

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II

Prof. Dr. Lars S. Maier

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Empagliflozin in atrialen
Kardiomyozyten von HFpEF-Patienten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Rabea Vorholt

2026

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II

Prof. Dr. Lars S. Maier

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Empagliflozin in atrialen
Kardiomyozyten von HFpEF-Patienten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Rabea Vorholt

2026

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Keller
Tag der mündlichen Prüfung:	08. September 2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau des Myokards auf zellulärer Ebene	1
1.1.1	Aktionspotenzial und elektromechanische Kopplung.....	3
1.1.2	Stoffwechsel, mitochondriale ATP-Produktion	6
1.2	Quellen reaktiver Sauerstoffspezies in kardialen Myozyten.....	7
1.3	Antioxidative Schutzmechanismen im Myokard	8
1.4	Sauerstoffradikale in zellulärer Physiologie und Pathologie	9
1.4.1	Kardiale Toxizität reaktiver Sauerstoffspezies	10
1.5	Chronische Herzinsuffizienz	13
1.5.1	Begriffsdefinition und Einteilung nach der European Society of Cardiology (ESC)	13
1.5.2	Epidemiologie und Ätiologie	15
1.5.3	Zelluläre pathomechanische Veränderungen	16
1.5.4	HFpEF und ROS	19
1.6	Der SGLT2-Hemmer Empagliflozin als therapeutische Möglichkeit bei Diabetes mellitus und Herzinsuffizienz	21
1.6.1	Aktuelle Datenlage zur Kardioprotektion von Empagliflozin	23
1.7	Fragestellung und Versuchsaufbau	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Pharmakologische Intervention.....	26
2.1.1	Empagliflozin	26
2.2	Gewinnung humaner atrialer Kardiomyozyten	26
2.3	Aufbereitung humaner atrialer Kardiomyozyten	27
2.4	Isolation humaner atrialer Kardiomyozyten.....	28
2.5	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	30
2.5.1	Grundlagen	30

2.5.2	Die Fluoreszenz-Farbstoffe	32
2.6	Messprotokoll.....	33
2.7	Statistik und Datenauswertung.....	35
2.8	Auswahl des Patientenkollektivs.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Klinische Daten der teilnehmenden Patienten	38
3.2	Auswertung der zellulären Messdaten	40
4	Diskussion	47
4.1	Erhöhter oxidativer Stress in HFpEF Myozyten	47
4.2	Potenzielle Zusammenhänge, über die eine verminderte ROS-Produktion die kardiale Funktion verbessert	48
4.2.1	Diastolische Funktion.....	49
4.2.2	Endotheliale Funktion	52
4.2.3	Myokardialer Ionenhaushalt.....	53
4.2.4	Ca ²⁺ -Homöostase und mitochondrialer Stoffwechsel	54
4.3	Limitationen	56
4.4	Ausblick und klinische Relevanz	56
5	Zusammenfassung.....	57
6	Anhang	59
6.1	Tabellenverzeichnis.....	59
6.2	Abbildungsverzeichnis	59
7	Literaturverzeichnis.....	61

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AGE	advanced glycation end products
AIP	Autocamtide-2 related inhibitory peptide
AT I	Angiotensin I
ATII	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body mass index [kg/m ²]
Ca ²⁺	Calcium
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige-Kinase 2
CK	Kreatinkinase
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase
DHPR	Dihydropyridinrezeptoren
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
Empa	Empagliflozin
eNOS	endothelial NOS/NOS3
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazellulärmatrix
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FFA	freie Fettsäuren
GPx	Glutathion-Peroxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit geringgradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion
HFrfEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HZV	Herzzeitvolumen
iNOS	inducible NOS/NOS2
K ⁺	Kalium
KHK	Koronare Herzkrankheit
LTCC	L-Typ-Calcium-Kanäle
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
Na ⁺	Natrium
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCX	Natrium/Calcium-Austauscher
NHE	Na ⁺ -H ⁺ -Austauscher
nNOS	neuronal NOS/ NOS1
NO	Stickstoffmonoxid, Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	N-terminales Brain Natriuretic Peptide
NYHA	New York Heart Association

O ₂	Sauerstoff
O ²⁻	Superoxid-Radikal
OH-.....	Hydroxyl-Radikal
PCr.....	Phosphokreatin
PKA.....	Proteinkinase A
PKG.....	Proteinkinase G
PLN.....	Phospholamban
RAAS.....	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE.....	receptor of advanced glycation end products
ROI.....	Region of interest
ROS.....	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR2.....	Ryanodinrezeptoren
SERCA2a.....	Sarcoplasmatic/Endoplasmatic-Calcium-ATPase
SGLT2.....	Natrium-Glukose-Transporter 2
SGLT2i.....	SGLT2-Hemmer
SOD.....	Superoxid-Dismutase
SR.....	sarkoplasmatisches Retikulum
TGF-β.....	Transforming Growth Factor β
T-Tubuli.....	transversale Tubuli
TTX.....	Tetrodotoxin
XO.....	Xanthin-Oxidase

1 Einleitung

Herz-Kreislaufferkrankungen, zu denen neben Vorhofflimmern und der Myokardinfarkt auch die Herzinsuffizienz zählt, waren 2020 in Deutschland die häufigste Todesursache und machten damit zusammen einen Anteil von 52,3% der zehn häufigsten Todesursachen aus ⁽¹⁾. Obwohl die Letalität seit 2011 kontinuierlich rückläufig ist, verbleibt die Morbidität der Herzinsuffizienz weiterhin auf einem hohen Niveau ⁽¹⁾. Wiederholte stationäre Krankenhausaufenthalte aufgrund einer dekompensierten Herzinsuffizienz reduzieren die Lebensqualität der Patienten, wobei die Hospitalisierungsrate, wie auch die Morbidität, seit 2011 ungefähr stagniert ⁽¹⁾.

Insbesondere bei der Herzinsuffizienz sind daher zur Symptomkontrolle sowie zur Verlangsamung des Krankheitsprogress medikamentöse Therapiemöglichkeiten von großer Bedeutung. Die seit 2021 bestehende Erweiterung dieser um die ursprünglich als antidiabetische Medikamente vorgesehenen SGLT2-Hemmer ⁽²⁾ könnte sich jedoch in Zukunft in großem Maße positiv auf die Hospitalisierungsrate auswirken.

Da Kardiomyozyten selbst keine SGLT2-Transporter exprimieren, blieb lange Zeit unklar, welche Mechanismen dieser Antidiabetika zu einem so ausgeprägten kardialen Benefit beitragen können. In klinischen und in experimentellen Studien wurden früh eine verbesserte diastolische Funktion beschrieben ^(3,4), auf zellulärer Ebene identifizierte man einen optimierten Ionenhaushalt sowie eine veränderte Substratauswahl.

Oxidativer Stress fällt in Situationen systemischer Inflammation, chronischer Hypoxie oder neurohumoraler Aktivierung, wie sie bei herzinsuffizienten Patienten der Fall ist, vermehrt auch kardial an und unterhält weiter den Progress der Erkrankung ⁽⁵⁾. Ob die SGLT2-Hemmer, speziell Empagliflozin, auch einen direkten Effekt auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in humanen kardialen Myozyten haben, ist weiter Bestandteil aktueller Forschung.

1.1 Aufbau des Myokards auf zellulärer Ebene

Das Myokard ist aus einkernigen Myozyten aufgebaut und zählt aufgrund des typischen Aufbaus der Myofibrillen zur quergestreiften Muskulatur. Die Myofibrillen bestehen aus mehreren hintereinander liegenden Sarkomeren, in denen die Aktin- und Myosinfilamente in

charakteristischer Weise angeordnet sind (siehe Abbildung 1). Zwischen den Myofibrillen befinden sich Mitochondrien, die in Herzzellen ca. 30% des Zellvolumens ausmachen ⁽⁶⁾. Die transversalen Tubuli (T-Tubuli) ziehen als Einstülpungen der Zellmembran, des Sarkolemm, tief in die Zelle hinein zwischen die Muskelfasern und stehen in engem räumlichen Kontakt mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), welches als intrazellulärer Speicher für Calcium (Ca^{2+})-Ionen dient (siehe Abbildung 1).

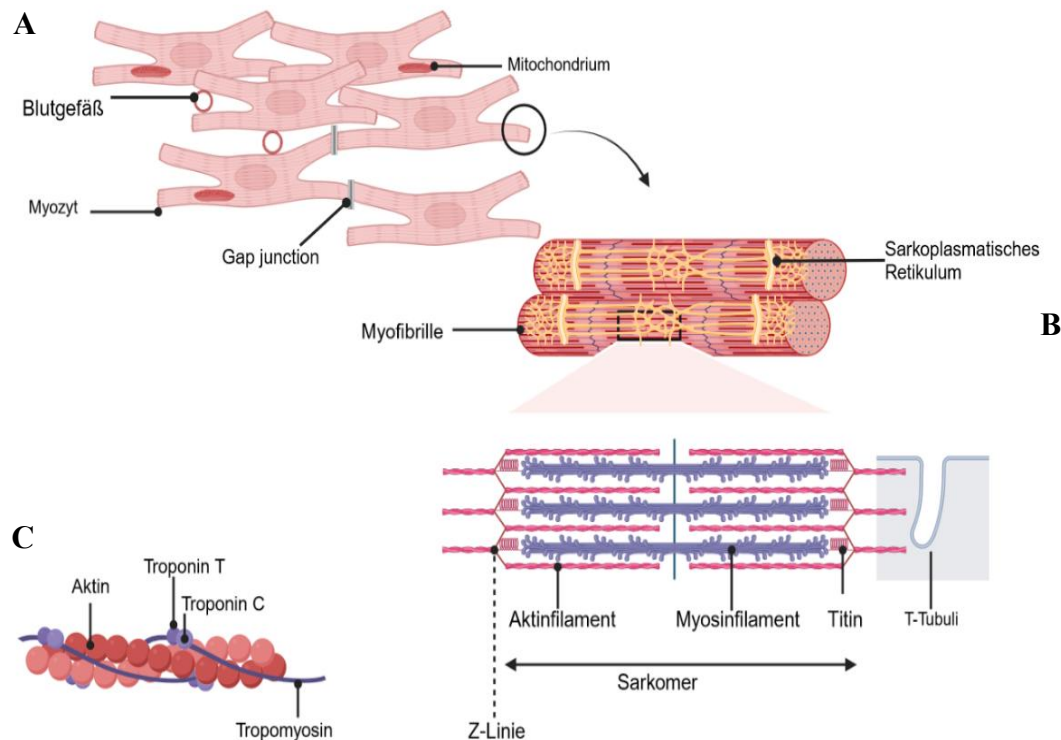


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Myokards auf zellulärer Ebene

A: Aufbau Myokard, B: Aufbau einer Myofibrille, C: Aufbau eines Aktinfilaments
erstellt mit biorender.com

Anders als die Skelettmuskulatur ist die Herzmuskulatur jedoch als ein funktionelles Synzytium, also eine elektromechanische Einheit, aufgebaut. An den Zellgrenzen, auch Glanzstreifen genannt, sind die einzelnen Zellen mittels gap junctions und Zonulae adherentes untereinander elektrisch sowie mechanisch verbunden ⁽⁷⁾. Die Weiterleitung eines Aktionspotenzials von einer Zelle zur nächsten geschieht somit automatisch und augenblicklich, sodass die rasche Übertragung von elektrischer Erregung in mechanische Kontraktion gewährleistet ist.

1.1.1 Aktionspotenzial und elektromechanische Kopplung

Die Erregung einer Herzmuskelzelle erfolgt, wie bereits erwähnt, über die Weiterleitung von Aktionspotenzialen. Beginnend in den Zellen des Sinusknotens, wird durch eine spontane Depolarisation ein Aktionspotenzial generiert und über das Erregungsleitungssystem des Herzens (AV-Knoten, His-Bündel, Tawara-Schenkel, Purkinje-Fasern) werden diese elektrischen Signale bis zum Kammermyokard weitergeleitet ⁽⁸⁾.

Im Ventrikelmyokard hat das Aktionspotenzial eine Dauer von 300ms und kann in vier Phasen eingeteilt werden. Erreicht die Membran nach einem eintreffenden Reiz ein Schwellenpotenzial von -65mV, kommt es zu einer Depolarisation. Diese Depolarisation (1) ist durch einen raschen Einstrom von Natrium (Na^+) durch spannungsabhängige Na^+ -Kanäle ($\text{Nav}1.5$) gekennzeichnet. Während der für Herzmuskelzellen spezifischen Plateauphase (2) ist die Membranleitfähigkeit für Ca^{2+} erhöht, sodass es zu einem Ca^{2+} -Einstrom entlang eines erheblichen chemischen Gradienten durch spannungsabhängige L-Typ-Calcium-Kanäle (LTCC) kommt. Nach einer anfänglich repolarisierenden Wirkung des durch spannungsabhängige Kaliumkanäle vermittelten Kalium (K^+)-Auswärtsstroms bewirkt der gleichzeitige Ca^{2+} -Einwärtsstrom vorübergehend ein stabiles Membranpotenzial. Während der Repolarisationsphase (3) kommt es durch eine gesteigerte K^+ -Permeabilität bei wieder inaktivierten Ca^{2+} -Kanälen zu einem reinen K^+ -Auswärtsstrom, der letztlich zum erneuten Erreichen des stabilen Ruhepotenzials (4) führt (siehe Abbildung 2).

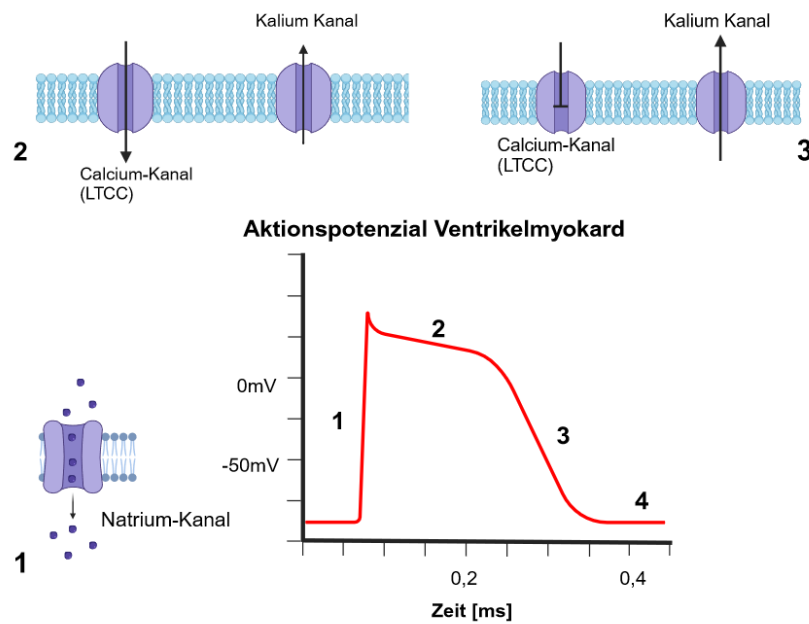


Abbildung 2: Schematischer Ablauf des Aktionspotenzials im Ventrikelmyokard

1: Depolarisation: Öffnung spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle, 2: Plateauphase: Ca^{2+} -Einstrom entlang LTCC und gleichzeitiger K^+ -Ausstrom, 3: Repolarisation: K^+ -Ausstrom bei inaktivierten Ca^{2+} -Kanälen, 4: Wiedererreichung des stabilen Ruhepotenzials

erstellt mit biorender.com

Um das elektrische Potenzial in eine mechanische Antwort zu übersetzen, ist das Netzwerk der T-Tubuli und des SR von großer Bedeutung. Die Aktivierung des kontraktilen Apparats erfolgt über den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration: Der Ca^{2+} -Einstrom durch die Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) in den T-Tubuli löst die Öffnung der Ryanodinrezeptoren (RyR2) im benachbarten SR aus, was einen weiteren quantitativ größeren Ca^{2+} -Strom nach intrazellulär bewirkt. Dieser Mechanismus wird auch als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung bezeichnet (CICR) ⁽⁹⁾. Der gleichzeitige Ablauf dieses Mechanismus entlang des gesamten Sarkolemmms führt zu einer zeitlichen und räumlichen Summation aller Ca^{2+} -Ströme. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration kann somit von einem Ruhewert von 10^{-7}mmol/l auf das bis zu 15-fache gesteigert werden ⁽⁹⁾. Durch Bindung von Ca^{2+} an Troponin C wird die Bindungsstelle am Aktinfilament freigegeben, sodass eine Aktin-Myosin-Interaktion stattfindet, der Querbrückenzyklus ablaufen kann und es zur Kontraktion kommt ⁽⁸⁾ (siehe Abbildung 3).

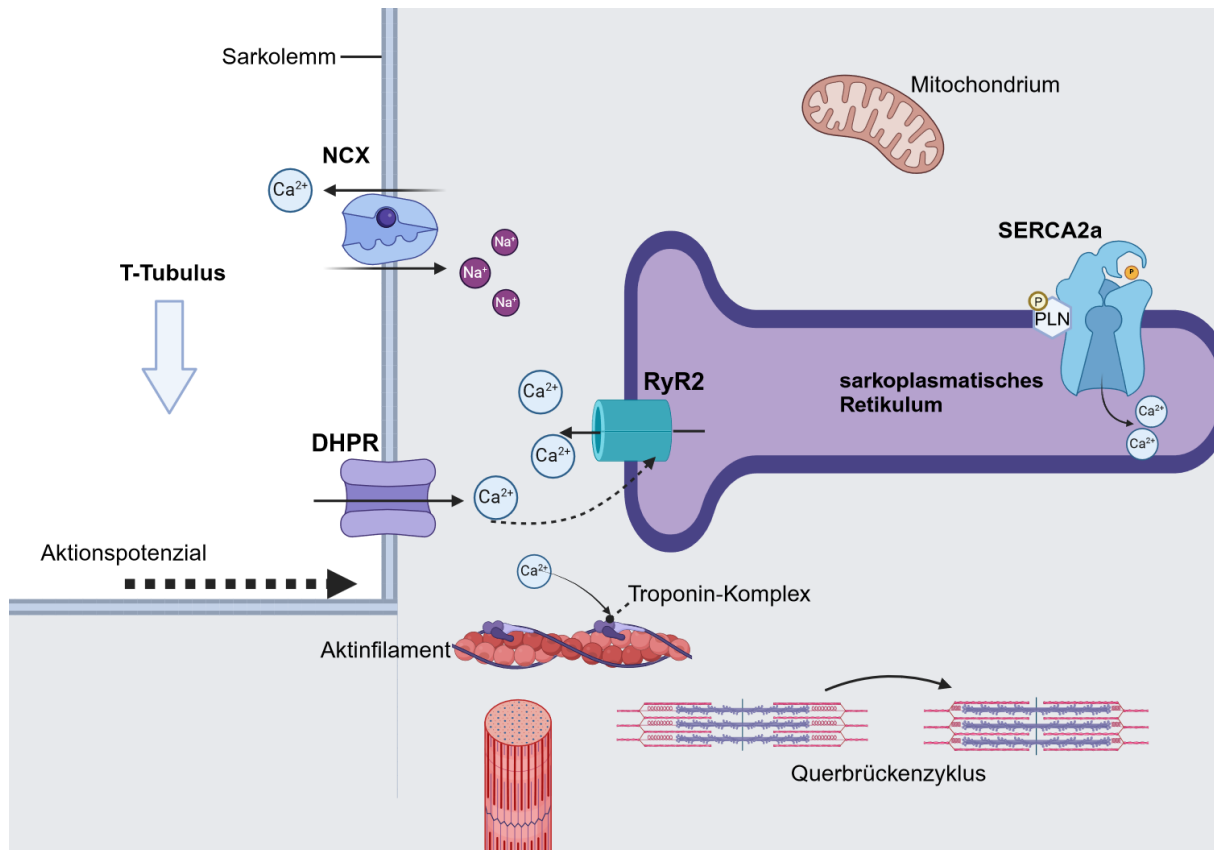


Abbildung 3: Elektromechanische Kopplung im Myokard, modifiziert nach Knollmann BC, Roden DM, Nature 451 929-936 (2008) ⁽¹⁰⁾

NCX: Natrium-Calcium-Austauscher, SERCA2a: Sarcoplasmatic/Endoplasmatic-Ca²⁺-ATPase, RyR2: Ryanodin-Rezeptor, DHPR: Dihydropyridinrezeptoren (LTCC), PLN: Phospholamban

erstellt mit biorender.com

Neben der Kontraktion ist auch die passive Dehnbarkeit des Myokards von großer Bedeutung für die adäquate Auswurfleistung des Herzens.

Während der Diastole wird das zelluläre Ca²⁺ hauptsächlich über zwei Transporter eliminiert: Der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) pumpt Ca²⁺ im Austausch für Na⁺ nach extrazellulär (stöchiometrisch 1 Ca²⁺:3 Na⁺) und die Sarcoplasmatic/Endoplasmatic-Ca²⁺-ATPase (SERCA2a), befördert Ca²⁺ unter ATP-Verbrauch zurück in das SR ⁽¹⁰⁾ (siehe Abbildung 3). Die SERCA2a selbst wird durch Phospholamban (PLN), ein weiteres Protein des SR, reguliert: Liegt Phospholamban dephosphoryliert vor, so wird die Transportaktivität der SERCA2a inhibiert. Wird PLN jedoch z.B. durch die Proteinkinase A (PKA) oder die Ca²⁺-Calmodulin-abhängige-Kinase 2 (CaMKII) phosphoryliert, resultiert dies in einer Dissoziation von SERCA2a und hebt dessen Inhibition auf. Dies bewirkt eine verstärkte Wiederaufnahme von Ca²⁺ zurück ins SR und resultiert somit in einer erhöhten Ca²⁺-Beladung im SR ⁽¹¹⁾.

Die Ca^{2+} -Homöostase ist somit von außerordentlicher Bedeutung für die myofilamentäre Relaxation: Sinkt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ab, wird durch die Dissoziation des Kalziums von Troponin C der Querbrückenzyklus beendet und die Filamente entspannen sich. Ein Protein, das hauptsächlich für die passive Steifheit der Ventrikel verantwortlich ist, ist das Titin ⁽¹²⁾ (siehe Abbildung 3), welches sich innerhalb des Sarkomers befindet und an der Z-Scheibe sowie am Myosinfilament befestigt ist. Kontrolliert wird seine Elastizität vor allem durch die Proteinkinase G (PKG): liegt Titin durch eine reduzierte PKG-Aktivität hypophosphoryliert oder in seiner N2B-Isoform vor, führt dies zu einer verstärkten passiven Ventrikelsteifheit ⁽¹³⁾. Diese Hypophosphorylierung lässt sich beispielsweise vermehrt bei Patienten mit HFpEF beobachten – vor allem auch oxidative Modifikationen durch einen erhöhten oxidativen Stress aufgrund bestehender Komorbiditäten können letztendlich zu einem vermehrten Vorliegen von hypophosphoryliertem Titin führen ⁽¹⁴⁾.

1.1.2 Stoffwechsel, mitochondriale ATP-Produktion

Um den energieaufwändigen Prozess der Aktin-Myosin-Interaktion aufrecht erhalten zu können, muss eine konstante Energieproduktion im Myokard gegeben sein. Diese wird zum überwiegenden Teil in Form von Adenosintriphosphat (ATP) sowie zusätzlich zur kurzfristigen Energieversorgung mittels Kreatinphosphat bereitgestellt ⁽¹⁵⁾. ATP wird im Herzmuskel größtenteils durch die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette in den Mitochondrien gebildet; die anaerobe ATP-Produktion durch Glykolyse ist physiologisch weniger bedeutend ⁽¹⁵⁾.

Die Voraussetzung für die Energiebereitstellung ist die Verstoffwechselung unterschiedlicher Substrate. Dazu herangezogen werden im humanen Myokard vorzugsweise Fettsäuren, Glukose und Laktat ⁽¹⁵⁾. Das Endprodukt all dieser Stoffwechselwege ist Acetyl-CoA, welches in den Citratzyklus eingeschleust wird und dabei Reduktionsäquivalente in Form von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) generiert. Diese werden im Verlauf der Atmungskette bei ausreichender Sauerstoff- (O_2) Konzentration oxidiert und die dabei freiwerdende Energie wird genutzt, um die Reaktion $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ zu katalysieren ⁽⁸⁾.

1.2 Quellen reaktiver Sauerstoffspezies in kardialen Myozyten

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind hoch reaktive chemische Verbindungen, die freie Radikale mit ungepaarten Elektronen enthalten, hergeleitet von molekularem Sauerstoff. Dazu werden das Superoxid-Radikal O_2^- , das Hydroxyl-Radikal $OH^\cdot$ und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gezählt ⁽¹⁶⁾. Sie sind äußerst instabile und daher kurzlebige Verbindungen, die sehr schnell mit zahlreichen zellulären Molekülen reagieren und schwer nachzuweisen sind. Sie entstehen fortwährend im Zuge der zellulären Homöostase, sowohl physiologischerweise als auch vermehrt in pathologischen Stoffwechsellagen. In Kardiomyozyten sind bislang mehrere unterschiedliche Quellen bekannt; hier soll nur auf die vier wichtigsten eingegangen werden. Ein zentraler Mechanismus stellt die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium dar. Die Atmungskette ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und umfasst fünf Proteinkomplexe (Komplex I – IV und die ATP-Synthase) sowie zwei Shuttles (Cytochrom C und Coenzym Q) ⁽¹⁷⁾. Elektronen, die aus den zellulären katabolen Stoffwechselwegen gewonnen wurden, werden durch diese Komplexe transportiert. Die hier aufgebaute protonenmotorische Kraft wird schließlich von der ATP-Synthase verwendet, um eine Phosphatgruppe auf Adenosindiphosphat (ADP) zu übertragen und somit Energie in Form von ATP für die Zelle bereit zu stellen ⁽¹⁸⁾. Zeitgleich zu diesem Mechanismus wird kontinuierlich durch die Komplexe I und III Sauerstoff von $O_2 \rightarrow O_2^-$ reduziert und somit als Nebenprodukt ROS generiert ⁽¹⁹⁾. Außerdem entweichen durchschnittlich 0.2-2% der Elektronen und reagieren mit molekularem Sauerstoff zu $OH^\cdot$ und O_2^- ⁽²⁰⁾. Diese ROS stellen den Hauptanteil mitochondrialer ROS dar und können zur Entstehung kardiovaskulärer Schäden beitragen ⁽²¹⁾. Als weitere Quelle kann die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOSs) angesehen werden. Drei Isoformen sind im Myokard vom besonderen Interesse: nNOS (neuronal NOS/NOS1), iNOS (inducible NOS/NOS2) und eNOS (endothelial NOS/NOS3). Deren Primärfunktion liegt in der Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), das modulierend nach β -adrenerger Stimulation auf die myokardiale Dehnbarkeit, basale Inotropie und Relaxation wirkt, Schaden nach Ischämie vermindert und Entzündungen unterdrückt ⁽²²⁾. Werden diese Enzyme jedoch instabil, z.B. bei arterieller Hypertonie, werden diese Enzyme jedoch instabil und produzieren vermehrt Sauerstoffradikale wie Superoxid. Dieser Vorgang wird als NOS-Entkoppelung bezeichnet ⁽²³⁾. Entkoppelte NOS spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von linksventrikulärer Hypertrophie, bei dilatativem Remodeling und bei kardialer Dysfunktion ⁽²⁴⁾.

Die Familie der NADPH-Oxidasen repräsentieren die größte ROS-Quelle im kardiovaskulären System ⁽¹⁶⁾. Die Familie dieser membrangebundenen Enzyme besteht aus sieben verschiedenen Isoformen, die unterschiedlich lokalisiert sind. Nox-4 und Nox-2, die im Myokard entscheidende Funktionen übernehmen, sind ebenfalls in Endothelzellen und in Fibroblasten exprimiert ⁽²⁵⁾. Im Unterschied zu den zuvor genannten ROS-Quellen ist die ROS-Bildung ist ihre primäre Funktion. Sie nutzen NADPH als Elektronendonator, um die Reduktion von $O_2 \rightarrow O_2^-$ zu katalysieren ⁽²⁶⁾. Die membrangebundene Nox-2 wird lediglich kurzzeitig aktiviert, beispielsweise bei erhöhten kardialen Füllungsdrücken, während mechanischen Stress sowie durch Angiotensin II (AT II) ⁽²⁷⁾. Dagegen ist die intrazellulär lokalisierte Nox-4 permanent niederschwellig aktiv und produziert vermehrt ROS nur z.B. unter hypoxischen Bedingungen ⁽²⁸⁾. Damit vereinbar ist der durch mehrere experimentelle Studien untermauerte Konsens, dass eine erhöhte Nox-2-Aktivität mit strukturellen und funktionellen Herzerkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Kardiomyopathie assoziiert ist ⁽²⁹⁾.

Die letzte der vier Hauptquellen für kardiale ROS ist die Xanthin-Oxidoreduktase. Sie kann entweder als Dehydrogenase oder als Oxidase vorliegen, jedoch produziert sie lediglich als Xanthin-Oxidase (XO) O_2^- und H_2O_2 ⁽¹⁶⁾. Eine erhöhte XO-Aktivität ist ein Merkmal dysfunktionaler Kardiomyozyten und konnte bereits in experimentellen Tiermodellen sowie bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz nachgewiesen werden ⁽³⁰⁾.

Ebenso wie für die Regulierung der einzelnen ROS-Quellen an sich sowie auch besonders für das komplexe Zusammenspiel aller ROS-Quellen untereinander sind eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich, um die äußerst feine Modulation der gesamten zellulären ROS-Produktion zu gewährleisten.

Neben diesen Enzymen wird kardial noch an anderen Stellen des zellulären Haushalts ROS generiert, die jedoch in dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle spielen. Nur vollständigkeithalber sollen hier noch die Cytochrom-Oxidase P_{450} , das $p66^{shc}$ -Protein und Enzymkomplexe wie 2-Oxoglutarat, Pyruvat-Dehydrogenase und Acyl-CoA-Dehydrogenase genannt werden ⁽³¹⁾⁽³²⁾⁽³³⁾.

1.3 Antioxidative Schutzmechanismen im Myokard

In einem physiologischen Zellmilieu bleibt die ROS-Konzentration stabil auf einem niedrigen Niveau, wodurch die zellulären Proteine vor Oxidation geschützt bleiben, was für den Ablauf vieler zellulärer Prozesse essenziell ist. Es existiert ein zelleigener Pool an verschiedenen

antioxidativen Schutzmechanismen, sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch, die sich mit der ROS-Produktion die Waage halten und somit oxidativen Stress verhindern ⁽¹⁹⁾.

Hierbei hervorzuheben ist vor allem die Superoxid-Dismutase (SOD), die in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist und die Reaktion von mitochondrial produziertem O_2^- zu H_2O_2 vereinfacht ⁽³⁴⁾. Anschließend katalysieren die Katalase oder die Glutathion-Peroxidase (GPx) H_2O_2 zu O_2 und H_2O ⁽³⁴⁾.

Im Hinblick auf die Superoxid-Dismutasen existieren kardial drei verschiedene Formen: eine zytosolische Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD), eine extrazelluläre glykosylierte CuZnSOD und die mitochondriale Mangan-SOD (MnSOD) ⁽³⁴⁾. Besonders letztgenannte ist bedeutend für die Bewahrung der funktionellen Zellqualität, wie Yen et al. bereits 1996 in einer Studie mit transgenen Mäusen nachweisen konnten: Durch die erhöhte Expression der MnSOD konnte während akuter Toxizität mittels Adriamycin ROS-induzierter Zellschaden vermindert und die kardiale Funktion erhalten bleiben ⁽³⁵⁾.

Die Neutralisation freier Radikale oder Vorstufen solcher verhindert zellschädigende Effekte (vgl. 1.4), die bei zu starker Kumulation von ROS entstehen würden. Die ständige Regeneration dieser antioxidativen Enzyme ist von zentraler Bedeutung aller physiologischen Stoffwechselprozesse im menschlichen Körper: übersteigt die ROS-Produktion die Kapazität der antioxidativen Mechanismen oder liegt ein Mangel an antioxidativen Enzymen vor, kommt es zu oxidativem Stress. Dieser ist vor allem mit Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, mit Neurodegeneration und mit eingeschränkter Immunkompetenz assoziiert ⁽²⁵⁾.

1.4 Sauerstoffradikale in zellulärer Physiologie und Pathologie

Das empfindliche Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Reduktionsmitteln kann schnell verletzt werden, was eine Reihe an oxidativen Zellschäden nach sich ziehen kann. ROS sind einerseits essenziell für den optimalen Ablauf zellulärer Funktionen, jedoch beeinträchtigt oxidativer Stress zahlreiche intrazelluläre Signalwege und führt bei chronischer Exposition zu molekularen und strukturellen Veränderungen, die zur Entstehung verschiedener kardialer Erkrankungen beitragen ⁽²⁵⁾.

Zweifellos sind immer mehrere Faktoren von Bedeutung, die das Ziel und die Wirkung der ROS beeinflussen. Relevant sind dabei deren Konzentration, das Zellkompartiment ihrer Synthese und der genaue ROS-Typ ⁽³⁶⁾.

Ganz allgemein übernehmen ROS in allen Zellarten auf molekularer Ebene eine Reihe wichtiger biologischer Funktionen. Als Mediator in zellulären Signalwegen agieren sie als

intrazelluläre second messenger bestimmter Liganden (TGF- β , PDGF, ATII, FGF-2, Endothelin-1), modulieren Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1), beteiligen sich an der Entzündungsmodulation und nehmen Einfluss auf die Zellalterung ⁽¹⁶⁾.

Der mitunter wichtigste Eingriff geschieht über posttranslationale Modifikationen. Durch Oxidation zellulärer Enzyme, von Ionenkanälen und Rezeptoren modifizieren sie deren molekulare Struktur und modulieren damit ihr Aktivitätsniveau. Häufige Angriffspunkte sind dabei Cystein-Reste an Proteinen; deren Oxidation resultiert in Modifikationen von Thiolgruppen, wie reversiblen inter- und intramolekularen Disulfidbrückenbildung und Nitrosylierung. ⁽³⁷⁾ Somit kann über die Kontrolle verschiedenster Enzyme und Proteine der Ionenhaushalt, der Stoffwechsel, die elektromechanische Kopplung und die Apoptose beeinflusst werden.

Gleichermaßen reagieren ROS mit zellulären Lipiden; neben der Oxidation freier Fettsäuren im Zytoplasma kommt es bei der Reaktion von ROS mit plasmalemmalen Lipiden zur Lipidperoxidation. Dies resultiert in Membranstabilität und Zellwandschäden, welche weiter die Aufrechterhaltung des Ionenhaushalts beeinträchtigen ⁽³⁸⁾.

Ferner werden durch Oxidation der nukleären Proteine DNA-Schäden verursacht, die über Denaturierung und Mutagenese irreversible Zellschäden verursachen, welche karzinogen, zytotoxisch oder apoptotisch wirken ⁽³⁸⁾.

1.4.1 Kardiale Toxizität reaktiver Sauerstoffspezies

Auch speziell kardial wurden die pathologischen Auswirkungen erhöhter ROS bereits eingehend erforscht. Unter anderem bei der Entwicklung kardialer Hypertrophie, welches ein zentrales Merkmal unterschiedlicher manifester kardialer Erkrankungen ist, haben Redox-Signalwege eine zentrale Bedeutung.

Oft induzieren G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Agonisten über ROS-Produktion kardiale Hypertrophie. Besonders bei erhöhten Füllungsdrücken und mechanischer Belastung werden diese Signalkaskaden aktiviert ⁽¹⁹⁾. Zwei wichtige Agonisten dieser Kaskaden sind Angiotensin II (ATII) ⁽³⁹⁾ sowie Endothelin-1 (ET-1). Durch Bindung von ATII an die zellulären Rezeptoren wird eine intrazelluläre Kaskade initiiert, die über O_2^- - Bildung durch Nox-2 und Umwandlung in H_2O_2 durch die SOD schließlich den MAP-Kinase-Weg aktiviert, was zu kardialer Hypertrophie oder auch Apoptose führen kann ⁽¹⁶⁾. Umgekehrt konnte in mehreren Tierversuchen mit Mausmodellen, bei denen die Funktion von Nox-2 inhibiert war, die Entwicklung kardialer Hypertrophie zurückgehalten werden ^(40, 39).

ET-1 induzierte Hypertrophie trägt insbesondere zur Entwicklung von Herzinsuffizienz bei, indem es die Balance von oxidativem Stress und antioxidativen Enzymen wie die Superoxiddismutase stört ⁽⁴¹⁾ (siehe Abbildung 4). Beispielhaft dafür zeigten Lebovitz et. al bereits 1996 an SOD2-knock-out-Mäusen, dass ein Mangel an antioxidativem Schutz zu dilatierten hypertrophierten Herzen führt ⁽⁴²⁾.

In ähnlichem Ausmaß wird zugleich die myokardiale Kontraktilität durch ROS beeinträchtigt. Experimentell konnte an diabetischen Mausmodellen gezeigt werden, dass erhöhte ROS-Level zu kardialer Fibrose und folglich zu einer eingeschränkten kontraktilen Funktion führen ⁽⁴³⁾.

Speziell im Myokard ist die elektromechanische Kopplung ein zentraler Mechanismus, bei dem ROS nicht nur wichtig für den genau abgestimmten Ablauf sind, sondern auch pathologisch wirken. An der Funktion mehrerer Kanäle, die für das Ca^{2+} -Handling des sarkoplasmatischen Retikulums zuständig sind, können ROS modifizierend eingreifen: Durch Modifikation von Sulfhydrylgruppen wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 erhöht, was während der Kontraktionsphase zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration führt ⁽³⁷⁾. Somit kann bei z.B. β -adrenerger Stimulation die Kontraktionskraft des Herzens fein moduliert werden. Der Effekt bleibt dabei jedoch stets abhängig von der Expositionsdauer der Proteine gegenüber ROS. Folglich kann es dabei in pathologischen Settings zu sogenannten Ca^{2+} -Sparks kommen: während der Diastole kommt es durch Leckagen zu minimalen Kalziumfreisetzungen aus dem SR nach intrazellulär, welche den NCX aktivieren und über einen zusätzlichen Natriumeinstrom zu späten Nachdepolarisationen führen. Diese triggern Arrhythmien und führen zu kontraktile Dysfunktion (siehe Abbildung 4). ⁽⁴⁴⁾

Zusätzlich wird durch ROS über einen zweiten wichtigen Ionenkanal des Kalziumhaushaltes Einfluss auf die Kalziumströme genommen: Durch direkte Oxidation der SERCA2a durch OH^- an der ATP-Bindungsstelle wird seine Transportaktivität inhibiert und folglich der Kalzium-Rücktransport in das SR minimiert ⁽⁴⁵⁾. Die resultierende Kalziumdepletion im SR sowie die Kalziumüberladung zytoplasmatisch tragen zusätzlich zu Kontraktilitätsstörungen und zur Arrhythmogenese bei ⁽⁴⁴⁾.

Eine weitere wichtige Einflussgröße in zellulären Signalkaskaden stellt, wie bereits in 1.1.1 erwähnt, die CaMKII dar, deren Aktivität durch Phosphorylierung oder Oxidation reguliert werden kann. Liegen im Rahmen der ATII-induzierten Kaskade erhöhte ROS-Konzentrationen vor, kommt es zu einer Oxidation der redox-sensitiven Aminosäuren an der regulatorischen Einheit und die CaMKII-Aktivität ist heraufgesetzt ⁽⁴⁶⁾. Die oxidierte Form der CaMKII (oxCaMKII) ist mit zahlreichen pathophysiologischen Prozessen im insuffizienten Myokard

assoziiert und führt zu Arrhythmien, EZM-Remodeling, Apoptose und moduliert Transkriptionsfaktoren ⁽⁴⁷⁾.

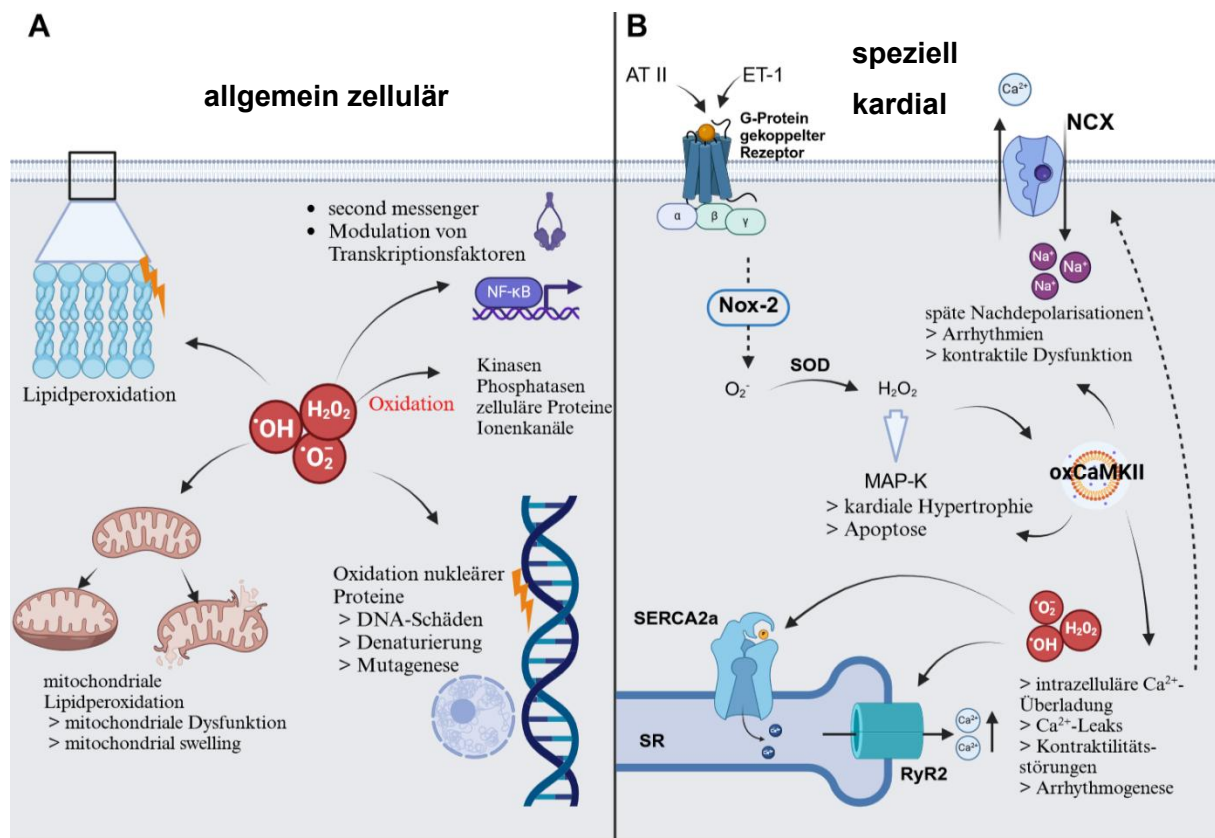


Abbildung 4: Pathologische Mechanismen reaktiver Sauerstoffspezies

A: allgemein zellulär, B: spezielle Kardiotoxizität

AT II: Angiotensin II; ET-1: Endothelin-1; NCX: Natrium-Calcium-Austauscher; Nox-2: NADPH Oxidase 2; SOD: Superoxiddismutase; MAP-K: MAP-Kinase; RyR2: Ryanodin-Rezeptor; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum

erstellt mit biorender.com

Ebenso können weitere Kanäle der Mechanotransduktion direkt modifiziert werden, u.a. die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher oder die Ca^{2+} -ATPase ⁽⁴⁸⁾.

Kalzium kommt also eine bedeutende Rolle in der kardialen Kontraktion sowie Relaxation zu, weshalb eine feine Modulierung seiner Ionenströme gewährleistet sein muss, um eine physiologische Herzaktion sicherzustellen. Störungen in dieser Regulationskette führen schnell zu elektrischer und mechanischer Dysfunktion, welche ursächlich in kardialen Funktionsstörungen, insbesondere bei Herzinsuffizienz, zu finden sind.

1.5 Chronische Herzinsuffizienz

1.5.1 Begriffsdefinition und Einteilung nach der European Society of Cardiology (ESC)

Herzinsuffizienz ist definiert als ein Zustand, in dem das Herz unter physiologischen Bedingungen und in Leistungssituationen nicht mehr dazu imstande ist, die systemische Perfusion aufrecht zu erhalten und Organe mit ausreichend Blut und somit auch mit Sauerstoff zu versorgen ⁽⁴⁹⁾. Ätiologisch sind zahlreiche unterschiedliche Ursachen bekannt, die einzeln für sich genommen oder auch in Kombination zum selben Endpunkt der Herzinsuffizienz führen (siehe 1.5.2).

Neben der pathophysiologischen Definition wird die Herzinsuffizienz auch über klinische Merkmale definiert. Diese bestehen aus einem Symptomkomplex, der sich aus zunehmender Leistungsminderung, (Belastungs-) Dyspnoe bzw. Orthopnoe und/oder peripherer bzw. pulmonaler Flüssigkeitsretention aufgrund eines reduzierten Herzzeitvolumens (HZV) zusammensetzt ⁽⁴⁹⁾. Diese reduzierte kardiale Funktion kann ihren Ursprung in einer Druck- und/oder einer Volumenüberlastung aufgrund einer erhöhten Vorlast, z.B. bei arterieller Hypertonie haben. Auch ein direkter myokardialer Schaden durch Ischämie, wie bei der koronaren Herzkrankheit (KHK) kann die kardiale Funktion reduzieren ⁽⁴⁹⁾. Die wichtigsten Pathomechanismen sind einerseits Störungen in der Kontraktionsfähigkeit (Inotropie) sowie in der Relaxationsfähigkeit (Lusitropie). Folglich kommt es durch die verminderte Herzfunktion zu einem Vorwärts- und/oder Rückwärtsversagen mit venöser Kongestion in dem Lungen- bzw. Körperkreislauf.

Erweitert wird die pathophysiologische und die klinische Definition durch die neurohumorale Komponente. Vermittelt über die Sympathikusaktivierung, eine Katecholaminausschüttung und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ⁽⁵⁰⁾ wird eine Reihe neuroendokriner Hormonsysteme aktiviert (siehe Abbildung 5). Diese anfangs protektiv wirkenden Adaptationen führen durch Flüssigkeitsretention und durch eine erhöhte Nachlast mittels Vasokonstriktion kurzzeitig zu einer Verbesserung des Herzzeitvolumens. Nach chronischer Stimulation der Angiotensin I (AT I) - und β -Rezeptoren im Zusammenspiel mit der Nachlaststeigerung und Volumenüberladung sind diese Adaptationen jedoch langfristig ursächlich für eine Progression der Erkrankung ⁽⁵¹⁾ (siehe Abbildung 5).

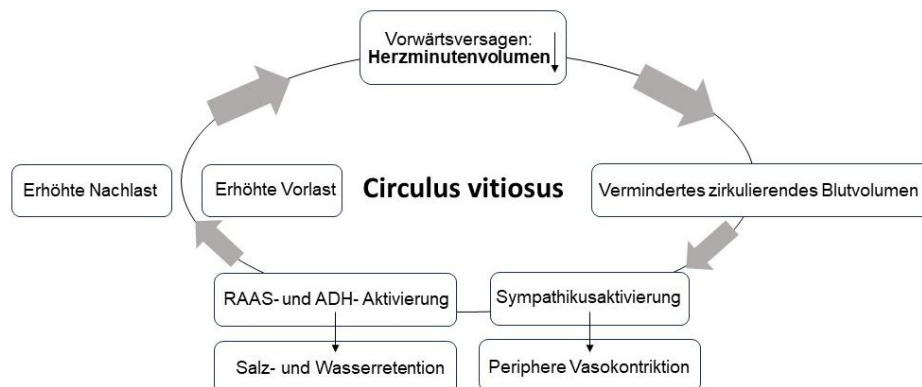


Abbildung 5: Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz (vereinfachte Darstellung); nach Herold, Gerd: Innere Medizin 2019, S. 211-212

Im klinischen Alltag wird der Schweregrad der Herzinsuffizienz anhand der noch erhaltenen Pumpfunktion beschrieben. Unter Zuhilfenahme objektivierender Methoden (Echokardiographie, Laborparameter) kann die Erkrankung feiner unterteilt werden. Hierzu liegt eine Leitlinie zur Diagnostik der akuten und chronischen HI von der ESC ⁽⁵²⁾ vor. Demnach wird anhand der Ejektionsfraktion (EF) zwischen Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HFrEF), mit geringgradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HFmrEF) und mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HFpEF) unterschieden ⁽⁵²⁾. Bei HFmrEF und HFpEF werden zusätzlich zwei weitere labordiagnostische und echokardiographische Kriterien zur Diagnostik herangezogen. Einerseits wird das N-terminale Fragment des Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP) aus dem Serum bestimmt. Die Synthese dieses Peptids findet vermehrt bei erhöhter Ventrikelspannung durch Volumenbelastung in den ventrikulären Myozyten statt. Da der Spiegel schon in frühen Stadien der Herzinsuffizienz erhöht ist, ist die Bestimmung des NT-proBNP's von großem diagnostischem Wert ⁽⁵³⁾. Besonders durch seinen hohen negativ prädiktiven Wert eignet sich das NT-pro BNP daher zum Ausschluss sowie zur Differentialdiagnostik einer chronischen oder akuten Herzinsuffizienz. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass dieser Parameter auch durch ein höheres Alter und eine herabgesetzte Nierenfunktion falsch positiv bewertet werden kann. ⁽⁵⁴⁾

Schließlich wird das Bestehen einer echokardiografisch darstellbaren relevanten strukturellen Veränderung mit einbezogen, die durch einen vergrößerten linken Vorhof oder einen hypertrophierten linken Ventrikel erkennbar ist (siehe Tabelle 1).

Um eine Einteilung des Schweregrads anhand der klinischen Beschwerdesymptomatik vorzunehmen, wird vorwiegend auf die Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) zurückgegriffen, die sich an der subjektiven Leistungsfähigkeit des Patienten misst. Diese Einteilung reicht von NYHA I (asymptomatisch) bis NYHA IV (schwere Dyspnoe), wobei bei letzterer Beschwerden schon in Ruhe bestehen ⁽⁴⁹⁾.

	HF_rEF	HF_{mr}EF	HF_pEF
1	Symptome ± Zeichen		
2	LVEF <40%	LVEF 40-49%	LVEF ≥ 50%
3	-	1) NT-proBNP > 125 pg/ml 2) mind. ein zusätzliches Kriterium: a. LVH und/oder LAE b. diastolische Dysfunktion	

Tabelle 1: Einteilung der chronischen Herzinsuffizienz, modifiziert nach der ESC-Leitlinie 2021 für Akute und Chronische Herzinsuffizienz ⁽⁵²⁾

1.5.2 Epidemiologie und Ätiologie

Herzinsuffizienz geht nicht nur mit erheblichen Einschränkungen im Alltag für den Patienten selbst einher, sondern bedeutet auch eine große sozioökonomische Herausforderung für die Gesellschaft.

Mit 36,16% der 939.520 Todesfälle 2019 stellten Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems die häufigste Todesursache in Deutschland dar ⁽⁵⁵⁾. Seitdem steigen die Inzidenzen der Herzerkrankungen weiter, unter denen vor allem Herzklappenerkrankungen, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz zunehmen ⁽⁵⁶⁾. Auch die Hospitalisierungsrate unter den Herzerkrankten steigt weiter an: 2017 wurden mit über 37.800 Patienten 1.5% mehr Menschen als 2015 aufgrund kardialer Erkrankungen in Krankenhäuser eingewiesen ⁽⁵⁶⁾. Gleichzeitig wird jedoch ein Rückgang der Mortalität beobachtet – allein bei den Patienten mit Herzinsuffizienz konnte die Sterberate um 11% ⁽⁵⁶⁾ gesenkt werden. Neben dem demografischen Wandel läge dies laut Fachkreisen auch an verbesserten Therapiemethoden und -möglichkeiten ⁽⁵⁷⁾.

Weltweit sind ca. 20 Millionen Menschen an chronischer Herzinsuffizienz erkrankt ⁽⁵⁸⁾. In den westlichen Staaten machen die Koronare Herzkrankheit (KHK) sowie die arterielle Hypertonie, die zu hypertensiver Kardiomyopathie führen kann, bis zu 90% der Ursachen für die chronische Herzinsuffizienz aus ⁽⁵⁶⁾. Immer öfter sind dafür Umstände wie der Lebensstil (Rauchen, Adipositas, Ernährung), Umwelteinflüsse (Feinstaubbelastung) und individuelle Risikofaktoren (Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, familiäre Vorerkrankungen) die Auslöser ⁽⁴⁹⁾.

Zu den selteneren Ursachen für eine Herzinsuffizienz zählen Arrhythmien (v.a. Vorhofflimmern), nicht-ischämische Kardiomyopathien (dilatativ, hypertroph, obstruktiv, restriktiv), erworbene oder angeborene valvuläre Erkrankungen (Aortenklappenstenose, Mitralklappeninsuffizienz) oder Perikarderkrankungen (z.B. konstriktive Perikarditis) ⁽⁴⁹⁾.

Pathophysiologisch gibt es nennenswerte Unterschiede zwischen HFrEF und HFpEF und genauso ist für die klinische Arbeit und dabei besonders für die therapeutische Konsequenz eine Unterscheidung essenziell. Bei HFrEF kommt es durch einen direkten myokardialen Schaden, meist ischämisch im Rahmen einer KHK, zu einer eingeschränkten Kontraktionsfähigkeit und zu einem daraus resultierenden verminderten Schlagvolumen ⁽⁵¹⁾. Konträr dazu wird bei dem Patientenkollektiv mit HFpEF einer sehr heterogene Pathophysiologie beobachtet. Grundlegende Merkmale hierbei sind oftmals die linksventrikuläre konzentrische Hypertrophie mit reduziertem Kammervolumen, die diastolische Dysfunktion mit reduzierter Relaxationsfähigkeit, sowie auch die vaskuläre Dysfunktion mit inadäquater Vasodilatation und arterieller Steifheit ⁽⁵⁹⁾. Wesentlich bei der Entstehung und Progredienz sind jedoch hauptsächlich die Komorbiditäten, insbesondere spielen hier COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) und Diabetes mellitus eine wichtige Rolle. Durch mikrovaskuläre Schäden und niedrigschwellige Entzündungsaktivität verschlechtert sich hierbei stetig schleichend die ventrikuläre Funktion ⁽⁵⁹⁾.

1.5.3 Zelluläre pathomechanische Veränderungen

1.5.3.1 CaMKII und ROS als Schlüsselemente der zellulären Ionenhomöostase

Auch auf zellulärer Ebene wurden zahlreiche Abläufe identifiziert, die zur Entwicklung von Herzinsuffizienz führen oder auch vice versa weiter durch die Erkrankung aggravierern. Zweifellos sind die Pathomechanismen je nach Ätiologie und Schweregrad im Detail

unterschiedlich, jedoch lassen sich einige typische Eigenschaften beschreiben, die als kennzeichnende zelluläre Mechanismen bei Herzinsuffizienz gelten.

Ein großes Defizit in Zellen herzinsuffizienter Patienten ist die dysregulierte Ionenhomöostase, insbesondere die von Na^+ , Ca^{2+} und K^+ . Unbestreitbar liegen dabei erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen vor; bei gleichzeitiger Störung der Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR liegt somit auch eine verminderte Ca^{2+} -Beladung im SR vor ⁽⁶⁰⁾. Ursächlich an dieser Dysbalance sind Ionenkanäle und -transporter, deren Funktion mittels Phosphorylierung durch Kinasen wie die Proteinkinase A (PKA) oder CaMKII verändert werden. Ein zentraler Angriffspunkt ist dabei der RyR2, der nach CaMKII-abhängiger Phosphorylierung durch seine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit diastolisches Ca^{2+} -Leck fördert ⁽⁶¹⁾. Die vermehrten intrazellulären Kalziumionen werden dabei vornehmlich nicht durch die SERCA2a zurück in das SR, sondern durch den NCX nach extrazellulär eliminiert. Folglich ist der Ca^{2+} -Pool im SR minimiert, was zu reduzierten Ca^{2+} -Transienten in der Systole führt und letztlich in einer herabgesetzten Kontraktionsfähigkeit resultiert ⁽⁶¹⁾. Der gleichzeitig erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} - Spiegel verhindert vor allem diastolisch die vollständige Relaxation und kann die diastolische Sarkomerlänge reduzieren. Dies führt zu reduzierten diastolischen Füllungskapazitäten und endet neben systolischem Pumpversagen zusätzlich in diastolischer Dysfunktion ⁽⁶²⁾.

Wie bereits in 1.4.1 gezeigt, wird genau diese Modifikation des RyR2 auch durch eine erhöhte ROS-Konzentration hervorgerufen. Entweder durch direkte Oxidation des RyR2 oder indirekt über die Oxidation der CaMKII und folglich wieder über die Phosphorylierung des RyR2 wird das SR-Kalzium-Leck gesteigert ⁽⁶³⁾. Ganz allgemein herrscht ohnehin in Myozyten herzinsuffizienter Patienten erhöhter oxidativer Stress, welcher hierbei eher durch eine erhöhte ROS-Produktion als durch eine verminderte antioxidative Kapazität hervorgerufen wird ⁽⁶⁴⁾. ROS sind also unmittelbar sowie indirekt vor allem über die Interaktion mit der CaMKII mit zellulären pathologischen Veränderungen der Kalziumhomöostase bei Herzinsuffizienz verbunden.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass neben dem RyR2 auch der LTCC, Phospholamban und die spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle durch die CaMKII phosphoryliert und somit deren Funktion verändert werden kann. Da in Kardiomyozyten herzinsuffizienter Patienten bereits mehrfach eine CaMKII-Überexpression und -Überaktivität nachgewiesen werden konnte, wird durch diese Kinase also an zahlreichen Stellen der kardialen Ionenhomöostase Einfluss genommen ⁽⁶⁵⁾.

Neben dem Kalziumtransport ist in Kardiomyozyten herzinsuffizienter Zellen vor allem auch die Natriumhomöostase verändert. Eine erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration kommt einerseits durch einen gesteigerten Na^+ -Einstrom durch spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle ⁽⁶⁶⁾ und den Na^+ - H^+ -Austauscher (NHE) ⁽⁶⁷⁾ zustande. Da die Na^+ - und Ca^{2+} -Homöostase sehr eng miteinander verbunden sind, reichen minimale Veränderungen auf einer Seite aus, um das feine Gleichgewicht zu stören. Die erhöhten intrazellulären Na^+ -Konzentrationen können dazu führen, dass anhand des hohen Konzentrationsgradienten nach extrazellulär der NCX im „reverse mode“ einen Na^+ -Auswärtsstrom sowie einen zusätzlichen Ca^{2+} -Einwärtsstrom mit sich zieht und somit die intrazelluläre Kalziumüberladung weiter verschlechtert ⁽⁶⁸⁾.

Da durch die Natriumflüsse auch simultan ein elektrischer Gradient geschaffen wird, bergen diese Ionenverschiebungen ebenso die Gefahr spontaner Depolarisationen. Das diastolische Ca^{2+} -Leck aus dem SR kann zu einem Auswärtsstrom der Kalziumionen über den NCX führen, welches gleichzeitig einen einwärtsgerichteten Na^+ -Einstrom mit sich zieht. Bei entsprechender Intensität kann dieser über eine verlängerte Dauer des Aktionspotenzials zu späten Nachdepolarisationen führen. ⁽⁶⁹⁾ Dadurch wird das Risiko von Arrhythmien erhöht, welche bei bereits bestehender Herzinsuffizienz als schwere Komplikation schnell zum Tod führen können ^(70, 61).

1.5.3.2 Substratauswahl im Stoffwechsel

Aufgrund der engen Beziehung zueinander resultiert aus der dysregulierten Ionenhomöostase auch ein eingeschränkter Stoffwechsel und damit eine reduzierte zelluläre Energieproduktion. Um den Prozess der Kontraktion aufrecht erhalten zu können, sind Herzzellen auf eine ständige Energieproduktion in Form von ATP durch die Mitochondrien angewiesen. Herzinsuffiziente Zellen werden in der Literatur oft als ein Motor ohne Treibstoff beschrieben ⁽⁷¹⁾. Tatsächlich sind diese Zellen mit einer mindestens 30%igen Reduktion der zellulären ATP-Verfügbarkeit assoziiert ⁽⁷²⁾. Neben vielen anderen zellulären Umbauten ist dafür auch eine Veränderung in der Auswahl, Verarbeitung und dem Verbrauch exogener Substrate verantwortlich.

Das gesunde Myokard besitzt, im Gegensatz zu anderen humanen Zellentitäten, eine außerordentliche metabolische Flexibilität und kann seinen Metabolismus anpassen, indem es den relativen Anteil der Energiequellen je nach Blutkonzentration am Energiestoffwechsel anpasst. Somit kann in jeder Stoffwechsellage eine ausreichende Energieversorgung garantiert werden. Gemäß metabolischer Lage werden in gesunden Myozyten als Ausgangssubstrat für die ATP-Produktion bis zu 90% freie Fettsäuren (FFA) herangezogen; der Rest wird aus

Glukose, Laktat und Aminosäuren gespeist. ⁽⁷²⁾ Bei Patienten mit weit fortgeschrittener Herzinsuffizienz wurde ein zellulärer Umbau beobachtet, der als „substrate shift“ ⁽⁷³⁾ beschrieben wird. Vorwiegend ist dieser gekennzeichnet durch einen herunterregulierten Fettsäure-Metabolismus, charakterisiert durch verminderte mRNA- und Proteinexpression mehrerer Enzyme, die zentral an der β -Oxidation beteiligt sind ⁽⁷⁴⁾. Die Inkongruenz zwischen Substrataufnahme und -verwertung resultiert in der Akkumulation von Lipiden im Zytosol, was der Zelle durch sogenannte Lipotoxizität weiteren Schaden zufügt ⁽⁷⁵⁾. Zudem legte eine Studie an Mäusen mit transverser Aortenkonstriktion (sog. TAC-Mäuse) von Kolwicz et al. bereits früh nahe, dass die verminderte β -Oxidation kausal mit der Entwicklung von Herzinsuffizienz zusammenhängt ⁽⁷⁶⁾.

1.5.3.3 Oxidativer Stress durch neurohumorale Aktivierung

Auf systemischer Ebene nimmt im circulus vitiosus der Entstehung chronischer Herzinsuffizienz die neurohumorale Aktivierung eine zentrale Rolle ein (siehe 1.5.1). Initial als Kompensationsmechanismus bei abnehmender Auswurfleistung aktiviert, führen diese Mechanismen nach chronischer Stimulation zur weiteren Progression der Erkrankung. Intrazellulär erzeugt diese endokrine Aktivierung zusätzlichen oxidativen Stress, der die antioxidative Kraft der Zelle übersteigt. ⁽¹⁹⁾ Überdies sind Mitochondrien in Myozyten herzinsuffizienter Patienten mit einer reduzierten Enzymkomplex-Aktivität der Atmungskette assoziiert, was eine gesteigerte Nox-2-induzierte ROS-Produktion zur Folge hat. Infolgedessen kommt es zu mitochondrialer Dysfunktion mit mitochondrialen DNA-Schäden, Öffnung mitochondrialer Permeabilitätsporen und gestörter mitochondrialer Biogenese. ⁽⁶⁴⁾ In Assoziation mit der steigenden Beeinträchtigung zellulärer Prozesse durch ROS kommt es schließlich zum Verlust funktionellen Myokards und damit einhergehender Reduktion des kardialen Outputs ⁽⁵⁰⁾.

1.5.4 HFpEF und ROS

Eine interessante Entität, über die bislang ätiologisch wenig Konkretes bekannt ist und bei der noch ein Mangel an guten Therapieansätzen besteht, ist die Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion. Pathophysiologisch begrenzt hier eine unzureichende ventrikuläre Relaxierung während der Diastole das diastolische Füllungsvolumen und reduziert somit bei physiologischer Ejektionsfraktion die Auswurfleistung des Herzens. Dieser als diastolische

Dysfunktion bezeichnete Zustand resultiert aus einem Zusammenspiel von linksventrikulärer Hypertrophie mit konzentrischem Remodeling, erhöhter extrazellulärer Matrix und abnormer Ca^{2+} -Homöostase. ⁽⁷⁷⁾ Folglich herrscht eine diastolische Steifigkeit, hervorgehend einerseits aus einem gesteigerten Vorkommen fibrotischer Fasern, welche die Elastizität des Myokards im Gesamten beeinträchtigen, und andererseits aus einer erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Konzentration intrazellulär, welche auf molekularer Ebene die Relaxierung einzelner Sarkomere begrenzt ⁽⁷⁸⁾.

Mehr als bei den anderen Entitäten stehen hier, wie bereits in 1.5.2 erwähnt, ätiologisch vor allem der Lebensstil und die Komorbiditäten im Vordergrund. Diabetes mellitus, arterielle Hypertension und Übergewicht oder Adipositas mit hohem Anteil viszeralen Fettes erzeugen einen Status systemischer Inflammation mit erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine ⁽⁷⁹⁾. Solche Zytokin-Signalwege induzieren über endotheliale ROS-Produktion auch myokardial intrazelluläre Kaskaden, die pathologische Veränderungen zur Folge haben: Kardiale interstitielle Fibrose resultiert in diastolischer Dysfunktion bei unzureichender Relaxationsfähigkeit, eine niedrige Verfügbarkeit endothelialer NO's (Stickstoffmonoxid) mindert das Sauerstoffangebot bei Belastung und myokardiale Hypertrophie schränkt das diastolische Füllungsvolumen und die systolische Pumpfunktion ein ⁽⁷⁹⁾.

Wie bereits erläutert, sind Proteine und auch Lipide primäre Angriffspunkte reaktiver Sauerstoffspezies. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II, welcher ein frequenter Komorbiditätsfaktor bei HFpEF darstellt, sind im peripheren Blut oxidierte Proteine und Lipide signifikant erhöht und gleichzeitig ist der Spiegel antioxidativer Enzyme vermindert ⁽⁸⁰⁾. Erhöhte ROS-Konzentrationen kommen direkt myokardial besonders über NADPH-Oxidasen und NOS zustande, diese führen zur Apoptose und mitochondrialer Dysfunktion ⁽⁸¹⁾. Ein weiterer Mechanismus ist in einer diabetischen Stoffwechsellage zusätzlich mit zunehmender ROS-Produktion verknüpft: durch chronische Hyperglykämie binden Zuckermoleküle nicht-enzymatisch an Proteine und Lipide, bekannt als Glykierung, wodurch sogenannte advanced glycation end products (AGE's) entstehen. Diese können an Rezeptoren (RAGE's) auf der Zelloberfläche von Endothelzellen und auch Kardiomyozyten binden, deren Aktivierung eine Reihe von intrazellulären Kaskaden (einschließlich NF- κ B-Aktivierung) auslöst und schließlich in ROS-Produktion endet ⁽⁸²⁾.

Therapeutische Optionen zielen daher wesentlich auf die Komorbiditäten ab und konzentrieren sich auf die Behandlung arterieller Hypertension und die endotheliale Dysfunktion beispielsweise mittels Nitraten. Auch Statine sollen vorteilhafte Wirkungen haben und neben

der Reduktion der Fibrose und der Hypertrophie besonders auch antioxidative Effekte haben, die einen wichtigen zugrundeliegenden Faktor der pathologischen Veränderungen dieser Entität ansteuert ⁽⁸³⁾.

Zusätzlich dazu wäre es jedoch wünschenswert, weitere Therapiemöglichkeiten in Aussicht zu haben, die speziell auf die kardialen Probleme abzielen und somit die ursächlichen Pathomechanismen der Erkrankung direkt angreifen.

1.6 Der SGLT2-Hemmer Empagliflozin als therapeutische Möglichkeit bei Diabetes mellitus und Herzinsuffizienz

Zur Therapie von Diabetes mellitus steht eine große Vielfalt unterschiedlich wirkender Antidiabetika zur Auswahl. Eine davon stellt das Antidiabetikum Empagliflozin (Empa) dar, welches über die selektive Hemmung des Natrium-Glukose-Transporters 2 (SGLT2) im proximalen Tubulus der Niere und damit über eine erhöhte renale Glukoseausscheidung seine blutzuckersenkende Wirkung entfaltet ⁽⁸⁴⁾. Zusätzlich dazu wurden anfangs vor allem bei Typ II-Diabetikern mit hohem kardiovaskulären Risikoprofil ausgeprägte kardioprotektive Wirkungen beobachtet. In der ersten großen klinischen Studie, EMPA-REG OUTCOME, wurde dieser kardiale Benefit als eine Risikoreduktion von 38%, an kardiovaskulären Ereignissen zu versterben, beschrieben. Überdies wurde eine 32% Risikoreduktion allgemeiner Sterblichkeit sowie eine 35% Risikoreduktion der Hospitalisierung auf Grund von Herzinsuffizienz festgestellt. ⁽⁸⁴⁾

Interessanterweise ist jedoch kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Inzidenz von Myokardinfarkten und Schlaganfälle beschrieben worden. Die antihyperglykämischen Effekte wie die milde Reduktion der HbA1c-Levels (um -0,4% nach 24 Monaten) als Korrelat für die glykämische Kontrolle sowie die leichte Reduktion des Körpergewichts, des Hüftumfangs und des Blutdrucks lassen eher auf geringe systemische Wirkungen des Antidiabetikums schließen. ⁽⁸⁴⁾

Neben der EMPA-REG-OUTCOME-Studie zeigten auch andere Vertreter der SGLT2-Hemmer (SGLT2i) einen großen kardiovaskulären Nutzen: Canagliflozin reduzierte signifikant die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse, bestehend aus kardiovaskulärem Tod sowie nicht-tödlicher Herzinfarkte und Schlaganfälle ⁽⁸⁵⁾. Auch eine Langzeittherapie mit Dapagliflozin resultierte in signifikant erniedrigter Raten kardiovaskulären Todes sowie Hospitalisierung auf Grund von Herzinsuffizienz ⁽⁸⁶⁾.

Besonders beeindruckend ist die Erkenntnis, dass Empa nicht nur bei Patienten mit Diabetes mellitus eine protektive kardiale Funktion aufweist, sondern auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, ungeachtet einer zusätzlichen Komorbidität mit Diabetes ⁽⁸⁷⁾.

Nachdem schon die Behandlung mit dem SGLT2-Hemmer Dapagliflozin bei Patienten mit Herzinsuffizienz zur Verminderung der Hospitalisierungsrate führte und dieser Effekt vor allem verstärkt bei Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion (EF <45%) zu beobachten war ⁽⁸⁸⁾, konnte dieser Effekt anschließend gleichermaßen bei Empa durch ähnliche Studien bewiesen werden:

In der klinischen Emperor-Reduced – Studie wurde der Effekt einer Empa-Therapie über zwei Jahre bei Patienten mit HFrEF, d.h. einer EF <40% und einem NT-proBNP von durchschnittlich 1000pg/ml, untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Risikoreduktion eines kardiovaskulären Todes sowie der Hospitalisierung aufgrund von Herzinsuffizienz ⁽⁸⁷⁾. Zudem konnte hierbei zum ersten Mal die kardioprotektive Wirkung nicht nur bei Diabetikern, sondern auch bei Nicht-Diabetikern nachgewiesen werden.

Aufgrund solcher Studienergebnisse ist Empagliflozin nach Dapagliflozin nun auch seit 2021 in der EU zur Behandlung bei Patienten mit chronischer HFrEF, ungeachtet einer zusätzlichen Komorbidität mit Diabetes mellitus, zugelassen ⁽²⁾.

Parallel dazu wurden die Effekte von Empa auf die Mortalität und Morbidität von 5988 Patienten mit HFpEF in der Emperor-Preserved-Studie über einen Zeitraum von 24 Monaten untersucht. Dort eingeschlossen wurden Patienten mit Symptomen einer Herzinsuffizienz, strukturellen oder funktionellen kardialen Veränderungen, einer EF >50% sowie einem NT-proBNP von >300pg/ml. Einheitlich zu den Ergebnissen der Emperor-Reduced-Studie konnte auch hier eine hohe relative Risikoreduktion von 21% im Hinblick auf einen kardiovaskulären Tod sowie Hospitalisierung aufgrund von Herzinsuffizienz gezeigt werden. ⁽⁸⁹⁾

Letztendlich konnten Butler et al. mit ihrer gepoolten Analysenstudie zeigen, dass die Risikoreduktion, aufgrund von dekompensierter Herzinsuffizienz hospitalisiert zu werden und eines kardiovaskulären Todes zu versterben, entlang aller Ejektionsfraktionen von <25% bis 65% durch die Behandlung mit Empa nachgewiesen werden kann und dieser Effekt auch unabhängig vom Geschlecht signifikant ist ⁽⁹⁰⁾.

1.6.1 Aktuelle Datenlage zur Kardioprotektion von Empagliflozin

Angeichts der Abwesenheit von SGLT2-Kanälen am kardialen Sarkolemm sind nun die zugrundeliegenden Mechanismen von besonderem Interesse, sowie deren Zusammenspiel, die diese signifikanten kardialen Benefits eines Antidiabetikums erklären können.

Die bereits spekulierten Mechanismen reichen von systemischen Effekten bis hin zu direkten kardialen Wirkungen. Zu Beginn wurde angenommen, dass kardiorenale Feedbackschleifen über eine vermehrte Diurese die Vorlast reduzieren und eine verminderte arterielle Steifigkeit die Nachlast senkt ⁽⁹¹⁾. Da aber der Effekt in der EMPA-REG-OUTCOME-Studie schon nach kurzer Zeit nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass eher direkte kardiale Veränderungen für die positiven Ergebnisse verantwortlich sind.

Eine Studie von Lin et al. zeigte, dass Empa nach Langzeit-Behandlung über zehn Wochen am diabetischen Mausmodell die Progression des Diabetes verlangsamte. Außerdem verbesserte die Therapie die kardiale interstitielle sowie perikoronare Fibrose, reduzierte die kardiale Makrophagen-Infiltration, verminderte die Dicke der koronaren Arterienwand und verbesserte die vaskuläre Dysfunktion. ⁽⁹²⁾ Auch eine Studie an humanen kardialen Myofibroblasten untermauerte diese Ergebnisse: Einhergehend mit der Suppression profibrotischer Marker sowie einer verminderten Fibroblasten-Aktivierung über TGF- β wurde eine Reduktion des Remodelings im Extrazellulärraum (EZM) nachgewiesen ⁽⁹³⁾. Da eine erhöhte Kollagendeposition in der Extrazellulärmatrix die Ventrikelsteifigkeit fördert und so zu diastolischer sowie systolischer Insuffizienz führt, kann durch Verlangsamung dieses Mechanismus das Fortschreiten der eingeschränkten ventrikulären Funktion aufgehalten werden.

Verdeutlicht wurde dieser Effekt in einer weiteren Studie an humanen Ventrikelpuben von Patienten mit Herzinsuffizienz ohne Diabetes, in der durch kurzfristige Behandlung der isolierten Trabekeln mit Empa die diastolische Spannung erheblich reduziert werden konnte, was für eine direkte Verbesserung der diastolischen Dysfunktion spricht. Damit zusammenhängend wurde gleichzeitig die Veränderung im Ca^{2+} -Haushalt untersucht. Dabei konnte nach kurzzeitiger Behandlung mit Empa jedoch keine Änderung der systolischen Ca^{2+} -Amplitude sowie des diastolischen Ca^{2+} -Levels nachgewiesen werden. ⁽³⁾ Ein akuter Effekt auf die myokardiale Ca^{2+} -Homöostase konnte somit nicht belegt werden.

Die Exposition von Empa an ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz über 24 Stunden zeigte jedoch einen wichtigen Effekt auf die Ca^{2+} -Ströme: Die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Beladung nimmt zu, die Frequenz diastolischer Ca^{2+} -Sparks als

Korrelat für Leckagen in der SR-Membran nehmen ab und die Ca^{2+} -Transienten-Amplituden als zelluläres Surrogat der kontraktilen Funktion verstärken sich ⁽⁹⁴⁾. Interessanterweise konnte auch hier dieser Effekt nicht beobachtet werden, nachdem die Zellen nur für 30 Minuten mit Empa behandelt wurden.

Als molekulare Ursache dafür konnte eine reduzierte CaMKII-Aktivität nachgewiesen werden. Dies resultierte in verminderter CaMKII-abhängiger posttranslationaler Phosphorylierung von RyR2 und PLN bei gleichbleibender Expression beider Proteine. ⁽⁹⁴⁾ Bedeutend ist überdies, dass diese Ergebnisse nicht nur bei Patienten mit etablierter Herzinsuffizienz nachzuweisen waren, sondern auch bei Mausmodellen ohne jegliche strukturelle oder funktionelle Herzerkrankung.

In enger Beziehung zum Ca^{2+} -Haushalt und damit auch bedeutend für die Aufrechterhaltung der kontraktilen Funktion steht der Na^+ -Haushalt. Neben der direkten Interaktion mit der CaMKII kann Empa auch indirekt über den Eingriff in die intrazelluläre Na^+ -Konzentration Einfluss auf die Ca^{2+} -Konzentration nehmen. Jüngere Studien belegen eine direkte Inhibition des plasmalemmalen Na^+ -Protonen-Austauschers NHE-1 nach akuter Behandlung mit Empa, was in einer verminderten intrazellulären Na^+ -Konzentration resultiert ⁽⁹⁵⁾. Vermutlich über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher NCX führt dies wiederum zu verminderter zytosolischer bei gleichzeitig erhöhter mitochondrialer Ca^{2+} -Konzentration ⁽⁹⁵⁾. Diese Effekte spiegeln alle eine Umkehr der schädlichen Mechanismen in der Ionenhomöostase dar, wie sie in der Entwicklung von Herzinsuffizienz beobachtet werden (siehe 1.5.3).

Weitere Hypothesen zur günstigen Wirkung von Empa beziehen sich auf eine effizientere Gestaltung des Stoffwechsels hinsichtlich Substrataufnahme, Substratauswahl und Substratverwertung. Einerseits wurde durch Empa bei Mausmodellen mit TAC - induzierter Herzinsuffizienz sowie bei isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine erhöhte GLUT1-Expression nachgewiesen ⁽⁹⁶⁾. Deckungsgleich dazu war die Glukoseaufnahme erhöht, auch in gesunden Herzzellen ⁽⁹⁶⁾. Vorteilhaft kann dies in dem Sinne sein, als dass die komplette Oxidation von Glukose eine O_2 -effizientere Alternative zu der Oxidation von Fettsäuren oder Ketonen ist ⁽⁹⁷⁾. Andererseits wurde an einem nicht-diabetischen Schweinemodell mit Herzinsuffizienz Gegenteiliges beobachtet: Durch Behandlung mit Empa wurde ein Wechsel der Substratverwertung von Glukose hin zu Ketonen, freien Fettsäuren und verzweigkettigen Aminosäuren gezeigt. Dadurch konnte die ATP-Ausbeute erhöht sowie die kardiale Arbeit effizienter gestaltet

werden, was sich in einer Optimierung der systolischen linksventrikulären Funktion und der Vermeidung nachteiliger Remodeling-Prozesse zeigte. ⁽⁹⁸⁾

Neben einer verbesserten linksventrikulären Funktion konnten die linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Volumina (LVESV, LVEDV) sowie die linksventrikuläre Muskelmasse in der klinischen Studie Empa-TROPISM von Santos-Gallego et al. durch die Medikation mit Empagliflozin signifikant gesenkt werden. Durch vermindertes kardiales Remodeling und reduzierter kardialer Hypertrophie wurde somit neben verbesserten messbaren Parametern auch eine Optimierung in der Lebensqualität der Patienten erreicht. ⁽⁹⁹⁾

Die bisherige Datenlage hinsichtlich der Reduktion oxidativen Stresses bezieht sich seither lediglich auf das myokardiale Endothel: Dort konnte nach Behandlung mit Empa in Mausmodellen sowie in humanen Proben eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies verringert werden bei gleichzeitiger Abnahme der inflammatorischen Prozesse im Rahmen der diabetischen Erkrankung ^(100, 101). In Kombination dazu führt zusätzlich die erhöhte Bioverfügbarkeit von NO, wahrscheinlich durch Verhinderung der Entkopplung der eNOS, außerdem zu einer verbesserten Relaxation der myokardialen Gefäße und reduziert somit die vaskuläre Dysfunktion ⁽¹⁰²⁾.

1.7 Fragestellung und Versuchsaufbau

Reaktive Sauerstoffspezies können sich je nach Quelle entweder zytosolisch oder mitochondrial befinden. In diesem Versuch soll durch zwei Fluoreszenzfarbstoffe, die freie Radikale einerseits im Zytoplasma und andererseits mitochondrial und nukleär detektieren, das myokardiale ROS-Vorkommen beurteilt werden. Hierzu wurden isolierte humane atriale Kardiomyozyten unter dem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Die humanen Zellen wurden durch Gewebeproben von Patienten gewonnen, die aufgrund von KHK, Aortensklerose, Aortenaneurysmen oder Mitralklappeninsuffizienz operiert wurden und dabei an eine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen wurden.

Um einen auf Empagliflozin beruhenden Effekt beobachten zu können, wurden die Zellen eines Patienten sowohl der Kontroll- als auch der Interventionsgruppe zugeordnet. Es wurden maximal vier Zellen pro Gruppe und Patient gemessen, mindestens jedoch eine Zelle.

Nach zehn-minütiger Messung der zellulären ROS-Entstehung wird über die Auswertungsprogramme ImageJ und Graphpad Prism die Steigung (slope) der

Fluoreszenzentwicklung durch lineare Regression ermittelt und anschließend daraus der Mittelwert jedes Patienten.

Schließlich wird bei der Gegenüberstellung der gemittelten slopes aus der Interventions- und Kontrollgruppe ersichtlich, ob die kurzzeitige Behandlung der Kardiomyozyten mit Empagliflozin einen direkten zellulären Effekt auf die ROS-Bildung hat.

Mithilfe dieser Arbeit soll also ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der direkten zellulären myokardialen Mechanismen der SGLT2i geleistet werden.

Hierzu werden folgende Theorien untersucht:

- 1) In Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion ist eine erhöhte ROS-Beladung zu beobachten.
- 2) Durch die kurzzeitige Behandlung mit Empagliflozin werden in humanen Kardiomyozyten von Patienten mit HFpEF weniger Sauerstoffradikale gebildet.
- 3) Die Reduktion der ROS-Produktion ist unabhängig von anderen Nebendiagnosen oder Laborparametern.

2 Material und Methoden

2.1 Pharmakologische Intervention

2.1.1 Empagliflozin

Empagliflozin (Summenformel $C_{23}H_{27}ClO_7$, molare Masse 450,91 g/mol) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst in einer Konzentration von 10mmol/l bei -18°C gelagert. Bei den in vitro-Experimenten wurde eine therapeutische Konzentration von 1µmol/l gewählt, die mit der Versuchstyrode täglich neu angesetzt wurde.

Der Kontrollgruppe wurde eine äquivalente Menge DMSO (Summenformel C_2H_6OS , molare Masse 78,13 g/mol) hinzugefügt.

2.2 Gewinnung humaner atrialer Kardiomyozyten

In freundlicher Zusammenarbeit mit der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums Regensburg unter der Leitung von Prof. Schmid wurden atriale Gewebeproben von Patienten gewonnen, die mit Unterstützung einer Herz-Lungen-Maschine

am offenen Herzen operiert wurden. Der Arbeit lag ein positives Votum des Ethikkommittees der Universität Regensburg vor. Der Deklaration von Helsinki entsprechend lag zudem ein schriftliches Einverständnis der inkludierten Patienten vor.

Die Vorerkrankungen mit Indikationsstellung zur Operation variierten – es wurden Patienten eingeschlossen, die aufgrund von KHK, Aortenklappenstenose, Mitralklappenstenose oder Aortenaneurysma operiert wurden. In jedem Fall handelte es sich um eine Probe des rechten Vorhofes, das routinemäßig bei der Kanülierung des Vorhofes entfernt wird.

Nach Absprache mit dem OP-Team wurden die Gewebeproben direkt nach Entnahme aus dem Saal abgeholt und in 4°C kalter Custodiol Perfusionslösung + BDM (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH) auf Eis in das Labor transportiert.

2.3 Aufbereitung humaner atrialer Kardiomyozyten

Die Gewebeproben wurden mit der Lösung in eine auf einem Eisblock stehende Petrischale überführt und Fettgewebe sowie fibrotische Areale entfernt, sodass mit fast reinem Myokardgewebe weitergearbeitet werden konnte. Um den folgenden Enzymlösungen eine vergleichbar gleich große Angriffsfläche am Gewebe zu bieten, wurde die Probe in 1-2mm kleine Stücke geschnitten.

Die Gewebestückchen wurden nun in ein vorgewärmtes Isolationsgefäß gegeben, in dem sich bereits 20ml der Ca^{2+} -freien Isolationstyrode (Tabelle 2) befanden. Die Lösung wurde während der gesamten Isolation unter konstantem Rühren mittels eines Rührfisches und unter Sauerstoffbegasung auf 37°C gehalten.

Zu Beginn der Isolation wurde das Gewebe von Blut, Fett und der Transportlösung bereinigt. Dafür wurde nach drei Minuten die Zellsuspension durch ein Zellsieb in ein Becherglas überführt und die Gewebestücke mit einer Pinzette vorsichtig zurück in das Isolationsgefäß mit 20ml einer frischen Isolationstyrode gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur Myokardgewebe zurückgeführt wurde. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	100
KCl	74,55	10
MgCl ₂	95,21	5
KH ₂ PO ₄	136,09	1,2

Taurin	125,15	50
MOPS	209,26	5
BDM	101,10	10
Glucose	180,16	20

Einstellung auf pH=7,2 bei 37°C mit 1M NaOH

Tabelle 2: Ca²⁺-freie Isolationstyrode

2.4 Isolation humaner atrialer Kardiomyozyten

Nach der Reinigung des Gewebes wurden die Stücke nun wieder in das Isolationsgefäß mit 20ml der Enzymlösung I (Tabelle 3) überführt, sodass der erste Verdauschnitt beginnen konnte.

Substanz	Gewicht
Collagenase Type I (Worthington 4196), 370 u/mg	0.015 – 0.0155g
Proteinase XXIV (Sigma Aldrich P8038), 7 u/mg	0.008g
in 20ml Ca ²⁺ -freier Isolationstyrode	

Tabelle 3: Enzymlösung I

Während der Isolation wurde ein schonender Calciumaufbau der Zellen durchgeführt, wofür anfangs nach 10 Minuten 40µl einer 10mM-Ca²⁺Cl₂-Lösung hinzugegeben wurden. Nach insgesamt 45 Minuten war der erste Verdauschnitt abgeschlossen und die Gewebestücke konnten nach dem Filtern durch das Zellsieb wieder rasch in 20ml der Enzymlösung II (Tabelle 4) gegeben werden.

Substanz	Gewicht
Collagenase Type I (Worthington 4196)	0.015 – 0.0155g
in 20ml Ca ²⁺ -freier Isolationstyrode	

Tabelle 4: Enzymlösung II

Hierzu wurden wieder 40µl der 10mM-Ca²⁺Cl₂-Lösung pipettiert. Um nun die Zellen auch mechanisch aus dem Zellverband zu lösen, wurde im Isolationsgefäß mit einer Pasteurpipette mit entfernter Spitze die Zelllösung immer wieder auf und ab pipettiert. Dabei wurde versucht,

keine Luftblasen in die Lösung zu befördern, damit die Zellqualität so gut wie möglich erhalten bleibt.

Nach fünf Minuten des zweiten Verdauschriffs wurde nun begonnen, regelmäßig 10µl der Zelllösung zu entnehmen und als Tropfenausstrich auf einen Objektträger unter dem Lichtmikroskop aufzutragen. So wurde die Zellqualität und -quantität im Verlauf beurteilt, um den richtigen Zeitpunkt zum Beenden der Gewebeverdauung bestimmen zu können. Maßgeblich hierfür waren die Anwesenheit von isolierten Myokardzellen im Verhältnis zu Zelldetritus sowie der zelluläre morphologische Charakter; besonders auf eine intakte Zellmembran sowie klar erkennbare Querstreifung wurde der Fokus gesetzt (siehe Abbildung 6). Der Zeitpunkt, an dem sich die Zellzahl nicht mehr signifikant erhöhte, die Zellqualität aber noch ausreichend war, wurde individuell bestimmt und überschritt nicht 20 Minuten nach Beginn des zweiten Verdauschriffes. Beendet wurde die Verdauung durch Zugabe von 400µl BCS.

Die Zelllösung wurde nun durch das Zellsieb in ein 50ml Falconröhrchen überführt. Die restlichen Gewebestückchen wurden ein letztes Mal in das Isolationsgefäß befördert, in dem sich 20ml des Storage Mediums (Tabelle 5) befanden. Durch mechanisches Auf- und Abpipettieren mit der Pasteurpipette wurden noch einmal Myokardzellen aus dem Zellverband gelöst. Nachdem auch diese zweite Zelllösung in ein 50ml Falconröhrchen überführt wurde, wurden beide Röhrchen bei 40g, 500rpm und 145cm Radius zentrifugiert. Der Überstand wurde nun bis auf das Zellpellet von ca. 2ml vorsichtig abpipettiert.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
KCl	74,55	30
KH ₂ PO ₄	136,09	10
MgCl ₂	95,21	1
HEPES	238,31	10
Glucose	180,16	11
Taurin	125,14	20
Glutamic acid	146,15	70
BDM	101,1	10
BCS		2%

Einstellung auf pH=7.4 bei Raumtemperatur mit KOH, Lagerung bei 4°C

Tabelle 5: Storage Medium

Um den Calciumaufbau abzuschließen, wurden zuerst 10µl der 10mM- $\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$ -Lösung zur Zellsuspension hinzugegeben und nach 10 Minuten durch 5µl ergänzt, sodass die Endkonzentration von 0,3mM Ca^{2+} erreicht werden konnte. Abschließend wurde erneut eine Probe dieser Zellsuspension unter dem Lichtmikroskop auf Zellqualität geprüft (siehe Abbildung 6) und nur nach Isolationen mit quantitativ und qualitativ hochwertigen Zellen wurden die fluoreszenzmikroskopischen Messungen durchgeführt.



Abbildung 6: Humane atriale Zelle unter dem konventionellen Lichtmikroskop

2.5 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

2.5.1 Grundlagen

Mithilfe des konfokalen Lasermikroskops können für diese Arbeit zelluläre ROS in räumlicher und zeitlicher Summation dargestellt werden. Im Unterscheid zur konventionellen Lichtmikroskopie arbeitet das konfokale Laser-Scanning Mikroskop jedoch mit einer anderen Technik. Erstens wird in konventioneller Lichtmikroskopie das gesamte Präparat gleichzeitig durchleuchtet. Bei konfokaler Lasermikroskopie hingegen wird stets nur ein kleiner punktueller Ausschnitt des Präparates mit dem Laser angeregt. Dies wird durch die Leitung des Anregungslichts durch eine Anregungslochblende (pinhole) möglich gemacht, sodass das kurzwellige Licht punktuell fokussiert wird und durch eine Installation verschiedener beweglicher Spiegel auf das zu durchleuchtende Objekt geleitet wird. Schrittweise wird dieser Punkt über das Präparat gerastert, sodass durch eine serielle Erfassung des emittierten Lichts des Gewebes ein vollständiges Abbild des Präparates entstehen kann.

Zweitens ist das Konfokalmikroskop mit einer zweiten Lochblende ausgestattet, die sich unmittelbar vor dem Detektor in der Zwischenbildebene befindet. Bei der Fluoreszenzmessung

wird das emittierte Licht vom Präparat nur aus dem fokussierten Bereich erfasst, da emittiertes Licht in lateraler und axialer Abweichung des Fokus abgeleitet wird und somit nicht auf den Detektor trifft. Die Tiefenschärfe und die Auflösung können durch die Größe des pinholes definiert und individuell angepasst werden. Mithilfe des konfokalen Lasermikroskops wird somit ein sehr detailgetreues Bild einer Zelle mit hoher Kontrastintensität und optimaler Auflösung erzeugt.

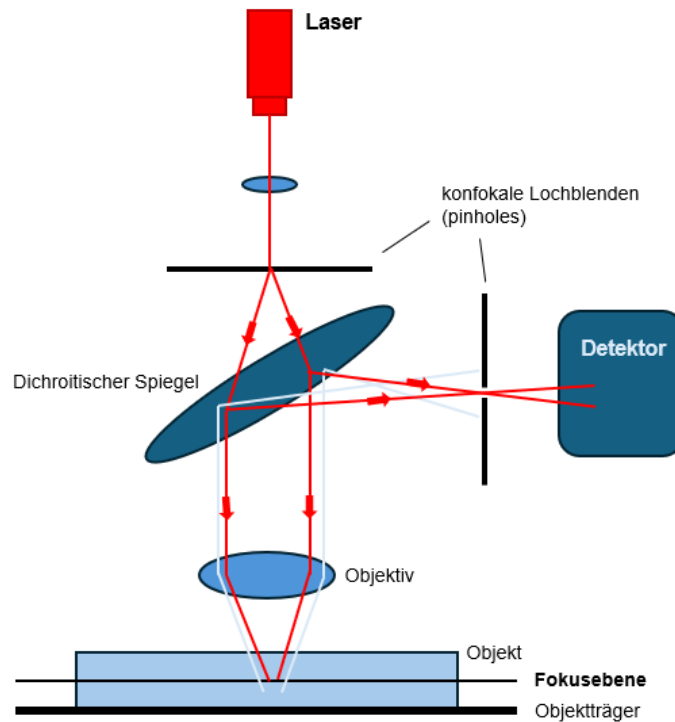


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Konfokalmikroskopes

Das vom Laser emittierte Licht (rot) wird über die Anregungslochblende auf die Fokusebene des Objektes gebündelt. Die Fluoreszenzfarbstoffe emittieren das Licht, welches durch die Lochblende des Detektors fällt (rot). Licht außerhalb der Fokusebene (blau) wird über den dichroitischen Spiegel und die Lochblende nicht in den Detektor geleitet.

Das in dieser Arbeit benutzte Konfokalmikroskop (LSM 700, Carl Zeiss AG Deutschland) ist außerdem mit mehreren Argonlasern ausgestattet, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen aussenden und durch einen dichroitischen Strahlteiler übereinander gelagert werden. Somit können gleichzeitig mehrere Fluorochrome, die durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen angeregt werden, in einer einzigen Probe benutzt werden.

2.5.2 Die Fluoreszenz-Farbstoffe

Fluoreszenz ist ein physikalischer Effekt, bei dem Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und daraufhin Licht einer höheren, energieärmeren Wellenlänge emittieren. Diese Wellenlängenverschiebung wird auch Stokes-Effekt genannt (Stokes, 1852). In der Fluoreszenzmikroskopie wird dies beispielsweise insofern genutzt, als dass Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) inkubiert werden, der an spezifische Zellstrukturen, Moleküle oder Enzyme bindet und nach Anregung durch spezielles Licht mittels Emission diese sichtbar macht.

Für die Darstellung der reaktiven Sauerstoffspezies wurden zwei ähnliche Farbstoffe genutzt, die diese jedoch in unterschiedlichen Zellkompartimenten darstellen können. Beide Fluorochrome sind in reduziertem Zustand nicht fluorogen und werden erst durch Kontakt mit Sauerstoffradikalen oxidiert und wirken somit fluoreszierend.

Im ersten Teil des Versuchs wurden die zytoplasmatischen ROS mittels des Fluoreszenzfarbstoffes CellROX Orange (C10443, Thermo Fisher Scientific, USA) dargestellt. Nach Lagerung des Farbstoffes, gelöst in DMSO bei einer Konzentration von 0,25mM und einer Temperatur von -20°C, wurde gemäß der Anleitung eine Messkonzentration von 5µM gewählt. CellROX Orange ist ein nicht-ratiometrischer Farbstoff, d.h. durch verstärkte Fluoreszenzemissionen kann man direkt auf erhöhte ROS-Konzentrationen schließen. Er hat ein festes Absorptionsmaximum bei $\lambda=545\text{nm}$ und Emissionsmaximum bei $\lambda=565\text{nm}$ Wellenlänge.

Im zweiten Teil wurde sich spezieller auf die direkt mitochondrialen ROS fokussiert, weshalb dazu eine Kombination aus CellROX Green (C10444, Thermo Fisher Scientific, USA) und Mitotracker Red (M22425, Thermo Fisher Scientific, USA) gewählt wurde. CellROX Green ($\lambda=485/520$) bindet nach Oxidation bei Anwesenheit von ROS an die DNA und detektiert diese deshalb nukleär, also im Nukleus sowie in den Mitochondrien. Da diese Bindung noch nicht sensitiv genug ist, wurden die Zellen zeitgleich mit Mitotracker Red ($\lambda=581/644$) inkubiert, um somit über die Überlappung beider Farbstoffemissionen auf die ROS-Entstehung in den Mitochondrien rückschließen zu können. Durch die Ausstattung mehrerer Argonlaser konnten daher die zwei Farbstoffe, mit der die Zelle inkubiert wurde, gleichzeitig im selben Myozyten dargestellt und parallel ausgewertet werden.

2.6 Messprotokoll

Nach Zentrifugation und Calciumaufbau wurden je 400µl der Zellsuspension in die Messkammern gegeben. Für die konfokale fluoreszenzmikroskopische Messung muss sichergestellt werden, dass die Zellen stabil in einer Ebene auf dem Glasboden der Kammer verbleiben. Entsprechend wurde die Glasplatte vor Auftragen der Zellsuspension mit 3,5µl Laminin (L2020, Sigma Aldrich, USA) beschichtet. Zur Garantie einer möglichst quantitativen und soliden Zelladhäsion wurde dreißig Minuten bis zur potenziell vollständigen Sedimentation gewartet. Anschließend wurde in einer mit Rotlicht ausgeleuchteten Dunkelkammer, was dem Schutz des photosensiblen Farbstoffes diene, die Zellsuspension vorsichtig mit einem Zellstofftuch abgenommen und durch 200µl der Farbstofflösung (Tabelle 6) ersetzt.

Substanz	Konzentration
Messtyrode (s. Tabelle 7)	
Fluoreszenzfarbstoff (CellRox Green + Orange)	5µM
Fluoreszenzfarbstoff (Mitotracker Red)	2nM
Pluronic	

Tabelle 6: Farbstofflösung

Die Messkammern wurden bei einer konstanten Außentemperatur von 37°C in der Dunkelkammer für 30 min. (CellRox Orange) bzw. 40 min. (CellRox Green + Mitotracker Red) inkubiert, um eine optimale Beladung der Zellen mit den Farbstoffen sicherzustellen.

Die Zellen in den Messkammern eines jeden Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: die Zellen der Interventionsgruppe (empa) wurden schon während der Inkubation mit der Farbstofflösung zusätzlich mit Empagliflozin in einer Konzentration von 1µM behandelt, während die Kontrollgruppe (veh) die reine Farbstofflösung erhielt.

Nach der Farbstoffinkubation wurde auch diese Lösung langsam abgenommen und die Kammer mit 400µl der Messtyrode ($\pm 1\mu\text{M}$ Empa) (Tabelle 7) befüllt.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	140
KCl	74,55	4

MgCl ₂	95,21	1
HEPES	238,31	5
Glucose	180.16	10
CaCl ₂	238.31	1

Einstellung auf pH=7,4 bei 37°C mit 1M NaOH

gelöst in doppelt destilliertem H₂O, Lagerung bei 4°C

Tabelle 7: Messtyrode

Schließlich wurde die Messkammer in die Messvorrichtung des Konfokalmikroskops gespannt und die Elektrode des Stimulators (MyoPacer, IonOptix, USA) angebracht. Der MyoPacer wurde auf eine Stimulationsfrequenz von 1 Hz mit einer Spannung von 20mV eingestellt und das 40x Ölimmersionsobjektiv benutzt. Zusätzlich wurde eine Superfusion mit Absaugung installiert, die bei 37°C mit 1ml/min kontinuierlich die Versuchstyrode in der Kammer ersetzt. Dadurch wurde gewährleistet, dass Zelldetritus sowie anfallende Metabolite und überschüssiger extrazellulärer Farbstoff entfernt wurden, um ein möglichst physiologisches Milieu zu schaffen.

Nach Sichtung der gesamten Kammer wurden stets Zellen ausgewählt, die den morphologischen Eigenschaften eines intakten Kardiomyozyten wie Querstreifung und stabiler Zellmembran entsprachen und auf eine suffiziente, aber auch nicht übermäßige Signalintensität und -verteilung geprüft wurden. Durch anfängliches Überprüfen der Signalwerte mittels der Funktion der Region of interest (ROI) über der gesamten Zelle konnte auf die Farbstoffbeladung bzw. ROS-Konzentration geschlossen werden.

Wurde eine den Anforderungen entsprechende Zelle gefunden, begann die Messung: Über einen Zeitraum von zehn Minuten wurde in Intervallen von dreißig Sekunden ein sogenannter optischer Schnitt des Kardiomyozyten punktweise nacheinander abgerastert. Dieser optische Schnitt wurde so gewählt, dass er ein möglichst großes Volumen der Zelle repräsentiert, auf dem der Nukleus mit angeschnitten ist und wobei die Zelle flach am Boden der Kammer aufliegt (siehe Abbildung 8). Durch die Messung über den von uns festgelegten Zeitraum erhält man eine realitätsgetreue Abbildung der Entwicklung zytosolischer bzw. mitochondrialer ROS, die sich auf die gesamte Zelle übertragen lässt.

Die Einstellungen am Konfokalmikroskop wurden wie folgt festgelegt, um eine angemessen beurteilbare Fluoreszenzintensität zu erreichen:

	CellRox Orange	CellRox Green	Mitotracker Red
Transmission	1.5	4.5	3.5
Pinhole	79.4, entspricht 2.24 AU	54.9, entspricht 1.68 AU	54.9
Gain Master	500	645	510

Tabelle 8: Einstellungen am Konfokalmikroskop
AU = airy units

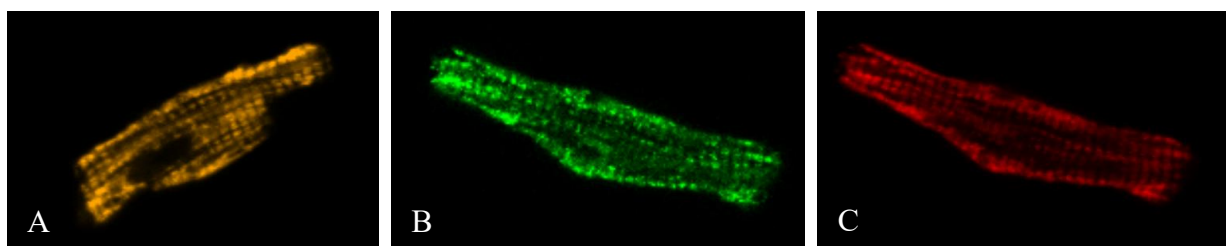


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung kardialer Myozyten unter dem Konfokalmikroskop

A Myozyt, inkubiert mit CellROX Orange, B Myozyt, inkubiert mit CellRox Green, C Myozyt, inkubiert mit Mitotracker Red

Aufgrund der unterschiedlichen Qualitäten der Isolationen konnte teilweise mit bis zu vier Kammern pro Patient und Gruppe gemessen werden. Mindestens wurde jedoch eine Zelle pro Patient und Gruppe gemessen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen gewährleisten zu können, wurden die Interventions- und Kontrollgruppen stets abwechselnd und nacheinander gemessen. Die Zeit zwischen Installation der Messkammer und dem Start der Messung überschritt nie fünfzehn Minuten. Ferner wurde nur eine Zelle pro Kammer gemessen, sodass die Zellen dem Medikament nicht mehr als 45 Minuten (CellRox Orange) bzw. 55 Minuten (CellRox Green) ausgesetzt waren.

2.7 Statistik und Datenauswertung

Die Originalaufnahmen der Konfokalmikroskopie wurden in das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ importiert und die graphischen Intensitätsschwankungen der einzelnen Pixel in absolute Zahlen übersetzt. Es wurde eine 32-Bit Farbtiefe gewählt und ein Mean Threshold mit der Methode „Default“ definiert, sodass ein binäres Bild der gesamten Zelle erstellt wurde. Pixel mit Intensitäten oberhalb einer bestimmten Schwelle wurden demnach als positive Pixel ins binäre Bild übersetzt. Pixel mit Intensitäten unterhalb dieser Schwelle wurden ausgeschlossen,

sodass der Hintergrund nicht in die Messung mit einbezogen wurde. Mit der Funktion Multi Measure wurden die Menge der Pixel aus jedem Bild in absolute Zahlen übersetzt. Somit erhielt man eine Zahlenfolge von zwanzig Werten, welche dem Intensitätsverlauf der Fluoreszenz der Zelle innerhalb der gemessenen zehn Minuten entsprach.

Die weitere statistische Verarbeitung wurde durch GraphPad Prism 6 ermöglicht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die absoluten Fluoreszenzintensitäten jeder einzelnen Zelle auf den jeweiligen Ausgangswert normalisiert (F/F_0) und als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Anschließend wurde die Steigung (slope) der Fluoreszenzintensitäten über den Zeitraum von zehn Minuten mittels linearer Regression ermittelt.

Von insgesamt 23 Patientinnen und Patienten wurden insgesamt 83 atriale Kardiomyozyten analysiert; 42 Zellen wurden mit CellROX Orange ($n = 11$ Patienten), 41 mit CellROX Green ($n = 12$ Patienten) inkubiert. Wurden mehrere Zellen pro Patient und pro Interventions- bzw. Kontrollgruppe gemessen, wurde die Steigung als Mittelwert angegeben.

Für die weitere Analyse zwischen den Patientengruppen wurde die Einwege-Varianzanalyse (Oneway ANOVA) mit dem Holm-Sidak-Post-Hoc-Test angewendet. Zuvor wurde die Normalverteilung der Variablen mit dem Shapiro-Wilk-Test bestätigt.

Die Patientendaten wurden mit SPSS als deskriptive Statistik ausgewertet. Kategorische Variablen wurden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert, für kontinuierliche Daten wurden der t-test sowie der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Kontrolle möglicher Störfaktoren wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Ziel war es, den potenziellen Einfluss klinisch relevanter Störvariablen auf die ROS-Produktion zu prüfen und deren Verzerrungseffekte auszuschließen. Mit einbezogen wurden das Vorliegen einer HFpEF, Diabetes mellitus Typ II, arterielle Hypertonie, Alter, Body-Mass-Index (BMI), eine positive Raucheranamnese, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowie der CRP-Wert.

Bei allen Tests wurde eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen.

2.8 Auswahl des Patientenkollektivs

In die Studie wurden insgesamt 23 Patientinnen und Patienten (fünf weiblichen, achtzehn männlichen Geschlechts) eingeschlossen, die sich einer elektiven Operation in der Herz-Thorax-Chirurgie am Universitätsklinikum Regensburg unterzogen und schriftlich in die Teilnahme einwilligten. Die Studie wurde unter Einhaltung der Deklaration von Helsinki sowie

den ethischen Richtlinien der entsprechenden Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt.

Für alle Patienten wurden basale Daten wie z.B. Laborparameter, Medikation, Vorerkrankungen oder Parameter aus der präoperativen Echokardiographie zusammengetragen, um sie analog der Einteilung in der EMPEROR-Preserved-Studie zu gliedern. Da sich diese Arbeit, wie auch die Arbeit von Anker et. al, mit dem Effekt von Empagliflozin auf die Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion beschäftigt, wurde die Einteilung anhand dieses Studiendesigns und nicht anhand der ESC-Guidelines gewählt. Der Cut-off-Wert des NT-proBNP wurde hier höher mit 300mg/dl statt mit 125mg/dl definiert. Die Echoparameter wie ein erhöhtes linksatriales Volumen als auch die erhöhte linksventrikuläre Muskelmasse waren hier identisch mit den ESC-Guidelines. Entsprechend dieser Parameter wurden die Patienten in die jeweilige Gruppe ihrer Herzinsuffizienz eingeteilt, davon fünfzehn in der HFpEF-Gruppe und acht in der non-failing Gruppe.

	Ejektionsfraktion (EF)	NT-pro BNP [pg/ml]	Strukturelle/funktionelle Veränderungen
Non-Failing (NF)	>50 %	<300	
HFpEF	>40 %	>300	LVH, LAE, diastolische Dysfunktion
HFrEF	<40 %		

Tabelle 9: Einteilung der Patienten nach dem EMPEROR-Preserved Studiendesign (Anker et. al, New England Journal of Medicine, 2021) ⁽⁸⁹⁾

NF = keine Herzinsuffizienz, HFpEF = Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion; HFrEF = Herzinsuffizienz mit reduzierter Pumpfunktion; LVH= linksventrikuläre Hypertrophie; LAE = linksatriale Vergrößerung

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten der teilnehmenden Patienten

	HFpEF (n=15)	NF (n=8)	p-Wert
Alter [Jahre], Mittelwert $\pm$ SD	69 $\pm$ 10 (n=15)	65 $\pm$ 8,6 (n=8)	0,153 ^t
männliches Geschlecht, n (%)	13 (86,7%) (n=15)	5 (62,5%) (n=8)	0,181 ^{Chi}
BMI [kg/m ²], Mittelwert $\pm$ SD	27,3 $\pm$ 5,1 (n=15)	29,4 $\pm$ 7,8 (n=8)	0,728 ^{MW}
Arterieller Hypertonus, n (%)	14 (93,3%) (n=15)	6 (75%) (n=8)	0,214 ^{Chi}
Diabetes mellitus, n (%)	3 (20%) (n=15)	1 (12,5%) (n=8)	0,651 ^{Chi}
HbA1c [%], Mittelwert	5,86 (n=15)	6,19 (n=8)	0,278 ^t
Positive Raucheranamnese, n (%)	5 (33,3%) (n=15)	4 (50%) (n=8)	0,435 ^{Chi}
Hypercholesterinämie, n (%)	4 (26,7%) (n=15)	3 (37,5%) (n=8)	0,591 ^{Chi}
Hyperlipidämie, n (%)	3 (20%) (n=15)	1 (12,5%) (n=8)	0,651 ^{Chi}
Vorhofflimmern, n (%)	7 (46,7%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,021^{Chi*}
paroxysmal, n (%)	6 (40%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,037^{Chi*}
persistierend, n (%)	0 (0%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	
permanent, n (%)	1 (6,7%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,455 ^{Chi}
NYHA-Klassifikation			
Klasse I, n (%)	5 (33,3%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,065 ^{Chi}
Klasse II, n (%)	8 (53,3%) (n=15)	3 (37,5%) (n=8)	0,469 ^{Chi}
Klasse III, n (%)	1 (6,7%) (n=15)	1 (12,5%) (n=8)	0,636 ^{Chi}
Klasse IV, n (%)	1 (6,7%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,455 ^{Chi}
GFR [mL/min], Mittelwert $\pm$ SD	63,8 $\pm$ 21,6 (n=15)	83,1 $\pm$ 11,1 (n=8)	0,014^{t*}
Kreatinin [mg/dl], Mittelwert $\pm$ SD	1,31 $\pm$ 0,63 (n=15)	0,87 $\pm$ 0,16 (n=8)	0,008^{MW*}
NT-proBNP [pg/ml], Mittelwert $\pm$ SD	1030 $\pm$ 1174 (n=15)	246 $\pm$ 259,6 (n=8)	0,023^{MW*}
LVEF [%], Mittelwert $\pm$ SD	55 $\pm$ 8 (n=15)	64 $\pm$ 10 (n=8)	0,040^{MW*}
Linksatriale Dilatation, n (%)	7 (46,7%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,015^{Chi*}
Linksventrikuläre konzentrische Hypertrophie, n (%)	12 (80%) (n=15)	5 (62,5%) (n=8)	0,211 ^{Chi}
Diastolische Dysfunktion, n (%)	7 (46,7%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,015^{Chi*}
Operation			

Aortenklappenersatz, n (%)	7 (46,7%) (n=15)	3 (37,5%) (n=8)	0,673 ^{Chi}
Aortokoronarer Bypass, n (%)	9 (60%) (n=15)	7 (87,5%) (n=8)	0,172 ^{Chi}
Mitralklappenersatz, n (%)	2 (13,3%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,28 ^{Chi}
Aorta ascendens Plastik, n (%)	2 (13,3%) (n=15)	0 (0%) (n=8)	0,28 ^{Chi}

Tabelle 10: Klinische Parameter der teilnehmenden Patienten

HFpEF = Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion, NF = keine Herzinsuffizienz

Es werden die absoluten Zahlen der Patienten in dieser Gruppe angegeben, auf die das Merkmal zutrifft, zusammen mit der jeweiligen Prozentzahl; ansonsten wie angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung

BMI = body mass index, GFR = glomeruläre Filtrationsrate, LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, t = t-Test, Chi = Chi-Quadrat-Test, MW = Mann-Whitney-U-Test, p-Werte stets als zweiseitige Signifikanz angegeben

* = $p < 0,05$

Bezüglich des Geschlechts und des Alters konnte in der HFpEF-Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Fast die gesamte HFpEF-Gruppe hatte einen bereits zuvor diagnostizierten arteriellen Hypertonus (14/15 Patienten (93,3%)), jedoch war das Vorkommen dieser und anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Raucherstatus und Diabetes mellitus in den beiden Gruppen nicht statistisch signifikant. Ein maßgeblicher Unterschied zeigte sich hingegen beim Vorhofflimmern: Während in der NF-Gruppe kein Patient an Vorhofflimmern erkrankt war, waren dies in der HFpEF-Gruppe 46,7% der Patienten ($p = 0,021$), wobei bei sechs Patienten (40%) ($p = 0,037$) paroxysmales Vorhofflimmern und bei einem Patienten permanentes Vorhofflimmern beschrieben war (6,7%, $p = 0,455$).

Wie zu erwarten, präsentierten sich Patienten mit HFpEF mit einem signifikant höheren Level von NT-proBNP (1030 ± 1174 pg/ml vs. $246 \pm 259,6$ pg/ml, $p = 0,023$). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion war in der HFpEF-Gruppe im Vergleich zur NF-Gruppe signifikant reduziert, jedoch im Mittel im Normbereich ($55 \pm 8\%$ vs. $64 \pm 10\%$, $p = 0,040$).

Entsprechend dazu waren in der HFpEF-Gruppe bei signifikant mehr Patienten die echokardiographischen Parameter diastolische Dysfunktion (46,7% vs. 0%, $p = 0,015$) sowie linksatriale Dilatation (46,7% vs. 0%, $p = 0,015$) zu verzeichnen. Das Vorhandensein einer linksventrikulären konzentrischen Hypertrophie unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,211$).

Auffällig ist zudem die im Vergleich zur NF-Gruppe deutlich reduzierte Nierenfunktion der Patienten mit HFpEF, die sich in Form einer erniedrigten GFR ($63,8 \pm 21,6$ ml/min vs. $83,1 \pm 11,1$ ml/min, $p = 0,014$) sowie einem erhöhten Kreatinin ($1,31 \pm 0,63$ mg/dl vs. $0,87 \pm 0,16$ mg/dl, $p = 0,023$) zeigt. Gleichzeitig ist die Prävalenz des Diabetes mellitus in dem erkrankten Kollektiv

jedoch nicht signifikant höher als in der nicht erkrankten Gruppe (3/15 vs. 1/8 Patienten, $p=0,651$).

3.2 Auswertung der zellulären Messdaten

Im Folgenden sind exemplarisch Originalregistrierungen des Konfokalmikroskops von sechs Kardiomyozyten dargestellt. Darunter werden gemittelt die normierten Steigungen der einzelnen Myozyten präsentiert, ohne dass die Steigungen pro Patient gemittelt wurden. Zur weiteren Analyse wurde eine lineare Regression der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von zehn Minuten durchgeführt.

Vergleicht man die zytosolische ROS-Produktion nur in der Kontrollgruppe bei mit CellROX Orange inkubierten Kardiomyozyten untereinander, geht bereits hieraus hervor, dass die ROS-Produktion bei Patienten mit HFpEF signifikant höher ist als bei Patienten ohne Herzinsuffizienz (siehe Abbildung 9).

Nach Inkubation mit Empagliflozin wurde eine signifikante Reduktion der ROS-Produktion beobachtet, jedoch nur in der HFpEF-Gruppe. Dieser Effekt war in den gepoolten Daten beider Fluoreszenzfarbstoffe, also kombiniert zytosolisch sowie nukleär und mitochondrial, nachweisbar und trat bei Patientinnen und Patienten ohne Herzinsuffizienz nicht auf (siehe Abbildung 10).

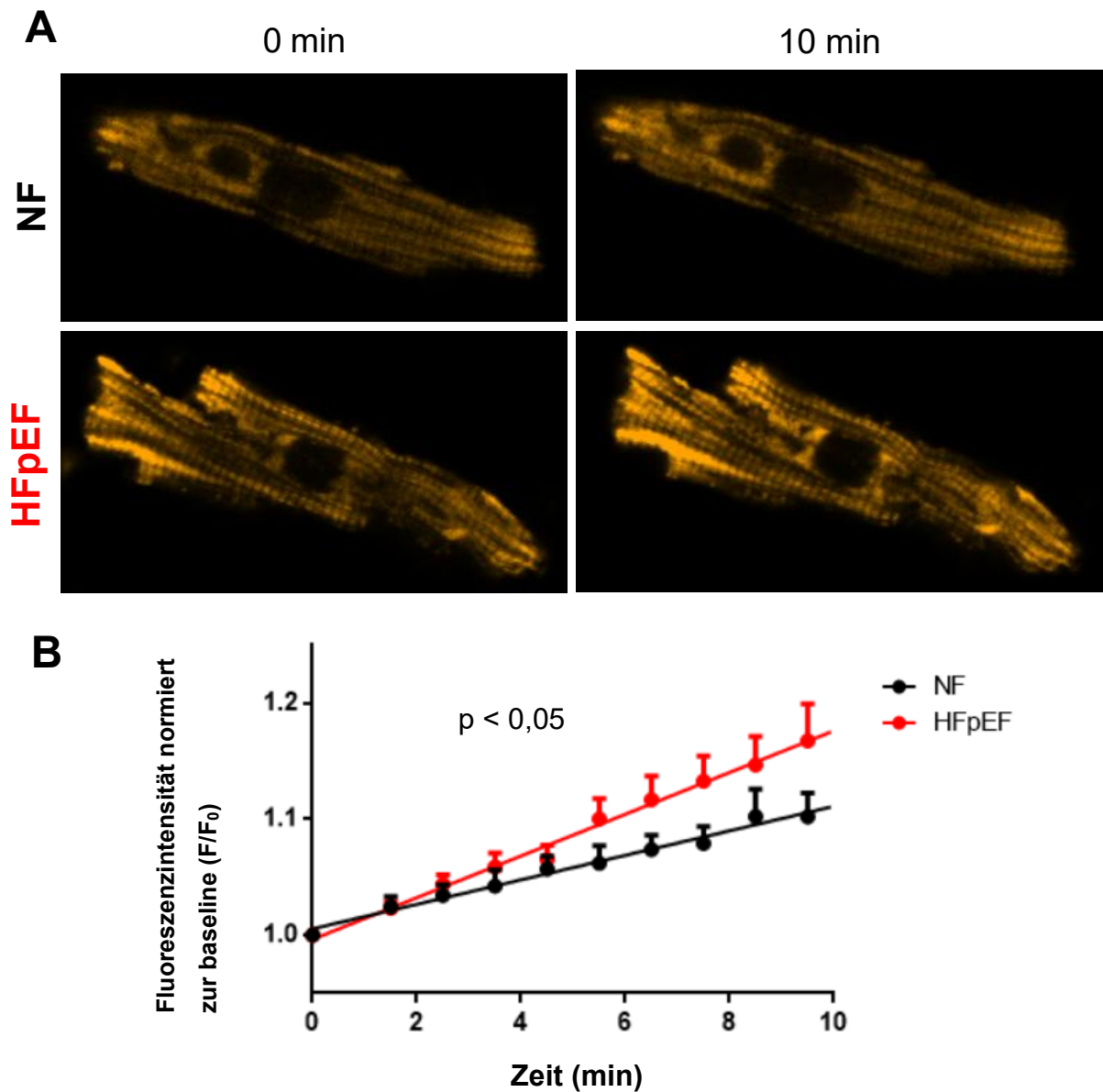


Abbildung 9: Die zytosolische ROS-Produktion ist in Kardiomyozyten von HFpEF Patienten signifikant erhöht.

A: Darstellung der Originalregistrierungen der Kardiomyozyten von Patienten ohne Herzinsuffizienz (NF) und mit HFpEF, inkubiert mit CellROX Orange. **B:** Lineare Regression der zytosolischen ROS-Produktion über zehn Minuten ($n = 9$ (NF) vs. $n = 12$ (HFpEF)). N gibt die Anzahl der gemessenen Kardiomyozyten an. Darstellung als Mittelwerte $\pm$ SEM; p-Wert nach ANCOVA

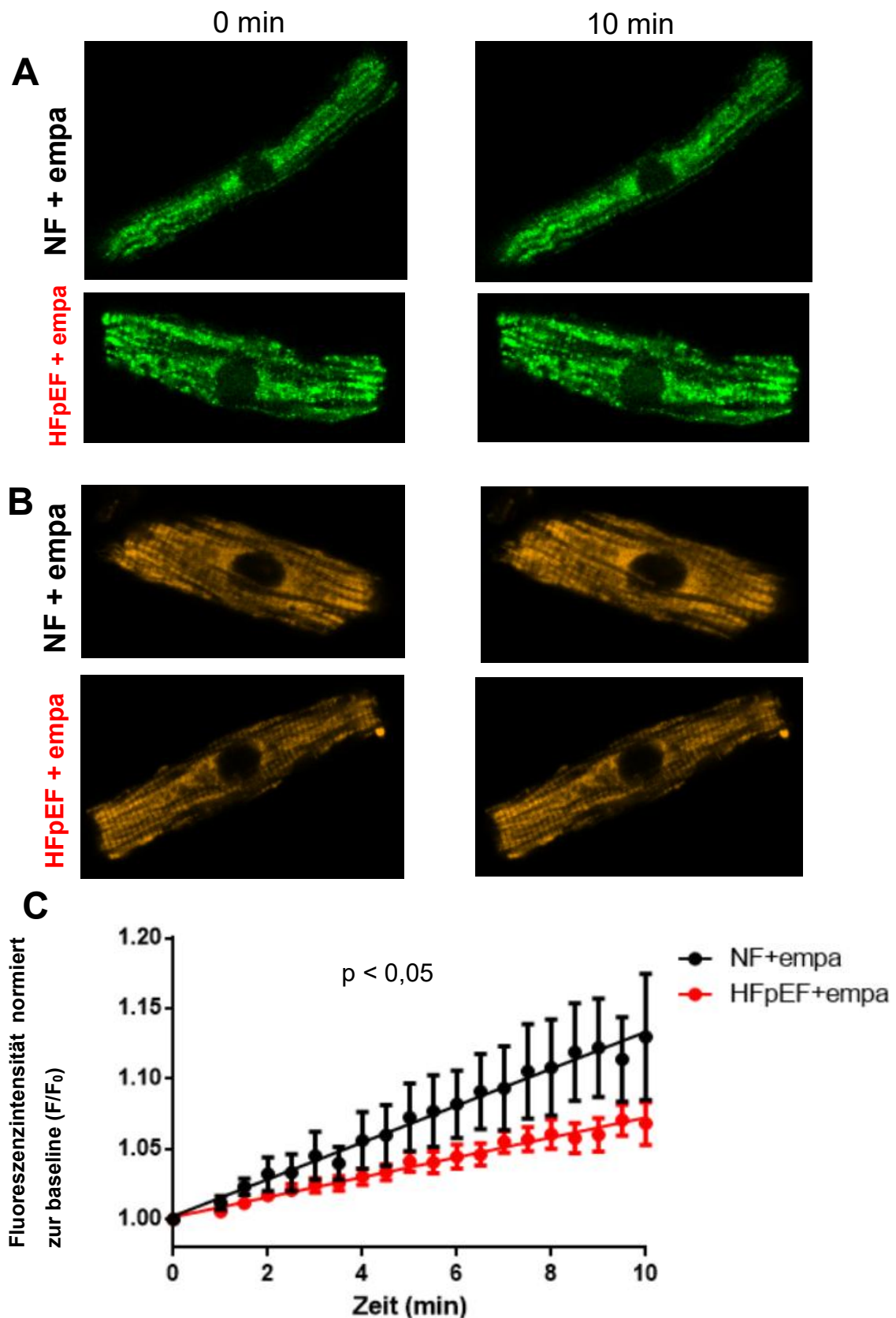


Abbildung 10: Die zytosolische und mitochondriale ROS-Produktion in Kardiomyozyten von Patienten mit HFpEF wird durch Empagliflozin reduziert.

Darstellung der Originalregistrierungen der Kardiomyozyten von Patienten ohne Herzinsuffizienz (NF) und mit HFpEF, inkubiert mit CellROX Green und Empagliflozin (**A**) sowie mit CellROX Orange und Empagliflozin (**B**)

C: Lineare Regression der ROS-Produktion über zehn Minuten nach Inkubation mit Empagliflozin ($n=14$ (NF) vs. $n=26$ (HFpEF)); N gibt die Anzahl der gemessenen Kardiomyozyten an, Darstellung als Mittelwerte $\pm$ SEM; p -Wert nach ANCOVA

Im Anschluss wurden die Steigungen der einzelnen Kardiomyozyten patientenweise gemittelt. Basierend auf der Einteilung gemäß dem Studiendesign der EMPEROR-Preserved-Studie ergaben sich daraus n = 8 Patienten in der NF-Gruppe (keine Herzinsuffizienz) und n = 15 Patienten in der HFpEF-Gruppe.

Betrachtet man zunächst nur die Kontrollgruppen, ist hieran grundlegend auszumachen, dass bei Patienten mit HFpEF mit einer durchschnittlichen Steigung von $3 \pm 0,23 \Delta F/s$ im Vergleich zu Patienten ohne Herzinsuffizienz mit einer Steigung von $1,7 \pm 0,29 \Delta F/s$ signifikant (p-Wert 0,0019, ANOVA, Holm-Sidak-Test) mehr ROS produziert werden (siehe Abbildung 11). Dies gilt zunächst für die gepoolten Daten der beiden Farbstoffe CellRox Orange und CellRox Green.

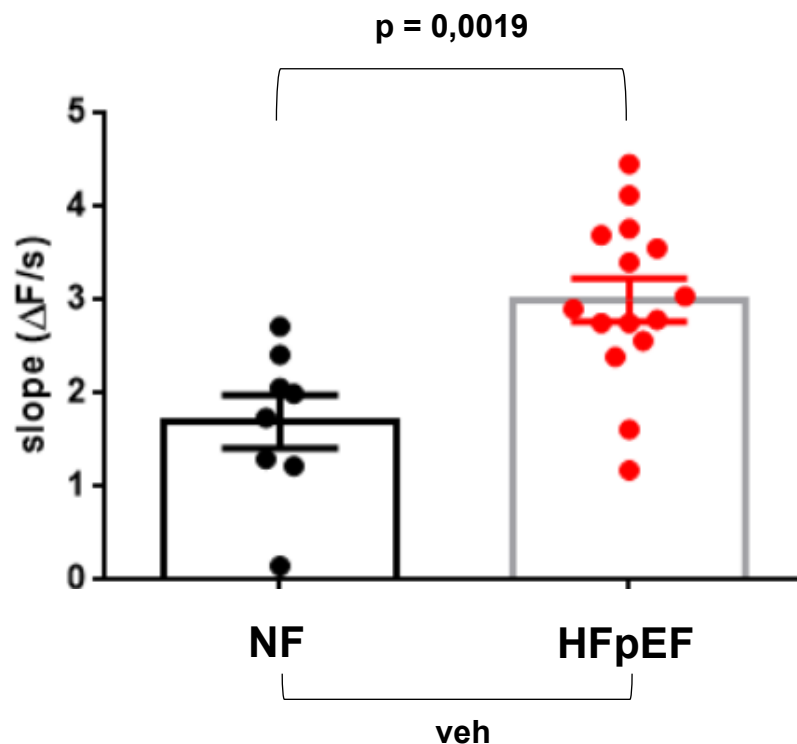


Abbildung 11: Auswertung der Steigungen der Kontrollgruppen von NF und HFpEF nach EMPEROR-Preserved, gepoolt aus CellROX Orange und CellROX Green; dargestellt als Streudiagramm mit Mittelwerten $\pm$ SEM

NF= keine Herzinsuffizienz, HFpEF = Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion, veh = Kontrollgruppe

p-Wert nach Einwege-ANOVA mit Holm-Sidak-Test

Bei den Patienten mit HFpEF wird nach Inkubation der Myozyten mit Empagliflozin die Steigung der Fluoreszenzintensität als Korrelat für die zelluläre ROS-Produktion signifikant von $3 \pm 0,23 \Delta F/s$ auf $1,6 \pm 0,14 \Delta F/s$ ($p = 0,0001$, Einwege-ANOVA mit Holm-Sidak-Test) gesenkt (siehe Abbildung 12).

Vergleicht man dazu die Gruppe der Patienten ohne Herzinsuffizienz, lässt sich durch Inkubation mit Empa dieser Zusammenhang jedoch statistisch nicht nachweisen, der p-Wert beträgt zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe hier $p = 0,96$.

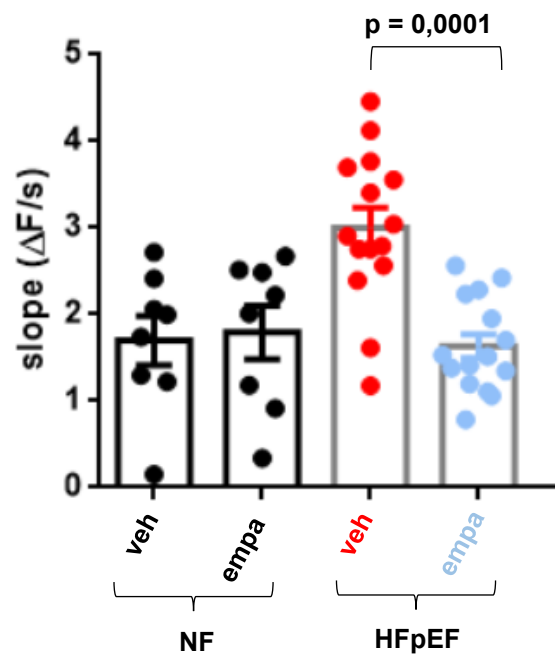


Abbildung 12: Auswertung der Steigungen innerhalb der Gruppen nach EMPEROR-Preserved, gepoolt aus CellROX Orange und CellROX Green; dargestellt als Streudiagramm mit Mittelwerten $\pm$ SEM

NF= keine Herzinsuffizienz, HFpEF= Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion, veh= Kontrollgruppe, empa= Interventionsgruppe
p-Wert nach Einwege-ANOVA mit Holm-Sidak-Test

Betrachtet man die beiden Farbstoffe getrennt voneinander, so zeigt sich bei beiden Farbstoffen jeweils ebenfalls ein statistisch signifikantes Ergebnis.

Mit CellROX Orange konnten in der NF-Gruppe n=4 Patienten und in der HFpEF-Gruppe n=7 Patienten getestet werden. Mit CellROX Green analog hierzu n=4 in der NF-Gruppe und n=8 in der HFpEF-Gruppe.

Analog zur gepoolten Aufteilung ist zu erkennen, dass bei CellROX Orange in der Interventionsgruppe von Patienten mit HFpEF mit einem p-Wert von $p=0,0007$ (ANOVA, Holm-Sidak-Test) die durchschnittliche Steigung von $3,45 \pm 0,28 \Delta F/s$ auf $1,9 \pm 0,18 \Delta F/s$ signifikant gesenkt werden kann (siehe Abbildung 13).

Eine vergleichbare Wirkung ist auch bei dem Farbstoff CellROX Green zu sehen. Dort wird die Steigung in der Interventionsgruppe von $2,61 \pm 0,3 \Delta F/s$ auf $1,38 \pm 0,4 \Delta F/s$ reduziert und ist damit ebenfalls statistisch signifikant ($p=0,009$) (siehe Abbildung 14).

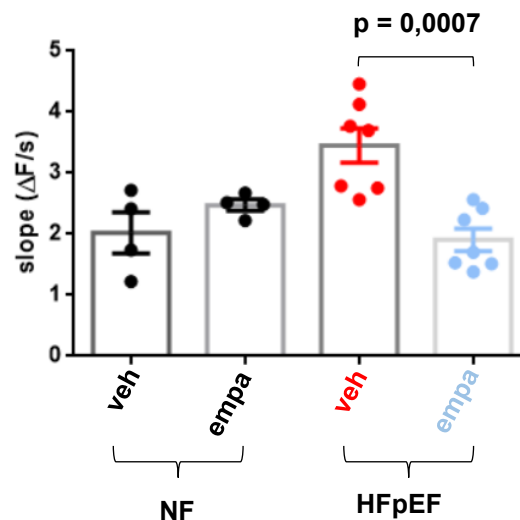


Abbildung 13: Auswertung der Steigungen pro Patient innerhalb der Gruppen nach EMPEROR-Preserved, CellROX Orange, dargestellt als Streudiagramm mit Mittelwerten $\pm$ SEM

NF= keine Herzinsuffizienz, HFpEF= Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion, veh= Kontrollgruppe, empa= Interventionsgruppe

p-Wert nach Einwege-ANOVA mit Holm-Sidak-Test

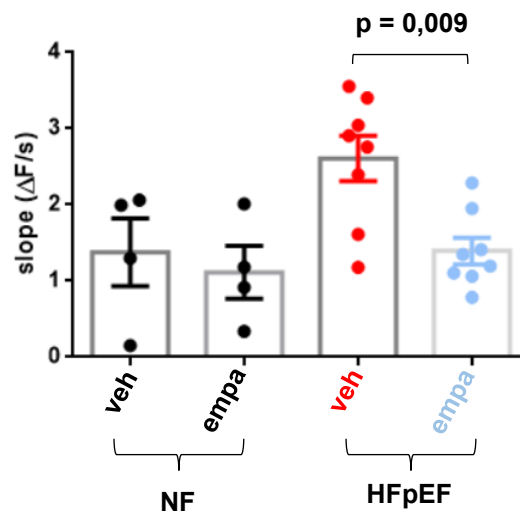


Abbildung 14: Auswertung der Steigungen pro Patient innerhalb der Gruppen nach EMPEROR-Preserved, CellROX Green, dargestellt als Streudiagramm mit Mittelwerten $\pm$ SEM

NF= keine Herzinsuffizienz, HFpEF= Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion, veh= Kontrollgruppe, empa= Interventionsgruppe

p-Wert nach Einwege-ANOVA mit Holm-Sidak-Test

Um zusätzlich den Einfluss des Vorliegens einer HFpEF isoliert auf die ROS-Produktion in der Kontrollgruppe zu betrachten, wurde eine multiple lineare Regression durchgeführt (siehe Tabelle 11). Hierbei diente die Steigung der Kontrollgruppe als abhängige Variable und klinische Parameter (z.B. Diabetes mellitus, BMI), welche isoliert ebenfalls einen Einfluss auf die ROS-Produktion haben können, wurden als unabhängige Variablen definiert.

Hieraus geht vor allem hervor, dass in dem vorliegenden Patientenkollektiv gesondert die Erkrankung HFpEF zu einer signifikant erhöhten ROS-Produktion führt ($p=0,015$ bei einem korrigierten R^2 von 0,338) und ist somit ein unabhängiger Prädiktor für die ROS-Produktion in Kardiomyozyten von HFpEF-Patienten. Parameter wie das Alter, der BMI oder ein arterieller Hypertonus korrelieren positiv, jedoch nicht signifikant mit der myokardialen ROS-Beladung. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus zeigt im Trend eine Korrelation mit erhöhten ROS-Levels in den Myozyten der Patienten ($p=0,065$).

Haben die Patienten eine Raucheranamnese, so korreliert diese negativ, jedoch nicht signifikant mit der Steigung der ROS-Produktion in der Kontrollgruppe.

	Regressionskoeffizient B	Standard-Fehler	Standardisierte Koeffizienten	Signifikanz (p-Wert)
HFpEF	1,042	0,386	0,477	0,015*
Alter	0,023	0,024	0,197	0,339
BMI	0,014	0,035	0,074	0,689
Raucheranamnese	-0,752	0,475	-0,341	0,131
eGFR	0,003	0,009	0,05	0,783
CRP	0,037	0,106	0,06	0,728
Diabetes mellitus	0,887	0,451	0,358	0,065
Arterielle Hypertension	0,278	0,615	0,081	0,657

Tabelle 11: Multiple lineare Regression

Abhängige Variable: Steigung der Kontrollgruppe (veh)

Einflussvariablen: HFpEF, Alter, BMI, Raucheranamnese, eGFR, CRP, Diabetes mellitus Typ II, arterielle Hypertension

BMI= body mass index, eGFR= glomeruläre Filtrationsrate, CRP= C-reaktives Protein

Diese Regressionsanalyse wurde mit dem Programm SPSS durchgeführt

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmals am humanen Myokard demonstriert werden, dass eine kurzzeitige in-vitro-Exposition von Kardiomyozyten aus HFpEF-Patientinnen und -Patienten mit Empagliflozin zu einer signifikanten Abnahme der zellulären ROS-Beladung führt. Darüber hinaus konnte erneut bestätigt werden, dass erhöhte kardiale ROS-Level ein zentrales Merkmal der Herzinsuffizienz darstellen. In diesem Versuch zeigten sich die gesteigerten ROS-Konzentrationen im Zytosol wie auch in den Mitochondrien.

4.1 Erhöhter oxidativer Stress in HFpEF Myozyten

Wie bereits in 1.5.4 dargelegt, herrscht bei Patienten mit HFpEF ein Zustand leichter chronischer systemischer Inflammation. Klassische Komorbiditäten, die primär mit HFpEF assoziiert sind – wie die chronische Nierenkrankheit, Diabetes mellitus Typ II oder das metabolische Syndrom (insbesondere arterielle Hypertonie und Hypercholesterinämie) – gehen mit einer vermehrten Ausschüttung inflammatorischer Zytokine einher. Diese korrelieren nachweislich mit erhöhten Konzentrationen freier Radikale im Myokard sowie mit

gesteigertem oxidativem Stress ⁽¹⁰³⁾. Ein erhöhter Blutdruck, ein erhöhter Blutzucker und Volumenüberladung stimulieren fortwährend die Expression von Entzündungsmarkern wie Interleukin-1 und -6 sowie TNF- α , welche wiederum mit HFpEF-Phänotypen assoziiert sind ⁽⁷⁷⁾. In Einklang damit wurden in dieser Arbeit im Vergleich zu gesundem Myokard gesteigerte ROS-Level direkt zellulär in Myozyten von HFpEF-Patienten nachgewiesen, welche durch eine kurzfristige Behandlung mit Empagliflozin bereits signifikant reduziert werden konnten. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Vorerkrankung mit HFpEF allein, unabhängig von weiteren Komorbiditäten wie dem metabolischen Syndrom oder Diabetes mellitus II ein Prädiktor für eine erhöhte myokardiale ROS-Beladung darstellt.

4.2 Potenzielle Zusammenhänge, über die eine verminderte ROS-Produktion die kardiale Funktion verbessert

Unbestrittenermaßen verbessert die Behandlung mit Empagliflozin bei Patienten mit Herzinsuffizienz die kardiale Funktion, die Morbidität sowie die Mortalität und dies unabhängig vom Subtyp der Herzinsuffizienz und von der Komorbidität mit Diabetes mellitus Typ II.

In 1.6.1 wurde bereits auf aktuelle Studien und Theorien eingegangen, die diskutieren, welche Mechanismen durch Empagliflozin auf systemischer sowie auf molekularer Ebene verändert werden, um so das beachtliche kardiale Benefit erklären zu können.

Nach anfänglich zahlreichen in vivo – Studien kam zunehmende Evidenz dafür auf, dass direkte zelluläre Mechanismen für das kardiale Benefit verantwortlich sein können. Um die systemischen Nebeneffekte ausblenden zu können, wurde das vorliegende Experiment daher in vitro und mit humanem Myokard durchgeführt.

Hier sollen nun Ansätze diskutiert werden, über welche Mechanismen die verbesserte kardiale Funktion durch die reduzierte myokardiale ROS-Beladung erklärt werden kann.

4.2.1 Diastolische Funktion

4.2.1.1 Gesteigerte Lusitropie

Eine gute diastolische Funktion ist bei Patienten mit HFpEF als auch bei herzgesunden Patienten nachweislich mit einer geringeren Hospitalisierungsrate assoziiert, sie gilt als guter prognostischer Parameter und bestimmt zu einem wesentlichen Grad die Gesamtmortalität ⁽¹⁰⁴⁾. Eine zentrale These der direkten kardialen protektiven Mechanismen von Empagliflozin stellt daher die Verbesserung der diastolischen Funktion bzw. die Verbesserung einer bereits bestehenden diastolischen Dysfunktion dar.

Früh wurde bereits von Hammoudi et al. gezeigt, dass nach sechs Wochen der Behandlung mit Empa an diabetischen Mäusen eine verbesserte diastolische Funktion, vor allem eine beschleunigte diastolische Relaxationsgeschwindigkeit, gemessen werden konnte ⁽¹⁰⁵⁾. Kongruent dazu zeigten Verma et al. in einer kleinen prospektiven Studie, dass bei Patienten mit Diabetes und kardiovaskulärer Erkrankung nach dreimonatiger Behandlung mit Empa echokardiographisch eine signifikante Reduktion der linksventrikulären Muskelmasse und eine erhöhte Spitzengeschwindigkeit am lateralen Mitralanulus in der frühen diastolischen Phase (e') als Ausdruck einer verbesserten diastolischen Funktion nachgewiesen werden konnten ⁽⁴⁾. Dabei wurden ebenfalls systemische Parameter wie der HbA1c und der Blutglukosewert signifikant gesenkt, der Blutdruck und das Körpergewicht blieben jedoch unverändert ⁽⁴⁾.

Ähnliche Effekte konnten in einer experimentellen Studie an isolierten Ventrikeltrabekeln von Patienten mit HFrEF und HFpEF dargestellt werden. Pabel et al. zeigten, dass Empa bereits nach kurzem wash-in signifikant die diastolische Spannung in den Trabekeln senkt, welche typischerweise bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht ist ⁽³⁾. Die systolische Funktion blieb dabei unverändert. Besonders hervorzuheben hierbei ist zusätzlich, dass diese Reduktion unabhängig vom Vorbestehen eines Diabetes gezeigt werden konnte. Diese Erkenntnisse sprechen stark gegen einen systemischen Mechanismus, der dieser verbesserten diastolischen Funktion zugrunde liegen könnte, sondern eher für eine direkte kardiale Wirkung von Empagliflozin.

Die gesteigerte passive Steifigkeit der Sarkomere bei Herzinsuffizienz steht in engem Zusammenhang mit Veränderungen des elastischen Sarkomerproteins Titin. Oxidativer Stress kann über zwei zentrale Mechanismen zu einer erhöhten diastolischen Spannung beitragen: Einerseits beeinträchtigt er den NO-cGMP-PKG-Signalweg, was eine verminderte PKG-Aktivität und damit eine reduzierte Phosphorylierung von Titin zur Folge hat ⁽¹⁰⁶⁾. Andererseits kann oxidativer Stress zur Aktivierung von CaMKII durch oxidative Modifikation führen,

wodurch ebenfalls eine dysregulierte Titinphosphorylierung entsteht ⁽¹⁰⁷⁾. Beide Mechanismen führen insbesondere in den elastischen Segmenten von Titin zu einer Hypophosphorylierung, was die Dehnbarkeit des Sarkomers reduziert, und die passive diastolische Spannung erhöht. ⁽¹⁰⁸⁾ Dies stellt einen wesentlichen pathophysiologischen Beitrag zur Entwicklung der diastolischen Dysfunktion dar.

Selbiges kann ebenso über direkte posttranslationale Oxidation am Titin ausgelöst werden, indem eine ROS-vermittelte Disulfidbrückenbildung zusätzlich eine erhöhte Sarkomerspannung bewirkt ⁽¹⁰⁸⁾. Eine Senkung der myokardialen ROS-Beladung könnte demnach diese Prozesse rückgängig machen und einer Verschlechterung der diastolischen Dysfunktion, vor allem bei Patienten mit bereits etablierter HFpEF, entgegenwirken.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der reduzierten passiven diastolischen Steifigkeit und dem geminderten oxidativen Stress durch Empagliflozin wurde in einer anderen sehr umfangreichen Studie an linksventrikulärem Myokard von HFpEF-Patienten gezeigt: Dort wurde die diastolische Spannung ähnlich wie nach Verabreichung von Glutathion (GSH) durch Empa auf ein niedriges Level reduziert ⁽¹⁰²⁾. Deckungsgleich mit der vorliegenden Arbeit wurden auch dort erhöhte ROS in Form von H₂O₂ nachgewiesen, die durch Inkubation mit Empa reduziert werden konnten. Eine signifikante positive Korrelation zwischen dem H₂O₂-Level und der diastolischen Spannung legt also einen direkten Zusammenhang von oxidativem Stress und diastolischer Dysfunktion nahe. Diese Beobachtung lässt zusätzlich auf einen möglichen direkten antioxidativen Effekt von Empagliflozin im Myokard schließen. Interessanterweise konnte die oxidative Belastung in der Arbeit von Kolijn et al. ebenso wie in der vorliegenden hauptsächlich und signifikant zytosolisch nachgewiesen werden, mitochondrial jedoch nur marginal ⁽¹⁰²⁾.

4.2.1.2 Kardiale Fibrosierung

Neben molekularen intrazellulären Prozessen ist auch insbesondere die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix für die diastolische Funktion von Bedeutung, welche die Relaxierungsfähigkeit der Ventrikel bestimmt. Kang et al. konnten belegen, dass nach 72-stündiger Inkubation humaner atrialer Myofibroblasten mit Empagliflozin eine reduzierte Myofibroblasten-Aktivität und ein vermindertes kollagenes Remodelling zu beobachten war ⁽⁹³⁾. Auf molekularer Ebene konnte zudem eine signifikante Suppression profibrotischer Marker nachgewiesen werden. Auch hier kann durch die Auslegung als in vitro – Experiment davon ausgegangen werden, dass systemische Wirkungen als Ursache eher zurückgestellt und wieder

direkte kardiale Effekte angenommen werden können. Auch an einem Schweinemodell mit HFrEF konnte nach Behandlung mit Empagliflozin über zwei Monate echokardiographisch in vivo sowie histologisch und molekular eine reduzierte myokardiale Fibrosierung gezeigt werden ⁽¹⁰⁹⁾.

Wie bereits in 1.4.1 erwähnt, stimulieren ROS profibrotische Signalwege und beeinträchtigen durch eine zunehmende kardiale Fibrose letztendlich vor allem das diastolische Füllungsvermögen. Eine mögliche Ursache für die reduzierte kardiale Fibrosierung kann man somit auch in der reduzierten ROS-Produktion durch Empa sehen, wobei kausale Zusammenhänge hierbei noch empirisch belegt werden müssen. Zudem scheint dieser Effekt eher auf einer langfristigen und systemischen Wirkkomponente zu beruhen, welche jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Eine unmittelbare Reduktion kardialer Fibrosierung ist als direkter protektiver Effekt daher nicht vorrangig anzunehmen. Es erscheint jedoch plausibel, dass eine anhaltend verringerte Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies im Verlauf langfristig fibrotische Umbauprozesse im Myokard abschwächen kann.

4.2.1.3 Linksventrikuläre kardiale Hypertrophie

Ein weiteres Kennzeichen insuffizienter Herzen ist die linksventrikuläre konzentrische Hypertrophie. Zu einem nicht unbedeutenden Teil wird kardiale Hypertrophie via intrazellulärer Signalwege (siehe 1.4.1) letztlich ROS-vermittelt induziert, wobei besonders Nox-2 und die Superoxiddismutase eine entscheidende Rolle spielen. Besonders in der Pathophysiologie von HFpEF herrscht seit Langem Konsens in der Fachliteratur über den klaren Zusammenhang zwischen chronischer systemischer Inflammation, erhöhter ROS-Level und folglich kardialer Hypertrophie ⁽⁷⁷⁾.

In einer prospektiven Kohortenstudie reduzierte Empa nach sechs Monaten signifikant die MRT-graphisch ermittelte linksventrikuläre Masse bezogen auf die Körperoberfläche (LVMI), welche am deutlichsten bei Patienten mit bereits erhöhtem Ausgangs-LVMI nachgewiesen werden konnte ⁽¹¹⁰⁾. Parallel konnte durch Oelze et al. an diabetischen Mausmodellen gezeigt werden, dass nach siebenwöchiger Empa-Gabe in aortalen Gefäßen sowie endothelial der oxidative Stress deutlich reduziert werden konnte. Zusätzlich wurden die Diabetes-induzierten erhöhten Expressionen von proinflammatorischen Proteinen (TNF- α , IL-1) sowie der NADPH-Oxidasen Nox-1, Nox-2 und der eNOS durch Empa normalisiert. ⁽¹¹¹⁾ In Zusammenschau dieser beiden Studien läge es nicht fern, zumindest eine partielle Verbindung zwischen dem reduzierten oxidativen Stress vaskulär und der reduzierten ventrikulären Hypertrophie zu sehen,

zumal intrazelluläre Signalwege Nox-2 induziert kausal zu kardialer Hypertrophie führen und in beiden Studien eine Komorbidität mit Diabetes bestand. Beschränkungen hierbei sind die unterschiedliche Spezies der untersuchten Probanden, die unterschiedliche Dauer der Applikation von Empa und der Fakt, dass in der Studie von Oelze et al. der Parameter der kardialen Hypertrophie außer Acht gelassen wurde. Dennoch lässt sich spekulieren, dass die reduzierte Nox-2- und eNOS-Expression nicht nur endothelial, sondern auch myokardial durch Empa hervorgerufen werden kann.

Zumindest eine der Theorien für die in der vorliegenden Arbeit gezeigte reduzierte ROS-Produktion könnte dies darstellen. Hierbei sei jedoch vor allem erwähnt, dass das Patientenkollektiv in dieser Arbeit sehr heterogen in Bezug auf eine Vorerkrankung mit Diabetes war im Vergleich zu den ausschließlich an Diabetes erkrankten Probanden in den zuvor erwähnten Studien.

Zusätzlich lassen sich diese langfristigen Regulatoren der diastolischen Steifigkeit nicht in einen zeitlichen Einklang mit der in dieser Arbeit gezeigten kurzfristigen Reduktion der ROS-Beladung bringen. Neben der verbesserten Herz-Geometrie muss es noch andere Mechanismen geben, welche die bereits nach kurzer Zeit nachzuweisende kardiale Protektion erklären können.

4.2.2 Endotheliale Funktion

In der in 4.2.1.1 angesprochenen Studie von Kolijn et al. konnte an humanem linksventrikulären Myokard von HFpEF-Patienten gezeigt werden, dass dort eine mikrovaskuläre Inflammation mit erhöhter ICAM-1-, VCAM-1-, TNF- α - und IL-6-Expression nachzuweisen ist, die durch kurzfristige Inkubation mit Empa signifikant reduziert wird ⁽¹⁰²⁾. Zudem resultierte hier eine gesteigerte eNOS-Modulation im Sinne einer signifikant reduzierten eNOS-Monomerisierung in einer minimierten NO-Bioverfügbarkeit, die durch Empa wiederhergestellt werden konnte ⁽¹⁰²⁾. Diese Resultate sprechen für eine verbesserte vaskuläre Dysfunktion, welche im Rahmen der HFpEF-Erkrankung gehäuft beobachtet wird und mit den oftmals bestehenden Komorbiditäten assoziiert ist. Bei erhöhter körperlicher Belastung, die myokardial ein gesteigertes Blut- sowie Sauerstoffangebot über die koronaren Gefäße fordert, kann somit durch Empa belastungsabhängig die Blutzufuhr besser angepasst werden und verhindert somit zellulären myokardialen Stress und reduziert den Leidensdruck der Patienten. Selbiges konnte in der tierexperimentellen Studie von Santos-Gallego et al. erwiesen werden: Auf dem Boden des reduzierten oxidativen Stress, hier vor allem nukleär, wird über eine erhöhte NO-

Verfügbarkeit eine verbesserte myofilamentäre Koordination erreicht ⁽¹⁰⁹⁾. Als ursächlichen Mechanismus der reduzierten ROS konnte diese Studie eine erhöhte Aktivität der Superoxiddismutase beweisen. Ob allein die erhöhte zelluläre antioxidative Kapazität als ausreichende Erklärung dafür hergenommen werden kann, oder ob überdies noch weitere Mechanismen dem geringeren oxidativen Stress zugrunde liegen, konnte nur in dieser Studie nicht weiter belegt werden.

Die vaskuläre Funktion hängt über den cGMP-PKG-Signalweg (siehe 4.2.1.1) eng mit der diastolischen Funktion zusammen: die erhöhte NO-Verfügbarkeit führt zu gesteigerten cGMP-Levels und reduziert die PKGI α -Polymerisierung, was wiederum in Hypophosphorylierung des Titins resultiert. Dies reduziert die passive myokardiale Spannung und vergrößert somit das diastolische Füllungsvermögen. Entsprechend konnten Santos-Gallago et al. neben den molekularen Mechanismen auch in vivo mittels bildgebenden Verfahren (Echokardiographie, kardiale MR) eine verbesserte diastolische Funktion nachweisen ⁽¹⁰⁹⁾. Dies suggeriert, dass die Mechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene auch zu einem Teil auf systemische Mechanismen übertragen werden könnten.

4.2.3 Myokardialer Ionenhaushalt

Neben der endothelialen Funktion nimmt auch der zelluläre Ionenhaushalt großen Einfluss auf die ventrikuläre Funktion, insbesondere auf die diastolische Relaxationsfähigkeit. Wie in Abschnitt 1.6.1 erläutert, kann Empagliflozin die im Rahmen der Herzinsuffizienz gestörte Ionenhomöostase partiell modulieren und zur teilweisen Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse beitragen. Es reduziert die zytosolische Calciumkonzentration, regeneriert den sarkoplasmatischen Calciumspeicher und reduziert die erhöhte Leitfähigkeit für Natriumionen. Ursächlich dafür können gleich mehrere Mechanismen in Betracht gezogen werden.

Zwei Proteine bzw. Verbindungen, die in zahlreichen Arbeiten als zentral hinsichtlich der protektiven Mechanismen angesehen werden, sind die CaMKII sowie die reaktiven Sauerstoffspezies. Wie in 1.6.1 ausführlich beschrieben, zeigten Pabel et al., dass die kurzfristige Behandlung mit Empa zwar die diastolische Spannung reduziert, es jedoch zu keinem Effekt auf die systolische Ca²⁺-Amplitude bzw. die diastolischen Ca²⁺-Levels kam ⁽³⁾. Hingegen konnte die 24-stündige Inkubation mit Empagliflozin eine erhöhte sarkoplasmatische Ca²⁺-Beladung und eine reduzierte Frequenz der Ca²⁺-Sparks zeigen ⁽³⁾. Einheitlich dazu bewiesen Mustroph et al. an herzinsuffizienten murinen und humanen Ventrikelzellen, dass eine ebenfalls 24-stündige Behandlung mit Empa die CaMKII-Aktivität signifikant reduziert

und dass zudem die Phosphorylierung des RyR2 durch die CaMKII signifikant vermindert wird ⁽⁹⁴⁾. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine verminderte CaMKII-Aktivität langfristig zur Umkehr dysregulierter Mechanismen der Ca^{2+} -Homöostase beitragen könnte. Überdies muss es aufgrund der bewiesenen unmittelbaren Wirkung einen weiteren Mechanismus geben, der der verbesserten myokardialen Kontraktilität zugrunde liegt.

Wie Trum et al. bereits 2020 zeigen konnten, inhibiert Empa nach nur 10-minütiger Inkubation humaner atrialer Myozyten die Aktivität des NHE-1, was folglich zu einem reduzierten Na^+ -Einstrom führt ⁽¹¹²⁾. Übereinstimmend damit konnte selbige Arbeitsgruppe auch einen reduzierten Na^+ -Einstrom über eine Untereinheit der spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle Nav1.5 durch kurzzeitige Behandlung mit Empa belegen ⁽¹¹³⁾. Ein denkbarer zugrunde liegender Mechanismus hierbei wäre die reduzierte Nav1.5 Phosphorylierung über die CaMKII, welche in Myozyten von HFpEF-Patienten verstärkt nachgewiesen werden konnte. Hier konnte eine identische Reduktion im Na^+ -Einstrom sowohl durch Empa als auch durch den CaMKII-Inhibitor Autocamtide-2 related inhibitory peptide (AIP) und dem späten Na^+ -Einstrom-Inhibitor Tetrodotoxin (TTX) gezeigt werden ⁽¹¹³⁾, was für eine ähnliche Wirkung dieser drei Substanzen spricht.

Auch eine weitere Arbeitsgruppe von Uthman et al. zeigte an endothelialen Zellen, dass Empa den NHE-1 inhibiert. Zusätzlich zeigten sie durch parallele Inkubation einerseits mit Empa und andererseits mit dem NHE-Inhibitor Cariporid eine gleichwertige Reduktion in zellulärer ROS-Beladung. ⁽¹¹⁴⁾ Dies legt einen engen funktionellen Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Natriumhaushalt und dem oxidativen Stress nahe, wobei eine Reduktion der Na^+ -Beladung mit einer verminderten ROS-Bildung assoziiert ist.

Auch Hegyi et al. zogen diese Parallelen und setzten sie zudem in Zusammenhang mit der CaMKII und der Ca^{2+} -Homöostase. Mutmaßlich indirekt über eine geringere ROS-Beladung wird durch Empa sowohl die CaMKII-Aktivität reduziert als auch der späte Na^+ -Einstrom supprimiert ⁽¹¹⁵⁾. Dies verringert proarrhythmische Nachdepolarisationen und kann damit das Risiko lebensbedrohlicher Arrhythmien reduzieren.

4.2.4 Ca^{2+} -Homöostase und mitochondrialer Stoffwechsel

Als letzte wichtige zelluläre Funktion, auf die ROS einen Einfluss nehmen bzw. durch die auf ROS vice versa Einfluss genommen wird, ist der zelluläre Stoffwechsel.

Eine große Studie, in der die kardial bezogenen Stoffwechselsubstrate umfänglich untersucht wurden, sind die Studien an diabetischen Schweinemodellen von Santos-Gallego et al. aus 2019

und 2021. Obwohl Resultate von verschiedenen Studien unterschiedliche Theorien liefern (siehe 1.6.1), bewies das zentrale Ergebnis von Santos-Gallego et al. durch die Behandlung mit Empa eine Verlagerung der Substratauswahl des myokardialen Stoffwechsels weg von Glukose hin zu Ketonen, freien Fettsäuren sowie verzweigtkettigen Aminosäuren ⁽⁹⁸⁾.

Aufgrund eines optimierten P/O-Verhältnis (generierte ATP-Moleküle pro O₂-Molekül) zieht das insuffiziente Myokard, welches bewiesenermaßen unter Sauerstoff-Mangel leidet, zunächst bevorzugt Glukose statt FFA als Substratquelle heran. Die ATP-Ausbeute von Glukose ist hierbei geringer als bei FFA, sodass der zelluläre Stoffwechsel energiedefizitär ist, die kardiale Effizienz bei energetisch mitochondrialer Dysfunktion reduziert wird und es zu einer Verschlechterung im circulus vitiosus der Herzinsuffizienz kommt. ⁽¹¹⁶⁾

Durch Empagliflozin findet jedoch ein Wechsel der Substratauswahl zurück zu Fettsäuren und Ketonen statt, welcher auch im gesunden Myokard beobachtet wird. Unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes kommt es durch die Glukosurie unter Empa zu einer erhöhten Glucagon- statt Insulinsekretion, sodass durch eine gesteigerte Lipolyse vermehrt Ketonkörper zur Verfügung stehen, die dem Myokard ebenfalls zur Verwertung bereitstehen ⁽¹¹⁷⁾. Aufgrund dieses Substratwechsels kann mehr ATP generiert werden, was die myokardiale Kontraktion effizienter gestaltet, die linksventrikuläre systolische Funktion verbessert und pathologisches Remodeling reduziert.

Ein zentrales Schlüsselement in der Verbindung des Ionenhaushaltes und des Stoffwechsels stellt zudem das Calcium dar. Als Katalysator für zahlreiche Enzyme des Citratzyklus (z.B. für die Isocitratdehydrogenase) ist eine ausreichende mitochondriale Ca²⁺-Konzentration essenziell für den reibungslosen Ablauf des Stoffwechsels. Ist die mitochondriale Ca²⁺-Konzentration jedoch in einem insuffizienten Myokard reduziert, fehlt der Antrieb für die Verwertung der Stoffe. Ein primär beeinträchtigter Ionenhaushalt führt also bei herzinsuffizienten Patienten folglich auch zu einem beeinträchtigten myokardialen Stoffwechsel, welcher in einer zellulären Energiedefizienz resultiert ⁽¹¹⁸⁾. Diese Energiedefizienz, welche sich über akkumulierte mitochondriale NAD⁺ sowie ADP manifestiert, erhöht zudem die mitochondriale ROS-Produktion über die Mn-SOD.

Durch die Therapie mit Empagliflozin werden nun an mehreren Einflussgrößen dieses komplexen Zusammenspiels Änderungen vorgenommen, sodass zunächst über eine wieder adäquate mitochondriale Ca²⁺-Konzentration der Stoffwechsel in gewohntem Maße stattfinden kann. Die Substratauswahl ist dem O₂-Gehalt besser angepasst, damit der Zelle dem Anspruch entsprechend genügend Energie in Form von ATP zur Verfügung steht.

4.3 Limitationen

Diese Arbeit thematisiert den akuten direkt zellulären Effekt von Empagliflozin auf die ROS-Entstehung in atrialen Myozyten von Patienten mit HFpEF.

Anders als in der Studie von Koliijn et al. ⁽¹⁰²⁾ wurde in dieser Arbeit keine Unterscheidung zwischen einzelnen Spezies reaktiver Sauerstoffverbindungen getroffen. Stattdessen wurde die Gesamtbeladung der Zellen mit reaktiven Sauerstoffspezies bestimmt, wodurch eine genauere Differenzierung der einzelnen Spezies nicht möglich war.

In dieser Arbeit wurden atriale Kardiomyozyten verwendet. Es ist jedoch möglich, dass in ventrikulären Kardiomyozyten unterschiedliche Ergebnisse auftreten, was in weiteren Studien eingehender untersucht werden sollte.

Zur detaillierteren Kategorisierung der kardialen Funktion der untersuchten Patienten wäre es sinnvoll gewesen, die Herzinsuffizienz nach echokardiographischen Merkmalen feiner beschreiben zu können. Insbesondere die Objektivierung der diastolischen Funktion mittels E/A-Ratio könnte einen Benefit hinsichtlich der Erfassung kardialer Einschränkungen erbringen. Aufgrund großflächig fehlender Echo-Parameter konnte jedoch nicht weiter auf die Beschreibung der kardialen Funktion eingegangen werden, sodass sich auf die bereits in der EMPEROR-Studie angewandten Parameter klinische Symptome, NT-proBNP und EF beschränkt wurde.

4.4 Ausblick und klinische Relevanz

Nicht nur für Patienten mit Diabetes und für Patienten mit Diabetes und einem kardiovaskulären Risikoprofil, sondern auch für Patienten mit HFrEF und HFpEF ohne eine diabetische Komorbidität ist Empagliflozin als ein Vertreter der SGLT2-Hemmer seit 2022 offiziell zur Behandlung zugelassen ⁽¹¹⁹⁾. Durch die zahlreichen präklinischen Studien konnte nicht nur gezeigt werden, dass Empa eine deutliche kardiale Protektion mit Reduktion der Mortalität und Morbidität an Herzinsuffizienz bewirkt, sondern es konnten zudem viele zugrundeliegenden Wirkmechanismen beschrieben werden.

Mit der Gruppe der SGLT2-Hemmer wurde erstmals eine Medikamentenklasse gefunden, die ein verbessertes kardiales Outcome bei Patienten mit HFpEF vor allem durch eine Reduktion

der Mortalität sowie der Hospitalisierungsrate erreichen konnte. Sie steht damit als alleinige Möglichkeit zur kausalen Therapie dieser Entität zur Verfügung, wobei alle weiteren therapeutischen Maßnahmen lediglich auf die Behandlung der Komorbiditäten sowie auf die Linderung der Symptome abzielen.

Eine vollumfassende Klärung der kardialen Wirkmechanismen der SGLT2-Hemmer bleibt weiter Gegenstand aktueller Forschungen, jedoch wurden in dieser Arbeit bereits die wichtigsten Theorien, besonders in Verbindung mit reaktiven Sauerstoffspezies, beleuchtet.

5 Zusammenfassung

Zur symptomatischen sowie kausalen Therapie der Herzinsuffizienz steht mit den SGLT2-Hemmern eine neue Medikamentengruppe zur Verfügung, die primär als antidiabetische Therapie konzipiert wurde und aufgrund ihres kardialen Benefits nun eine Erweiterung ihres Behandlungsspektrums erfahren konnte.

Trotz des beachtlichen Ausmaßes der kardialen Protektion blieb der zugrundeliegende Mechanismus der SGLT2-Hemmer-induzierten Kardioprotektion zunächst unklar. Große klinische sowie experimentelle Studien nicht nur mit Empagliflozin sondern auch mit den klassenverwandten Wirkstoffen Dapagliflozin und Canagliflozin lieferten sukzessive Antworten auf die Frage nach den kardioprotektiven Mechanismen. Neben systemischen Wirkungen wie einer reduzierten Vorlast aufgrund einer induzierten Glukosurie rückten zunehmend direkte kardiale Mechanismen in den Vordergrund.

Ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Angriffspunkten in zellulärer Ionenhomöostase, zellulärem Stoffwechsel, zellulärem Inflamationsmanagement sowie in kardialer Mechanik, insbesondere der diastolischen Funktion sowie extrazellulärer Zusammensetzung scheinen kollaborativ die kardiale Funktion zu optimieren. Insgesamt lässt sich sagen, dass die zelldestruktiven Veränderungen im insuffizienten Myokard, zellulär als auch im Zellverband, durch eine Therapie mit Empagliflozin größtenteils wieder aufgehoben werden.

Mit dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass eine erhöhte ROS-Beladung ein Merkmal von Myozyten von Patienten mit HFpEF ist. Das Vorliegen einer HFpEF ist dabei ein Prädiktor für eine erhöhte ROS-Produktion, unabhängig von weiteren klinischen und laborchemischen Faktoren, die ebenfalls eine erhöhte ROS-Produktion hervorrufen könnten. Es wurde zudem erstmals an humanem Myokard bewiesen, dass die mitochondriale sowie die

zytosolische ROS-Beladung durch eine kurzzeitige in vitro-Behandlung mit Empagliflozin signifikant gesenkt werden kann. Dies spricht für eine ausgeprägte myokardiale antiinflammatorische Wirkung. Ob diese über eine reduzierte ROS-Produktion oder eine erhöhte antioxidative Kapazität oder aber durch eine Kombination beider Faktoren erklärbar ist, ist noch weiter zu erforschen.

Zudem kann eine geringere zelluläre ROS-Beladung allein jedoch nicht direkt für diese ausgeprägten Auswirkungen in reduzierter Hospitalisierungsrate und Mortalität bei Herzinsuffizienz-Patienten erklärbar sein. Dass reduzierte ROS für einen stabilen Ca^{2+} - und Na^{+} -Haushalt, einen reibungslos ablaufenden Stoffwechsel sowie folglich für eine energieeffiziente diastolische Funktion sorgen, kann im Kontext mit der vorhandenen Literatur bislang nur vermutet werden.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der chronischen Herzinsuffizienz	15
Tabelle 2: Ca ²⁺ -freie Isolationstyrode.....	28
Tabelle 3: Enzymlösung I.....	28
Tabelle 4: Enzymlösung II.....	28
Tabelle 5: Storage Medium	29
Tabelle 6: Farbstofflösung.....	33
Tabelle 7: Messtyrode	34
Tabelle 8: Einstellungen am Konfokalmikroskop	35
Tabelle 9: Einteilung der Patienten nach dem EMPEROR-Preserved Studiendesign	37
Tabelle 10: Klinische Parameter der teilnehmenden Patienten.....	39
Tabelle 11: Multiple lineare Regression	47

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Myokards auf zellulärer Ebene	2
Abbildung 2: Schematischer Ablauf des Aktionspotenzials im Ventrikelmyokard	4
Abbildung 3: Elektromechanische Kopplung im Myokard	5
Abbildung 4: Pathologische Mechanismen reaktiver Sauerstoffspezies	12
Abbildung 5: Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz	14
Abbildung 6: Humane atriale Zelle unter dem konventionellen Lichtmikroskop	30
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Konfokalmikroskopes...	31
Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung kardialer Myozyten unter dem Konfokalmikroskop	35
Abbildung 9: Die zytosolische ROS-Produktion ist in Kardiomyozyten von HFpEF Patienten signifikant erhöht.....	41
Abbildung 10: Die zytosolische und mitochondriale ROS-Produktion in Kardiomyozyten von Patienten mit HFpEF wird durch Empagliflozin reduziert	42
Abbildung 11: Auswertung der Steigungen der Kontrollgruppen von NF und HFpEF nach EMPEROR-Preserved, gepoolt aus CellROX Orange und CellROX Green.....	43

Abbildung 12: Auswertung der Steigungen innerhalb der Gruppen nach EMPEROR-Preserved, gepoolt aus CellROX Orange und CellROX Green; dargestellt als Streudiagramm mit Mittelwerten $\pm$ SEM	44
Abbildung 13: Auswertung der Steigungen pro Patient innerhalb der Gruppen nach EMPEROR-Preserved, CellROX Orange	45
Abbildung 14: Auswertung der Steigungen pro Patient innerhalb der Gruppen nach EMPEROR-Preserved, CellROX Green	46

7 Literaturverzeichnis

1. Deutsche Herzstiftung e.V. Deutscher Herzbericht 2021. Frankfurt am Main; September 2022 [cited 2023 Oct 4]. Available from: URL: <https://herzstiftung.de/system/files/2022-09/DHB21-Herzbericht-2021.pdf>.
2. Rößler A. Empagliflozin: Zweiter SGLT-2-Hemmer bei Herzinsuffizienz. Pharmazeutische Zeitung online 2021 Jun 22 [cited 2023 Jan 13]. Available from: URL: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/zweiter-sgl-2-hemmer-bei-herzinsuffizienz-126410/>.
3. Pabel S, Wagner S, Bollenberg H, Bengel P, Kovács Á, Schach C et al. Empagliflozin directly improves diastolic function in human heart failure. *Eur J Heart Fail* 2018; 20(12):1690–700.
4. Verma S, Garg A, Yan AT, Gupta AK, Al-Omran M, Sabongui A et al. Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass and Diastolic Function in Individuals With Diabetes: An Important Clue to the EMPA-REG OUTCOME Trial? *Diabetes Care* 2016; 39(12):e212–e213. Available from: URL: <https://diabetesjournals.org/care/article/39/12/e212/31950/Effect-of-Empagliflozin-on-Left-Ventricular-Mass>.
5. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(4):379–88. Available from: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282802915269>.
6. Anastacio MM, Kanter EM, Makepeace CM, Keith AD, Zhang H, Schuessler RB et al. Relationship between mitochondrial matrix volume and cellular volume in response to stress and the role of ATP-sensitive potassium channel. *Circulation* 2013; 128(11 Suppl 1):S130-5.
7. Schmidt RF, editor. Physiologie kompakt. 4., korrigierte und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2001. (Springer eBook Collection Medicine).
8. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S. Duale Reihe Physiologie. 4., unveränderte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2021. (Duale Reihe). Available from: URL: <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1909153>.
9. Gilbert G, Demydenko K, Dries E, Puertas RD, Jin X, Sipido K et al. Calcium Signaling in Cardiomyocyte Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2020; 12(3). Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7050587/>.

10. Dewenter M, Lieth A von der, Katus HA, Backs J. Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circ Res* 2017; 121(8):1000–20.
11. Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation by CaMKII under pathophysiological conditions. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008; 13:5988–6005. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18508637/>.
12. Loescher CM, Freundt JK, Unger A, Hessel AL, Kühn M, Koser F et al. Titin governs myocardial passive stiffness with major support from microtubules and actin and the extracellular matrix. *Nat Cardiovasc Res* 2023; 2(11):991–1002. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/s44161-023-00348-1>.
13. Franssen C, González Miqueo A. The role of titin and extracellular matrix remodelling in heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J* 2016; 24(4):259–67. Available from: URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12471-016-0812-z>.
14. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MPV, Bronzwaer JGF et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 2012; 126(7):830–9. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22806632/>.
15. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res* 2013; 113(6):709–24.
16. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115(3):500–8.
17. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86(5):494–501.
18. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol (Lond)* 2003; 552(Pt 2):335–44.
19. D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A et al. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020:5732956.
20. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3-4):222–30.

21. Chen Y-R, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* 2014; 114(3):524–37.
22. Seddon M, Shah AM, Casadei B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* 2007; 75(2):315–26. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17568574/>.
23. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(13):6770–4. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8692893/>.
24. Moens AL, Kass DA. Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(11):2439–44.
25. Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res* 2012; 111(8):1091–106.
26. Magnani F, Mattevi A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2019; 59:91–7. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X18301805>.
27. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li J-M, Gove C, Lambeth JD et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2003; 93(9):802–5.
28. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(3):181–9.
29. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel J-L, Hasenfuss G et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 41(12):2164–71.
30. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *The FEBS journal* 2008; 275(13):3278–89. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18513323/>.

31. Lu D, Ma Y, Zhang W, Bao D, Dong W, Lian H et al. Knockdown of cytochrome P450 2E1 inhibits oxidative stress and apoptosis in the cTnT(R141W) dilated cardiomyopathy transgenic mice. *Hypertension* 2012; 60(1):81–9.
32. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 2005; 122(2):221–33.
33. Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC de, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(4):333–43.
34. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120(4):483–95.
35. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996; 98(5):1253–60.
36. Moris D, Spartalis M, Tzatzaki E, Spartalis E, Karachaliou G-S, Triantafyllis AS et al. The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Ann Transl Med* 2017; 5(16):324.
37. Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(11):1889–99. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16716890/>.
38. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 1999; 32(8):595–603. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912099000752>.
39. Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2002; 105(3):293–6. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11804982/>.
40. Hingtgen SD, Tian X, Yang J, Dunlay SM, Peek AS, Wu Y et al. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Physiological genomics* 2006; 26(3):180–91. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16670255/>.

41. Mushtaq S, Ali T, Javed Q, Tabassum S, Murtaza I. N-Acetyl Cysteine Inhibits Endothelin-1-Induced ROS Dependent Cardiac Hypertrophy through Superoxide Dismutase Regulation. *Cell J* 2015; 17(2):355–60.
42. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(18):9782–7.
43. Wilson AJ, Gill EK, Abudalo RA, Edgar KS, Watson CJ, Grieve DJ. Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting. *Heart* 2018; 104(4):293–9.
44. Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L. Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(1):214–22. Available from: URL: <https://jpet.aspetjournals.org/content/318/1/214>.
45. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res* 1997; 80(1):76–81.
46. Erickson JR. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5:59. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3980116/>.
47. Luczak ED, Anderson ME. CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2014; 73:112–6. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4048820/>.
48. Hool LC, Corry B. Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(4):409–35. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17280484/>.
49. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung; 2019. Available from: URL: www.herzinsuffizienz.versorgungsleitlinien.de.
50. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *Journal of the American College of Cardiology* 2017; 70(2):212–29. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28683969/>.

51. Herold G, editor. Innere Medizin. Köln: Gerd Herold; 2019.
52. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. Eur Heart J 2021; 42(36):3599–726.
53. Luchner A, Holmer, Stephan, Schunkert, Heribert, Riegger, Günter A. Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NT-proBNP für die Klinik. In: Deutsches Ärzteblatt. A3314 - 3321 [cited 2024 Aug 30]. Available from: URL: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/39816/Bedeutung-der-Herzinsuffizienzmarker-BNP-und-NT-proBNP-fuer-die-Klinik>.
54. Cao Z, Jia Y, Zhu B. BNP and NT-proBNP as Diagnostic Biomarkers for Cardiac Dysfunction in Both Clinical and Forensic Medicine. International journal of molecular sciences 2019; 20(8). Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31013779/>.
55. Todesursachen in Deutschland | Statista [cited 2020 Sep 16]. Available from: URL: <https://de.statista.com/statistik/studie/id/66670/dokument/todesursachen/>.
56. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. Deutscher Herzbericht: Rückgang der Sterberate aber weitere Zunahme von Herzerkrankungen; 2019. Available from: URL: <https://dgk.org/daten/Herzbericht-2018-dgk-pm.pdf>.
57. Immer mehr Patienten mit Herzerkrankungen in Deutschland. Deutsches Ärzteblatt 2019 Feb 7. Available from: URL: <https://www.aerzteblatt.de/news/immer-mehr-patienten-mit-herzerkrankungen-in-deutschland-d53b98da-4270-4536-87ed-c78946c9749a>
58. Mazurek JA, Jessup M. Understanding Heart Failure. Heart failure clinics 2017; 13(1):1–19. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27886916/>.
59. Ma C, Luo H, Fan L, Liu X, Gao C. Heart failure with preserved ejection fraction: an update on pathophysiology, diagnosis, treatment, and prognosis. Braz J Med Biol Res 2020; 53(7):e9646. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7296715/>.
60. Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? Circ Res 2003; 92(4):350–8.

61. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res* 2003; 92(8):904–11.
62. Zeitz O, Maass AE, van Nguyen P, Hensmann G, Kögler H, Möller K et al. Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na(+)-Ca(2+) exchange. *Circ Res* 2002; 90(9):988–95.
63. Cutler MJ, Plummer BN, Wan X, Sun Q-A, Hess D, Liu H et al. Aberrant S-nitrosylation mediates calcium-triggered ventricular arrhythmia in the intact heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(44):18186–91. Available from: URL: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1210565109>.
64. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(6):H2181-90.
65. Sag CM, Wagner S, Maier LS. Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 2013; 63:338–49. Available from: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584913002451>.
66. Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MMGJ, Belterman CNW, Coronel R, Fiolet JWT. Increased Na⁺/H⁺-exchange activity is the cause of increased Na⁺_i and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. *Cardiovasc Res* 2003; 57(4):1015–24. Available from: URL: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/57/4/1015/346066?login=false>.
67. Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MMGJ, Belterman CNW, Coronel R, Opthof T et al. Chronic inhibition of Na⁺/H⁺-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. *Cardiovasc Res* 2005; 65(1):83–92. Available from: URL: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/65/1/83/310530?login=false>.
68. Baartscheer A. [Na⁺]_i and the driving force of the Na⁺/Ca²⁺-exchanger in heart failure. *Cardiovasc Res* 2003; 57(4):986–95. Available from: URL: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/57/4/986/347832>.
69. Belevych AE, Terentyev D, Terentyeva R, Nishijima Y, Sridhar A, Hamlin RL et al. The relationship between arrhythmogenesis and impaired contractility in heart failure: role of altered ryanodine receptor function. *Cardiovasc Res* 2011; 90(3):493–502. Available from: URL: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/90/3/493/276034?login=true>.

70. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circulation. Heart failure* 2009; 2(6):664–75. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835502/>.
71. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007; 356(11):1140–51.
72. Nickel A, Löffler J, Maack C. Myocardial energetics in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2013; 108(4):358.
73. Chatham JC, Young ME. Metabolic remodeling in the hypertrophic heart: fuel for thought. *Circ Res* 2012; 111(6):666–8.
74. Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 1996; 94(11):2837–42.
75. Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801(3):311–9.
76. Kolwicz SC, Olson DP, Marney LC, Garcia-Menendez L, Synovec RE, Tian R. Cardiac-specific deletion of acetyl CoA carboxylase 2 prevents metabolic remodeling during pressure-overload hypertrophy. *Circ Res* 2012; 111(6):728–38.
77. Zhazykbayeva S, Pabel S, Mügge A, Sossalla S, Hamdani N. The molecular mechanisms associated with the physiological responses to inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biophys Rev* 2020; 12(4):947–68. Available from: URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-020-00742-0>.
78. Pabel S, Hamdani N, Singh J, Sossalla S. Potential Mechanisms of SGLT2 Inhibitors for the Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front. Physiol.* 2021; 12:752370. Available from: URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.752370/full>.
79. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62(4):263–71. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109713018901>.

80. Ramakrishna V, Jaikhan R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol* 2008; 45(1):41–6.
81. Shen E, Li Y, Li Y, Shan L, Zhu H, Feng Q et al. Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia. *Diabetes* 2009; 58(10):2386–95.
82. Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacology & therapeutics* 2017; 172:50–62. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27916650/>.
83. Marume K, Takashio S, Nagai T, Tsujita K, Saito Y, Yoshikawa T et al. Effect of Statins on Mortality in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Without Coronary Artery Disease - Report From the JASPER Study. *Circulation Journal* 2019; 83(2):357–67. Available from: URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/83/2/83_CJ-18-0639/_html/-char/en.
84. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2015; 373(22):2117–28.
85. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, Zeeuw D de, Fulcher G, Erond N et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2017; 377(7):644–57.
86. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A et al. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2019; 380(4):347–57.
87. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med* 2020; 383(15):1413–24.
88. Kato ET, Silverman MG, Mosenzon O, Zelniker TA, Cahn A, Furtado RHM et al. Effect of Dapagliflozin on Heart Failure and Mortality in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2019; 139(22):2528–36.
89. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M et al. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med* 2021. 385:1451-1461
90. Butler J, Packer M, Filippatos G, Ferreira JP, Zeller C, Schnee J et al. Effect of empagliflozin in patients with heart failure across the spectrum of left ventricular ejection

fraction. *Eur Heart J* 2022; 43(5):416–26. Available from: URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8825259/>.

91. Chilton R, Tikkanen I, Cannon CP, Crowe S, Woerle HJ, Broedl UC et al. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2015; 17(12):1180–93.

92. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13:148.

93. Kang S, Verma S, Hassanabad AF, Teng G, Belke DD, Dundas JA et al. Direct Effects of Empagliflozin on Extracellular Matrix Remodelling in Human Cardiac Myofibroblasts: Novel Translational Clues to Explain EMPA-REG OUTCOME Results. *The Canadian journal of cardiology* 2020; 36(4):543–53. Available from: URL:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31837891/>.

94. Mustroph J, Wagemann O, Lucht CM, Trum M, Hammer KP, Sag CM et al.

Empagliflozin reduces Ca/calmodulin-dependent kinase II activity in isolated ventricular cardiomyocytes. *ESC Heart Fail* 2018; 5(4):642–8.

95. Baartscheer A, Schumacher CA, Wüst RCI, Fiolet JWT, Stienen GJM, Coronel R et al. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na⁺ through inhibition of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia* 2017; 60(3):568–73.

96. Mustroph J, Lucht CM, Wagemann O, Sowa T, Hammer KP, Sag CM et al. Empagliflozin enhances human and murine cardiomyocyte glucose uptake by increased expression of GLUT1. *Diabetologia* 2019; 62(4):726–9.

97. Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart.

Biochim Biophys Acta 2011; 1813(7):1333–50. Available from: URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488911000231>.

98. Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, Ishikawa K, Watanabe S, Picatoste B et al. Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics. *Journal of the American College of Cardiology* 2019; 73(15):1931–44. Available from: URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109719336897>.

99. Santos-Gallego CG, Vargas-Delgado AP, Requena-Ibanez JA, Garcia-Ropero A, Mancini D, Pinney S et al. Randomized Trial of Empagliflozin in Nondiabetic Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 2021; 77(3):243–55. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109720377536>.
100. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol* 2019; 18(1):15.
101. Uthman L, Homayr A, Juni RP, Spin EL, Kerindongo R, Boomsma M et al. Empagliflozin and Dapagliflozin Reduce ROS Generation and Restore NO Bioavailability in Tumor Necrosis Factor α -Stimulated Human Coronary Arterial Endothelial Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2019; 53(5):865–86. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31724838/>.
102. Kolijn D, Pabel S, Tian Y, Lódi M, Herwig M, Carrizzo A et al. Empagliflozin improves endothelial and cardiomyocyte function in human heart failure with preserved ejection fraction via reduced pro-inflammatory-oxidative pathways and protein kinase G α oxidation. *Cardiovasc Res* 2021; 117(2):495–507. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32396609/>.
103. Campbell KS, Sorrell VL. Cell- and molecular-level mechanisms contributing to diastolic dysfunction in HFpEF. *J Appl Physiol (1985)* 2015; 119(10):1228–32.
104. Achong N, Wahi S, Marwick TH. Evolution and outcome of diastolic dysfunction. *Heart* 2009; 95(10):813–8. Available from: URL: <https://heart.bmj.com/content/95/10/813>.
105. Hammoudi N, Jeong D, Singh R, Farhat A, Komajda M, Mayoux E et al. Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther* 2017; 31(3):233–46.
106. Numata G, Takimoto E. Cyclic GMP and PKG Signaling in Heart Failure. *Frontiers in Pharmacology* 2022; 13:792798. Available from: URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9036358/>.

107. Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS et al. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res* 2013; 112(4):664–74.
108. Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res* 2014; 114(6):1052–68.
109. Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, Garcia-Ropero A, Ishikawa K, Watanabe S et al. Empagliflozin Ameliorates Diastolic Dysfunction and Left Ventricular Fibrosis/Stiffness in Nondiabetic Heart Failure: A Multimodality Study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2021; 14(2):393–407. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1936878X20307993>.
110. Verma S, Mazer CD, Yan AT, Mason T, Garg V, Teoh H et al. Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease: The EMPA-HEART CardioLink-6 Randomized Clinical Trial. *Circulation* 2019; 140(21):1693–702.
111. Oelze M, Kröller-Schön S, Welschhof P, Jansen T, Hausding M, Mikhed Y et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PLoS ONE* 2014; 9(11):e112394.
112. Trum M, Wagner S, Maier LS, Mustroph J. CaMKII and GLUT1 in heart failure and the role of gliflozins. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; 1866(6):165729.
113. Trum M, Schollmeier E, Riechel J, Lebek S, Reuthner K, Keller K et al. Empagliflozin inhibits increased Na influx in HFpEF cardiomyocytes and reduces arrhythmic activity in human atrial trabeculae. *Eur Heart J* 2022; 43(Supplement_2). Available from: URL: https://academic.oup.com/eurheartj/article/43/Supplement_2/ehac544.2948/6746540?login=false#google_vignette.
114. Uthman L, Li X, Baartscheer A, Schumacher CA, Baumgart P, Hermanides J et al. Empagliflozin reduces oxidative stress through inhibition of the novel inflammation/NHE/Na⁺/c/ROS-pathway in human endothelial cells. *Biomed Pharmacother* 2022; 146:112515. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221013020>.

115. Hegyi B, Mira Hernandez J, Shen EY, Spencer ER, Smoliarchuk D, Edwards TA et al. Empagliflozin and ROS-CaMKII-late sodium current signaling in heart failure with preserved ejection fraction. *Biophysical Journal* 2023; 122(3):35a.
116. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85(3):1093–129.
117. Abdelgani S, Khattab A, Adams J, Abu-Farha M, Daniele G, Al-Mulla F et al. Distinct Mechanisms Responsible for the Increase in Glucose Production and Ketone Formation Caused by Empagliflozin in T2DM Patients. *Diabetes care* 2023; 46(5):978–84. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36857415/>.
118. Bertero E, Maack C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circ Res* 2018; 122(10):1460–78. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29748369/>.
119. *Kardiologie.org*. Neues HFpEF-Medikament: Empagliflozin in der EU zugelassen; 2022 [cited 2023 Mar 21]. Available from: URL: <https://www.kardiologie.org/herzinsuffizienz/neues-hfpef-medikament--empagliflozin-in-der-eu-zugelassen/20196720>.

