schwein ohne diabetische Grunderkrankung ein reduzierter linksventrikulärer Füllungsdruck in Verbindung mit

einer gesteigerten Relaxationsfähigkeit in der Diastole gezeigt werden (Santos-Gallego, Requena-Ibanez, u. a. 2021). In einem HFpEF-Modell der Ratte zeigte sich unter Empagliflozin zudem eine Reduktion der linksventrikulären Masse und der Wandspannung (Connelly u. a. 2019), wie auch ein direkter Effekt u.a. auf die Myozyten-Compliance (Pabel u. a. 2018). Wenngleich sich das diastolische Kalzium im TAC-Modell unter Empagliflozin nicht beeinflusst zeigte, kann hier durch die relevante Reduktion von Kalziumsparkfrequenz und Kalziumleck aus dem SR eine prognostischen Relevanz diskutiert werden: Im Verlauf der progredienten kardialen Dekompensation mit zunehmender Anzahl an Kalziumsparks ist unter Empagliflozin eine Aufrechterhaltung der diastolischen Kalziumverhältnisse durch die Reduktion der Frequenz dieser Freisetzungen von Vorteil, um einer Dekompensation des Kreislaufs entgegenzuwirken.

In Zusammenhang mit der ausgeprägten Reduktion der Sparkfrequenz im humanen Modell der Herzinsuffizienz ist die klinische Korrelation einer verbesserten diastolischen Funktion von Interesse. Echokardiografisch konnte die SUGAR-DM-HF-Studie (*Studies of Empagliflozin and Its Cardiovascular, Renal and Metabolic Effects in Patients With Diabetes Mellitus, or Prediabetes, and Heart Failure*) in herzinsuffizienten Patienten mit Diabetes oder Pre-Diabetes nach 9 Monaten eine Reduktion des enddiastolischen Volumens des linken Ventrikels mit einer einhergehenden Reduktion des NT-proBNP-Spiegels unter Empagliflozin zeigen (Lee u. a. 2020). Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse der EMPERIAL-Studie hingegen zeigten keine signifikanten Unterschiede der NT-proBNP-Werte in Patienten mit HFrEF mit und ohne Diabetes mellitus (Abraham u. a. 2021); diese diskrepanten Ergebnisse könnten jedoch auch durch die unterschiedliche Dauer der Intervention bedingt sein. Insgesamt ist das präventive Potenzial von Empagliflozin im klinischen Alltag bei nachgewiesenem Nutzen auf die kardiovaskulären Endpunkte der EMPAREG-Outcome-Studie unabhängig einer manifesten Herzinsuffizienz zu Studienbeginn nicht von der Hand zu weisen (D. Fitchett u. a. 2018). Gleichzeitig ist die Relevanz der Melioration einer diastolischen Dysfunktion in der HFrEF durch die prognostische Assoziation mit der Langezeit-Mortalität gegeben (Benfari u. a. 2019).

4.4 Korrelate einer verbesserten systolischen Funktion zeigen sich unter Empagliflozin im Modell muriner und humaner Herzinsuffizienz

Im murinen Wildtyp ließ sich bei unveränderter NCX-Funktion und erhöhtem SR-Kalzium-Gehalt eine signifikant erhöhte systolische Kalziumtransientenamplitude beobachten. Die Aktivität der SERCA zeigte sich nicht im relevanten Maße erhöht, sodass die Begründung einer Mehrspeicherung durch erhöhten Rücktransport ins SR unwahrscheinlich erscheint und eher durch die Reduktion der spontanen Kalziumfreisetzungen (s. 4.3) zu begründen ist. In der murinen HFrEF hingegen zeigte sich bei signifikanter Zunahme der Kalziumtransienten und einem gesteigerten Kontraktionsvermögen eine in den niedrigeren Frequenzen signifikante Zunahme der Beschleunigung des diastolischen Rücktransports von Kalzium ins SR im Vergleich zur Kontrolle, was mit einer erhöhten SERCA-Aktivität assoziiert sein kann (Bers & Bridge 1989). Dies ist von großem Interesse, da eine verminderte Phosphorylierung von PLN und somit eine konsekutive Reduktion des Kalziumrücktransports durch die SERCA ins SR mit der Herzinsuffizienz assoziiert ist (Maier 2003). Auch zeigten weitere Untersuchungen in der diabetischen Maus, dass die Inkubation mit Empagliflozin eine erhöhte Phosphorylierung von PLN mit dem Resultat eines erhöhten PLN/SERCA-Quotienten bewirkt (Hammoudi u. a. 2017), was die Aufrechterhaltung der systolischen Kapazitäten im TAC-Modell sowohl in vivo, als auch am isolierten perfundierten Herzen erklären könnte (Byrne u. a. 2017). Darüber hinaus zeigte sich in der murinen infarzierten HFrEF eine bessere kardiale Kontraktilität, unabhängig von Vor- und Nachlast (Connelly u. a. 2020). Während dies ähnlich der Wirkung von Aldosteron-Antagonisten auf Masse und Volumen des linken Ventrikels anmutet, räumen die Autoren ein, dass ein diuretischer Effekt die Beobachtung auf die systolische Funktion nicht hinreichend erklärt (Connelly u. a. 2020).

In der Untersuchung der humanen insuffizienten Kardiomyozyten ließ sich ebenso eine signifikant erhöhte Kalziumtransientenamplitude nachweisen. Die diastolische Aktivität der SERCA zeigte sich durch Empagliflozin, ähnlich wie im murinen Wildtyp und im Gegensatz zum murinen HFrEF-Modell, unbeeinflusst. Dies ließ sich ebenfalls in humanen Kardiomyozyten aus induzierten primären Stammzellen nach mehrwöchiger

Inkubation mit Empagliflozin beobachten. Darüber hinaus berichteten die Autoren jedoch auch, dass systolische Kalziumtransienten, SR-Kalziumgehalt, diastolischen Kalzium-Sparks und NCX-Aktivität durch Empagliflozin unbeeinflusst blieben (Pabel u. a. 2020). Diese Diskrepanz zu den vorliegenden Ergebnissen kann einer Reihe von Faktoren zugrunde liegen: Zum einen sind die unterschiedlichen Inkubations-Zeiten mit Empagliflozin zu bedenken, zum anderen ist zwar die Translation zwischen humanen Modellen weniger problematisch als zwischen verschiedenen Spezies, dennoch sollte die Übertragung der Ergebnisse aus gesunden induzierten Stammzellen auf isolierte insuffiziente Kardiomyozyten unter Vorbehalt erfolgen: Die Prozesse im herzinsuffizienten Organismus, wie die Aktivierung des Sympathikus und eine veränderte Proteomik mit der Induktion von inflammatorischen Prozessen, Apoptose-Vorgängen, extrazellulärem Remodeling und veränderten Stoffwechselfvorgängen in der Zelle, sind zu berücksichtigen (Ferreira u. a. 2019).

Im Kontext der klinischen Interventionsstudien am Menschen konnte die EMPATROPISM-Studie eine Reduktion von enddiastolischem und endsystolischem linksventrikulärem Volumen sowie der Masse des linken Ventrikels bei herzinsuffizienten Patienten ohne Diabetes mellitus zeigen; darüber hinaus ließ sich auch, im Einklang mit den vorliegenden Effekten auf die Systole der insuffizienten Kardiomyozyten, eine Verbesserung der systolischen Kapazitäten im Sinne einer deutlichen Zunahme der Ejektionsfraktion nach sechsmonatiger Einnahme von Empagliflozin beobachten (Santos-Gallego, Vargas-Delgado, u. a. 2021; Santos-Gallego, Garcia-Roperero, u. a. 2019).

4.5 Die Reduktion der intrazellulären Natriumkonzentration unter Empagliflozin unterstützt die „Natrium-Hypothese“

Da die Kalziumhomöostase in engem Zusammenhang mit dem Natriumhaushalt der Zellen steht, kann einer primären Veränderung des Natriums die sekundäre Einflussnahme auf die zellulären Kalziumverhältnisse folgen. Dies wird bei der Diskussion bezüglich der mechanistischen Hintergründe der SGLT2-Inhibitoren in der Herzinsuffizienz auch als „Natrium-Hypothese“ gehandelt, um die beobachteten Ergebnisse in den klinischen Studien der letzten Jahre zu erklären (Ha & Wende 2019).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei einer unbeeinflussten Funktion des NCX-Forward-Mode in Verbindung mit einem erhöhten SR-Kalzium-Gehalt (s.o.) im murinen Wildtyp eine signifikante Reduktion der intrazellulären Natriumkonzentrationen nach 24-stündiger Kultur mit Empagliflozin im Vergleich zum Vehikel. Erklärungsansätze kommen dafür mehrere in Frage:

Zum könnte es durch einen direkten Einfluss von Empagliflozin auf den NCX der Kardiomyozyten begründet sein, wie es in diabetischen Mäusen unter Empagliflozin bereits beschrieben wurde (Lee u. a. 2019). Durch eine stärkere Aktivierung des Reverse-Modes des Transporters käme es nicht nur zu einer Reduktion des intrazellulären Natriums; sekundär wäre auch eine Erhöhung des zytosolischen Kalziums mit Einfluss auf die SR-Kalzium-Load zu erwarten. Passend dazu berichteten die Autoren von signifikant erhöhten systolischen Kalziumtransienten und einer Zunahme des SR-Kalziumgehalts, mit der Tendenz einer Kontraktilitätssteigerung unter Empagliflozin. Dies ließ sich in unseren Ergebnissen jedoch nicht reproduzieren; im Wildtyp zeigte sich die Aktivität des NCX unverändert; lediglich unter sympathischen Stress war eine erhöhte Aktivität zu beobachten. Die Auswirkung auf den Natriumhaushalt wurde von den erwähnten Autoren leider nicht untersucht. Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe im Patch-Clamp-Verfahren jüngst eine Reduktion der subsarkolemmalen Konzentrationen von Natrium in murinen Kardiomyozyten nach 30-minütiger Inkubation mit Empagliflozin beobachten (Müstroph u. a. 2018), während alle Untersuchungen, auch die der Natriumkonzentrationen, nach 30-minütiger Inkubation mit Empagliflozin in dieser Arbeit ohne relevante Veränderungen in den Ionenverhältnissen blieben (s. 4.2).

Des Weiteren ist eine Beeinflussung des späten Natriumstroms Late I_{Na} zu erwägen, sowohl durch direkte Modulation des zuständigen Ionen-Kanals wie auch indirekt, z.B. durch die Regulation der CaMKII (s. 1.6). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit konnte hierbei eine Empagliflozin-vermittelte Reduktion des späten Natriumstroms in murinen Kardiomyozyten nach transverser Aortenkonstriktion zeigen. Konsekutiv präsentierten sich auch die proarrhythmogenen spontanen Kalziumfreisetzungen, die bei Zunahme des späten Natriumstroms vermehrt auftreten, reduziert. In weiterführenden Modell-Untersuchungen identifizierten die Autoren den Natriumkanal Nav 1.5 als potenzielle molekulare Zielstruktur von Empagliflozin (Philippaert u. a. 2021).

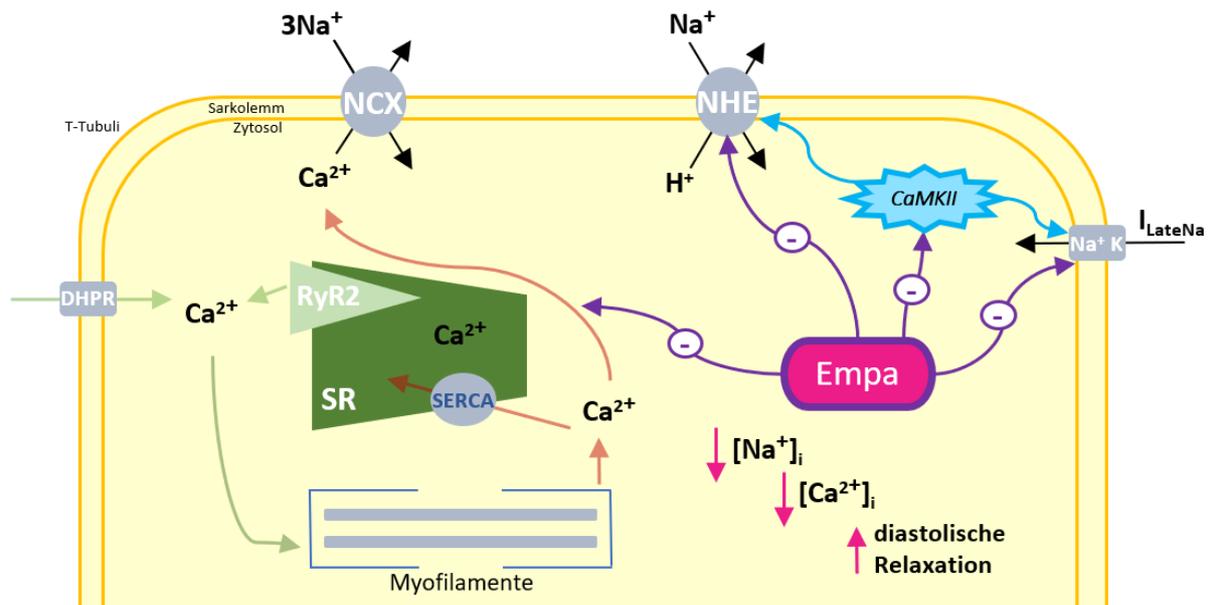


Abb. 4.5.1: Potenzielle direkte und indirekte Mechanismen durch den SGLT2-Inhibitor Empagliflozin am einzelnen Kardiomyozyten zur beobachteten Beeinflussung des Natrium- und Kalziumhaushalts.

Zuletzt wächst die Datenlage einer direkten Modulation des NHE durch die SGLT2-Inhibitoren. Baartscheer et al. berichteten bereits 2017 von einer Inhibition des Transporters unter Superfusion mit Empagliflozin und reproduzierten dies im Anschluss in Experimenten mit Dapagliflozin und Canagliflozin (Baartscheer u. a. 2017; Uthman u. a. 2018). Darüber hinaus zeigte auch unsere Arbeitsgruppe unlängst eine Inhibition des NHE in humanen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten unter Empagliflozin (Trum u. a. 2020). Eine in-silico-Analyse, die nachfolgend in einem in-vivo-Experiment validiert werden konnte, wies den NHE als den wahrscheinlichsten Transporter zur Interaktion mit Empagliflozin aus (Iborra-Egea u. a. 2019). Allerdings zeigten sich in der Vergangenheit auch gegenteilige Berichte, die eine Modulation des kardialen NHE sowie eine Beeinflussung des zellulären Natriumgehaltes durch Empagliflozin nicht nachweisen konnten (Chung u. a. 2020). Eine weiterführende Analyse diskutierte aufgrund dieser Diskrepanz u.a. die Unterschiede in Sensitivität und Spezifität der verwendeten Methoden, die die Autoren jedoch in einer Stellungnahme als nicht berechtigt sahen (Zuurbier u. a. 2021; Chung u. a. 2021).

4.6 Die Natrium-Kalium-ATPase ist als mechanistische Zielstruktur unwahrscheinlich

Stromaufwärts der postulierten Interaktion von Natrium und Kalzium wurde die Modulation der Natrium-Kalium-ATPase untersucht, deren herabgesetzte Aktivität in insuffizienten Kardiomyozyten zu einer steigenden Natriumkonzentration im Zytosol beitragen soll (Swift u. a. 2008). Dieser Beobachtungen stehen jedoch auch Ergebnissen gegenüber, die keine Reduktion der Aktivität in der Herzinsuffizienz nachweisen konnten (Despa u. a. 2002). Als Folge der korrigierten Natriumverhältnisse bei Empagliflozin-vermittelter reduzierten Aktivität der NKA wäre das typisches Transportverhalten des NCX im Forward-Mode zu erwarten, was aufgrund der Beobachtung einer unveränderten Aktivität in den vorigen Experimenten eher unwahrscheinlich erscheint (s. 4.4).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine relevante Aktivitätserhöhung der NKA im murinen Wildtyp nach Empagliflozin-Kultur von 24 Stunden nachgewiesen werden. Dabei wurde der NKA-Inhibitor Ouabain zur Demaskierung potenzieller Modulationen durch Empagliflozin eingesetzt.

Erst kürzlich konnte eine Untersuchung der NKA nach Kurzinkubation mit Empagliflozin ebenfalls keinen Einfluss auf deren Aktivität in Ratten-Kardiomyozyten zeigen (Chung u. a. 2020). Insgesamt scheint die Relevanz der NKA für die pathophysiologischen Hintergründe des gestörten Ionenhaushalts in der Herzinsuffizienz nicht abschließend geklärt; zumindest ist sie jedoch als Zielstruktur für Empagliflozin weitgehend auszuschließen.

4.7 Ausblick

In Zusammenschau fügen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in eine wachsende Datenlage über die mechanistischen Hintergründe von Empagliflozin und die zu beobachtende Wirkung auf die kardiovaskulären Endpunkte der Interventionsstudien ein. Die Hinweise auf zelluläre Mechanismen des SGLT2-Inhibitors häufen sich, genauso wie sich die Erkenntnis abzeichnet, dass ein diabetischer Stoffwechselzustand des Organismus keine Kondition für den kardialen Erfolg des Medikaments darstellt.

Ein vielversprechender Ansatz zur Aufklärung der mechanistischen Hintergründe scheint momentan der Natrium-Protonen-Austauscher zu sein (Iborra-Egea u. a. 2019; Trum u. a. 2020). Es bleibt abzuwarten, ob sich dieser Verdacht vonseiten der Grundlagenforschung bestätigen lässt.

Die klinische Forschung konnte seit der Veröffentlichung der EMPA-REG-OUTCOME-Studie innerhalb des EMPOWER-Programms von Boehringer Ingelheim und Eli Lilly, zur umfassenden Aufklärung der renalen und kardiovaskulären Effekte von Empagliflozin, mit EMPEROR-Reduced eine reproduzierbare Verbesserung der Endpunkte von Hospitalisierung und kardiovaskulären Tod durch Empagliflozin in der HFrEF, ohne Anwesenheit einer diabetischen Grunderkrankung, zeigen (Packer u. a. 2021), die sich mit der EMPRISE-Studie auch in der klinischen Routine realisieren ließ (Patorno u. a. 2019). Als Resultat erweiterte die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA (Food and Drug Administration) im Januar 2021 die Zulassung von Empagliflozin zur Anwendung bei Erwachsenen mit einer HFrEF (<https://www.boehringer-ingelheim.us/press-release/us-fda-accepts-supplemental-new-drug-application-jardiance-empagliflozin-adults-heart>). Dieser Durchbruch schloss sich der bereits 2020 ausgesprochenen Zulassung von Dapagliflozin zur Behandlung von herzinsuffizienten Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion an (<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-type-heart-failure>), im November 2020 war daraufhin die Zulassung zur Herzinsuffizienz-Therapie mit Dapagliflozin in Europa durch den Ausschuss für Humanarzneimittel der Europäischen Arzneimittelagentur EMA gefolgt (<https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2020/forxiga-approved-in-the-eu-for-heart-failure.html>).

Auch erfolgte bereits 2019 die Aufnahme der SGLT2-Inhibitoren in die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie zur Reduktion der Hospitalisierung aufgrund von Herzinsuffizienz bei Patienten mit Diabetes mellitus (Cosentino u. a. 2019).

Vor dem Hintergrund der aktuellen Entwicklungen ist somit sowohl eine Zulassung von Empagliflozin zur Herzinsuffizienz-Therapie durch die EMA, ohne die Voraussetzungen einer diabetischen Grunderkrankung im betreffenden Patienten, wie auch eine Erweiterung der Leitlinien-Empfehlungen zu erwarten.

5 Zusammenfassung

Die EMPA-Reg-Outcome-Studie erreichte unter Gabe des SGLT2-Inhibitors Empagliflozin eine Reduktion von Herzinsuffizienz-assoziiierter Hospitalisierung, Tod kardiovaskulärer Ursache sowie Tod jeglicher Ursache in Patienten mit Diabetes mellitus. Erste Ergebnisse der EMPRISE-Studie konnten dies im Alltag der klinischen Routine reproduzieren. Die beobachteten Effekte sind dabei nicht hinreichend mit der bekannten diuretischen Wirkung sowie den Glukose-senkenden Eigenschaften der SGLT2-Inhibitoren zu erklären.

Die vorliegende Arbeit untersuchte deshalb erstmals die direkte Wirkung von Empagliflozin auf den Natrium- und Kalziumhaushalt in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von gesunden Wildtypmäusen sowie Wildtypmäusen mit artifizieller chronischer Nachlasterrhöhung und humanen ventrikulären Kardiomyozyten der Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion. Unter anderem zeigte die Exposition mit Empagliflozin in therapeutischer Dosis (1 $\mu\text{mol/L}$) eine Reduktion der intrazellulären Natriumkonzentration sowie des diastolischen Kalziumgehalts im Wildtyp, unter beta-adrenerger Stimulation vermochte es zudem, die Frequenz der proarrhythmogenen diastolischen Kalziumfreisetzungen zu reduzieren. Eine Reduktion des Kalziumlecks ließ sich im murinen und humanen Insuffizienzmodell beobachten; zudem zeigte sich in diesen Modellen, wie auch im gesunden murinen Wildtyp, eine Verbesserung der systolischen Kapazitäten. Aufgrund der positiven Beeinflussung von Kalzium- und Natrium-Homöostase im gesunden murinen Wildtyp lässt sich zudem eine potenzielle prophylaktische Wirkung durch Empagliflozin diskutieren, die sich durch eine Verbesserung der Endpunkte in Unabhängigkeit vom Status der kardiovaskulären Ausgangssituation in EMPA-REG-OUTCOME abzeichnete. Zuletzt ergab die mechanistische Untersuchung der Natrium-Kalium-ATPase keine Hinweise auf eine relevante Modulation durch Empagliflozin. Alle Ergebnisse waren dabei unabhängig von einer diabetischen Grunderkrankung und erst nach einer Exposition mit Empagliflozin über einen Zeitraum von 24 Stunden, in gleich einer regelmäßigen Einnahme im klinischen Setting, zu beobachten. Insgesamt fügt sich der Beitrag der vorliegenden Arbeit in die wachsende Datenlage eines zellulären Wirkmechanismus von Empagliflozin mit dem Potenzial eines Paradigmenwechsel in der zukünftigen Therapie der Herzinsuffizienz.

6 Literaturverzeichnis

- Abdurrachim, Desiree u. a. 2019. Empagliflozin reduces myocardial ketone utilization while preserving glucose utilization in diabetic hypertensive heart disease: A hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance spectroscopy study. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 21, 2, 357–365.
- Abraham, William T u. a. 2021. Effect of empagliflozin on exercise ability and symptoms in heart failure patients with reduced and preserved ejection fraction, with and without type 2 diabetes. *European Heart Journal* 42, 6, 700–710.
- Ai, X. 2005. Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Modulates Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation and Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Leak in Heart Failure. *Circulation Research* 97, 12, 1314–1322.
- Albani, Jihad René 2008. *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. John Wiley & Sons.
- Allen, D G, Eisner, D A & Orchard, C H 1984. Factors influencing free intracellular calcium concentration in quiescent ferret ventricular muscle. *The Journal of Physiology* 350, 1, 615–630.
- Allen, Paul D. u. a. 1992. Na,K-ATPase expression in normal and failing human left ventricle. In G. Hasenfuss u. a., hg. *Cellular and Molecular Alterations in the Failing Human Heart*. Heidelberg: Steinkopff, 87–94. http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-72474-9_7 [Stand 2018-08-14].
- Anker, Stefan D. u. a. 2021. Effect of Empagliflozin on Cardiovascular and Renal Outcomes in Patients With Heart Failure by Baseline Diabetes Status: Results From the EMPEROR-Reduced Trial. *Circulation* 143, 4, 337–349.
- Arai, Masashi u. a. 1993. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circulation Research* 72, 2, 463–469.
- Baartscheer, Antonius u. a. 2017. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na^{+} through inhibition of the cardiac $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia* 60, 3, 568–573.
- Baartscheer, Antonius, Schumacher, Cees A., Van Borren, M.M.G.J., u. a. 2003. Increased $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -exchange activity is the cause of the increased $[\text{Na}^{+}]_i$ and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. *Cardiovascular research* 57, .
- Baartscheer, Antonius, Schumacher, Cees A., Beltermann, C.N.W., u. a. 2003. $[\text{Na}^{+}]_i$ and the driving force of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in heart failure. *Cardiovascular Research* 57, .
- Bassani, R A, Bassani, J W & Bers, D M 1992. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *The Journal of Physiology* 453, 1, 591–608.

- Belevych, Andriy u. a. 2007. Enhanced Ryanodine Receptor-Mediated Calcium Leak Determines Reduced Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content in Chronic Canine Heart Failure. *Biophysical Journal* 93, 11, 4083–4092.
- Benarroch, E. E. 2011. Na⁺, K⁺-ATPase: Functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76, 3, 287–293.
- Benfari, Giovanni u. a. 2019. Diastolic Determinants of Excess Mortality in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *JACC: Heart Failure* 7, 9, 808–817.
- Bers, Donald 2001. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. Bd. 237, Springer Science & Business Media.
<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=00PLwEsg1ccC&oi=fnd&pg=PA1&dq=%22also+thank+my+many+research+collaborators+over+the+years+who+have+joined+me%22+%22I+have+tried+to+maintain+the+flavor+of+the+first+edition,+including+some+historical%22+&ots=au8wJkir1W&sig=AflhfUEo7rHkhE733J7tDjehMEA> [Stand 2017-07-15].
- Bers, Donald M. & Bridge, John HB 1989. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. *Circulation research* 65, 2, 334–342.
- Beuckelmann, D J, Näbauer, M & Erdmann, E 1993. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation Research* 73, 2, 379–385.
- Bhatia, R. Sacha u. a. 2006. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *New England Journal of Medicine* 355, 3, 260–269.
- Bhatt, Deepak L., Szarek, Michael, Pitt, Bertram, u. a. 2021. Sotagliflozin in Patients with Diabetes and Chronic Kidney Disease. *New England Journal of Medicine* 384, 2, 129–139.
- Bhatt, Deepak L., Szarek, Michael, Steg, P. Gabriel, u. a. 2021. Sotagliflozin in Patients with Diabetes and Recent Worsening Heart Failure. *New England Journal of Medicine* 384, 2, 117–128.
- Brandt, Neil 1985. Identification of two populations of cardiac microsomes with nitrendipine receptors: correlation of the distribution of dihydropyridine receptors with organelle specific markers. *Archives of biochemistry and biophysics* 242, 1, 306–319.
- Brodie, C. u. a. 1987. Role of Na-K ATPase in Regulation of Resting Membrane Potential of Cultured Rat Skeletal Myotubes. *Journal of Cellular Physiology* 130, 191–198.
- Byrne, Nikole J. u. a. 2017. Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an Experimental Model of Pressure Overload-Induced Heart Failure. *JACC: Basic to Translational Science* 2, 4, 347–354.
- Cannell, M. B. & Soeller, C. 1997. Numerical analysis of ryanodine receptor activation by L-type channel activity in the cardiac muscle diad. *Biophysical journal* 73, 1, 112.
- Cannon, Christopher P. u. a. 2020. Cardiovascular Outcomes with Ertugliflozin in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 383, 15, 1425–1435.
- Ceriello, Antonio 2006. Oxidative Stress and Diabetes-Associated Complications. *Endocrine Practice* 12, 60–62.

- Chang, Yoon-Kyung u. a. 2016. Dapagliflozin, SGLT2 Inhibitor, Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury D. Long, hg. *PLOS ONE* 11, 7, e0158810.
- Chen, F. u. a. 1995. Distribution of the Na⁺/Ca²⁺ exchange protein in developing rabbit myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 268, 5, C1126–C1132.
- Chen, X. 2002. L-Type Ca²⁺ Channel Density and Regulation Are Altered in Failing Human Ventricular Myocytes and Recover After Support With Mechanical Assist Devices. *Circulation Research* 91, 6, 517–524.
- Cheng, Heping, Lederer, W. J. & Cannell, Mark B. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 5134, 740–744.
- Cherney, D. Z. I. u. a. 2014. Renal Hemodynamic Effect of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 129, 5, 587–597.
- Chilton, R. u. a. 2015. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 17, 12, 1180–1193.
- Chung, Yu Jin u. a. 2020. Off-target effects of sodium-glucose co-transporter 2 blockers: empagliflozin does not inhibit Na⁺/H⁺ exchanger-1 or lower [Na⁺] _i in the heart. *Cardiovascular Research* .
- Chung, Yu Jin u. a. 2021. SGLT2 inhibitors and the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger-1: the plot thickens. *Cardiovascular Research* .
- Connelly, Kim A. u. a. 2019. Empagliflozin Improves Diastolic Function in a Nondiabetic Rodent Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC: Basic to Translational Science* 4, 1, 27–37.
- Connelly, Kim A. u. a. 2020. Load-independent effects of empagliflozin contribute to improved cardiac function in experimental heart failure with reduced ejection fraction. *Cardiovascular Diabetology* 19, 1, .
<https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-020-0994-y> [Stand 2021-02-27].
- Cosentino, Francesco u. a. 2019. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *European Heart Journal* 41, 2, 255–323.
- Curran, Jerald u. a. 2007. β-Adrenergic Enhancement of Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak in Cardiac Myocytes Is Mediated by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Circulation Research* 100, 3, 391–398.
- Curran, Jerry u. a. 2014. Nitric Oxide-Dependent Activation of CaMKII Increases Diastolic Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release in Cardiac Myocytes in Response to Adrenergic Stimulation N. Beard, hg. *PLoS ONE* 9, 2, e87495.
- Despa, S. 2005. Phospholemman-Phosphorylation Mediates the β-Adrenergic Effects on Na/K Pump Function in Cardiac Myocytes. *Circulation Research* 97, 3, 252–259.
- Despa, Sanda u. a. 2002. Intracellular Na⁺ Concentration Is Elevated in Heart Failure But Na/K Pump Function Is Unchanged. *Circulation* 105, 21, 2543–2548.

- Diez, J. 2002. Losartan-Dependent Regression of Myocardial Fibrosis Is Associated With Reduction of Left Ventricular Chamber Stiffness in Hypertensive Patients. *Circulation* 105, 21, 2512–2517.
- Donoso, P. u. a. 1992. Fluorescence measurements of cytoplasmic and mitochondrial sodium concentration in rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology* 448, 1, 493–509.
- Engelhardt, Johann & Knebel, Werner 1993. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. *Physik in unserer Zeit* 24, 2, 70–78.
- Fabiato, A. 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *ajp cell*.
- Fabiato, A. 1985. Time and Calcium Dependence of Activation and Inactivation of Calcium-induced Release of Calcium from the Sarcoplasmic Reticulum of a Skinned Canine Cardiac Purkinje Cell.
- Fawcett, Don W. & McNutt, N. Scott 1969. The ultrastructure of the cat myocardium: I. Ventricular papillary muscle. *The Journal of cell biology* 42, 1, 1–45.
- Ferrannini, Ele u. a. 2016. Shift to Fatty Substrate Utilization in Response to Sodium–Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Subjects Without Diabetes and Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 65, 5, 1190–1195.
- Ferreira, João Pedro u. a. 2019. Proteomic Bioprofiles and Mechanistic Pathways of Progression to Heart Failure: The HOMAGE Study. *Circulation: Heart Failure* 12, 5, . <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005897> [Stand 2021-02-25].
- Fitchett, D u. a. 2018. Empagliflozin reduces heart failure irrespective of control of blood pressure, low density lipoprotein cholesterol and HbA1c. In Diabetes Kongress 2018 – 53. Jahrestagung der DDG. Berlin. <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1641913> [Stand 2019-12-23].
- Fitchett, D. u. a. 2018. P1879 Empagliflozin reduces mortality and hospitalisation for heart failure irrespective of cardiovascular risk score at baseline. *European Heart Journal* 39, suppl_1, ehy565–P1879.
- Fitchett, David u. a. 2018. Effects of empagliflozin on risk for cardiovascular death and heart failure hospitalization across the spectrum of heart failure risk in the EMPA-REG OUTCOME® trial. *European Heart Journal* 39, 5, 363–370.
- Fowler, MICHAEL B. u. a. 1986. Assessment of the beta-adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation* 74, 6, 1290–1302.
- Frank, J. S. 1992. Distribution of the Na(+)-Ca²⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *The Journal of Cell Biology* 117, 2, 337–345.
- Gee, K.R. u. a. 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 2, 97–106.

- Grempler, R. u. a. 2012. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14, 1, 83–90.
- Grimm, Michael & Brown, Joan Heller 2010. β -Adrenergic receptor signaling in the heart: Role of CaMKII. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48, 2, 322–330.
- Gryniewicz, Grzegorz, Poenie, Martin & Tsien, Roger 1985. A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties.
- Gustavsson, M. u. a. 2013. Allosteric regulation of SERCA by phosphorylation-mediated conformational shift of phospholamban. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 43, 17338–17343.
- Gutierrez, Daniel A. u. a. 2013. NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovascular Research* 100, 3, 392–401.
- Ha, Chae-Myeong & Wende, Adam R. 2019. The Growing Case for Use of SGLT2i in Heart Failure. *JACC: Basic to Translational Science* 4, 1, 38–40.
- Habibi, Javad u. a. 2017. Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 16, 1, .
<http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-016-0489-z> [Stand 2018-08-11].
- Hammoudi, Nadjib u. a. 2017. Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 31, 3, 233–246.
- Hasenfuss, Gerd 1998. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovascular research* 37, 2, 279–289.
- Hasenfuss, Gerd u. a. 1994. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation research* 75, 3, 434–442.
- Heerspink, Hidde J L u. a. 2020. Rationale and protocol of the Dapagliflozin And Prevention of Adverse outcomes in Chronic Kidney Disease (DAPA-CKD) randomized controlled trial. *Nephrology Dialysis Transplantation* 35, 2, 274–282.
- Herrington, William G u. a. 2018. The potential for improving cardio-renal outcomes by sodium-glucose co-transporter-2 inhibition in people with chronic kidney disease: a rationale for the EMPA-KIDNEY study. *Clinical Kidney Journal* 11, 6, 749–761.
- Hicks, Michael J., Shigekawa, Munekazu & Katz, Arnold M. 1979. Mechanism by which cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circulation research* 44, 3, 384–391.
- Hirota, Simon, Pertens, Evi & Janssen, Luke J. 2007. The reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger provides a source of Ca²⁺ for store refilling following agonist-induced Ca²⁺ mobilization. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 292, 2, L438–L447.

- Hummel, Charles S. u. a. 2011. Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300, 1, C14–C21.
- Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 3886, 1356–1365.
- Iborra-Egea, Oriol u. a. 2019. Unraveling the Molecular Mechanism of Action of Empagliflozin in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction With or Without Diabetes. *JACC: Basic to Translational Science* 4, 7, 831–840.
- Inui, MI, Saito, Akitsugu & Fleischer, Sidney 1987. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 262, 4, 1740–1747.
- IonOptix LLC 2010. IonOptix Fluorescence Photometry Recording System: Complete, turnkey system for high-speed fluorescence recording.
- Kanai, Y u. a. 1994. The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *Journal of Clinical Investigation* 93, 1, 397–404.
- Kang, Sean u. a. 2020. Direct Effects of Empagliflozin on Extracellular Matrix Remodelling in Human Cardiac Myofibroblasts: Novel Translational Clues to Explain EMPA-REG OUTCOME Results. *Canadian Journal of Cardiology* 36, 4, 543–553.
- Kato, Eri T. u. a. 2019. Effect of Dapagliflozin on Heart Failure and Mortality in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* 139, 22, 2528–2536.
- Kieval, R. S. u. a. 1992. Immunofluorescence localization of the Na-Ca exchanger in heart cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 263, 2, C545–C550.
- Kong, Huihui u. a. 2008. Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *Biochemical Journal* 414, 3, 441–452.
- Koufakis, Theocharis u. a. 2020. Interpreting the results of the VERTIS-CV trial: Is this the end of the "class effect" perspective? *Journal of Diabetes* 12, 12, 942–945.
- Lambers Heerspink, H. J. u. a. 2013. Dapagliflozin a glucose-regulating drug with diuretic properties in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15, 9, 853–862.
- Langendorff, Oscar 1895. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 61, 6, 291–332.
- LaRaia, Paul J. & Morkin, Eugene 1974. Adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent membrane phosphorylation: a possible mechanism for the control of microsomal calcium transport in heart muscle. *Circulation research* 35, 2, 298–306.
- Laufs, U. u. a. 2017. Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. *Der Kardiologe* 11, 3, 183–192.
- Lee, Matthew M. Y. u. a. 2020. Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Volumes in Patients with Type 2 Diabetes, or Prediabetes, and Heart Failure with Reduced Ejection Fraction (SUGAR-DM-HF). *Circulation* .

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052186> [Stand 2021-02-25].

- Lee, Ting-I u. a. 2019. Empagliflozin Attenuates Myocardial Sodium and Calcium Dysregulation and Reverses Cardiac Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 7, 1680.
- Leimbach, Wayne N. u. a. 1986. Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation* 73, 5, 913–919.
- Levi, ALLAN J., LEE, CHIN O. & BROOKSBY, PAUL 1994. Properties of the fluorescent sodium indicator “SBFI” in rat and rabbit cardiac myocytes. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 5, 3, 241–257.
- von Lewinski, Dirk u. a. 2010. Glucose-transporter–mediated positive inotropic effects in human myocardium of diabetic and nondiabetic patients. *Metabolism* 59, 7, 1020–1028.
- Lipp, Peter & Niggli, Ernst 1996. Submicroscopic calcium signals as fundamental events of excitation–contraction coupling in guinea-pig cardiac myocytes. *The Journal of Physiology* 492, Pt 1, 31.
- Lytvyn, Yuliya u. a. 2015. Glycosuria-mediated urinary uric acid excretion in patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 308, 2, F77–F83.
- Maack, Christoph u. a. 2006. Elevated Cytosolic Na⁺ Decreases Mitochondrial Ca²⁺ Uptake During Excitation-Contraction Coupling and Impairs Energetic Adaptation in Cardiac Myocytes. *Circulation Research* 99, 2, 172–182.
- Maier, L. S. 2003. Transgenic CaMKII δ Overexpression Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca²⁺ Handling: Reduced SR Ca²⁺ Load and Activated SR Ca²⁺ Release. *Circulation Research* 92, 8, 904–911.
- Marx, Steven O. u. a. 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 4, 365–376.
- McGuire, Darren K. u. a. 2021. Association of SGLT2 Inhibitors With Cardiovascular and Kidney Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *JAMA Cardiology* 6, 2, 148.
- McMurray, John J. & Stewart, Simon 2000. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 5, 596–602.
- McMurray, John J.V. u. a. 2019. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine* 381, 21, 1995–2008.
- McMurray, John J.V. u. a. 2012. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaborati. *European Journal of Heart Failure* 14, 8, 803–869.
- Merck, E. 1885. *Merck E. Verzeichniss sammtlicher preparate und drogen*. 67. Auflage Darmstadt: Merck Archives.

- Minsky, Marvin 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10, 4, 128–138.
- Mitchell, R. D., Simmerman, Heather K. B. & Jones, Larry R. 1988. Ca Binding Effects on Protein Conformation and Protein Interactions of Canine Cardiac Calsequestrin. *Journal of Biological Chemistry* 263, .
- Moellmann, Julia u. a. 2020. Empagliflozin improves left ventricular diastolic function of db/db mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866, 8, 165807.
- Mudaliar, Sunder, Alloju, Sindura & Henry, Robert R. 2016. Can a Shift in Fuel Energetics Explain the Beneficial Cardiorenal Outcomes in the EMPA-REG OUTCOME Study? A Unifying Hypothesis. *Diabetes Care* 39, 7, 1115–1122.
- Mustroph, Julian u. a. 2019a. Empagliflozin enhances human and murine cardiomyocyte glucose uptake by increased expression of GLUT1. *Diabetologia* 62, 4, 726–729.
- Mustroph, Julian u. a. 2019b. Empagliflozin enhances human and murine cardiomyocyte glucose uptake by increased expression of GLUT1. *Diabetologia* 62, 4, 726–729.
- Mustroph, Julian u. a. 2018. Empagliflozin reduces Ca/calmodulin-dependent kinase II activity in isolated ventricular cardiomyocytes: Empagliflozin reduces CaMKII activity. *ESC Heart Failure* 5, 4, 642–648.
- Nair, Sunil & Wilding, John P. H. 2010. Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors as a New Treatment for Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95, 1, 34–42.
- Neal, Bruce u. a. 2017. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 377, 7, 644–657.
- Neef, S. u. a. 2010. CaMKII-Dependent Diastolic SR Ca²⁺ Leak and Elevated Diastolic Ca²⁺ Levels in Right Atrial Myocardium of Patients With Atrial Fibrillation. *Circulation Research* 106, 6, 1134–1144.
- O A <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2020/forxiga-approved-in-the-eu-for-heart-failure.html>.
- O A <https://www.boehringer-ingenheim.us/press-release/us-fda-accepts-supplemental-new-drug-application-jardiance-empagliflozin-adults-heart>.
- O A <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-type-heart-failure>.
- Pabel, Steffen u. a. 2018. Empagliflozin directly improves diastolic function in human heart failure. *European Journal of Heart Failure* 20, 12, 1690–1700.
- Pabel, Steffen u. a. 2020. Long-term effects of empagliflozin on excitation-contraction-coupling in human induced pluripotent stem cell cardiomyocytes. *Journal of Molecular Medicine* 98, 12, 1689–1700.
- Packer, Milton u. a. 2021. Effect of Empagliflozin on the Clinical Stability of Patients With Heart Failure and a Reduced Ejection Fraction: The EMPEROR-Reduced Trial. *Circulation* 143, 4, 326–336.

- Packer, Milton u. a. 2019. Evaluation of the effect of sodium–glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin on morbidity and mortality of patients with chronic heart failure and a reduced ejection fraction: rationale for and design of the EMPEROR-Reduced trial. *European Journal of Heart Failure* 21, 10, 1270–1278.
- Packer, Milton 2019. Reconceptualization of the Molecular Mechanism by Which Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Reduce the Risk of Heart Failure Events. *Circulation* 140, 6, 443–445.
- Packer, MILTON 1985. Sudden unexpected death in patients with congestive heart failure: a second frontier. *Circulation* 72, 4, 681–685.
- Panayotova-Heiermann, Mariana, Loo, Donald D. F. & Wright, Ernest M. 1995. Kinetics of Steady-state Currents and Charge Movements Associated with the Rat Na^+ /Glucose Cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* 270, 45, 27099–27105.
- Patorno, Elisabetta u. a. 2019. Empagliflozin and the Risk of Heart Failure Hospitalization in Routine Clinical Care: A First Analysis From the EMPRISE Study. *Circulation* 139, 25, 2822–2830.
- Peterson, Blaise Z, DeMaria, Carla D & Yue, David T 1999. Calmodulin Is the Ca^{2+} Sensor for Ca^{2+} -Dependent Inactivation of L-Type Calcium Channels. *Neuron* 22, 3, 549–558.
- Philippaert, Koenraad u. a. 2021. Cardiac Late Sodium Channel Current Is a Molecular Target for the Sodium/Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Empagliflozin. *Circulation* 143, 22, 2188–2204.
- Pieske, Burkert u. a. 2002. Rate Dependence of $[\text{Na}^+]_i$ and Contractility in Nonfailing and Failing Human Myocardium. *Circulation* 106, 4, 447–453.
- Poche, R. 1996. Submikroskopische Morphologie und Molekularbiologie des Herzmuskels. In *Herzkrankheiten*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 11–26. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-97605-6_2 [Stand 2021-03-28].
- Pogwizd, S. M. u. a. 2001. Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Heart Failure Roles of Sodium-Calcium Exchange, Inward Rectifier Potassium Current, and Residual β -Adrenergic Responsiveness. *Cellular Biology* .
- Pogwizd, S. M. u. a. 1999. Upregulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger Expression and Function in an Arrhythmogenic Rabbit Model of Heart Failure. *Cellular Biology* .
- Qaseem, Amir u. a. 2017. Oral Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Practice Guideline Update From the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine* 166, 4, 279.
- Qin, N. u. a. 1999. Ca^{2+} -induced inhibition of the cardiac Ca^{2+} channel depends on calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 5, 2435–2438.
- Ribola, F. A. u. a. 2017. Effects of SGLT2 inhibitors on weight loss in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21, 1, 199–211.
- Rockman, Howard A. u. a. 1991. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 18, 8277–8281.

- Santos-Gallego, Carlos G., Requena-Ibanez, Juan Antonio, u. a. 2019. Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics. *Journal of the American College of Cardiology* 73, 15, 1931–1944.
- Santos-Gallego, Carlos G., Requena-Ibanez, Juan Antonio, u. a. 2021. Empagliflozin Ameliorates Diastolic Dysfunction and Left Ventricular Fibrosis/Stiffness in Nondiabetic Heart Failure. *JACC: Cardiovascular Imaging* 14, 2, 393–407.
- Santos-Gallego, Carlos G., Vargas-Delgado, Ariana P., u. a. 2021. Randomized Trial of Empagliflozin in Nondiabetic Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 77, 3, 243–255.
- Santos-Gallego, Carlos G., Garcia-Roper, Alvaro, u. a. 2019. Rationale and Design of the EMPA-TROPISM Trial (ATRU-4): Are the “Cardiac Benefits” of Empagliflozin Independent of its Hypoglycemic Activity? *Cardiovascular Drugs and Therapy* 33, 1, 87–95.
- Scheen, André J 2014. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Empagliflozin, a Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor. *Clinical Pharmacokinetics* 53, 3, 213–225.
- Schmidt, Ulrich u. a. 1998. contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum atpase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30, 1929–1937.
- Schwinger, Robert HG u. a. 1999. Reduced sodium pump $\alpha 1$, $\alpha 3$, and $\beta 1$ -isoform protein levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity but unchanged Na^+ - Ca^{2+} exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation* 99, 16, 2105–2112.
- Shannon, Thomas R., Ginsburg, Kenneth S. & Bers, Donald M. 2002. Quantitative Assessment of the SR Ca^{2+} Leak-Load Relationship. *Circulation Research* 91, 7, 594–600.
- Shannon, Thomas R., Wang, Fei & Bers, Donald M. 2005. Regulation of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca Release by Luminal $[\text{Ca}]$ and Altered Gating Assessed with a Mathematical Model. *Biophysical Journal* 89, 6, 4096–4110.
- Shindler, Daniel M. u. a. 1996. Diabetes mellitus, a predictor of morbidity and mortality in the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD) trials and registry. *The American Journal of Cardiology* 77, 11, 1017–1020.
- Simmerman, Heather K. B. u. a. 1986. Sequence Analysis of Phospholamban. *Journal of Biological Chemistry* 261, 28, 13333–13341.
- Solini, Anna u. a. 2017. Dapagliflozin acutely improves endothelial dysfunction, reduces aortic stiffness and renal resistive index in type 2 diabetic patients: a pilot study. *Cardiovascular Diabetology* 16, 1, .
<http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-017-0621-8> [Stand 2019-12-23].
- Sossalla, Samuel u. a. 2008. Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts — Role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45, 1, 32–43.

- Statistisches Bundesamt 2017a. *Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) 2016*.
- Statistisches Bundesamt 2017b. *Todesursachen in Deutschland 2015*. Statistisches Bundesamt.
- Steenaaart, Nancy A.E. u. a. 1992. The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293, 1, 17–24.
- Stokes, George Gabriel 1852. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 142, 463–562.
- Studer, Roland u. a. 1994. Gene Expression of the Cardiac Na⁺-Ca²⁺-Exchanger in End-Stage Human Heart Failure. *Circulation Research* 75, 3, .
- Sun, Xin-Hui u. a. 1995. Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. *The Journal of cell biology* 129, 3, 659–671.
- Swedberg, Karl u. a. 1990. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 82, 5, 1730–1736.
- Swift, F. u. a. 2008. Altered Na⁺/Ca²⁺-exchanger activity due to downregulation of Na⁺/K⁺-ATPase 2-isoform in heart failure. *Cardiovascular Research* 78, 1, 71–78.
- Tada, M. u. a. 1982. Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Molecular and Cellular Biochemistry* 46, 2, . <http://link.springer.com/10.1007/BF00236776> [Stand 2018-08-18].
- Takahashi, T u. a. 1992. Expression of dihydropyridine receptor (Ca²⁺ channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 90, 3, 927–935.
- Takeshima, H. u. a. 1989. Primary Structure and Expression from Complementary DNA of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *Nature* 339, .
- Thermo Fisher Scientific 2010a. Chapter 19, Molecular Probes™ Handbook (11th edition).pdf.
- Thermo Fisher Scientific 2010b. Chapter 21, Molecular Probes™ Handbook (11th edition).pdf.
- Toyoshima, Chikashi u. a. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405, 6787, 647–655.
- Tromp, Jasper u. a. 2017. Biomarker Profiles in Heart Failure Patients With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *Journal of the American Heart Association* 6, 4, . <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.116.003989> [Stand 2021-02-13].
- Trum, Maximilian u. a. 2020. Empagliflozin inhibits Na⁺ /H⁺ exchanger activity in human atrial cardiomyocytes. *ESC Heart Failure* 7, 6, 4429–4437.
- Uthman, Laween u. a. 2018. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger, lowering of cytosolic Na⁺ and vasodilation. *Diabetologia* 61, 3, 722–726.

- Valdivia, Carmen R. u. a. 2005. Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38, 3, 475–483.
- Verma, Subodh u. a. 2018. Empagliflozin Increases Cardiac Energy Production in Diabetes. *JACC: Basic to Translational Science* 3, 5, .
- Vila-Petroff, Martín u. a. 2010. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to intracellular pH recovery from acidosis via Na⁺/H⁺ exchanger activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49, 1, 106–112.
- Wagner, Stefan u. a. 2013. Redox Regulation of Sodium and Calcium Handling. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 9, 1063–1077.
- Wanner, Christoph u. a. 2016. Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 375, 4, 323–334.
- Washburn, William N. 2009. Development of the Renal Glucose Reabsorption Inhibitors: A New Mechanism for the Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus Type 2. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 7, 1785–1794.
- Weber, Karl T. 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology* 13, 7, 1637–1652.
- Wilhelm, S. u. a. 2003. *Confocal Laser Scanning Microscopy Principles*. Zeiss Jena.
- Witcher, D. R. u. a. 1991. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *Journal of Biological Chemistry* 266, 17, 11144–11152.
- Wiviott, Stephen D. u. a. 2019. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 380, 4, 347–357.
- Wright, Ernest M. 2001. Renal Na⁺-glucose cotransporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 280, 1, F10–F18.
- Yokoyama, Hiroyuki u. a. 2000. Sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger activity and expression in human ventricular myocardium. *Journal of the American College of Cardiology* 36, 2, 534–540.
- Zannad, Faiez u. a. 2020. SGLT2 inhibitors in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a meta-analysis of the EMPEROR-Reduced and DAPA-HF trials. *The Lancet* 396, 10254, 819–829.
- Zelniker, Thomas A. u. a. 2019. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *The Lancet* 393, 10166, 31–39.
- Zhang, J. u. a. 2003. Three-dimensional Localization of Divergent Region 3 of the Ryanodine Receptor to the Clamp-shaped Structures Adjacent to the FKBP Binding Sites. *Journal of Biological Chemistry* 278, 16, 14211–14218.
- Zhou, Lubing u. a. 2003. Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *Journal of Cellular Biochemistry* 90, 2, 339–346.

- Zhu, Xinsheng u. a. 2005. Increased leakage of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ contributes to abnormal myocyte Ca²⁺ handling and shortening in sepsis*: *Critical Care Medicine* 33, 3, 598–604.
- Zinman, Bernard u. a. 2015. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 373, 22, 2117–2128.
- Zuurbier, Coert J. u. a. 2021. SGLT2 inhibitor empagliflozin inhibits the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger 1: Persistent inhibition under various experimental conditions. *Cardiovasc. Res* .

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Stefan Wagner, sowie PD Dr. med. Julian Mustroph, dem laborwissenschaftlichen Betreuer meiner Arbeit.

Mit ihren Kenntnissen der pathophysiologischen Mechanismen der Herzinsuffizienz schafften sie die Anregung, den bislang nur in der Therapie des Diabetes mellitus etablierten SGLT2-Inhibitoren Empagliflozin hinsichtlich seiner Wirkung am Herzen zu untersuchen und ermöglichten somit ein innovatives Vorhaben an der Schnittstelle von klinischer und grundlagenwissenschaftlicher Forschung. Ihre Expertise in der Planung und Umsetzung dieses Projekts garantierte mir eine kontinuierliche Unterstützung und verhalf mir zu einer Grundkompetenz im wissenschaftlichen Arbeiten, von der ich meine restliche wissenschaftliche Karriere profitieren werde.

Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maier, die mich schnell zu einem Teil ihres Teams machten und immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Hervorheben möchte ich hier besonders Herrn Thomas Sowa und Frau Felicia Radtke, durch deren umfassende Hilfe mir ein schneller und erfolgreicher Einstieg in die grundlagenwissenschaftliche Arbeit gelang und eine zunehmende Selbstständigkeit in der praktischen Ausübung meiner Experimente ermöglicht wurde, die mir sonst verwehrt geblieben wäre.

Mein herzlicher Dank gilt darüber hinaus dem Forschungsrat der Fakultät für Medizin für die Verleihung des Promotionsstipendiums zur Unterstützung in der Durchführung der vorliegenden Arbeit, sowie der Promotionskommission zur Aufnahme als Doktorandin in die Graduiertenschule der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg.