Aus der Klinik Kardiologie und Pneumologie
Prof. Dr. Gerd Hasenfuß
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Pleiotrope Effekte Empagliflozins auf humanes und murines Myokard

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hannah Luzie Bollenberg
aus
Berlin

Göttingen 2024

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer*in: Prof. Dr. med. Samuel Sossalla

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. Niels Voigt

Prüfungskommission

Referent*in: Prof. Dr. med. Samuel Sossalla

Ko-Referent*in: ..……..

Drittreferent*in: …..……..

Datum der mündlichen Prüfung: ……

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Pleiotrope Effekte Empagliflozins auf humanes und murines Myokard“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 31.03.2024 ……

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Pabel S, Wagner S, **Bollenberg H,** Bengel P, Kovács Á, Schach C, Tirilomis P, Mustroph J, Renner A, Gummert J (2018): Empagliflozin directly improves diastolic function in human heart failure. Eur J Heart Fail. 20, 1690-1700

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **II**
Tabellenverzeichnis ..... **III**
Abkürzungsverzeichnis ..... **IV**
Formelverzeichnis ..... **VI**
1 Einleitung **1**
1.1 Hintergrund **1**
1.2 Anatomische und physiologische Grundlagen des Herzens **4**
1.2.1 Anatomie der Kardiomyozyten **4**
1.2.2 Elektromechanische Kopplung **5**
1.3 Die Herzinsuffizienz **10**
1.3.1 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz **11**
1.3.2 Diabetische Kardiomyopathie **14**
1.4 Der Wirkstoff Empagliflozin **17**
1.5 Aktuelle Studienlage zu Beginn dieser Arbeit **18**
2 Material und Methoden **21**
2.1 Gewebe **21**
2.1.1 Humanes Gewebe **21**
2.1.2 Murines Gewebe **21**
2.2 Versuchsaufbau **22**
2.2.1 Lösungen **22**
2.2.2 Aufbau der Versuchsanlage **25**
2.3 Vorbereitung **27**
2.3.1 Murines Gewebe **27**
2.3.2 Humanes Gewebe **29**
2.4 Empagliflozinkonzentrations-Wirkungsbeziehung **30**
2.4.1 Kraft-Frequenz-Beziehung in murinem Gewebe **31**
2.4.2 Kraft-Frequenz-Beziehung in humanem Gewebe **32**
2.5 Post-Rest-Versuche **32**
2.6 Wash-Out-Versuche **33**
2.7 Datenakquise **34**
2.8 Statistische Auswertung **34**
3 Ergebnisse **36**
3.1 Humanes Gewebe **36**
3.1.1 Kontraktilitätsmessungen in humanem HF-Gewebe **38**
3.1.2 Kontraktionskinetik **39**

3.1.3 Kraft-Frequenz-Beziehung **41**
3.1.4 Post-Rest-Versuche **44**
3.2 Murines Gewebe **44**
3.2.1 Diabetisches Mausmodell **46**
3.2.2 Nicht-diabetisches Mausmodell **52**
4 Diskussion **59**
4.1 Klinische Konzentration **59**
4.2 Pleiotrope Wirkung Empagliflozins auf Myokardtrabekel **60**
4.3 Diabetes-(un-)abhängige Wirkung **63**
4.4 Klinische Translation **71**
5 Zusammenfassung **73**
6 Literaturverzeichnis **74**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung. 8
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.. 26
Abbildung 3: Versuchsanlagen der Kontraktilitätsexperimente. 26
Abbildung 4: Beschriftetes Foto des Organbadabschnittes der Versuchsanlage. 28
Abbildung 5: Originalabbildungen einzelner Kontraktionen humaner Proben. 38
Abbildung 6: Kraftentwicklung der humanen HF Proben. 39
Abbildung 7: Kontraktionskinetik der humanen HF Proben. 40
Abbildung 8: FFR der HF Proben.. 42
Abbildung 9: Kontraktionskinetik der humanen HF Proben bei 1Hz, 2Hz, 3Hz. 43
Abbildung 10: Post-Rest-Verhalten der HF Proben. 44
Abbildung 11: Kontraktionsparameter der murinen Proben 45
Abbildung 12: Kraftentwicklung der diabetischen murinen Trabekel. 47
Abbildung 13: Kontraktionskinetik der murinen diabetischen Proben.. 48
Abbildung 14: FFR: Kraftentwicklung der murinen, diabetischen Proben. 49
Abbildung 15: FFR: Kontraktionskinetik der murinen db/db-Proben. 51
Abbildung 16: Post-Rest-Verhalten der db/db-Proben. 52
Abbildung 17: Kraftentwicklung der WT Proben bei steigenden Konzentrationen.. 53
Abbildung 18: Kontraktionskinetik der murinen herzinsuffizienten Proben. 54
Abbildung 19: FFR: Kraftentwicklung der murinen WT-Proben. 56
Abbildung 20: FFR: Kontraktionskinetik der murinen WT-Proben. 57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammensetzung der Stammlösung 22
Tabelle 2: Zusammensetzung der 1x-KHS 23
Tabelle 3: Zusammensetzung der Dissektionslösung 24
Tabelle 4: Zusammensetzung der DMSO-Lösung für die Wash-Out-Versuche 24
Tabelle 5: Ca^{2+}-Aufsättigung murinen Myokards. 29
Tabelle 6: Ca^{2+}-Aufsättigung im humanen Myokard. 30
Tabelle 7: Schema für die Zugabe der Empagliflozin-Lösung 30
Tabelle 8: Frequenzabfolge der FFR-Versuche 31
Tabelle 9: Frequenzerhöhungsschritte der humanen Kraftfrequenz-Beziehung 32
Tabelle 10: Post-Rest-Versuchsreihe, Schema der Stimulationspausen 33
Tabelle 11: Messpunkte der Wash-Out-Versuchsreihe 33
Tabelle 12: Klinischen Parameter der humanen Myokardproben. 37

Abkürzungsverzeichnis

Ach	Acetylcholin
AGE	*Advanced Glycation Endproducts*
AV	Atrioventrikulär
BARI-2D	*A Randomized Trial of Therapies for Type 2 Diabetes and Coronary Artery Disease*
BDM	2,3-Butanedion-Monoxim (BDM)
BDM-Lsg.	2,3-Butanedion-Monoxim-Dissektionslösung
c_{max}	Maximale Plasmakonzentration
CaMKII	Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CANVAS	*Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes*
CV	*cardiovascular;* kardiovaskulär
CVD-REAL	*Comparative Effectiveness of Cardiovascular Outcomes in New Users of SGLT-2 Inhibitors*
db/db-Mäuse	Diabetisches Mausmodell
deltaC-Mäuse	Nicht-diabetisches Mausmodell, Wildtyp
+df/dt	Kontraktionsgeschwindigkeit
-df/dt	Relaxationsgeschwindigkeit
DM1	Diabetes mellitus Typ 1 (*Diabetes mellitus Typ 1*)
DM2	Diabetes mellitus Typ 2 (*Diabetes mellitus Typ 2*)
DPP4	Dipeptidylpeptidase-4
EC-Coupling	*Excitation-contraction-Coupling*; elektromechanische Kopplung
EF	Ejektionsfraktion
eHF	*End-stage Heartfailure;* Herzversagen im Endstadium
EMPA-REG	*Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Typ 2 Diabetes Mellitus Patients – Removing Excess Glucose*
EMPA-TROPISM	*Are the "Cardiac Benefits" of Empagliflozin Independent of Its Hypoglycemic Activity? (ATRU-4)*
EMMY	*Impact of EMpagliflozin on cardiac function and biomarkers of heart failure in patients with acute MYocardial infarction (EMMY-Trial) – a phase III Study*
EMPEREOR-preserved/	*EMPagliflozin outcomE tRial in Patients With chrOnic heaRt Failure With Preserved Ejection Fraction*
EMPEREOR-reduced	*EMPagliflozin outcomE tRial in Patients With chrOnic heaRt Failure With reduced Ejection Fraction*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EXAMINE	*Cardiovascular Outcomes Study of Alogliptin in Patients With Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome*
FFR	*Force-Frequency-Relation*; Kraft-Frequenz-Beziehung
GLP1	*Glucagon-Like-Peptide 1*
HF-Patient:innen	Patient:innen mit Herzinsuffizienz

HFmrEF	*Heart Failure with mid-range Ejection Fraction*
HFpEF	*Heart Failure with preserved Ejection Fraction*
HFrEF	*Heart Failure with reduced Ejection Fraction*
HZV	Herz-Zeit-Volumen
KHK	Koronare Herzkrankheit
KHS-Lösung	Krebs-Henseleit-Lösung
L_{max}	Maximale Länge
MACE	*Major Adverse Cardiac Events*
MRA	Mineralkortikoid-Rezeptorblocker
mRNA	*messenger*-RNA, Boten-Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin
Na^+ /K^+ -ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
ORIGIN	*Outcome Reduction with an Initial Glargin Intervention*
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PMCA	Plasmamembran-Ca^{2+}- ATPase
PR	*Post-Rest;* Post-Pausen
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	*Reaktive oxygen species*, reaktive Sauerstoff Spezies
RT90%	*Relaxation Time 90%,* Zeit bis zur 90%igen Relaxation
norm.	*Normalized,* Normalisierte Einheit in %
RyR	Ryanodinrezeptor
SAVOR-TIM-53	*Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus*
SERCA	Sarkoplasmatische Calcium-ATPase
SGLT1/2	*Sodium-Glucose-Cotransporter 1/2*, Natrium-Glukose-Kotransporter 1/2
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tdev	Systolische Kontraktionskraft
TECOS	*Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin*
Tdia	Diastolische Grundspannung/Kraft
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
UKPDS-33	*UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group*
WT	Wildtyp, deltaC-Mausreihe
z.B.	Zum Beispiel
ZDF Ratten	*Zucker Diabetic Fatty Rats*
1x-KHS	1-fach Krebs-Henseleit-Lösung
10x-KHS	10-fach Krebs -Henseleit-Lösung

Formelverzeichnis

Formel 1 **Berechnung der Wandspannung** 18
Formel 2 **Post-Rest-Quotient** 39
Formel 1 **Berechnung des Standardfehlers (SEM)** 41

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus sind zwei Volkskrankheiten, die in bidirektionalem Zusammenhang stehen. Im Laufe der Krankengeschichte kommt es bei fast der Hälfte der Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) Patient:innen zu einer Einschränkung der Herzfunktion. Das Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln ist fünfmal höher verglichen mit nicht an Diabetes erkrankten Menschen (Rorthet al. 2018). Insgesamt ist eine Vergesellschaftung von Diabetes und Herzinsuffizienz (*heart failure*, HF) von bedeutender prognostischer Relevanz und mit einer deutlich schlechteren Überlebenschance assoziiert verglichen mit der Prognose herzinsuffizienter Nichtdiabetiker:innen (Gustafsson et al. 2004). Für Diabetiker:innen mit HF liegt das mediane Überleben bei drei bis sechs Jahren und die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate bei 12%, wohingegen mehr als 80% der Diabetiker:innen ohne HF die Fünf-Jahresmarke überleben (Bertoni et al. 2004). Überdies bestehen auch weitreichende Konsequenzen in Bezug auf die Lebensqualität der HF-Patient:innen.

Körperliche Symptome, eine zunehmende Einschränkung der Belastbarkeit und vermehrte stationäre Behandlungen haben einschneidende Konsequenzen für das Wohlbefinden der komorbiden Patient:innen (Ponikowski et al. 2016). Körperlich wirkt sich die HF im Verlauf auch auf andere Organsysteme aus. Zu Beginn klagen die Patient:innen oft über Dyspnoe, Schwächegefühl und eine schnellere Erschöpfbarkeit. Mit der Zeit kann es zudem zur zerebralen Minderperfusion, einer Abnahme der Nieren-, Lungen- und Leberfunktion bei verminderter Perfusion und/oder Stauung kommen. Akute Verschlechterungen der Herzfunktion im Sinne kardialer Dekompensationen machen zeitweise stationäre Aufenthalte notwendig und bedingen somit immer wiederkehrende Unterbrechungen des gewohnten Lebens. Mit dem schleichenden Progress der HF nimmt auch die Fähigkeit zur Teilhabe und -nahme an Alltag ab und kann bis in die Berufsunfähigkeit führen (Ponikowski et al. 2016).

Hinzu kommen die langfristigen Folgeerkrankungen des DM2. Gerade in Bezug auf das Herz können DM2-typische Komplikationen wie mikro- und makrovaskuläre Veränderungen, in Form einer Koronaren-Herzkrankheit (KHK), den Progress der HF beschleunigen (Stratton et al. 2000). Ursächlich wirken verschiedene Mechanismen zusammen. Vorrangig sind hierbei DM2 Langzeitkomplikationen wie mikro- und makrovaskuläre Veränderungen, im Sinne einer KHK und dadurch bedingte arteriellen Hypertonie zu erwähnen. Des Weiteren sind metabolische Veränderungen der Kardiomyozyten und des myokardialen Interstitiums nicht außer Acht zu lassen (Kannel et

al. 1974, Stratton et al. 2000). All diese Prozesse tragen zur Entwicklung einer diastolischen und systolischen Dysfunktion bei Pat. mit Diabetes bei. Während die systolische Funktionseinschränkung vornehmlich durch eine geringere Ejektionsfraktion gekennzeichnet ist, ist beim diastolischen Versagen vor allem eine verminderte Dehnungs- und Füllungsfähigkeit charakteristisch (Ponikowski et al. 2016).

Eine Kontrolle der Risikofaktoren stellt aktuell den Goldstandart dar. Symptom-kontrollierende und prognoseverbessernde Substanzen wie die Angiotensinkonvertierendes-Enzym- *(Angiotensin-Converting-Enzym)*-Inhibitoren (ACE-Inhibitoren) und Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten (AT1-Antagonisten), setzen bei der Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) an. Die RASS-Inhibitorn reduzieren direkt die Vasokonstriktion, führen über eine Verringerung der renalen Na^+-Resorption zu einem erniedrigten Extrazellulärvolumen und folglich auch indirekt zur Abnahme des Blutdrucks. Sie unterbrechen damit die sich selbst antreibende Abwärtsspirale der Krankheitsprogression. Zudem zeigen Daten einen positiven Einfluss auf Remodellierungsprozesse des Herzens für die ACE-Inhibitoren (Porter et al. 2009) und Mineralkortikoid-Rezeptorantagonisten (MRA), die überdies in schwachem Maße über den diuretischen Effekt blutdrucksenkend wirken. Die zudem eingesetzten β-Blocker wirken kardial negativ ionotrop, dromotrop und chronotrop und wirken protektiv vor maligne Rhythmusstörungen im Zuge einer weiter fortgeschrittenen HF. Neuere Daten suggerieren einen blutdrucksenkenden Effekt über eine potentielle Inhibition der Reninausschüttung und RAAS-Aktivierung (Ogrodowczyk et al. 2016). Prognoseverbessernd wirken die drei Therapiesäulen der HF also über eine Erleichterung der kardialen Pumpfunktion im Sinne einer Blutdrucksenkung, über eine Inhibition pathologischer Umbau- und Aktivierungsprozesse und über die Reduktion des Auftretens maligner Rhythmusstörungen (Mosterd et al. 2007).

Allerdings sind diese Therapeutika für die systolische HF zugelassen. Zudem gab es seit 1996 verglichen mit anderen Fachdisziplinen nur eine sehr geringe Rate an therapeutischen Neuzulassungen (Warner et al. 2020). Zur Therapie der diastolischen HF steht zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch keine spezifische, evidenzbasierte Therapie zur Verfügung (Ponikowski et al. 2016).

Wird das hohe Risiko für die Entwicklung einer HF im Verlauf einer Diabetes Erkrankung bedacht verleitet es zur Annahme, eine rechtzeitige und konsequente antihyperglykämische Therapie könne den Progress zum Endpunkt HF verhindern und einen positiven Einfluss auf das Risiko an kardiovaskulären (*cardiovascular*, CV) Ereignissen zu versterben nehmen (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group et al. 2008, Lehrke und Marx 2017). Abgesehen von Empagliflozin konnte nur für Biguanide (Metformin) ein prognoseverbessernder Effekt bei Pat mit DM2 und HF nachgewiesen werden (Eurich et al. 2013). Die Datenlage zu den anderen antidiabetischen Medikamenten ist mindestens uneinheitlich (Kenny und Abel 2019). Sulfonylharnstoffe standen sogar unter dem Verdacht

die kardiovaskuläre Mortalität zu erhöhen (Goldner et al. 1971, Gerstein et al. 2008, Lehrke et al. 2017). Aber auch nicht-medikamentöse Therapiestrategien, die sogenannten Lifestylemodifikationen, die unter anderen eine Gewichtsreduktion und eine Verbesserung der körperlichen Fitness beinhalteten, zeigte nur zum Teil oder gar keinen direkten Effekt auf die CV Mortalität (Gregg et al. 2016). In Zusammenschau der aktuell veröffentlichten Studie existieren somit keine Daten, die die Hypothese, eine strenge glykämische Kontrolle reduziere das CV Risiko, stützen (Lehrke et al. 2017). Herzinsuffiziente Diabetiker:innen benötigen weiterhin signifikant öfter eine stationäre Behandlung und weisen eine erhöhte Mortalität auf als nicht an Diabetes erkrankte HF-Patient:innen (MacDonald et al. 2008).

Das Ergebnis der Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Typ 2 Diabetes Mellitus Patients – Removing Excess Glucose (EMPA-REG Studie) markierte daher eine hoffnungsvolle Wende in der Diabetestherapie (Zinman et al. 2015). Insgesamt wurden 7020 Patient:innen im Mittel 3,1 Jahre beobachtet, wobei die Interventionsgruppe (4687 Patient:innen) zusätzlich zur Standarttherapie täglich 10mg oder 25mg Empagliflozin und die Kontrollgruppe (2333 Patient:innen) ein Placebo erhielt. Die Gruppe mit der ergänzende Gabe Empagliflozins zeigte eine deutliche Überlegenheit gegenüber der Kontrollgruppe bezüglich der kardiovaskulären Mortalität, der Gesamtmortalität, der Notwendigkeit zur stationären Behandlung auf Grund von HF-Symptomen, sowie nicht-fataler Myokardinfarkte oder Schlaganfälle. Bemerkenswerterweise zeigten sich die positiven Effekte bereits innerhalb der ersten drei Monate nach Start der Empagliflozinbehandlung (Zinman et al. 2015).

In Anbetracht der Studienlage bezüglich glykämischer Kontrolle und HF eröffnete dies den Raum für die Fragen nach zugrundeliegenden Mechanismen, die den sichtbaren Effekt hinreichend erklären könnten. Die Antwort darauf ließ die EMPA-REG-Studie jedoch offen.

In der darauffolgenden Diskussion über mögliche zugrundeliegende Mechanismen schien eine alleinige Risikoreduktion aufgrund der Minimierung der langwirksamen sekundären Risikofaktoren aufgrund der kurzen Zeitspanne bis zum Auftreten der Effekte unwahrscheinlich (Zinman et al. 2015). Nachfolgende klinische Studien konnten vielmehr zeigen, dass die positiven Effekte Empagliflozins auch unabhängig der CV Risikofaktoren, also der Blutdruckwerte, der LDL-Spiegel und der HbA1c-Werte, auftraten (Zinman et al. 2017). Für eine mögliche Erklärung der Ergebnisse untersuchten eine Vielzahl an folgend begonnenen Studien die Wirkung Empagliflozins auf verschiedene Metabolismus- und Risikoparameter. Es wurde beobachtet, dass Empagliflozin die Insulinsensitivität erhöht (Ferrannini et al. 2014), das Plasmavolumen reduziert (Sha et al. 2014), den systolischen Blutdruck um 3-5mmHg und den diastolischen um 2-3mmHg senkt (Vasilakou et al. 2013) und die Gefäßfunktion verbesserte (Chilton et al. 2015).

Auch wenn diese Daten Hinweis darauf gaben, dass eine gewisse direkte Wirkung im vaskulären System zu erwarten sei, erklärte dies nicht den signifikanten Unterschied der Prognose der beiden Patient: innenkollektive. Als verbleibende naheliegende Möglichkeit

blieben daher direkte Effekte am Herzen. Diese Arbeit widmet sich daher der Aufklärung möglicher direkter kardiale Effekte Empagliflozins auf das Herz. Sie soll mögliche pleiotrope Effekte zum einen an Proben aus humanen explantierten Herzen, die sich im Endstadium des Herzversagens befanden, untersuchen und darüber hinaus die Wirkung in einem diabetischen und einem nicht-diabetischen, herzinsuffizienten, murinen Modell evaluieren. Zunächst soll jedoch als Grundlage die relevante Physiologie des Myokards, die Pathologie der HF und der diabetischen Kardiomyopathie, sowie der zu Beginn dieser Arbeit aktuelle Stand der Forschung erörtert werden.

1.2 Anatomische und physiologische Grundlagen des Herzens

Für ein tieferes Verständnis und eine Einordnung möglicher Erklärungen der Ergebnisse, werden im Folgendem zunächst die hierfür wichtigsten physiologischen Grundlagen des Herzens erläutert. Dabei werden der ultrastrukturelle Aufbau der Kardiomyozyten und die elektromechanischen und elektrochemischen Grundlagen der Erregungsentstehung, -ausbreitung und -übersetzung im Fokus stehen, Kenntnisse über die Anatomie des Herzens, sowie die Erregungsleitungssysteme sind als gegeben vorausgesetzt

1.2.1 Anatomie der Kardiomyozyten

Die koordinierte Weiterleitung der Erregung auf das gesamte Myokardgewebe ist die essenzielle Voraussetzung für die effektive mechanische Kontraktion und die daraus resultierende Pumpbewegung des Herzens. Eine effektive Pumpaktion des gesamten Gewebes bedarf einer zeitlichen und örtlichen Abstimmung auf Ebene der Kardiomyozyten zum einen im Sinne der Fortleitung der Aktionspotentiale und gleichzeitig der Übersetzung in mechanische Aktionen. Der Prozess der Übersetzung eines elektrischen Impulses in eine mechanische Kontraktion der einzelnen Zellen wird elektromechanische Kopplung genannt. Verschiedene zelluläre Strukturen sind an der elektromechanischen Kopplung (*Excitation-contraction-Coupling* (EC-Coupling) beteiligt (Bers 2002).

Die äußere Schicht des Kardiomyozyt ist das Oberflächensarkolemn. Dieses stülpt sich an vielen Stellen ein und bildet so die transversalen Tubuli (T-Tubuli). Hierbei geht die Oberflächensarkolemn kontinuierlich in diese über. Die T-Tubuli verlaufen jedoch nicht ausschließlich transversal, sondern zum Teil auch längs oder schräg und ragen tief in die Zelle hinein. Diese Anordnung bieten so die Möglichkeit einer schnellen Erregungsübertragung auf den im Zellinneren gelegenen Kontraktionsapparat (siehe Abb. 1).

Intrazellulär ist vor allem das Endoplasmatischen Retikulums (ER), das in Muskelzellen Sarkoplasmatisches Retikulum (SR) genannt wird, für die Erregung der Herzzelle von Bedeutung. Dieses formt sackartige Kammern, die sich in unmittelbarer Nähe zu den T-Tubuli befinden. Diese Anordnung aus einer endständigen Zisterne des SR nahe eines T-Tubuli wird auch Dyade genannt (Fawcett et al. 1969, Block et al. 1988).

Die regelrechte Funktion beruht auf der ungleichmäßigen Verteilung der Kanäle entlang des Sarkolemm. Verglichen mit der Oberflächenmembran ist die Dichte der Natrium-Kanäle (Na^+-Kanäle), der *delayed-rectifyer*-Kalium-(K^+-) Kanäle und Natrium-Kalium-Pumpe (Na^+/K^+-ATPase) in der T-Tubuli-Membran geringer (Jaimovich et al. 1976, Kirsch et al. 1977), während die Calcium- (Ca^{2+}-) Kanäle, die sogenannten Dihydropyridin-Rezeptoren, dort mehr als viermal so häufig zu finden sind (Almers et al. 1981, Venosa et al. 1981, Jorgensen et al. 1989). Diese sind spannungsaktivierte Ca^{2+}-Kanäle vom *long lasting-Typ* (langanhaltende Ionenströme, L-Typ), die Ca^{2+} von extra- nach intrazellulär strömen lassen (Jorgensen et al. 1989).

Die Kardiomyozyten sind über sogenannte Glanzstreifen (*Disci intercalares*) miteinander verbunden. An dieser funktionellen und mechanischen Schnittstelle finden sich Kommunikations- und Adhäsionskontakte (Zhao et al. 2019). Die Kommunikation, also die Weiterleitung elektrochemischer Potentiale, zwischen den verschiedenen Kardiomyozyten läuft über die *Gap Junctions*. Diese ermöglichen eine freie Diffusion von Kationen und Anionen zwischen benachbarten Kardiomyozyten (Sjostrand et al. 1958, Feher 2012). Für die Übertragung mechanischer Zugkräfte bzw. einer Stabilisierung des Zellverbands dienen die *Fascia adherens* und Desmosomen (Zhao et al. 2019). Der Verbund der Kardiomyozyten wird daher als funktionelles Synzytium bezeichnet. Streng genommen bestehen weiterhin einzelne Zellen, deren Zellmembranen nicht verschmolzen sind, die jedoch in solcher Weise miteinander verbunden sind, dass sie synchronisiert reagieren (Revel et al. 1967). Auch die Form der einzelnen Kardiomyozyten dient dem Ziel einer optimalen Verknüpfung der Zellen zu einem gesamten Gewebe. Die Zellen verzweigen sich in Längsrichtung an ihren Enden, sodass es zu einer netzartigen Verzahnung kommt (Bers 2002)

1.2.2 Elektromechanische Kopplung

Die Zellen des Arbeitsmyokards weisen im Gegensatz zu den Schrittmacherzellen ein stabiles Ruhemembranpotential auf, welches bei ca. -90mV liegt.

Die elektrische Erregung des oberflächlichen Sarkolemn führt zur Bildung eines Aktionspotentials, welches sich als eine Welle der Depolarisation an der Membran auch auf die transversalen Tubuli überträgt. Während des Aufstrichs wird die Erregung via *Gap-Junctions* weitergeleitet. Die dabei von dem präsynaptischen Kardiomyozyten zum postsynaptischen Kardiomyozyt fließenden Kationen depolarisieren die postsynaptische Zelle auf ca. -65mV, während Anionen zur präsynaptischen Zelle fließen und diese repolarisieren. Die Depolarisation bewirkt eine Öffnung der spannungsabhängigen schnellen Na^+-Kanäle, den $Na_V1.5$, und einen gleichzeitigen Schluss der einwärtsgerichteten K^+-Kanäle. Es kommt zum sogenannten „*Overshoot*“, einer Veränderung des Membranpotentials auf ca. +30mV. Ist dies erreicht schließt der Großteil der $Na_V1.5$ und es beginnt die Plateauphase. Es kommt jedoch nie zum völligen Flussstillstand, da einige wenige $Na_V1.5$ geöffnet bleiben und einen „Rest

Fluss“ (auch verspäteten Na^+-Strom) ermöglichen und einige $Na_V1.5$ während der Repolarisationsphase bereits wieder öffnen (Maltsev et al. 1998, Sakmann et al. 2000).

Bereits während des Aufstrichs beginnen sich die spannungsaktivierten L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle ab einem Membranpotential von ca. -40mV zu öffnen. Sie sind jedoch vor allem für die Plateauphase von Bedeutung, während der die meisten geöffnet sind. Der langsamen Ca^{2+}-Einstrom ist für die lange Dauer der Plateauphase verantwortlich und hält das Membranpotential bei etwa 0mV. Die Dauer der Plateauphase und Repolarisation ist äquivalent der Zeitspanne, die für Kontraktion und Erschlaffung der Myofilamente zur Verfügung stehen (Eisner et al. 2017).

Im Sinne einer negativen Rückkopplung bei intrazellulär hohen Ca^{2+}-Spiegeln und einer wieder zunehmenden Repolarisation nimmt die Ca^{2+}-Leitfähigkeit der Membran wieder ab. Die auswärts gerichteten, verzögerten K^+-Kanäle öffnen und K^+ fließt nach extrazellulär. Die diffundierenden Ionen folgen dem Konzentrationsgradienten und führen so zu einem Ladungsunterschied entlang der Membran und einer zunehmenden Negativierung des Membranpotentials. Ab ca. -70mV öffnen die einwärtsgerichteten K^+-Kanäle wieder. Die Leitfähigkeit der Membran nimmt damit selektiv für K^+-Ionen weiter stark zu. Die N^+- K^+-ATPase pumpt K^+ entgegen des Konzentrationsgradienten nach extrazellulär, um einen Ladungsausgleich herzustellen. Zudem verschieben geringe Ströme von Na^+ und Ca^{2+} das Membranpotential ins positivere. Das Gleichgewichtspotential einzelner Ionen kann durch die Nernst-Gleichung berechnet werden und ist abhängig von der intra- und extrazellulären Konzentration der Ionen. Für K^+ ergibt sich in Kardiomyozyten so zum Beispiel ein Wert um ca. -91mV, für Na^+ liegt es hingegen bei ungefähr +66mV. Das Ruhemembranpotential ist die Summe der Gleichgewichtpotentiale der fließenden Ionen und wird so maßgeblich bestimmt durch einerseits die Menge der fließenden Ionen bzw. die Leitfähigkeit der Membran für diese und andererseits proportional zu deren elektrochemischen Treibkraft. Es stabilisiert sich ca. bei -90mV, und liegt damit in etwa beim Gleichgewichtspotential der K^+-Ionen, bedingt durch die Na^{2+}-K^+ -ATPase und die SERCA, die gegen die elektrochemischen Gradienten pumpen (Grant 2009).

Die räumliche Nähe der L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle zur terminalen Zisterne des SR ist von essenzieller Bedeutung. Der durch Depolarisation der T-Tubuli und konsekutiver Öffnung der Ca^{2+}-Kanäle ermöglichte Einstrom geringer Mengen von Ca^{2+}-Ionen fungiert als sogenannter Ca^{2+}-Funken. Die einströmenden Ionen bindet an den Ryanodinrezeptor (RyR) des SR und bewirkt so eine Öffnung desselben mit konsekutiv massive Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR. Hierdurch wird die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration von 10^{-7} mol/L auf 10^{-5} mol/L erhöht.

Im sogenannten Querbrückenzyklus bindet das nun ins Zytoplasma sezernierte Ca^{2+} an die Ca^{2+}-bindende Untereinheit des dünnen Filaments Troponin C (TnC). Im entspannten Zustand ist TnC an das inhibitorische Troponin I (TnI) gebunden, welches wiederrum die myosinbindende Stelle des Aktin besetzt. Bei Ca^{2+}-Bindung des TnC kommt es über eine

Konfirmationsänderung zur Lösung des TnC vom TnI, das dann die Aktinbindungsstelle freigibt. Diese Veränderung ermöglicht, vermittelt durch das Troponin T (TnT), eine Bindung des Myosins an das Aktin. Die für die Kontraktion benötigte Energie wird durch Abgabe eines Phosphatmoleküls aus dem am Myosinköpfchen gebundenen ATP gewonnen. Diese wird in den ersten Kraftschlag umgewandelt, wobei das Myosinköpfchen von einer ca. 90°- auf eine 50°-Stellung abknickt. Folgend löst sich auch ADP aus der Myosinbindung, sodass das Köpfchen in eine 45°-Stellung weiterknickt. Dies entspricht in Summe etwa einem Verschieben des Myosins gegen des Aktins um 10nm. Durch erneute Bindung von ATP an Myosin kann sich die Verbindung zum Aktin lösen und das Myosinköpfchen kehrt in die Ausgangsstellung bei 90° zurück (Huxley 1969, Huxley und Simmons 1971).

Abgesehen vom Vorhandensein neuen ATPs ist die Relaxation durch die Dissoziation von Ca^{2+} vom Troponin geprägt, die durch Senkung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration erreicht wird. Hierfür pumpt zum einen die sarkoplasmatische Ca^{2+}-ATPase (SERCA) Ca^{2+}-Ionen zurück ins SR. Dieser aktive Transport passiert entgegen eines starken Konzentrationsgradientens und erfordert für die Rückaufnahme von 2 Ca^{2+}-Ionen 1 ATP-Molekül. Das Protein Phospholamban vermittelt hierbei die Ca^{2+}-Rückaufnahme, indem es unter basalen Bedingungen die Wiederaufnahme hemmt. Wird Phospholamban allerdings reguliert z.B. durch Phosphorylierung, fällt die hemmende Wirkung weg. Die Phosphorylierung bedingt also einer Stimulation der SERCA-Aktivität und somit einen rascheren Abfall der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Unterstützend werden durch den Na^{+}/Ca^{2+}-Austauscher (NCX) im nicht erregten (diastolischen) Zustand drei extrazelluläre Na^{+}-Ionen gegen ein intrazelluläres Ca^{2+}-Ionen durch passiven Transport ausgetauscht (Annunziato et al. 2004). Ergänzend transportiert die Plasmamembran-Ca^{2+}-ATPase (PMCA) unter Hydrolyse eines ATPs ein Ca^{2+} aktiv aus der Zelle. Die beiden Transporter komplementieren sich, da der NCX zwar eine große und schnelle Transportkapazität aufweist, jedoch eine geringe Ca^{2+}-Affinität und daher effizienter für den Transport bei hohen Konzentrationen ist, während die PMCA eine hohe Affinität aber langsame Transportrate aufweist und somit vor allem bei niedrigen Konzentrationen zur intrazellulären Ca^{2+}-Senkung beiträgt (Strehler et al. 2001).

Kommt es zu keinem erneuten Einstrom von Ca^{2+}, sinken die intrazellulären Ca^{2+}-Spiegel. Das an das TnC gebundene Ca^{2+} diffundiert zusehends vom TnC ab. Die damit einhergehende Bindung des TnI an das Aktin inhibiert eine Bindung des Myosins ans Aktin und es stellt sich eine Relaxation ein. Eine erneute Erregung ist dann, bei wiederhergestellten intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration von 10−7 mol/L, einem stabilisierten Ruhemembranpotential von ca. -90mV und wieder aktivierbaren $Na_V1.5$, erneut möglich.

Im Gegensatz zur Kontraktion der Skelettmuskulatur, benötigt die Herzmuskulatur sowohl den Ca^{2+}-Einstrom über das Sarkolemn als auch die Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR.

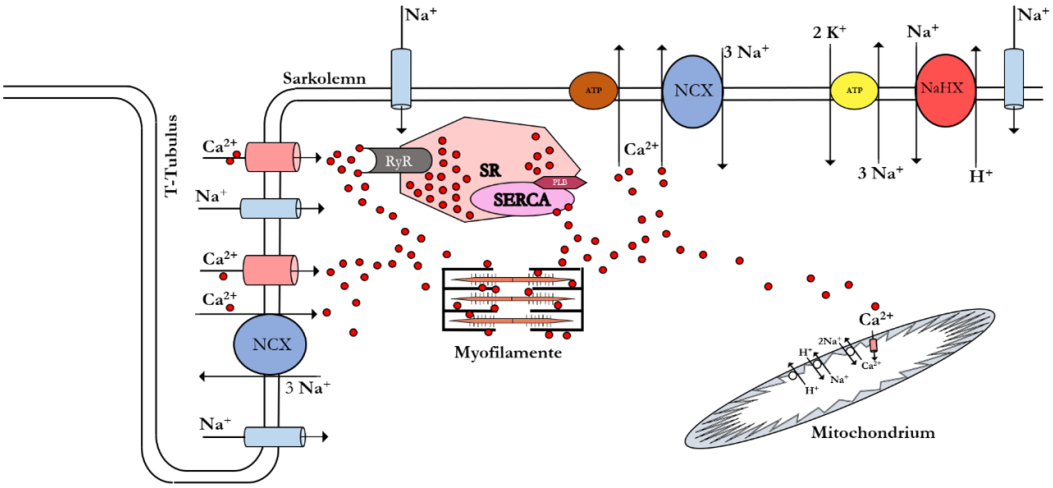

Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung. Die Ca^{2+}-Kanäle (rosa) öffnen sich, nachdem die Zelle durch einen Na^{+}-Einstrom durch die Na^{+}-Kanäle (hellblau) depolarisiert ist. Der Ca^{2+}-Einstrom triggert die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) des SR, sodass Ca^{2+}(rot) aus diesem ins Zytosol strömt. Im Zytosol bindet das Ca^{2+} an das Troponin C. TnC ändert dadurch seine Konfirmation und löst sich vom TnI, welches sich wiederrum von der Myosinbindungsstelle am Aktin löst. Konsekutiv kann unter ATP-Hydrolyse eine Stellungsänderung des Myosinköpfchens erfolgen, die zur Kontraktion führt. Die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration wird über einen Ausstrom oder Transport nach Extrazellulär oder ins Mitochondrium durch die SR- Ca^{2+}-ATPase (SERCA), den Na^{+}/ Ca^{2+}-Austauscher (NCX), die ATP-abhängige Ca^{2+}-ATPase und die Ca^{2+}-Kanäle gesenkt. Die SERCA-Aktivität wird über Phospholamban (PLB) reguliert. Die Repolarisation und die Konstanthaltung des Ruhemembranpotentials wird durch die Na^{+}-/ K^{+}-ATPase gewährleistet. Des Weiteren ist der Na^{+}/H-Austauscher (NHE) dargestellt, der im Antiport ein Wasserstoffatom (H+) gegen ein Na^{+}-Ion austauscht.

Für die Regulation der Kontraktionskraft stehen drei verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um diese dem peripheren Bedarf anzupassen.

Nach dem von Frank Starling beschriebenen Mechanismus resultiert eine Dehnung der Herzmuskelfasern in einer Zunahme der entwickelten Kontraktionskraft. So besitzt das Herz die Fähigkeit, bis zu einem gewissen Grad autonom die Kontraktionskraft dem Füllungsvolumen, also der Dehnung der Herzwände, anzupassen. Wird das enddiastolische Volumen, die Vorlast, erhöht, führt dies zu einer Dehnung der Myofilamente. Es konnte gezeigt werden, dass es hierdurch bis zu einem gewissen Füllungsgrad zu einer optimaleren Überlappung der Myofilamente kommt (Gordon et al. 1966). Des Weiteren zeigt sich positive Effekte in Bezug auf die Ca^{2+}-Sensitivität der Myofilamente (Hibberd et al. 1979), sowie auf die Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR (Allen et al. 1982). Bei erhöhter Vorlast kann so die angepasste Kontraktionskraft direkt zu einem erhöhten Schlagvolumen und somit zu einer Entlastung der Kammer führen. Der Mechanismus zeigt jedoch ein Dehnungsmaximum, ab dem die die Maximalkraft wieder abnimmt, da die kontraktilen Elemente sich nicht mehr optimal überlappen.

Auch die Herzfrequenz ist eine regulierende Größe. In Abhängigkeit der Schläge pro Minute steht die Zeit, die der Herzmuskel pro Kontraktionszyklus hat, um sich zu relaxieren.

Bei einer Stimulation zwischen 60 min^{-1} und 180 min^{-1} Schlägen korrelieren Kraft und Frequenz positiv, dh. die Kraft steigt mit der Frequenz.

Bei steigenden Frequenzen wird die Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytoplasma beschleunigt. Dies geschieht vornehmlich über eine Modulation des Phospholamban, das über die Ca^{2+} -calmodulinabhängige Proteinkinase-II (CaMKII) inaktiviert wird, sodass dessen hemmende Wirkung auf die SERCA ausbleibt. Die so gesteigerte SERCA-Aktivität bedingt die sogenannte „*frequency-dependent acceleration of Relaxation*", bedeutet also eine verkürzte Relaxationszeit bei einer vermehrten Ca^{2+} -Rückresorption ins SR (DeSantiago et al. 2002, Maier et al. 2002). Gleichzeitig akkumulieren Na^{+}-Ionen durch die dicht aufeinanderfolgenden Aktionspotentiale. Der verminderte Na^{+}-Gradient bewirkt eine geringere Aktivität des Na^{+}/ Ca^{2+} -Austauscher, sodass über diesen Weg weniger Ca^{2+} eliminiert wird. Die vermehrte Beladung des SR führt beim folgenden Kontraktionszyklus zu einer vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, sodass sich die Kontraktionskraft erhöht.

Wird das Maximum jedoch überschritten, nimmt die sich entwickelnde Kraft ab (Alpert et al. 1998). Ab einer Frequenz von 180 Schlägen pro Minute zeigen die Ca^{2+}-Transportproteine eine verminderte Reaktivierung (Crozatier 1998). Lemaire (1998) konnten zudem zeigen, dass ein verstärktes Ca^{2+}-Leck aus dem SR sich negativ auf die Kraftentwicklung bei hohen Frequenzen auswirkt (Lemaire et al. (1998).

Steigt oder sinkt der periphere Sauerstoffbedarf, kann das Herzzeitvolumen (HZV) auch über das vegetative Nervensystem an den veränderten Bedarf angeglichen werden. Mögliche Stellgrößen sind hierbei die Kontraktilität (Inotropie), die Frequenz (Chronotropie), die Relaxationsgeschwindigkeit (Lusitropie), sowie die atrioventrikuläre (AV) Überleitungsgeschwindigkeit (Dromotropie). Vermittelt wird dies über sympathische und parasympathische Fasern, mittels der jeweiligen Botenstoffen Noradrenalin (NA) und Acetycholin (Ach). Auf zellulärer Ebene führt eine Aktivierung von Gs-Proteingekoppelten β1- und β2-Adrenorezeptoren durch NA-Bindung zu einer vermehrten cAMP-Bildung aus ATP durch die Adenylatzyklase (Bristow et al. 1989). Zyklisches AMP fungiert als aktivierender „*second Messenger*" und stimuliert die Proteinkinasen A (PKA), die nun u.a. die L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle und die RyR phosphoryliert (Tsien et al. 1986). In phosphorylierter Form erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit, sodass sich konsekutiv die Ca^{2+}-Konzentration intrazellulär während der Systole erhöht (Valdivia et al. 1995). Geringer ausgeprägt, aber dennoch wirksam, ist die Wirkung von NA auf die α1-Adrenorezeptoren. Durch Aktivierung der an die Phospholipase C gekoppelten Rezeptoren steigt das intrazelluläre Inositoltriphosphat an, welches an der Entwicklung des positiv-inotropen Effekts beteiligt ist.

Der Anstieg des zytosolischen cAMP führt des Weiteren zu einer Phosphorylierung des Phospholamban. Dessen inhibierende Wirkung auf die SERCA nimmt ab und folglich strömt mehr Ca^{2+} zurück ins SR (James et al. 1989). Gleichzeitig führt eine cAMP-abhängige Phosphorylierung von Troponin I (TnI) zur einer Sensibilitätsminderung des Troponin Cs

(TnC) gegenüber Ca^{2+}, sodass Ca^{2+} vermehrt ab diffundiert. Beide Mechanismen führen zu einer Beschleunigung der Relaxation, sind also positiv lusitrop.

Weiterhin wirkt der hohe cAMP-Spiegel in den Schrittmacherzellen des Sinusknoten stimulierend auf die Frequenz, ist positiv chronotrop (DiFrancesco et al. 1991). Die erhöhte Frequenz kann entsprechend schneller über den AV-Knoten geleitet werden, da cAMP hier zu einer verstärktem Ca^{2+}-Strom führt und somit die Überleitungszeit verkürzt wird (positiv dromotop).

Der positiv verstärkenden Wirkung auf Inotropie, Chronotropie, Dromotropie und Lusitropie stehen parasympathisch vermittelte antiadrenerge Mechanismen gegenüber. Über die Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteingekoppelten α1-Adenosinrezeptors oder eines M2-Cholinrezeptor mittels ACh kann die Herzaktivität gedrosselt werden. Abgesehen von einer cAMP-Senkung über einer verminderte Adenylatcyklaseaktivität, wird in den Schrittmacherzellen eine dämpfende Wirkung über die Stimulation inhibitorischer G-Proteine vermittelt. Dort werden K^{+}-Ströme ACh-abhängig aktiviert, sodass es zu einer Hyperpolarisation der Zellen und einer Verzögerung bis zur Auslösung eines neuen Aktionspotentials kommt.

1.3 Die Herzinsuffizienz

Die physiologischen Anpassungsmechanismen sind jedoch begrenzt in ihrem Kompensationsvermögen. Der Frank-Starling-Mechanismus zeigt ebenso wie der Bowditch-Effekt ein Kompensationsmaximum mit anschließend wieder abnehmende Kompensationsleistung.

Der positiv ionotrope und chronotrope Effekt der neurohumeralen Aktivierung geht einerseits mit einer vermehrten Herzarbeit einher. Diese ist im Sinne der Aufrechterhaltung des HZV positiv, bedeutet für den Herzmuskel jedoch eine dauerhaft vermehrte Arbeit, die sich in einem chronisch gesteigerten Sauerstoffverbrauch ausdrückt. Gleichzeitig führt der positiv lusitrope Effekt zu einer verkürzten Diastolendauer, also zu einer Abnahme der Sauerstoffversorgung. Das chronische Auseinanderklaffen des Sauerstoffbedarfs und der Versorgung schädigt die Muskelzellen. In der Folge kann es zur Einschränkung der systolischen und diastolischen Kraftentwicklung, zu einem fibrösen Umbau des Gewebes und zur Zunahme der diastolischen Grundspannung in unterschiedlich schweren Ausprägungen kommen. Im Verlauf stellt sich so eine Spirale aus abnehmender Herzleistung und Heraufregulierung der Kompensationsmechanismen, die im folgenden Kapitel erläutert werden, ein, die in einer irreversiblen Schädigung des Herzmuskels münden können.

Grundsätzlich gibt es drei Prinzipien, die zu einer insuffizienten Pumpfunktion führen können: Systolische und diastolische Ventrikelfunktionsstörungen und Herzrhythmusstörungen. Natürlich lässt sich die HF nicht nur nach der Ätiologie einteilen, sondern auch anhand anderer Parameter. Für diese Arbeit wurde die Einteilung der

Europäischen Gesellschaft für Kardiologie übernommen und der Fokus auf die für diese Arbeit relevante diastolische und systolische Funktionsstörung gelegt.

Für die systolische HF ist eine verminderte Ejektionsfraktion (EF) (physiologisch größer als 55%) definierend. Sie entspricht der HF mit reduzierter Ejektionsfraktion („*Heartfailure with reduced Ejectionfraction*“ (HFrEF), wobei gleichzeitig auch eine diastolische Dysfunktion vorliegen kann. Patient:innen mit einer EF von 40 bis 49% werden dem Spektrum der Herzinsuffizienz mit mittlerer Ejektionsfraktion („*Heart Failure with midrange-ejectionfraction*“ (HFmrEF) zugeordnet. Der diastolischen HF liegt eine Relaxationsstörung zugrunde und entspricht einer HF mit erhaltener EF, auch „*Heart Failure with preserved Ejectionfraction*“ (HFpEF). Trotz hierbei erhaltener prozentualer EF, resultiert infolge einer verminderten enddiastolischen Füllung die Kontraktion in einem verminderten (absoluten) Schlagvolumen (Ponikowski et al. 2016).

Patient:innen im Endstadium des Herzversagens („*end-stage Heart-Failure*“; eHF) weisen typischerweise sowohl eine reduzierte EF als auch eine erhöhte diastolische Spannung auf (Sossalla et al. 2008, Sossalla et al. 2010a).

1.3.1 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Pathophysiologisch steht hinter der HF zu Beginn eine Abnahme des Schlag- und Herzzeitvolumens, sowie des Blutdrucks. Der durch die Barorezeptoren registrierte Blutdruckabfall führt zu einer gesteigerten neurohumeralen Antwort. Kurzfristig vermögen die erhöhten NA-Konzentrationen und die gesteigerte Plasmareninaktivität durch eine gesteigerte Frequenz das verminderte Schlagvolumen zu kompensieren und das HZV konstant zu halten (Kemp et al. 2012).

Durch den konstant hohen Sympathikotonus mit entsprechenden Botenstoffblutkonzentrationen kommt es zu einer exzessiven Stimulation der β-Adrenozeptoren. Eine weitere direkte Stimulation durch Agonisten wird durch eine cAMP-abhängige Sequestrierung der Rezeptoren von der Zelloberfläche unterbunden, sodass eine Kompensation über die Frequenz nur in bestimmtem Maß möglich ist. Bei lang andauernder, vermehrter Stimulation kommt es sogar zur Runterregulation, indem zum einen die Rezeptoren proteolytischen abgebaut und zum anderen weniger der für den Aufbau der Rezeptoren benötigten mRNA (*messenger-Ribonucleinacid*, Boten-Ribonukleinsäure) bereitgestellt wird (Sibley et al. 1985). Von dieser Verminderung ist bei der HF hauptsächlich der β1-Subtyp betroffen (Bristow et al. 1992). Im Verlauf wird dieser erste Kompensationsmechanismus so abgeschwächt.

Erschwerend kommt die Abnahme der renalen Perfusion bei vermindertem HZV hinzu. Das Herzkreislaufsystem reagiert darauf mit einer Aktivierung des RAAS, welches durch die erhöhten NA-Spiegel noch weiter angeregt wird. Es kommt zur vermehrten Bildung des vasokonstriktorischen Angiotensin II, sodass sich die Nachlast, der systemische Widerstand, gegen den das Herz anpumpt, erhöht. Gleichzeitig erhöht sich auch die Vorlast. Durch

Aktivierung des RAAS kommt es zu einer gesteigerten Aldosteronsynthese, die durch vermehrte Rückresorption von Na^+ und Wasser einen gesteigerten Volumenstatus bedingt (Sayer and Baht 2014).

Mittels Frank-Starling-Mechanismus wird die Kontraktilität kurzfristig angepasst und konstant gehalten. Die vermehrte Druck- und Volumenbelastung und die konstant erhöhten Angiotensin-II-Konzentrationen führen mittelfristig jedoch zu einer Einleitung von Wachstumsprozessen und einer Hypertrophie des Myokards (Krug et al. 2003). Um entgegen dem erhöhten Auswurfwiderstand das Blut aus dem Herz zu pumpen, muss ein erhöhter transmuraler Druck aufgewendet werden. Die Wandspannung steigt an. Im Sinne des Laplace-Gesetz führt eine Zunahme des Myokarddurchmessers und eine gleichzeitige Verkleinerung des Innendurchmessers der Ventrikel zu einer Normalisierung der Wandspannung und einer Aufrechterhaltung der systolischen Myokardfunktion.

$$K = \frac{P * r}{(2 * d)}$$

Formel 1: Berechnung der Wandspannung. **K**: Wandspannung; **P**: transmuraler Druck; **r**: Gefäßradius; **d**: Wanddicke

Diese Kompensation durch konzentrische Hypertrophie kann jedoch nur in einem gewissen Rahmen stattfinden (Cohn et al. 2000). Die intramyokardial liegenden Endäste der Koronararterien sind direkt dem steigenden Druck ausgesetzt. Die Mediaschicht verdickt reaktiv. Perivaskulär findet eine verstärkte Fibrosierung statt. Das Missverhältnis zwischen dem dadurch verringerten Kapillarquerschnitt und der zu versorgenden Myozytendichte kippt in ein ungünstiges Verhältnis, bei dem zum Teil schon in Ruhe die Koronarreserve aufgebraucht sein kann. Eine daraus resultierende Minderversorgung und Ischämie führen konsekutiv zur weiteren Progression der HF (Grossman et al. 1975). Verstärkend kommt zudem hinzu, dass eine konstant erhöhte Frequenz ohnehin auf Kosten der Diastolendauer geht. Die Koronardurchblutung, die hauptsächlich während dieser Phase stattfindet, wird dementsprechend vermindert (Goodwill et al. 2019). Langfristig kommt es so zu einer sich akkumulierenden Schädigung des Kardiomyozyten.

Gleichzeitig zeigen sich auch interstitielle Veränderungen. Es kommt zu einer vermehrten Kollageneinlagerung (Brilla und Rupp, 1994). Das wenig dehnbare und zugfeste Kollagen treibt die Ventrikeldilatation und somit eine weitere Erhöhung der Wandspannung voran. Ab ca. 20% Kollagengehalt (normal 2-4%) wird die Kontraktilität gemindert (Li 2014, Weber 1989). Die molekularen Mechanismen sind zwar noch nicht ausreichend geklärt, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass pathologisch erhöhte Aldosteron-Konzentrationen stark dazu beitragen (Brilla et al. 1994).

Neben den interzellulären Veränderungen kommt es auch auf intrazellulärer Ebene zu beeinträchtigenden Modulationen. Zum einen verändert die Hypertrophie die Herzgeometrie. Die Dehnungskurve des Frank-Starling-Mechanismus weist, wie beschrieben, ein Maximum auf, ab dem die Kraft durch eine höhere Vorspannung nicht

weiter gesteigert wird. Nach diesem kommt es zum Überschreiten des optimalen Überlappungsverhältnis der Myofilamente (Kosta und Dauby 2021) und folglich zu einer Kraftminderung. Zum anderen wird die Kontraktionskraft durch von Homöostase abweichende intrazelluläre Ionenkonzentrationen reduziert. Diesen wird zudem ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien zugeschrieben (Pieske et al. 2002, Sossalla et al. 2010b). Einer zentralen Rolle kommt dabei der CaMKII zu. Diese führt über Phosphorylierung zu einer verminderten PLB-Aktivität und somit konsekutiv zu einer Steigerung der SERCA-Aktivität. In der HF kommt es jedoch zu einer verminderten CaMKII- und damit SERCA-Aktivität (Netticadan et al. 2000, Mishra et al. 2003). Diese markiert einen möglichen Übergangspunkt von der kompensierenden Hypertrophie in die HF (de la Bastie et al. 1990, Feldman et al. 1993).

Weiterhin zeigt der neben der SERCA für die Ca^{2+}-Homöostase essenzielle NCX eine veränderte Aktivität, in Form verstärkter Expression und Aktivität (Schillinger et al. 1998). Daraus resultiert eine verstärkter Ca^{2+}-Auswärtstransport.

Erschwerend kommt hinzu, dass die in der HF pathologisch erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 zu einem diastolischen Ca^{2+}-Leck führt (Maier et al. 2003, Ai et al. 2005), das den Ca^{2+}-Gehalt des SR zusätzlich reduziert. Die reduzierte Ca^{2+}-Wiederaufnahme in das SR, bei gleichzeitig verstärktem Ca^{2+}-Transport nach extrazellulär, resultiert somit in einem verminderten Ca^{2+}-Gehalt des SR (Hasenfuss und Pieske, 2002). Das verstärkte Ca^{2+}-Leck wirkt zudem proarrhythmogen und konnte mit dem plötzlichen Herztod assoziiert werden (Lehnart et al. 2008).

Eine Fülle an Daten weist darauf hin, dass die Ca^{2+}-Sensitivität der Myozyten unverändert bleibt (Gwathmey et al. 1990, Perreault et al. 1990). In Folge der erniedrigten Ca^{2+}-Freisetzungen während der Systole nimmt daher die Schlagkraft ab. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei niedrigen Frequenzen die Kraftminderung geringer ausfällt als bei höheren, die Kraft-Frequenz-Beziehung also weniger positiv ist als in gesundem Myokard (Pieske et al. 1995).

In der HF, aber auch bereits im hypertrophen Stadium, zeigen die Kardiomyozyten einen gestörten Na^{+-}Haushalt, im Sinne einer Zunahme der intrazellulären Na^{+}-Konzentrationen. Diese wirken zum einen aktivierend auf den NXC, sodass es zu einer weiteren Verstärkung der zytosolischen Ca^{2+}-kommt. Zusätzlich scheint in der HF zudem der späten Na^{+}-Einstrom, durch eine Aktivierung der CaMKII verstärkt zu sein (Despa et al. 2002, von Lewinski et al. 2003, Wagner et al. 2006, Sossalla et al. 2011). Konsekutiv führte der späte Na^{+}-Strom zu einer Steigerung des Na^{+}-Einstroms während des Aktionspotentials und führt so zu einer Verlängerung dieses (Hale et al. 2008, Sossalla et al. 2008). Eine Na^{+}-Überladung konnten mit einer verminderten systolischen und diastolischen Dysfunktion assoziiert werde (Sossalla et al. 2011).

In Anbetracht des engen Zusammenhangs der intrazellulären Na^{+}-Konzentration, der Aktivierung des NCX und der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, fügen sich die Daten, die

eine Na^+-Überladung mit einer geminderten systolischen und diastolischen Kraft assoziieren konnten, gut in die sich gegenseitig bedingenden und verstärkenden Ionenkonzentrationsveränderungen ein. Es sei noch erwähnt, dass hohe intrazelluläre Na^+-Konzentrationen zudem Hypertrophie-induzierend wirken (Jelicks et al. 1995, Gray et al. 2001)

Greifen all diese Kompensations- und Pathomechanismen über längere Zeit ineinander, akkumulieren die kardialen Schäden und die myokardiale Dysfunktion aggraviert.

1.3.2 Diabetische Kardiomyopathie

Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe an Stoffwechselkrankheit, die als gemeinsames Merkmal unbehandelt eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels aufweisen. Es werden als wichtigste Vertreter der Diabetes mellitus Typ 1 (DM1), der auf einer verminderten Insulinproduktion und damit Mangel beruht, vom häufigeren Typ 2 (DM2), dem eine Insulinresistenz zugrunde liegt, unterschieden. Für das Verständnis dieser Arbeit ist jedoch vor allem der Typ 2 von Bedeutung, sodass weitere Untergruppen im Folgenden nicht näher erläutert werden.

Der DM2 tritt bei Übergewichtigen, meist älteren Patient:innen auf. Hierbei ist ätiologische zum einen die jahrelange kalorische Überversorgung, oft einhergehend mit Adipositas und einem metabolischen Syndrom und zum anderen die genetische Disposition zu erwähnen. Der Prozess ist meist schleichend. Typische, aber unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit, Erschöpfbarkeit und Leistungsabfall beruhen auf der verminderten zellulären Glukoseverfügbarkeit, Polyurie und Glukosurie sind auf die osmotische Wirkung der vermehrt über den Harnausgeschiedenen Glukose zurückzuführen. In Folge letzteres kann es zur Polydipsie kommen. Oft fällt der DM2 jedoch erst laborchemisch auf. Diagnostische Kriterien umfassen dabei entweder einen HbA1c > 6,5%, einen Nüchternglukosewert > 126mg/dl oder einen Glukosewert >200mg/dl entweder nach dem 2h-Wert des oralen Glukosetoleranztest oder akzidentiell (Cosentino et al. 2019).

In der Folge der chronisch hyperglykämischen Zuständen treten makro- und mikroangiopathische Veränderungen auf, die zu einer Bandbreite an Organschäden führen können. Die KHK, ischämische Schlaganfälle und periphere arterielle Verschlusskrankheiten sind die wichtigsten Komplikationen makroangiopathischer Veränderungen, während die diabetische Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie in Folge von Mikroangiopathien auftreten (Beckman et al. 2002).

Die schädigende Wirkung chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel tritt jedoch nicht erst bei den oben genannten diagnostischen Grenzwerten auf. Bereits prädiabetische Nüchtern-Glukosewerte (100-125mg/dl) prädisponieren für ein erhöhtes Herzinsuffizienzrisiko. Zwei Drittel der beobachteten Patient:innen entwickelten eine HFrEF, wobei das Risiko in Korrelation mit der Manifestationsstärke der Diabeteserkrankung steigt (Itzhaki Ben Zadok et al. 2017). Es konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Metabolischen Syndroms und der Entwicklung einer HF gezeigt werden (Kannel et al. 1974,

Stratton et al. 2000). Entwickeln sich trotz fehlendem Nachweis einer KHK, Klappenfehler oder andere konventioneller kardiovaskulärer Risikofaktoren eine myokardiale Dysfunktion und/oder HF, wird diese Dysfunktionalität des Myokards als diabetische Kardiomyopathie bezeichnet (Rubler et al. 1972).

Pathophysiologisch stellt die diabetische Kardiomyopathie ein Konglomerat verschiedener schädigender Faktoren dar. Zu Beginn ist die diabetische Kardiomyopathie meist asymptomatisch und wird durch eine zunehmende Fibrosierung und myokardiale Steifigkeit charakterisiert. Daraus resultiert eine Störung der frühdiastolischen ventrikulären Füllung, die wiederrum eine übermäßige Füllung und Dilatation der Vorhöfe, sowie einen erhöhten Enddiastolischen linksventrikulärem Druck bedingt (Westermeier et al. 2016). In der Frühphase liegen hierbei die für die Diabetes mellitus-Erkrankung kennzeichnenden Insulinresistenz, konstant erhöhte Blutglukoselevel, erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren und dadurch hervorgerufene Reaktionskaskaden zugrunde (Jia et al. 2016).

Bedingt durch die periphere Insulinresistenz ist eine Energiegenerierung vor allem über Fettsäuresubstrate nötig (Rodrigues et al. 1998). Diese Stoffwechselanpassung hat eine höheren Sauerstoffverbrauch und liefert nur unzureichend Energie sowie akkumulierende toxische Zwischenprodukte. Diese begünstigen apoptotische Prozesse (Liedtke et al. 1988), wirken profibrotisch und störend auf den Ca^{2+}-Haushalt der Kardiomyozyten (Malhotra et al. 1997, Abe et al. 2002).

Hyperglykämische Blutkonzentrationen führen zum einen zu einer Dysbalance zwischen vermehrter Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies und verminderter antioxidativen Schutzmechanismen. Weiterhin wirken sie aktivierend auf das RAAS (Xu et al. 2013), wobei erschwerend hinzukommt, dass bei DM2 Patient:innen die Angiotensin-II-Rezeptordichte und mRNA-Expression am Herzen erhöht sind (Giacchetti et al. 2005). Der Hypertrophiereiz wird so und durch die konstant hohe Insulinlevel noch potenziert (Sundgren et al. 2003).

Verstärkend kommt die Entstehung der *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs), die in direkter Korrelation mit der Höhe des Blutglukosespiegel steht, hinzu. Nicht nur erhöhen diese ebenfalls den oxidativen Stress und wirken so proapoptotisch und profibrosierend, sie führen durch Quervernetzungen auch direkt zu einer Erhöhung der myokardialen Steifigkeit (Hartog et al. 2007, Bodiga et al. 2014). Der gestörten Insulinsignalwege und akkumulierende AGEs hemmen die Produktion des vasodilatatorisch wirkende Stickstoffmonooxids (NO) der Endothelzellen. Darunter nimmt vor allem die für die Versorgung der Kardiomyozyten notwendige Fähigkeit, auf sich ändernde Stoffwechsellagen flexibel reagieren zu können, ab (Quehenberger et al. 2000, Sanders et al. 2000).

Die diabetesbedingten erhöhten Blutspiegel an freien Fettsäuren führen außerdem zu einer verstärkten Einlagerung von Lipiden und so auch unabhängig von atherosklerotischen Veränderungen direkt zu einer beschleunigten Koronarsklerose, der Steatosis cordis (Rijzewijk et al. 2008).

Wie auch in der nicht-diabetes bedingte HF, spielen bei der Entwicklung der diabetischen Kardiomyopathie die im vorangegangenen beschriebenen intrazellulären pathologischen Prozesse eine entscheidende Rolle.

Daten aus diabetischen Mäusen und Ratten konnten erhöhte diastolische Ca^{2+}-Level, verlangsamte Ca^{2+}-Ströme und eine reduzierte SERCA-Aktivität nachgewiesen werden (Ye et al. 2003, Belke et al. 2004, Ye et al. 2004, Van den Bergh et al. 2007). Letztere konnte auf die Abnahme der Glut4-Transporter bei Diabetes (Cook et al. 2009) und das damit begrenzte intrazelluläre Glukoseangebot zurückgeführt werden (Jia et al. 2016).

Von weitreichender Bedeutung und im wesentlich unterschiedlich zur nicht-diabetischen HF scheint jedoch die Hochregulierung der CaMKII bei erhöhten Glukose-spiegeln zu sein (Erickson et al. 2013, Daniels et al. 2015). Eine kurzzeitige Aktivitätszunahme führt im physiologischen Zustand zum Wiedereinstellen der Ca^{2+}-Homöostase, eine dauerhafte Aktivierung, wie beim Diabetes mellitus Typ 2, führt jedoch zu Pathologien der kardialen Funktion (Anderson et al. 2011, Daniels et al. 2015).

Eine chronische Überaktivität der CaMKII führt zu einem verstärkten Ca^{2+}-Strom der L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle. Zudem kommt es bei repetitiver Stimulation zu einer verzögerten Inaktivierung der Kanäle (Yuan et al. 1994). Weiterhin erhöht die CaMKII die Offenwahrscheinlichkeit der T-Typ- Ca^{2+}-Kanäle (Wolfe et al. 2002).

Auch die Na^{+}-Kanäle sind Ziel der CaMKII. Die diabetesbedingte gesteigerte CaMKII-Aktivität führt zu einer Reihe an Veränderungen der Na^{+}-Kanäle, die zusammen genommen in einer Verlängerung des APs und einer intrazellulären Na^{+}-Überladung enden (Glynn et al. 2015).

Bezüglich der K^{+}-Kanäle muss zwischen einer akuten und einer chronischen CaMKII-Aktivitätserhöhung differenziert werden. So steigert diese zwar kurzfristig die Leit- oder Transportkapazität der spannungsgesteuerten, der einwärtsgerichteten- und der Ca^{2+}-abhängigen K^{+}-Kanäle, eine chronische Steigerung führt jedoch zu einer verminderten Aktivität und Expression (Hegyi et al. 2019), die somit in der diabetischen Kardiomyopathie auftritt.

Überdies wird die RyR-Aktivität CaMKII-abhängig reguliert und neigt in diesem Zustand zu spontanen Ca^{2+}-Ausströmen (Camors et al. 2014).

Neben den veränderten Ionenkanälen konnte auch eine direkte Alteration der Kontraktionsproteine des myosinbindenden Protein C (Tong et al. 2015), Troponin I (Swiderek et al. 1990) und der leichten Kette des Myosins (Eikemo et al. 2016) nachgewiesen werden. Dies resultiert zunächst in einer erhöhten Ca^{2+}-Sensitivität, die zunächst positiv ionotrop wirkt. Offen bleibt jedoch, wie sich eine chronische Sensitivitätssteigerung auswirkt. Ein negativer Einfluss konnte jedoch klar auf die diastolische Grundspannung nachgewiesen werden. Durch CaMKII-abhängige Phosphorylierung des Titins ist dies in seiner Elastizität pathologische verändert (Hamdani et al. 2013, Hidalgo et al. 2013). Gepaart

mit der endothelialen Dysfunktion münden all diese Prozesse in einer Veränderung der Binnenstruktur im Sinne einer Fibrosierung. Die folglich geminderte Dehnbarkeit der Ventrikel und die erschwerte Füllung treiben die diastolische Funktionsstörung konstant voran. Erschwerend kommt hinzu, dass eine diabetisch bedingte Denervierung der Barorezeptoren zu einer generalisierten Aktivierung des Sympathikus führt (Bisognano et al. 2000, Pappachan et al. 2008, Jia et al. 2016), die, wie bereits erläutert, mit den frequenzbedingten Einschränkungen der kardialen Versorgung während der Diastole einhergeht.

Zusammenfassend finden sich in der HF und in der diabetischen Kardiomyopathie ähnliche pathologische Veränderungen auf zellulärer Ebene.

1.4 Der Wirkstoff Empagliflozin

Empagliflozin ist ein orales Antidiabetikum. Seit 2014 ist es zugelassen für die Behandlung des DM2. Es kann als Monopräparat oder als Kombination mit gängigen Antidiabetika verabreicht werden.

Empagliflozin gehört zu den selektiven Natrium-Glukose-Kotransporter-2- (*Sodium-Glucos-Cotransporter* 2-; SGLT2-) Inhibitoren. Es wird zur Gruppe der Gliflozine gezählt und ist strukturell eng verwandt mit den Wirkstoffen Dapagliflozin und Canagliflozin. Es existieren zwei Isoformen, der SGLT1 und SGLT2. Während der SGLT1 vornehmlich in der Leber, Lunge, Niere, dem Herzen und Dünndarm vorkommt, beschränkt sich die SGLT2-Expression hauptsächlich auf die Niere (Ferrannini 2017). Dort findet sich der SGLT2 im frühproximalen Tubulus der Niere und ist mit einem Anteil von 90% maßgeblich an der Rückresorption von Glukose aus dem Primärharn verantwortlich. Im Kotransport mit einem Molekül Na^+-transportiert der SGLT2 ein Molekül Glukose in die Zelle, von wo aus die Glukose über einen Glukosetransporter ins Blut diffundiert.

Empagliflozin inhibiert den Transporter und es kommt zu einer vermehrten Glukoseausscheidung über den Harn, wodurch konsekutiv eine Senkung des Blutglukosespiegels um bis zu 30mg/dl erreicht wird. Dadurch kann eine HbA1c-Senkung um ca. 1% erzielt werden, im Rahmen der EMPA-REG-Studie bedeutete dies eine Reduktion von im Mittel 8,1% auf 7,3% (Zinman et al. 2015). Überdies lassen sich auch Veränderungen anderer Werte unter Empagliflozintherapie beobachten, die maßgeblich für das kardiovaskuläre Risikoprofil sind. Das Gewicht nimmt im Mittel um 1-2 kg ab (Liakos et al. 2014) und der systemische Blutdruck sinkt um etwa 4-6mmHg (Tikkanen et al. 2015, Zinman et al. 2015).

Laut der European Medicine Agency (EMA/32946/2017) beträgt die mittlere Halbwertszeit 12,4 Stunden. Die klinisch gewählte Dosis zur Eindosierung beträgt 10mg und kann im Verlauf auf 25mg erhöht werden. Dies entspricht in etwa einer Blutkonzentrationen von 0,6µM.

1.5 Aktuelle Studienlage zu Beginn dieser Arbeit

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine strenge Kontrolle des Blutglukoselevels mit einer Senkung des Herzinfarktrisikos einhergeht, jedoch keinen Effekt auf die kardiovaskuläre Mortalität oder Herzinsuffizienz-Prävalenz aufweist (Stratton et al. 2000, Gerstein et al. 2008).

Aufgrund der bekannten Komorbidität werden neue Diabetesmedikamente auch speziell hinsichtlich ihres kardiovaskulären Risikoprofils getestet. Für die standardisierte Bewertung wird häufig der Dreikomponenten Major Adverse Cardiac Events (kurz MACE) Endpunkt gewählt. Dieser beinhaltet die Endpunkte kardiovaskulärer bedingter Sterbefälle, nicht-tödlicher Myokardinfarkt und nicht-tödlicher Schlaganfall (Hicks et al. 2018).

Als kardiovaskulär sicher gelten folgende zwei Substanzklassen. Zum einen die Glucagon-Like-Peptide-1- (GLP1-) Rezeptorantagonisten (Pfeffer et al. 2015, Marso et al. 2016) und zum anderen die Gliptine (DPP-4-Inhibitoren) (Scirica et al. 2013, White et al. 2013, Green et al. 2015). Die für letztere in der „Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus"- (SAVOR-TIM-53-) Studie gezeigt erhöhte Hospitalisierungsrate in Bezug auf Herzinsuffizienz (Scirica et al. 2015), ließ sich in der „Cardiovascular Outcomes Study of Alogliptin in Patients With Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome"- (EXAMINE-)Studie (White et al. 2013) zwar als signifikante Tendenz reproduzieren, war in der „Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin"- (TECOS-) Studie (Green et al. 2015) hingegen nicht mehr nachweisbar.

Für die Insulin-Sensitizer existieren ebenfalls widersprüchliche Daten. Die durch die „A Randomized Trial of Therapies for Type 2 Diabetes and Coronary Artery Disease"- (BARI-2D-) Studie nachgewiesene Sicherheit (Damluji et al. 2017), konnte durch die „UK Prospective Diabetes Study Group"- (UKPDS-33) und die „Outcome Reduction with an Initial Glargin Intervention"- (ORIGIN-) Studie nicht bestätigt werden (Stratton et al. 2000, Gerstein et al. 2018). Weitere Studien zeigten zwar eine Reduktion des MACE-Risikos und eine ähnlich hohe Mortalität, gingen dann jedoch mit einer erhöhten Hospitalisierungsrate einher (Dormandy et al. 2005).

Als 2015 die EMPA-REG-Studie veröffentlich wurde (Zinman et al. 2015), zeigte sich, dass verglichen mit einem Placebo Empagliflozin nicht nur bezüglich der kardiovaskulären Sicherheit deutlich überlegen war, sondern auch die Gesamtmortalität und die Notwendigkeit zur stationären Behandlung herzinsuffizienter Patient:innen durch eine Behandlung mit Empagliflozin deutlich reduziert wurde. Insgesamt wurden 7020 Patient:innen im Mittel 3,1 Jahre beobachtet, wobei die Interventionsgruppe zusätzlich zur Standarttherapie täglich 10mg oder 25mg Empagliflozin und die Kontrollgruppe ein Placebo erhielt. Als primären Endpunkt wurden die 3 Komponenten des MACE-Risikos definiert, als sekundären Endpunkt wurden die Hospitalisierungsraten aufgrund von Symptomen einer

Herzinsuffizienz festgesetzt. Bemerkenswerterweise zeigten sich die positiven Effekte bereits innerhalb der ersten drei Monate nach Start der Empagliflozinbehandlung.

Gleichzeitig verdichtete sich die Datenlage, die einen Klasseneffekt der Gliflozine suggerierte. Die „Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes"- (CANVAS-) Studie (Mahaffey et al. 2019) zeigte eine Canagliflozin-bedingte signifikante Reduktion des MACE-Risikos (Neal et al. 2017) und auch die „Comparative Effectiveness of Cardiovascular Outcomes in New Users of SGLT-2 Inhibitors"- (CVD-REAL-) Studie postulierte eine signifikant verringerte Rate and stationären Behandlungen herzinsuffizienter Patient:innen und Gesamt-Todesfallrate beim Vergleich der SGLT2-Inhibitoren mit anderen oralen Antidiabetika (Kosiborod et al. 2017).

Doch Veränderungen des HbA1c, des Blutdrucks und der Cholesterinspiegel, klassische CV-Risikofaktoren, konnten die Gesamtverbesserung nicht ausreichend erklären (Fitchett et al. 2017, Zinman et al. 2017). Zudem konnte die MACE-Risikoreduktion eGFR-unabhängig beobachtet werden, obwohl die glukosesenkende Wirkung Empagliflozins eGFR-abhängig auftrat (Wanner et al. 2018). Dies bestärkt die Vermutung, dass die CV-Risikoreduktion zumindest teilunabhängig von der glukosereduzierenden Wirkung auftritt.

Insgesamt wurde jedoch stärker auf die systemischen Veränderungen und deren positiven Einfluss auf die kardiale Leistung fokussiert und weniger auf mögliche direkte kardiale Effekte.

Dies mag zu großen Teilen auch daran liegen, dass der SGLT-2 nicht an Kardiomyozyten vorkommt (Mustroph et al. 2019), also keine offensichtliche Verbindung des Wirkstoffs zum Herzmuskel besteht. Der SGLT-1 jedoch ist auf Kardiomyozyten zu finden (von Lewinski et al. 2010). Ein möglicher Effekt über letzteren kann zwar erwogen werden, erscheint jedoch bei einer über 2500-mal stärkere Selektivität Empagliflozins für den SGLT-2 (Grempler et al. 2012) bei den klinischen Plasmakonzentrationen als eher unwahrscheinlich.

Als mögliche Erklärung für die früh sichtbaren Effekte Empagliflozins wurde der pro-diuretischen Effekt diskutiert. Die vermehrte Glukoseausscheidung wirkt aufgrund osmotischer Eigenschaften synergistisch mit anderen Diuretika, gleichzeitig wird während der Frühphase der Therapie auch die Rückaufnahme von Na^+ im Symport mit Glukose inhibiert und es kommt zur vermehrten Na^+-Ausscheidung (Cherney et al. 2014, Tanaka et al. 2017). Konsekutiv kommt es zu einem verminderten extrazellulären Volumen, also einer reduzierten Vorlast, eine direkte Stellgrößen der kardialen Belastung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die SGLT2-Inhibitortherapie von keiner reflektorischen sympathischen Aktivierung wie die Thiazid- oder Schleifendiuretika begleitet werden (Wan et al. 2018). In einer Mediationsanalyse der EMPA-REG-Studie konnte in etwa die Hälfte der kardiovaskulären Outcomeverbesserung der intravasalen Wasserreduktion, sichtbar in Form eines gesteigerten Hämatokrits, zugeschrieben werden (Inzucchi et al. 2018a), ein Effekt, der auch für verwandte Wirkstoffe der SGLT2-Inhibitorklasse nachweisbar war (Lambers Heerspink et al. 2013).

SGLT2-Inhibitoren zeigten in mehreren Studien einen geringen senkenden Effekt auf den Blutdruck (Mazidi et al. 2017). Der verringerte intrakardiale Füllungsdruck und die reduzierte Nachlast führen zu einer besseren Durchblutung des Endokards, sowie reduziertem kardialen Stress (Verma 2019).

Weiterhin zeigte sich, dass wenige Wochen nach Beginn einer Therapie mit Empagliflozin eine Reduktion des zentralen systolischen Blutdrucks und weitere Parameter, die als Marker für arterielle Steifigkeit gelten, zu beobachten war (Striepe et al. 2017).

Neben den das vaskuläre System betreffenden Faktoren fanden auch Überlegungen zu metabolischen Veränderungen Eingang in die Debatte, insbesondere der Metabolismus der Kardiomyozyten. Im gesunden Herzen wird 90% der der ATP-Produktion durch die Oxidation von Fettsäuren und Kohlenhydraten generiert. Bei DM-Patient:innen ist die Fähigkeit flexibel auf metabolische Veränderungen zu reagieren eingeschränkt und es kommt zu einer stärkeren Gewichtung zugunsten der Energiegewinnung aus Ketonkörpern und verzweigtkettigen Aminosäuren (Verma 2019). SGLT-2-Inhibitoren führen zu einem leichten Anstieg von Ketonkörpern. Dies gilt sowohl für DM und nicht an Diabetes erkrankte Patient:innen. Eine Anpassung des myokardialen Stoffwechsels hin zu einer energieeffizienteren Verwertung der Ketonkörper könnte ebenfalls zu einer verbesserten Herzleistung führen (Kappel et al. 2017, Verma et al. 2017).

Überdies wurde eine kardiale Beeinflussung über die kardiale Na^+--Wasserstoff-Austauscher (NHE1)-Aktivität bedacht (Baartscheer et al. 2017). In der Herzinsuffizienz konnte eine verstärkte NHE1-Aktivität nachgewiesen. Die dadurch erhöhten Na^+- und Calciumlevel führen zu vermehrtem Myozytenstress und der Entwicklung einer Kardiomyopathie (Packer et al. 2017). Dementsprechend könnte eine Inhibition des NHE kardioprotektiv wirken.

Das Herz wurde im Zuge der wissenschaftlichen Diskussion somit immer wieder als Profiteur von systemischen Wirkketten in den Fokus gerückt, es fanden jedoch keine weitergehenden Studien bezüglich einer direkten kardialen Wirkung statt.

Das Ziel dieser Arbeit war daher eine Evaluation möglicher pleiotroper Effekte Empagliflozins auf murines und humanes Myokard.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebe

Alle Experimente wurden gemäß der Declaration of Helsinki und nach NIH Guidelines (Guides for he Care and Use of Laboratory Animals) und gemäß den Richtlinien der Directive 2010/63/EU des Europäischen Parlaments zum Schutz von Tieren, die zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden, durchgeführt. Für die Entnahme und Verwendung humanen Gewebes liegen positive Voten der Göttinger Ethik-Kommission mit Einverständniserklärung der Patient:innen vor.

2.1.1 Humanes Gewebe

Die sezierten Muskelstreifen wurden dem rechten Ventrikel explantierter Herzen entnommen. Die explantierten Herzen entstammen einer Kooperation mit dem Transplantationszentrum Bad Oeynhausen. Nach Entnahme der explantierten Herzen wurde diese in der kardioplegen Lösung Custodiol transportiert (Sossalla et al. 2010a, Fischer et al. 2013). Ventrikuläres Myokard wurde aus 19 explantierten Herzen von Patient:innen im Endstadium des Herzversagen gewonnen.

2.1.2 Murines Gewebe

Für die Tierversuche liegen positive Voten der Ethik-Kommission unter dem Aktenzeichen 14/9/11 vor. Sie erfolgte gemäß der NIH Richtlinien (Guide fort he Care and Use of Laboratory Animals) und den Richtlinien 2010/63/EU des Europäischen Parlaments zum Schutze der wissenschaftlich verwendeten Tiere und wurden genehmigt unter dem Aktenzeichen 31/9/00 „Funktionelle, biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von Gewebeproben aus explantierten menschlichen Herzen“. Es wurden Mäuse vom diabetischen Typ (db/db) und nicht-diabetischen Typ (Wiltyp der Mauslinie deltaC) verwendet.

Die verwendeten Herzmuskelpräparate stammen von Tieren verschiedener Altersgruppen, genetischen Hintergrunds und männlichen und weiblichen Geschlechts.

Für das nicht-diabetischen Mausmodell wurden Wildtypen (WT) der deltaC-Mausreihe des Zuchtstammes C57B6/J der Zentralen Tierexperimentellen Einheit (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen verwendet.

Für das diabetische Tiermodelle wurden übergewichtige, an Diabetes erkrankte Mäuse (BKS.Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J) genutzt. Hierbei kommt durch das *db*-Gens zu einer G-zu-T-Punktmutation in den Genen Dock7 und Lepr, die physiologischerweise Proteine für den Leptinrezeptor und die Leptinsignaltransduktion kodieren (Chen et al. 1996). Leptin ist ein Zytokinrezeptor für das Hormon der Fettzellen Leptin und ist an der Regulation von

Hunger, dem Energiemetabolismus und Gewicht beteiligt (Nordström et al. 2013). Veränderte Rezeptoren konnten bei Menschen mit Adipositas assoziiert werden (Considine et al. 1996, Masuo et al. 2008). Mäuse, mit dysfunktionalem Leptinrezeptor, zeigen eine chronische Hyperphagie und folglich starke Gewichtszunahme mit konsekutiv erhöhten hohen Leptin- und Insulinspiegeln. Sie dienen daher als Modelle für Studien zu Adipositas, Diabetes und Dyslipidämien (Sharma et al. 2003).

Diese als Diabetesmodell etablierten Mäuse zeigen ab dem 10 bis 14. Lebenstag erhöhte Insulinlevel, zwischen der vierten bis achten Woche steigen die Blutzuckerspiegel. Im Verlauf zeigen die Mäuse typische Diabetessymptome wie Polydipsie, Polyurie und Polyphagie (Hummel et al. 1966). Bei dem verwendeten $Lepr^{db}$-Stamm zeigen sich zudem die für diese Arbeit wichtige dysfunktionale myokardiale Komponente. Mit einem Alter von 16 Wochen ist die linksventrikuläre Steifigkeit voll ausgeprägte (Hamdani et al. 2014). Für die Experimente dieser Arbeit wurden 20 Tiere im Alter zwischen 12 und 14 Wochen verwendet. 9 waren weiblichen und 11 männlichen Geschlechts.

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Lösungen

Insgesamt wurden fünf spezielle Lösungen benötigt. Als Basis diente die Krebs-Henseleit-Lösung (KHS-Lösung) in unterschiedlich konzentrierter Form. Verdünnt und angereichert mit unterschiedlichen Stoffen diente sie zum einen als Lösung während des Schrittes der Präparation der Muskeltrabekel (als sog. Dissektionslösung), sowie als Lösung für die Kontraktilitätsexperimente selbst. Die Konzentration der Elektrolyte entspricht dabei annährend der physiologischen Konzentration.

2.2.1.1 Krebs-Henseleit-Lösung

Für die im Folgenden beschriebene Krebs-Henseleit-Lösung (KHS-Lösung) wurde zunächst eine 10-fach konzentrierten Stammlösung (KHS-10x) hergestellt.

Zur Produktion eines Liters der Stammlösung benötigt man die in Tabelle 1 zusammengefassten Stoffe.

Tabelle 1 Zusammensetzung der Stammlösung

Bezeichnung	**Konzentration**	**Menge für 1l Stammlösung**
Aqua bidestilliert		auf 1 l
Natriumchlorid	116,1 mM	67,8 g

Kaliumchlorid	5,0 mM	3,73 g
Natrium-di-Hydrogenphosphat	2,0 mM	2,76 g
Magnesiumchlorid	1,2 mM	2,44 g
Natriumsulfat	1,2 mM	1,70 g

Zur Herstellung der 1-fach konzentrierten KHS-Lösung (1x-KHS) wurde die 10x-KHS entsprechend Tabelle 2 verdünnt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der 1x-KHS

Bezeichnung	**Konzentration**	**Menge für 1l Stammlösung**
Aqua bidestilliert		900 ml
10x-KHS		100 ml

2.2.1.2 Dissektionslösung (BDM-Lsg.)

Bei der Präparation wurde eine mit 2,3-Butanedion-Monoxim (BDM) angereicherte 1x-KHS-Lösung benutzt. Unter Anwesenheit von BDM werden die Ca^{2+}-Bindungsstellen von Troponin C und der Ca^{2+}-Kanäle blockiert und so die Kontraktionsfähigkeit der Muskelstreifen inhibiert (Gwathmey et al. 1991). Die Hemmung der elektromechanischen Kopplung verhindert die Kontraktion, sodass der Sauerstoffbedarf des Myokards gesenkt wird.

Durch die vorherige Aufsättigung der Dissektionslösung mit einem Carbogen-Gemisch, bestehend zu 95% aus Sauerstoff (O2) und zu 5 % aus Kohlendioxid (CO2), war eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet. Das Kohlendioxid und das Hydrogencarbonat bilden ein offenes Puffersystem, sodass der pH-Wert der Lösung konstant gehalten wurde.

Die zur Herstellung der BDM-Lsg. benötigten Materialien sind folgend in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Dissektionslösung

Bezeichnung	**Konzentration**	**Menge**
10x-KHS		100ml
D-Glukose	10,0 mM	1,8 g
Natriumhydrogencarbonat	20,0 mM	1,7 g
2,3-Butanedione-Monoxime (BDM)	20,0 mM	2,0 g
1 mol/l Kalziumchlorid in Wasser	0,2 mM	250 µl
Aqua bidestilliert		Auf 1 l

Alle Lösungen wurden bei 5°C in geschlossenen Glasflaschen gelagert. Die BDM-Lsg. und 1x-KHS wurden dabei maximal drei Tage nach Herstellung verwendet.

2.2.1.3 DMSO-Lösung

DMSO dient als Träger für Empagliflozin. Um mögliche auftretende Effekt ausschließlich auf Empagliflozin zurückführen zu können, durften sich die für die Interventionsgruppe als auch für die Kontrollgruppe benutzten Lösungen bis auf das Empagliflozin nicht unterscheiden. Die Kontrolllösung (DMSO-Lsg.) wurde daher, wie in Tabelle 4 dargestellt, so mit DMSO aufgesättigt, dass sie der Empagliflozinlösung entsprach.

Im Zuge der Wash-Out-Versuche war es notwendig, das sich im System befindliche Empagliflozin auszuwaschen. Dafür wurde eine Wash-Out-Versuchslösung (WO-Lsg.) hergestellt, die mit DMSO und Ca^{2+} so aufgesättigt war, dass sie den Endkonzentrationen der Kontrollkonzentrationsreihe (humane Proben 10µM, murine Proben 0,5µM) entsprach. Vor Verwendung wurde sie mit Carbogen begast und auf 37°C erwärmt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der DMSO-Lösung für die Wash-Out-Versuche

Bezeichnung	**Menge**
1x-KHS	100 ml
DMSO	450 µL
1 mol/l Kalziumchlorid in Wasser	150µL

2.2.1.4 Custodiollösung

Die für den Transport und den Präparationsprozess verwendete Custodiollösung wurde von der Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Deutschland (Nummer 1414711) bezogen.

2.2.1.5 Empagliflozinlösung

Um das als reinen Wirkstoff gelieferten Empagliflozin verwenden zu können, wurde zunächst eine Lösung mit einer Konzentration von 1µMhergestellt. Hierzu wurde 22.18ml DMSO-Lösung 0,01g Empagliflozin hinzugefügt.

Die für die Experimentreihen benötigte schrittweise Aufdosierung von 500µM wurden unter Hinzugabe von 25 µl der 1µM-Lösung zu 50ml Krebs-Henseleit-Lösung erreicht.

2.2.2 Aufbau der Versuchsanlage

Die Versuchsanlage bestand aus zwei analog aufgebauten, geschlossenen Kreisläufen. Die Muskelpräparate wurden in einem Organbad zwischen einen mit einer Mikrometerschraube verbundenen Haken und einer Drahtöse, die mit einem Kraftaufnehmer (KG3, Scientific Instruments, West Palm Beach/USA) verbunden war, eingehängt.

Das Präparat wurde kontinuierlich von Lösung umspült. Diese zirkulierte von einem 100ml-fassende Reservoir durch eine erwärmbare Glasspirale zum Organbad und zurück in das Reservoir.

Verbunden waren die einzelnen Systemkomponenten über Zu- und Ablaufschläuchen. Eine Rollenpumpe (Reglo, Firma Ismatec, Wertheim-Mondfeld) gewährleistete das konstante Zirkulieren der Lösung. Durch die Doppelwände mit dazwischen liegendem Raum, ließen sich die Reservoirs und die Glasspirale mit Wasser umspülen und so Einfluss auf die Temperatur der zirkulierenden Lösung nehmen. Die Schlauchlängen war minimal, um einen Temperaturverlust möglichst gering zu halten. Das umspülende Wandwasser wurde in einem separaten Wasserbad zunächst auf 40,5°C erwärmt, sodass die Versuchslösung bei Erreichen des Organbads physiologische 37°C aufwies.

Die Reservoirs wurden zudem mit Wachsfolie abgedichtet, um ein Verdunsten und eine dadurch bedingte Minderung des zirkulierenden Volumens zu verhindern. Die Versuchslösung wurde im Reservoir durchgehend mit Carbogen begast, sodass ein ausreichender Sauerstoffgehalt und ein konstanter pH sichergestellt waren.

Im Organbad wurde die Feldstimulation parallel zur Längsachse des Muskelpräparats ausgerichtet. Die beidseits installierten Platinelektroden waren mit einem Stimulator (Firma Scientific Instruments, West Palm Beach/USA) verbunden.

Für eine optimale Sicht diente ein Mikroskop mit bis zu 3-facher Vergrößerung und integrierter Messskala in einem Okular, sowie eine flexible Lampe.

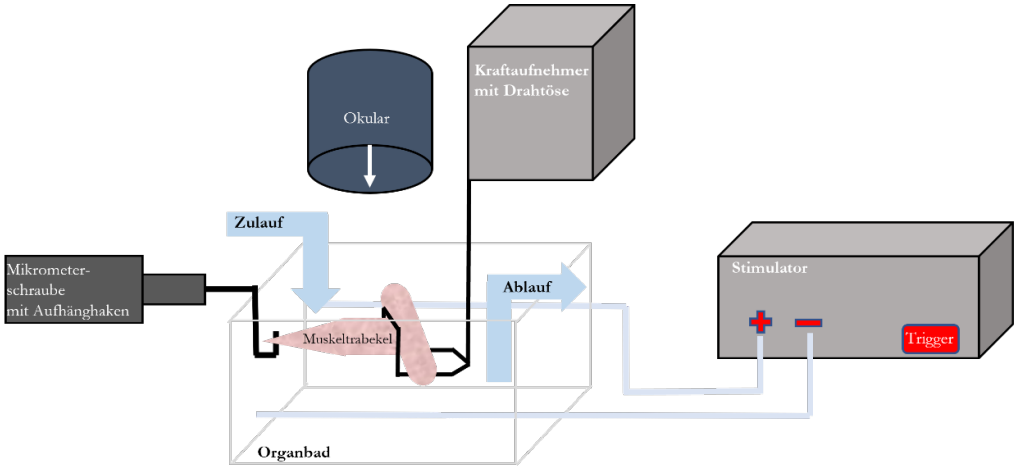

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Der präparierte Herzmuskeltrabekel wurde zwischen Aufhängehaken und Drahtöse eingespannt. Es wurde kontinuierlich von Lösung umspült, die vom Zulauf zum Ablauf floss. Über die Mikrometerschraube ließ sich die Spannung des Muskelpräparats regulieren. Die Drahtöse war mit dem Kraftaufnehmer verbunden, sodass eine kontinuierliche Messung der Kontraktionsparameter möglich war. Ein parallel zur Längsachse des Präparats ausgerichtete Feldstimulation sorgte für den Kontraktionsstimulus. Über ein Okular war eine genaue Aufsicht möglich.

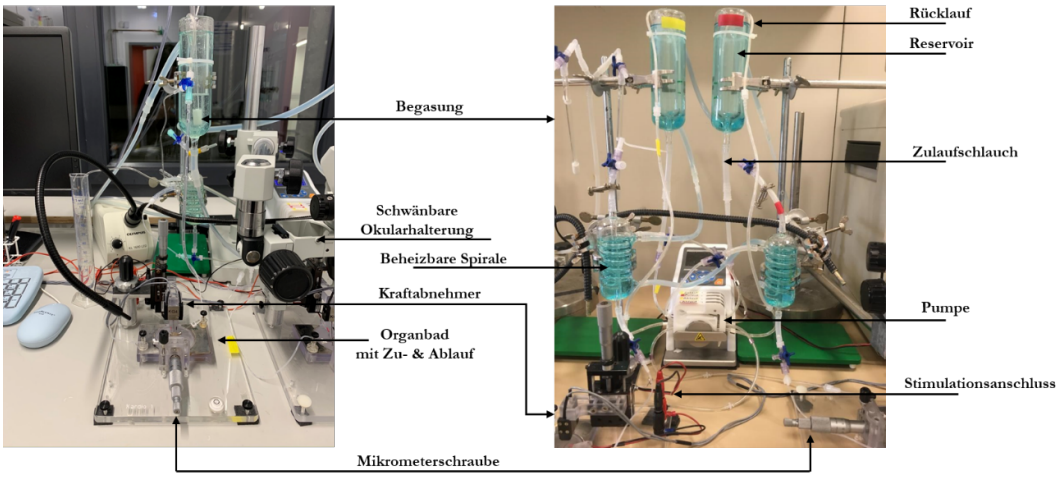

Abbildung 3: Versuchsanlagen der Kontraktilitätsexperimente. Die Lösung zirkuliert, angetrieben durch die zwischengeschaltete Pumpe, vom Reservoir über den Zulaufschlauch durch die beheizbare Glasspirale zum Organbad. Dort ist das Muskelpräparat zwischen einem mit der Mikrometerschraube verbundenen Haken und einer Drahtöse, über die der Kraftabnehmer die Kontraktionsparameter misst, eingespannt. Die Lösung zirkuliert vom Organbad über den Rücklaufschlauch zurück ins Reservoir. In diesem findet eine kontinuierliche Begasung mit Carbogen statt. Das Reservoir und die Glasspirale sind doppelwandig und können von erwärmter Lösung durchspült werden, sodass die Temperatur, der sich im System befindliche

Versuchslösung reguliert werden kann. Auf dem rechten Bild sind zwei Anlagen abgebildet. Die Pumpe treibt hierbei beide Systeme parallel an, die Kreisläufe bleiben jedoch streng voneinander getrennt.

2.3 Vorbereitung

Zu Beginn wurden alle benötigten Utensilien (Präparierbesteck, verschließbarer Behälter mit BDM-Lsg, Injektionsnadel, Clip) bereitgelegt. Zudem wurde die Versuchsapparatur mit jeweils 100ml 1x-KHS-Lösung befüllt und die Begasung und Erwärmung gestartet. Vor Installation der Muskelpräparate wurde so das Erreichen einer Homöostase des pHs, der Gaskonzentrationen und der Temperatur gewährleistet und optimale, über die einzelnen Experimente hinweg konstante, Versuchsbedingungen geschaffen.

2.3.1 Murines Gewebe

Gemäß § 4 Abs. 3 TierSchG wurde die Tötung der Tiere zur Entnahme von Gewebe für wissenschaftliche Zwecke der Bezirksregierung in Braunschweig dem Aktenzeichen T2/08 und dem Titel „Funktionelle Untersuchung an Herzmuskelzellen von Mäusen“ angezeigt.

Die Narkotisierung erfolgte in einem geschlossenen Glasbehälter mit Isofluran Gas (Forene, Firma Abbott, Illinois/USA), woraufhin die Tiere in Narkose durch zervikale Dislokation getötet wurden.

Anschließend wurde das Abdomen durch einen rippenbogennahen Schnitt eröffnet, das Zwerchfell durchtrennt und die Rippen beidseits in der Medioclavicularlinie bis zur Clavicula durchtrennt. Der durch eine Klemmschere fixierte Processus Xyphoideus wurde nach kranial geklappt und der daran fest gewachsene Herzbeutel vorsichtig durchtrennt, sodass gute Sicht auf das Herz und ein einfacherer Zugang zu diesem gewährleistet waren. Die Gefäße wurden herznah mit einer Pinzette gehalten und oberhalb dieser durchtrennt. Das explantierte Herz wurde direkt in einen mit gekühlter BDM-Lsg. befüllten verschließbaren Behälter überführt und ohne Zeitverzögerung zum Präparationsarbeitsplatz gebracht.

Dort wurde das Herz in eine Plastikschale mit Silikonbett überführt, die ebenfalls mit BDM-Lsg. befüllt war. Über den Aortenstumpf erfolgte die Fixierung auf einer Injektionsnadel. Durch Perfusion mit Dissektionslösung wurde das verbliebene Blut der Herzkammern ausgewaschen und diese gereinigt und gleichzeitig das Herz in der Plastikschale fixiert.

Weitere benötigte Materialien waren Mikropinzetten und -scheren. Die Eröffnung des Herzens erfolgte unter Sicht mit einem Stereomikroskop. Unter Erhalt und orientierend an den anatomischen Strukturen wurde die Vorderwand des rechten Ventrikels von der Pulmonalarterie hin zur Herzspitze aufgeschnitten. Sie wurde anschließend beiseite geklappt, sodass sich die für die Versuche benötigten Papillarmuskeln dargestellten.

Wie in Abbildung 4 gezeigt, wurden diese präpariert. Vorteilhaft war eine T-förmige Präparation an der Basis und ein Erhalt der Papillarsehenfäden. Dabei war eine möglichst atraumatische Präparation, das heißt eine möglichst geringe Irritation in Form von Dehnen

oder Quetschen, von größter Wichtigkeit. In der Regel konnten pro Herz zwei rechtsventrikuläre Papillarmuskeln gewonnen werden.

Das Perfusionssystem wurde vor Überführung der Muskelstreifen in das Organbad gestoppt. Das Präparat wurde möglichst atraumatisch zwischen Mikrometerschraube und Kraftaufnehmer so eingehängt, dass der Streifen zwar fixiert, jedoch nicht gedehnt war. Dabei wurden die Sehnenfäden durch die Öse gefädelt, sodass die T-förmige breite Basis als Widerlager funktionierte und der Muskelstreifen fixiert wurde. Die Sehnenfäden dienten dann als vorderer Aufhängepunkt am Haken.

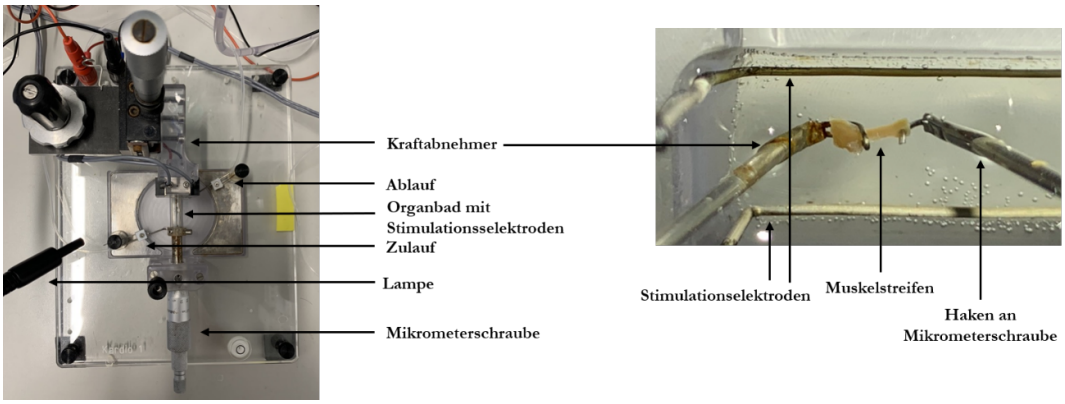

Abbildung 4: Beschriftetes Foto des Organbadabschnittes der Versuchsanlage. Gezeigt ist eine Aufsicht auf das Organbad. Der Muskelstreifen wurde zwischen Haken und Öse eingespannt. Parallel zur Längsachse der Probe war die Stimulation ausgerichtet. Die Lösung floss vom Zulauf zum Ablauf. Über die Mikrometerschraube konnte die Dehnung reguliert und über den Kraftabnehmer die Kontraktionskräfte gemessen werden.

Das bereits wie beschrieben vorbereitete Perfusionssystem wurde gestartet, die ersten 50ml des Perfusats jedoch verworfen, um das in der Dissektionslösung enthaltenen BDM aus dem System zu entfernen. Die Streifen wurden vermessen und deren Größen im Protokoll notiert und in das Programm LabView eingetragen. Während des Experiments zirkulierten die verbliebenden 50ml der Lösung kontinuierlich im System. Die Muskelstreifen wurden mit Hilfe der Feldstimulation im Organbad mit einer Frequenz von 4Hz stimuliert. Die Ca^{2+}-Startkonzentration von 0,25µM in der zirkulierenden Lösung wurde schrittweise alle 3 Minuten um je 0,25µM angehoben, bis die für murines Gewebe annähernd physiologische Endkonzentration von 1,25µM erreicht war. Während dieses Prozesses fing das Muskelpräparat an zu kontrahieren.

Tabelle 5: Ca^{2+}-Aufsättigung murinen Myokards. Angegeben ist die pro Schritt und Zeitpunkt hinzugegebene Menge und daraus resultierende Ca^{2+}-Konzentration der Lösung

Schritt	Zeit [min]	Hinzugefügte Menge [µl] in 50ml KHS-Lösung	Ca^{2+}-Konzentration in Lösung [mM/l]
0	0	0	0,25
1	3	12,5	0,5
2	6	12,5	0,75
3	9	12,5	1,0
4	12	12,5	1,25

In den folgenden interventionsfreien 10 Minuten konnte der Streifen sich bei geringer Vorlast (diastolische Spannung 0,1mN/mm2) an das Milieu adaptieren.

Durch langsames Drehen an der Justierschraube wurde anschließend bis zur Länge Lmax gedehnt. Basierend auf dem Frank-Starling Mechanismus ist die bei Lmax entwickelte Kraft maximal und wurde in der Regel bei einer diastolischen Spannung von ca. 2,5 mN/mm² bis 5,5 mN/mm² erreicht. Hierbei wurde jeweils bei einem Zuwachs der systolischen Kraft um +1 mN/mm² eine 30 Sekunden lange Dehnungspause eingehalten.

Um eine Stabilisierung der Kontraktionskraft zu sichern (steady-state), wurden 10 Minuten bei nun optimaler Vordehnung abgewartet.

2.3.2 Humanes Gewebe

Zunächst wurde aus dem explantierten Herzen apexnah aus dem rechten Ventrikel ein geeignetes, rosiges Stück Myokard herausgeschnitten und in eine mit Custodiol befüllte Plastikschale gelegt. Dort wurde es mit zwei bis drei Nadeln fixiert. Unter Sicht durch das Binokular wurden anschließend zwei möglichst isoliert verlaufende ventrikuläre Trabekel präpariert. Auch für das humane Gewebe wurde eine T-förmige Basis gewählt, das vordere Ende wurde jedoch nach Möglichkeit mit einem Schnitt glatt durchtrennt. Kriterien für die Auswahl waren eine möglichst rosige Farbe, augenscheinlich wenig fibröses Gewebe in naher Umgebung, sowie nicht vorhandene Verwachsungen. Bei der Präparation wurde eine Dehnung oder Stauchung vermieden.

Die Muskelstreifen wurden umgehend in das Organbad überführt. Die Entfernung des mitüberführten Custodiols erfolgte analog zu der Dissektionslösung bei der Verwendung muriner Präparate. Der Streifen befand sich nun in dem Organbad, umspült von 50ml zirkulierender, begaster und beheizter Versuchslösung.

Es erfolgte die Vermessung und Notierung der Präparatsgröße. Anschließend wurde die Stimulation mit 1Hz begonnen. Die Amplitude wurde bei 5,8A eingestellt.

Es erfolgte der Ca^{2+}-Konzentrationsaufbau der Versuchslösung nach folgendem Schema:

Tabelle 6: Ca^{2+}-Aufsättigung im humanen Myokard.

Schritt	Zeit [min]	Hinzugefügte Menge [µl] in 50ml KHS-Lösung	Ca^{2+}-Konzentration in Lösung [mM/l]
0	0	0	0,25
1	3	12,5	0,5
2	6	12,5	0,75
3	9	12,5	1,0
4	12	12,5	1,25
5	15	12,5	1,5
6	18	12,5	1,75
7	21	12,5	2,00

Während dieses Prozesses fing das Muskelpräparat an zu schlagen.

In der folgenden Adaptionsphase von 10 Minuten konnte der Streifen sich bei geringer Vorlast (diastolische Spannung 0,1mN/mm2) stabilisieren. Wie bei murinen Präparaten wurde die humanen Streifen bis Lmax gedehnt. Dies wurde meist bei einer diastolischen Spannung von ca. 2,5 mN/mm^2 bis 5,5 mN/mm^2 erreicht. Vor Beginn des Versuchsprotokolls wurden 10 Minuten bei nun optimaler Vordehnung abgewartet bis der Steady-State erreicht war.

2.4 Empagliflozinkonzentrations-Wirkungsbeziehung

Nach zufälliger Zuordnung entweder zur Empagliflozin-Versuchsgruppe oder zur Kontrollgruppe (DMSO) wurde die Baseline registriert und die Empagliflozinkonzentration nach folgendem Schema in das Lösungsreservoir gegeben:

Tabelle 7: Schema für die Zugabe der Empagliflozin-Lösung

Schritt	Zeit (min)	Empagliflozinkonzentration im System
0	0	0 µM

1	10	0,1 μM
2	20	0,5μM
3	20	1 μM
4	40	10 μM

Analog dazu wurde bei dem Kontrollstreifen bei jedem Schritt dasselbe Volumen DMSO-Lsg. ohne Empagliflozin hinzugegeben, um mögliche unspezifische Cofounder wie beispielsweise den zeitlichen Einfluss zu erkennen.

Es wurde fortwährend mit 4Hz stimuliert und jeweils nach Erreichen eines stabilen Zustandes bei den Konzentrationsstufen die Messung registriert.

Im Zuge der Versuchsreihe des Mausmodelle zeigte sich eine zum Teil ausgeprägter Zeiteffekt, im Sinne abnehmender systolischer Kraft und diastolischer Grundspannung, sodass ein verkürztes Protokoll durchgeführt wurde, bei dem die Empagliflozinkonzentration bzw. Menge an Kontrolllösung direkt auf 0,5μM erhöht und folgend eine Wash-Out-Versuchsreihe angeschlossen wurde. Weiterhin wurde immer eine paarig gemessene Kontrolle mitgemessen, um Zeiteffekte in der Auswertung auszuschließen.

Dies ermöglichte die Effekte Empagliflozins mit der vor Hinzugabe des Wirkstoffs registrierten Grundlinie (prä- vs. post-Wash-In) und dem gepaarten Kontrollstreifen zu vergleichen.

2.4.1 Kraft-Frequenz-Beziehung in murinem Gewebe

Mit steigenden Frequenzen wird auch die Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytoplasma beschleunigt. Dies geschieht vornehmlich über eine Modulation des Phospholamban, sodass konsekutiv die SERCA-Aktivität gesteigert wird. Zum einen verkürzt sich so die Relaxationszeit und zum anderen wird so vermehrt Ca^{2+} zurück ins SR gepumpt (Maier et al. 2002). Die Kraftentwicklung unter steigenden Frequenzen kann also als indirekter Indikator für die Ca^{2+}- und Na^{+}-Homöostase der Zellen herangezogen werden. Physiologischerweise steigt bei höheren Frequenzen die Kraft an, wobei bei sehr hohen Frequenzen ab eine erneute Abnahme zu erwarten wäre.
Zu erwarten wäre zudem eine Beschleunigung der Relaxationsgeschwindigkeit bei höheren Frequenzen.

Nach Erreichen der jeweiligen Endkonzentration (0,5μM bzw. 10μM) erfolgte anschließend eine Ermittlung der Kraft-Frequenz-Beziehung (Force-Frequency-Relationship, FFR) nach in Tabelle 7 beschriebenem Schema. Hierfür wurde die Stimulationsfrequenz variiert und nach Erreichen eines stabilen Zustandes über eine Zeitspanne von einer Minute eine Messung der entwickelten Kraft vorgenommen.

Tabelle 8: Frequenzabfolge der FFR-Versuche

Schritt	Frequenz [Hz]
1	4
2	6
3	8
4	10

2.4.2 Kraft-Frequenz-Beziehung in humanem Gewebe

Das eingangs beschriebene Kraft-Frequenz-Verhalten in murinem Gewebe gilt analog auch für humanes Gewebe. Hier wäre eine Kraftabnahme ab etwa 180 Schlägen pro Minute, dh. ab einer Frequenz von 3Hz zu erwarten. Die Frequenz wurde nach Abschluss der FFR-Versuchsreihe wieder auf 1Hz eingestellt und ein Steady-State abgewartet Die Kraft-Frequenz-Beziehung wurde wie in Tabelle 8 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 9: Frequenzerhöhungsschritte der humanen Kraftfrequenz-Beziehung

Schritt	Frequenz [Hz]
1	1
2	2
3	3

2.5 Post-Rest-Versuche

Um Aussagen über den sarkoplasmatischen Ca^{2+}-Stoffwechsel und mögliche Effekte Empagliflozins treffen zu können, wurde das Kontraktionsverhalten nach Stimulationspausen (PR: *Post-Rest*, Post-Stimulationspausen) untersucht. Ca^{2+} wird wie bereits beschrieben zu Teilen durch die SERCA in das SR und über den NCX nach extrazellulär aus dem Zytosol transportiert. Die Kontraktionskraft kann hierbei als indirektes Maß für den Ca^{2+}-Gehalt des SR herangezogen werden. Durch die Messung der Amplitude der ersten Post-Rest-Kontraktion und der Bildung eines Quotienten mit der Kontraktionskraft vor der Pause, kann indirekt auf die funktionelle SR-Kapazität geschlossen werden (Bers 2002).

Hierzu wurde für die Kontraktion vor der Pause und nach der Pause jeweils die diastolische Grundspannung von der systolischen Kraft subtrahiert.

$$\frac{PostR}{Prär} = \frac{PostR_{Systole} - PostR_{Diastole}}{Prär_{Systole} - Prär_{Diastole}}$$

Formel 2: Post-Rest-Quotient. Die netto entwickelte Kraft nach der Stimulationspause, berechnet durch Subtraktion der diastolischen Spannung ($PostR_{Diastole}$) von der systolischen Kraft ($PostR_{Systole}$) wird ins Verhältnis gesetzt zur Differenz der netto entwickelten Kraft ($PräR_{Systole}$) und der diastolischen Grundspannung ($PräR_{Diastole}$) vor der Stimulationspause.

Die Basisstimulation (human 1Hz, murines Gewebe 4Hz) wurde für wie folgend beschrieben ausgesetzt und wieder begonnen. Kontrahierte ein Muskelpräparat auch ohne Stimulation wurde es aus der Auswertung herausgenommen, da so der Post-Rest-Wert verfälscht wurde.

Tabelle 10: Post-Rest-Versuchsreihe, Schema der Stimulationspausen

Schritt	Humanes Gewebe Stimulationspause [sek]	Murines Gewebe Stimulationspause [sek]
1	10	1
2	20	5
3	60	10

2.6 Wash-Out-Versuche

Für jedes System wurde separat jeweils 100ml WO-Lsg. vorbereitet. Zunächst wurde der Kreislauf unterbrochen, indem der Zulaufschlauch in ein Auffangbehälter umgeleitet wurde. Da so kein Wiederzulauf zum Reservoir mehr bestand, leerte sich dieses. Dabei wurde jeweils so viel Versuchslösung abgelassen, dass sich der Flüssigkeitsspiegel genau an der Mündung des Reservoirs zum Schlauch befand. Durch die Minimierung der Grenzfläche konnte die Vermischung von alter und frischer DMSO-Lösung reduziert werden ohne, dass Luftblasen in das Schlauchsystem gesogen wurden. Die ausgespülte Versuchslösung wurde verworfen.

Es wurden nach folgendem Schema die Werte gespeichert:

Tabelle 11: Messpunkte der Wash-Out-Versuchsreihe

Schritt	Messzeitpunkt (min)
1	0

2	7
3	10
4	15

2.7 Datenakquise

Für die Messung der entwickelten Kraft wurden die in den Organbädern installierten dünnen Drahtösen bzw. -haken mit Kraftaufnehmer des Typs KG3 (Firma Scientific Instruments, West Palm Beach/USA) verbunden. Das in ein analoges Spannungssignal umgewandelte Kraftsignal wurde über einen Brückenverstärker (Firma Scientific Instruments, West Palm Beach/USA) verstärkt und an die analog/digital Wandlerkarte Typ PCI 1200 (Firma National Instruments Corporation, Austin/USA) des Messcomputers weitergeleitet.

Es wurde die Software LabView (Firma National Instruments Corporation, Austin/USA) genutzt. Die während des Experiments erfassten und gespeicherten durchschnittlichen Werte der letzten Einzelschläge für die diastolische und systolische Kraft wurden auf die Dimensionen des Muskeltrabekels normalisiert und wurden in einer chart-Datei gespeichert, die als Überblick dient.

Zusätzlich wurde an jedem Auswertungspunkt eine Datei mit höherer Zeitauflösung erstellt, die eine genaue Auswertung der Kräfte (systolische Kraft: Tdev (mN/mm²), diastolische Kraft: Tdia (mN/mm²)) sowie die der kinetischen Daten der Kontraktion (maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (+/- df/dt in mN/mm²*s), Zeit bis zur 90%igen Relaxation (RT90%)) anhand einzelner Kontraktionskurven erlaubt.

Die so erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel® archiviert und der statistischen Verarbeitung zugeführt

2.8 Statistische Auswertung

Die Daten dieser Arbeit wurden mithilfe des Programms Graph Pad Prism (GraphPad Software, USA) ausgewertet. Sie sind als arithmetisches Mittel plus/minus Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean, SEM) angegeben.

Der Standardfehler wurde wie folgt berechnet:

$$SEM = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Formel 3: Berechnung des Standardfehlers (SEM). σ^2: Varianz; σ: Standardabweichung; n: Stichprobengröße

Bei wiederholten Messungen wurden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit Hilfe eines Zwei-Wege ANOVAS (Analysis of Variance / Varianzanalyse) analysiert und mit Hilfe eines Bonferroni-Tests bzw. einem zweiseitigen Student's t-Test auf statistische Signifikanz überprüft. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5% (Signifikanzniveau (p) < 0,5) wurden als statistisch signifikant angesehen

3 Ergebnisse

Die überraschenden Ergebnisse der EMPA-REG-Studie von 2015 warf die Frage nach direkten kardialen Effekten auf, die unabhängig von der Minimierung der diabetesbedingten Risikofaktoren auftraten. Um mögliche pleiotrope Effekte Empagliflozins auf humanes Myokard zu untersuchten, wurden Proben aus explantierten humanen Herzen, die sich im Endstadium des Herzversagens (Abbildungen im Folgenden als Human HF betitelt) befanden, mit dem Wirkstoff behandelt. Da aus ethischen Gründen eine Vergleichsversuchsreihe mit gesunden humanen Herzen nicht möglich war, wurden weitere Experimente mit murinen Herzen durchgeführt. Um analog zum Patient:innenkollektiv der EMPA-REG-Studie die Wirkung auf diabetisch vorgeschädigtes Gewebe zu untersuchen, wurden Herzen eines diabetischen Mausmodells (db/db-Mäuse) und eines nicht-diabetischen Mausmodells (deltaC-Mäuse, WT) genutzt, die beide typische Charakteristika der Herzinsuffizienz zeigten.

Wie vorranggegangen beschrieben wurde in allen Experimentreihen zunächst Konzentrationsreihen erstellt, die u.a. die klinisch relevante Dosis von 0,5µM beinhaltet, sowie niedrigere und höhere Dosen. In Abhängigkeit von der Qualität des Gewebes und des Verlaufs der zuvor durchgeführten Konzentrationsreihenversuche wurden, sofern möglich, Post-Rest-Versuche und/oder Frequenzabhängigkeits-Versuchsreihen (Force-Frequency-Versuche) angeschlossen.

Um Effekte auf die Kontraktilität von intaktem humanem Myokard zu erfassen, wurden die systolische und diastolische Kraft in mN/mm^2 gemessen. Des Weiteren wurden zur Beurteilung der Kontraktionskinetik die normalisierte Kontraktions- (+df/dt norm. in mN/mm^2*s) und die Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt in mN/mm^2*s) gemessen. Zur weiteren Beurteilung der Entspannung wurde die 90%ige Relaxationszeit (RT90% in ms) und die normalisierte 90%ige Relaxationszeit erhoben.

Zum Ausschluss von zeitabhängigen Veränderungen dienten parallel gemessene Kontrollstreifen. Pro explantiertem Herzen konnte zu überwiegendem Teil methodisch-bedingt je ein Muskelstreifen (human: ventrikuläre Muskeltrabekel; murin: Papillarmuskeln) zur Messung der Empagliflozinwirkung und ein Streifen für die Kontrollgruppe gewonnen werden.

3.1 Humanes Gewebe

Insgesamt wurden 16 Herzen im Endstadium der Herzinsuffizienz unter steigenden klinisch relevanten Empagliflozin-Konzentrationen untersucht.

In der folgenden Tabelle wurden alle klinischen Charakteristika der Patient:innen, sofern vorhanden, zusammengefassten. Zum Teil konnten einzelne Parameter aufgrund fehlender klinischer Verfügbarkeit jedoch nicht erhoben werden und fanden somit keinen Einfluss.

Tabelle 12: Klinischen Parameter der humanen Myokardproben.

Klinische Parameter	**HF Patient:innen (n=16)**
Männliches Geschlecht (%)	50,0
Alter (Mittelwert ± SD, Jahre)	56,4±4,1
EF (Mittelwert ± SD, %)	31,3±3,3
Herzfrequenz (Mittelwert ± SD, /min)	78,9±4,3
LVAD (%)	33,3
LA Durchmesser (Mittelwert ± SD, mm)	57,4±3,5
LVEDD (Mittelwert ± SD, mm)	58,6±3,2
Diabetes (%)	12,1
Ischämische Herzkrankheit (%)	27,3
ACE Inhibitoren (%)	44,4
β-Blocker (%)	90,9
Diuretika (%)	90,9
Digoxin (%)	0,0
Katecholamine (%)	9,1
Amiodaron (%)	36,4
AT_1-Rezeptor Antagonisten (%)	18,2
Aldosteron Antagonisten (%)	36,4
PDE Inhibitoren (%)	18,2
Ca-Kanal Blocker (%)	0,0
Statine (%)	27,3

Dargestellt sind die klinischen Charakteristika der herzinsuffizienten Patient:innen, von denen Proben für die Versuche gewonnen werden konnten; **HF**: Herzversagen im Endstadium; **EF**: Ejektionsfraktion; **LVAD**: left-ventricular assist device (links-ventrikuläres Unterstützungssystem); **LA**: left atrial (linker Vorhof); **LVEDD**: left ventricular end-diastolic diameter (links-ventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; **ACE**: Angiotensin-Converting Enzyme; **AT1**: Angiotensin 1; **PDE**: Phosphodiesterase.; **n** gibt die Anzahl an, die Einheit ist jeweils in Klammern dahinter angegeben, **SD**: Standartdeviation (Standartabweichung). Die klinischen Daten konnten nicht vollständig von allen Patient:innen erhoben werden.

3.1.1 Kontraktilitätsmessungen in humanem HF-Gewebe

Mithilfe des Kraftabnehmers konnten die Parameter der Kontraktionskinetik für jede Kontraktion ermittelt werden. Hierfür wurde die zu Beginn herrschende mittlere diastolische Grundspannung und mittlere systolische Kraft als Baseline gesetzt und Abweichungen im Verhältnis zu dieser berechnet.

Exemplarisch wird in Abbildung 5 nachfolgend je eine Kontraktion pro Konzentrationsschritt als Originalabbildung gezeigt. Sie veranschaulicht den Ablauf der einzelnen Kontraktionen und veranschaulichen die Entwicklung der diastolischen Spannung unter Empagliflozingabe.

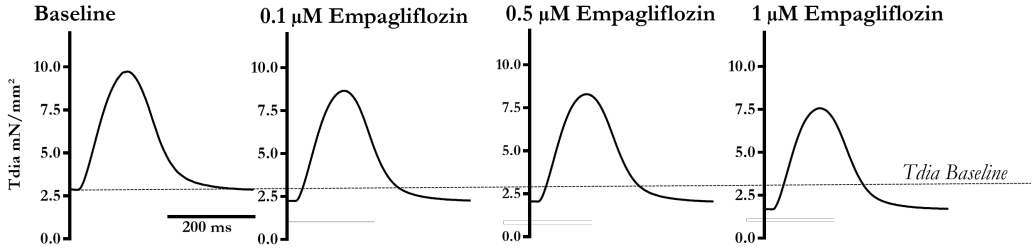

Abbildung 5: Originalabbildungen einzelner Kontraktionen humaner Proben. Exemplarisch abgebildet sind einzelne Kontraktionen eines humanen Muskelstreifens im Verlauf der Konzentrationsreihe bei den jeweilig angegebenen Konzentrationsschritten (Baseline, 0,1µM, 0,5µM, 1µM, 10µM) unter Empagliflozinwirkung.

Es war zu beobachten, dass die entwickelte Kraft der isometrisch kontrahierenden Trabekel sich bei steigenden Konzentrationen Empagliflozins (0,1; 0,5 und 1 µM) im Vergleich zu den Kontrollstreifen nicht signifikant (p=>0,9999, n =10 vs. 14 Kontrollen) änderte. Verglichen mit dem Wert der Baseline nahm die entwickelte systolische Kontraktionskraft der von Empagliflozin-Lösung umspülten Proben von 7,773 ± 0,6738 mN/mm^2 auf 7,517 ± 0,811 mN/mm^2 ab. Dies entspricht im Mittel einer Reduktion um etwa 2% ± 1,6 (p=0,3323; $n_{Empagliflozin}$=10). Bei den Kontrollstreifen wurde sie um etwa 1%±0,8 (p=0,3843; $n_{Kontrolle}$=7) schwächer.

Dagegen zeigte sich, dass unter steigenden Empagliflozinkonzentrationen die diastolische Spannung signifikant abnahm ($n_{Empagliflozin}$=10 vs. $n_{Kontrolle}$=14). Im Vergleich zur Baseline war diese bei einer ein gewaschenen Empagliflozinkonzentration von 0,5µM signifikant um 24,73±5,1% (p <0,05 $n_{Empagliflozin}$=10) reduziert. Im direkten Vergleich zu den Kontrollstreifen zeigte sich für die Tdia bei 0,1µM eine signifikante Reduktion um 13,64% ± 5,09% ($n_{Empagliflozin}$=9, n=$_{Kontrolle}$=9; p=0,0354), bei 0,5µM um 15,54% ± 4,86% ($n_{Empagliflozin}$=10; $n_{Kontrolle}$=10; p=0,0078) und bei 1,0µM um 20,66% ± 5,09 % ($n_{Empagliflozin}$=10, $n_{Kontrolle}$=9; p=0,0004). Die Kontrollstreifen selbst zeigten beim Vergleich zur Baseline keine signifikanten Veränderungen. Bei 0,1µM konnte eine Reduktion um etwa 5,5% ±4,89%

(p=2,837; $n_{Kontrolle}$=13), bei 0,5µM um etwa 9% ±5,979% (p=0,159; $n_{Kontrolle}$=14) und bei 1,0mM um 10,5% ± 8,683% (p=0,2483; $n_{Kontrolle}$=13) beobachtet werden.

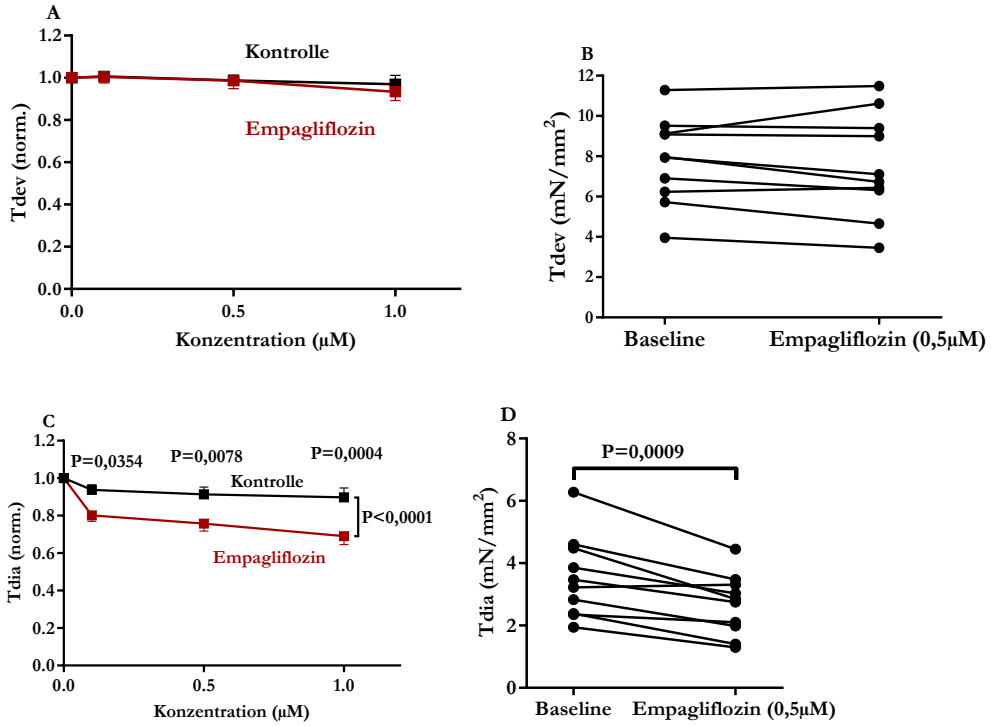

Abbildung 6: Kraftentwicklung der humanen HF Proben. Dargestellt sind (**A**) die normalisierte Diastolische Kraft (Tdia norm. in mN/mm²) von Trabekeln aus 16 humanen Herzen unter schrittweise steigenden Konzentrationen (0,1; 0,5; 1µM) Empagliflozins (p<0,0001; $n_{Empagliflozin}$=10) vs. Kontrolle ($n_{Kontrolle}$=14) und (B) die Entwicklung der diastolischen Kraft nach dem Einwaschen von 0,5µM-Empagliflozin-Lösung im Vergleich zur vorher bestimmten Baseline. Analog dazu (**C**) der Verlauf der normalisierten systolischen Kraftentwicklung (Tdev) der Interventionsgruppe ($n_{Empagliflozin}$=10 Trabekel) vs. Kontrolle ($n_{Empagliflozin}$=14) und (**D**) die Entwicklung der systolischen Kraft in mN/mm² gezeigt als absolut Werte unter Empagliflozin.

3.1.2 Kontraktionskinetik

Die Kontraktionsgeschwindigkeit (+df/dt, Kraftanstiegskoeffizient entspricht Kraftänderung/Zeit) änderte sich innerhalb der Interventionsgruppe unter Empagliflozingabe signifikant. Im Vergleich zu Baseline war sie um 4,5% ± 1,74% schneller (p=0,0292; $n_{Empagliflozin}$=10), während die Kontrolle nicht signifikant um 3,4% ± 2,9% zunahm (p=0,2753; $n_{Kontrolle}$ =7). Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Zeit ein nicht auszuschließender Faktor beim Vergleich der Entwicklung innerhalb einer Gruppe war.

Der direkte Vergleich zwischen der Interventions- und der Empagliflozingruppe bei 0,5µM erbracht jedoch keinen signifikanten Unterschied (p=0,4187, $n_{Empagliflozin}$=7, $n_{Kontrolle}$=7).

Beim Vergleich prä- und post-Empagliflozin-Wash-In ergab sich ein nicht signifikanter Unterschied für die Relaxationsgeschwindigkeit, die normalisierte -df/dt nahm um etwa 4±

11,4% ($n_{Empagliflozin}$=9, p=0,728). In der Kontrollgruppe war der Unterschied ebenso nicht signifikant und betrug 3,6% (p=0,7551; $n_{Kontrolle}$ =6).

Dies spiegelte sich in einer Verlängerung der benötigten Zeit bis zur 90%igen Relaxation wider. Unter 0,5µM Empagliflozin benötigten die humanen Kardiomyozyten im Mittel etwa 1,8% ± 8,7% weniger Zeit (338ms vs. 332ms; p=0,8375 ; $n_{Empagliflozin}$=9), während die Kontraktion der Kontrolltrabekel etwa 3,4%±19,8% länger brauchten (; p=0,8674 $n_{Kontrolle}$ =6). Zwischen den jeweils auf die Baseline (1Hz) normalisierten Gruppen Empagliflozin gegen Kontrolle zeigte sich abschließend kein signifikanter Unterschied von 7,35% ± 6,3% (p=0,3613; $n_{Empagliflozin}$ = 7, $n_{Kontrolle}$=5).

Die Abbildung 7 illustrieren diese Ergebnisse.

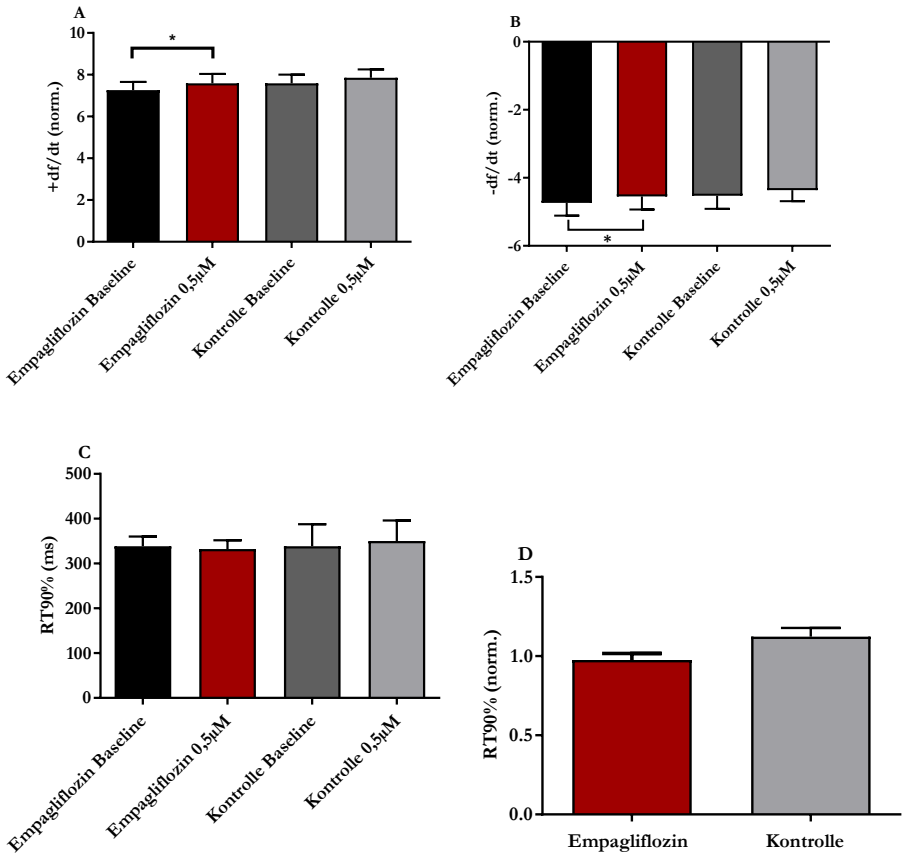

Abbildung 7: Kontraktionskinetik der humanen HF Proben. Gezeigt sind (**A**) die normalisierte Kontraktionsgeschwindigkeit (+df/dt (norm.) in mN/mm²×s) im Vergleich zur jeweiligen Baseline der Gruppe: 0,5µM Empagliflozin, sowie die Relaxationsparameter (**B**)-(**D**) normalisierte Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt (norm.) in mN/mm²×s) und die 90%ige Relaxationszeit als absolut Werte (RT90% in ms) und normalisiert auf die jeweilige Baseline (RT90% (norm.)). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, außer bei der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit innerhalb der Interventionsgruppe nach 0,5µM Empagliflozin-Wirkung Wash-In (*: p=0,0301; $n_{Empagliflozin}$=9).

3.1.3 Kraft-Frequenz-Beziehung

Da sich die Versuche an humanen Trabekeln direkt an die Konzentrationsreihen anschlossen, wurde die Kraft-Frequenz-Beziehung unter einer anwesenden Konzentration von 10µM Empagliflozin bzw. DMSO als Kontrolle untersucht.

Der bereits erwähnte Bowditch-Effekt führt zu einer Kraftzunahme bei (im humanen Myokard) Frequenzsteigerungen zwischen 60 (1 Hz) und 180 (3 Hz) Schlägen pro Minute. Physiologischerweise kann dabei eine positive Korrelation von Frequenz und Kraftentwicklung beobachtet werden. Wie in der Einleitung beschrieben ist in der Herzinsuffizienz dieser Effekt jedoch aufgehoben. Es lässt sich hingegen sogar beobachten, dass bei steigenden Frequenzen die Kontraktionskraft abnimmt. Höhere Frequenzen und eine voranschreitende Zeit stellen jedoch eine starke (u.a. metabolische) Belastung der Muskeltrabekel dar, die zu einer reduzierten Kraftentwicklung führen können. Die Aussagekraft der Entwicklung innerhalb der jeweiligen Gruppe ist daher eingeschränkt. Vielmehr ist der Vergleich zwischen Interventions- und Kontrollgruppe relevant, da hierbei die Belastung durch Zeit und Frequenzsteigerung bei allen Muskeltrabekel gleichermaßen wirkt und Unterschiede auf die Anwesenheit von Empagliflozin zurückführbar sind.

Die systolische Kraft nahm bei steigenden Frequenzen ab. Sowohl unter Empagliflozingabe als auch in der Kontrollgruppe war eine signifikante Reduktion zu beobachten. In der Interventionsgruppe fiel die Kontraktionskraft zunächst bei 2 Hz erst um etwa 5% ($p=0{,}3544$; $n_{Empagliflozin}=10$), bei 3 Hz im Vergleich zur Baseline dann jedoch signifikant um 30,9% ($p=0{,}0044$; $n_{Empagliflozin}=10$). Analog dazu nahm in der Kontrollgruppe die systolische Kraft bei 2 Hz verglichen mit der Baseline bei 1 Hz um etwa 9,7% ($p=0{,}1859$; $n_{Kontrolle}=6$) ab und fiel dann signifikant stark um 40,6% ab als die Frequenz auf 3 Hz erhöht wurde ($p=0{,}0295$; $n_{Kontrolle}=6$). Da auch hierbei die Zeit als Cofounder zu berücksichtigen ist, ist insbesondere der direkte Vergleich der normalisierten Kontroll- mit der Interventionsgruppe aussagekräftig. Hierbei ergab sich weder bei 2 Hz noch bei 3 Hz einen signifikanten Unterschied (2 Hz: $p=0{,}5871$; 3 Hz: $p=0{,}5233$; $n_{Empagliflozin}=10$, $n_{Kontrolle}=6$)

Unter höheren Frequenzen konnte ein signifikanter Anstieg der diastolischen Spannung in der Interventionsgruppe beobachtet werden. In der von 10µM Empagliflozin-Lösung umspülten Gruppe fand sich zunächst kein signifikanter Unterschied bei 2 Hz im Vergleich zur Baseline bei 1 Hz ($p=0{,}869$; $n_{Empagliflozin}=10$), bei 3 Hz unterschied sie sich jedoch signifikant um etwa 92,31% ($p=0{,}0111$; $n_{Empagliflozin}=10$). Innerhalb der Kontrollgruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied beobachten (Kontrolle 0,5µM 2Hz vs. 1Hz Baseline: $p=0{,}7312$; Kontrolle 0,5µM 3Hz. vs. Baseline 1Hz: $p=0{,}3993$; $n_{Kontrolle}=6$). Auch hier erbrachte der aussagekräftige direkte Vergleich zwischen den auf die jeweilige Baseline normalisierten Werte von Interventions- mit Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied (2 Hz: $p=0{,}1933$, $n_{Empagliflozin}=6$, $n_{Kontrolle}=6$; 3Hz: $p=0{,}096$, $n_{Empagliflozin}=10$, $n_{Kontrolle}=6$)

Die Abbildung 8 veranschaulicht die Ergebnisse.

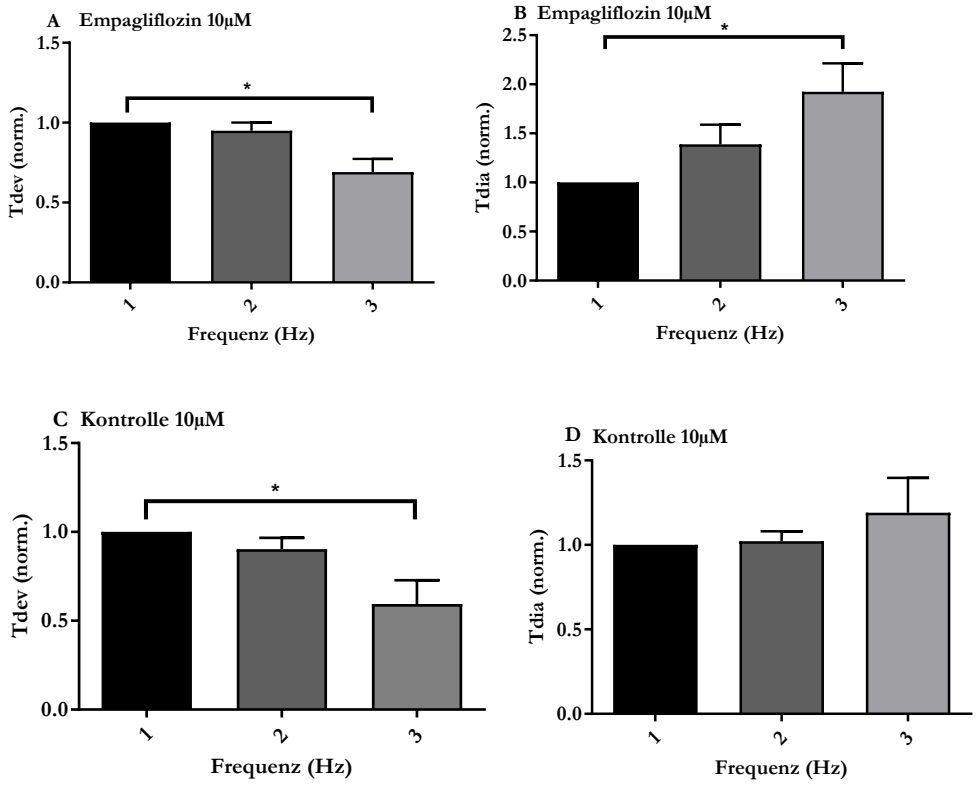

Abbildung 8: FFR der HF Proben. Die Diagramme bilden die Entwicklung der auf die Baseline normalisierten diastolischen Spannung (systolischen Kraft (Tdev (norm.) und Tdia (norm.)) bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen (1Hz; 2Hz; 3Hz) ab. (**A**) und (**B**) zeigen den Verlauf unter Empagliflozinwirkung ($n_{Empagliflozin}$=10); (**C**) und (**D**) zeigen die Kontrollgruppe; als Baseline wurde die entwickelte Kraft (Tdev) bzw. Spannung (Tdia) bei der Stimulationsfrequenz von 1Hz gesetzt; es zeigte sich signifikante Unterschiede für beide Gruppen für die Tdev bei 3Hz gegen die jeweilige Baseline (Empagliflozin 1Hz vs. 3Hz: p=0,0044; $n_{Empagliflozin}$=10; Kontrolle 1Hz vs. 3Hz: (p=0,0295; $n_{Kontrolle}$=6), sowie für die Tdia der Interventionsgruppe beim Vergleich von 1Hz vs. 3Hz (p=0,0111; $n_{Empagliflozin}$=10). Der ***** markiert signifikante Unterschiede.

Mit unterschiedlich hohen Frequenzen änderten sich die Relaxationsparameter innerhalb der jeweiligen Gruppen deutlich. Beim Vergleich der normalisierten Gruppen Kontrolle gegen Interventionsgruppe ergab sich abschließend kein signifikanter Unterschied für keines der Parameter (+df/dt: 2Hz: p=0,7167, 3Hz: p=0,5683; -df/dt: 2Hz: 0,2105, 3 Hz: 0,1768; RT90% norm.: Kontrolle vs. Empagliflozin 2Hz: p=0,3842; 3Hz: p=0,2728; ($n_{Empagliflozin}$=8, $n_{Kontrolle}$=8).

Innerhalb der Empagliflozingruppe nahm die Kontraktionsgeschwindigkeit +df/dt bei Erhöhung der Frequenz auf 2Hz signifikant um 17,68% (p=0,0002; $n_{Empagliflozin}$=10) und bei einer Frequenz von 3 Hz um 43,58% (p=<0,0001; $n_{Empagliflozin}$=10) zu.

Die Relaxationsgeschwindigkeit -df/dt war verglichen mit der Baseline bei 1Hz bei 2Hz signifikant um -13,3% (p=0,0084; $n_{Empagliflozin}$=10) gesteigert und bei 3Hz zeigte sich eine Änderung von 54% (p=0,0003; $n_{Empagliflozin}$=10).

Auch die benötigte Zeit bis zur 90%igen Relaxation änderte sich dementsprechend signifikant in der Interventionsgruppe. Bei 2Hz war die Zeit um 18,3% von 328ms auf 268ms abgesunken (p=0,0001; $n_{Empagliflozin}$=10) und bei 3Hz auf 180ms um 45% reduziert (p=<0,0001; $n_{Empagliflozin}$=11). Auch beim Vergleich der normalisierten Relaxationszeit zeigen sich signifikante Unterschiede (Empagliflozin: p=<0,0001; $n_{Empagliflozin}$=10).

Analog zeigte sich die Entwicklung signifikant in der Kontrollgruppe für die +df/dt (1Hz vs. 2Hz: +13,94%, p=0,0002; 1Hz vs. 3Hz: +38,65%, p <0,0001; $n_{Kontrolle}$=8), die -df/dt (1Hz vs. 2Hz: 12,4%, p=0,0135; 1Hz vs. 3Hz: 45,18%, p=0,0064; $n_{Kontrolle}$=7), ebenso wie der Verlauf der RT90% (1Hz vs. 2Hz: 16,2%, p=0,0055; 1Hz vs. 3Hz: 30,3%, p=0,04909; $n_{Kontrolle}$=8), sowie der RT90% norm. (1Hz vs. 2Hz: 15,5%, p=0,0046; 1Hz vs. 3Hz: 29,7%, p=0,0346; $n_{Kontrolle}$=8).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

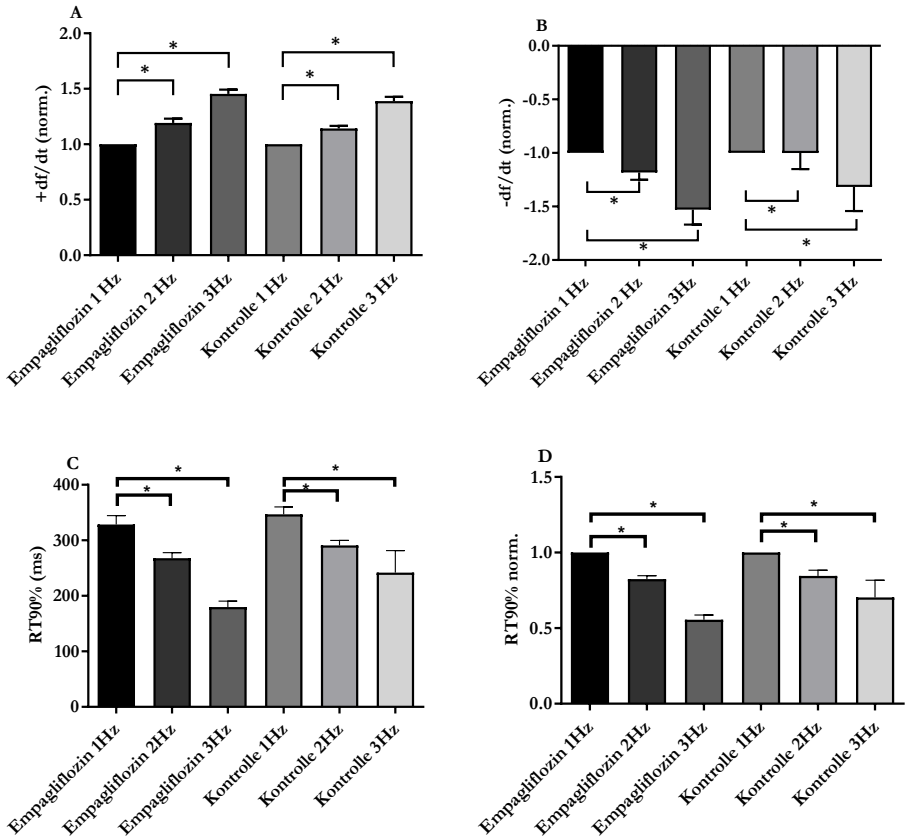

Abbildung 9: Kontraktionskinetik der humanen HF Proben bei 1Hz, 2Hz, 3Hz. Gezeigt sind (**A**) die normalisierte Kontraktionsgeschwindigkeit (+df/dt (norm.) in mN/mm²×s) im Vergleich zur jeweiligen Baseline der Gruppe bei unterschiedlichen Frequenzen (1Hz, 2Hz, 3Hz), sowie die Relaxationsparameter (**B**)-(**D**) normalisierte Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt (norm.) in mN/mm²×s) und die 90%ige Relaxationszeit als absolut Werte (RT90% in ms) und normalisiert auf die Baseline (RT90% (norm.)). Es zeigen sich für alle Parameter sowohl innerhalb der Kontroll-, als auch innerhalb der Interventionsgruppe signifikante Unterschiede, jedoch micht beim Vergleich zwischen Empagliflozin- und Kontrollgruppe. Der * markiert signifikante Unterschiede.

3.1.4 Post-Rest-Versuche

Der Post-Rest- (PR-)Quotient erlaubt Rückschlüsse auf den Ca^{2+}-Stoffwechsel der Kardiomyozyten. Für die statistischen Auswertung der Post-Rest-Versuche wurde der Quotient aus der netto entwickelten Kraft (Tdev) der ersten Kontraktion nach der Stimulationspause normalisiert auf den letzten Wert vor der Pause gebildet. Eine Zunahme kann auf einen vermehrten zytosolischen Ca^{2+}-Gehalt nach Kontraktionspause hindeuten und ist positiv mit SERCA-Aktivität korreliert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Baseline und dem entsprechenden präRest/postRest-Quotienten der beiden Gruppen (p= 0,1467, Empa 10s $n_{Empagliflozin}$=7; 30s, 60 s $n_{Empagliflozin}$=6 vs. Kontrolle 10s $n_{Kontrolle}$=6; 30s, 60s $n_{Kontrolle}$=5). Es zeigten sich jedoch zwei gegensätzliche Trends. Bei den mit Empagliflozin behandelten Streifen schien der Quotient eher größer zu werden (Mittelwert 10s = 1,287; 30s=1,314; 60s=1,422), während die Kontrollgruppe bei länger andauernden Pausen einen stabilen Zustand zu erreichen schien (Kontrolle 10s=1,233; 30s=1,167, 60s=1,178). Der Vergleich der beiden Gruppen miteinander war jedoch nicht signifikant (p= 0,1467).

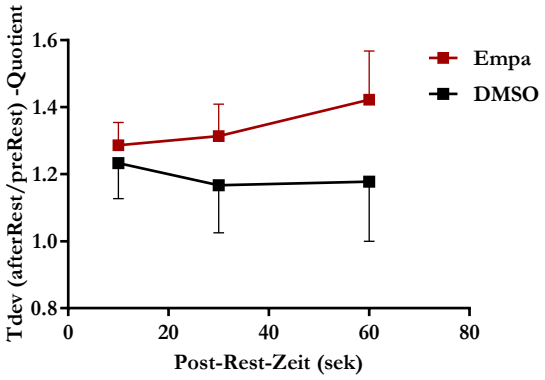

Abbildung 10: Post-Rest-Verhalten der HF Proben. Dargestellt ist der Quotient aus der netto entwickelten Kraft (Tdev) der ersten Kontraktion nach der Stimulationspause normalisiert auf den letzten Wert vor der Pause aufgetragen gegen die Länge der Stimulationspause in Sekunden; dargestellt werden die Entwicklungen der Empagliflozingruppe und der Kontrollgruppe beim Konzentrationsschritt von 10µM. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p= 0,1467, 10s $n_{Empagliflozin}$=7; 30s, 60 s $n_{Empagliflozin}$=6 vs. Kontrolle 10s $n_{Kontrolle}$=6; 30s, 60s $n_{Kontrolle}$=5), jedoch ein Zunahmetrend innerhalb der Empagliflozingruppe (Mittelwert 10s = 1,287; 30s=1,314; 60s=1,422).

3.2 Murines Gewebe

Aufgrund der höheren Empfindlichkeit der isolierten murinen Papillarmuskeln gegenüber der zeitlichen Komponente wurde hier keine vierstufigen Konzentrationsreihen, wie in den Versuchen mit humanem Gewebe erstellt, sondern direkt auf die klinisch relevante Dosis von 0,5µM Empagliflozin erhöht. Aufgrund der Limitationen der Versuchsdauer im Mäusemodell, war es nicht durchgehend möglich Kraft-Frequenz-Versuche und/oder Post-

Rest-Versuche durchzuführen, da zum Teil Arrhythmien auftraten, die Muskelstreifen durch Stimulation nicht mehr zur Kontraktion gebracht werden konnten oder es schon zu Beginn nicht möglich war einen stabilen Ausgangszustand zu erreichen.

Der Vergleich der beiden verwendeten murinen Gewebe zeigte deutlich die für den Phänotyp der diabetischen Kardiomyopathie charakteristische eingeschränkte Pumpfunktion und erhöhte Steifigkeit.

Während die systolische Kraft der db/db-Mäuse im Mittel um 65.6 ± 0,2% (p=0,0016; n_{WT}=30 vs. $n_{db/db}$=35) gemindert war, war die diastolische Grundspannung um ca. 50% (p=0,0005) erhöht im Vergleich zu den Herzen der WT Mäuse. Der Vergleich wird durch Abbildung 12 veranschaulicht.

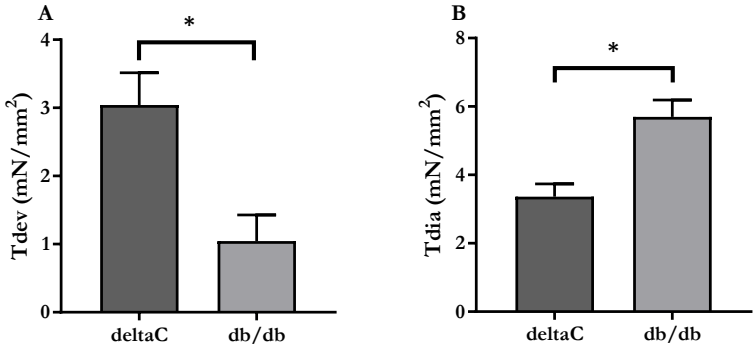

Abbildung 11: Kontraktionsparameter der murinen Proben. Gezeigt sind (**A**) die mittlere Kontraktionskraft (Tdev (mN/mm2) und (**B**) die mittlere diastolische Spannung (Tdia (mN/mm2) des wildtyp-Mausmodells im Vergleich mit den mittleren Werten des diabetischen db/db-Mausmodells. Es war ein signifikanter Unterschied (*****) beim Vergleich der db/db-Mäuse mit der Gruppe der WT-Mäuse in Bezug auf die Tdev (-65.6 ± 0,2%, p=0,0016) und auf die Tdia (+50%; p=0,0005) zu beobachten (n_{WT}=30 vs. $n_{db/db}$=35).

Exemplarisch wird in Abbildung 12 nachfolgend je eine Kontraktion bei Baselineniveau und bei 0,5µM Empagliflozin als Originalabbildung gezeigt. Sie veranschaulicht die Kraftentwicklung unter Empagliflozingabe.

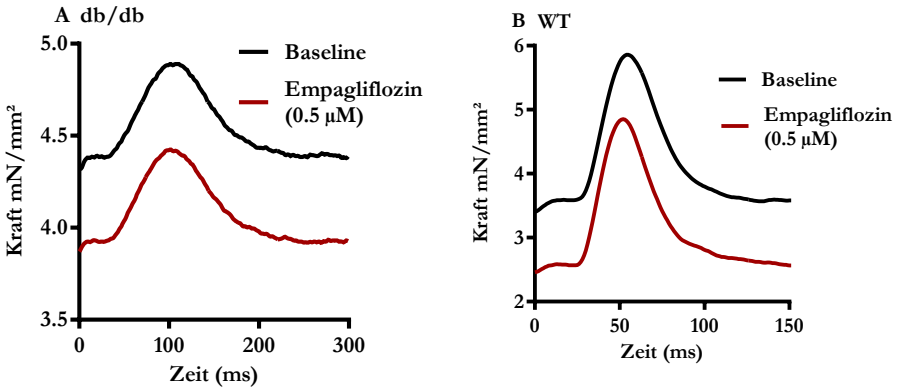

Abbildung 12: Originalabbildung der Kraftentwicklung einer Kontraktion in murinem Myokard. Es wird die Kraft (N/mm²) im zeitlichen Verlauf auf Baselineniveau und nach 0,5µM Empagliflozin dargestellt. A

repräsentiert eine Originalabbildung aus diabetischem Myokard, B zeigt die Kraftentwicklung einer Kontraktion in murinem Myokard des Wildtypen.

3.2.1 Diabetisches Mausmodell

Zur Untersuchung möglicher Effekte Empagliflozins auf diabetisches Myokard wurden Papillarmuskeln aus murinen Herzen vom db/db Typ verwendet. Dabei wurden die Kontraktions- und Kinetikparameter erhoben und mit den Werten der Kontrollgruppe, die ebenfalls Papillarmuskeln aus murinen Herzen des db/db Typs waren, verglichen. Es wurden Daten aus 20 Mäusen im Alter zwischen 12 und 14 Wochen ausgewertet, wobei 9 weiblich und 11 männlich waren.

3.2.1.1 Kontraktilitätsmessung

Die Muskelstreifen aus diabetischem Myokard zeigten bereits zu Versuchsbeginn kompromittierte systolische Kräfte verglichen mit den Trabekeln aus nicht-diabetischem Myokard.

Analog zu den Ergebnissen der humanen Proben zeigte sich bei der klinisch relevanten Empagliflozinkonzentration (0,5µM) die Kraft im Vergleich zur Kontrolle (p=0, 0,6972) oder Baseline (p=0,8271) keine Veränderung (Empagliflozin: $n_{Empagliflizin}$ =13, Kontrolle $n_{Kontrolle}$=12). Im Mittel unterschied sich die Empagliflozin Gruppe von der Kontrollgruppe nach dem Wash-In um 5.8±14.6%. Auch innerhalb der Kontrollgruppe ließ sich keine signifikante Veränderung nachweisen (Kontrolle vs. Baseline p=0,6213; $n_{Kontrolle}$=8; Kontrolle 0,5µM vs. Wash-Out p=0,6093 $n_{Kontrolle}$=4).

Interessanterweise verringerte sich im diabetischen Myokard die massiv erhöhte diastolische Spannung signifikant um 19.1±4.6%, nachdem Empagliflozin hinzugefügt wurde (P=0,0003; $n_{Empagliflizin}$=14). Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der diastolischen Spannung nach Behandlung mit Empagliflozin mit einem mittleren Unterschied von 16.68±6.895% (p=0,0232, $n_{Empagliflizin}$=14 vs. $n_{Kontrolle}$=13).

Die Reduktion der diastolischen Spannung innerhalb der Empagliflozingruppe zeigte sich bei Wash-Out als reversible ($n_{Empagliflizin}$=6), im Mittel nahm die Spannung erneut um etwa 19,61±5% zu, der Unterschied war signifikant (p=0,0251).

Das Wash-Out bei den Kontrollstreifen ($n_{Kontrolle}$=7) führte zu einer nicht signifikanten Wiederzunahme um 0,41±8.1% (p=0,9611). Im abschließenden Vergleich zwischen Empagliflozin und Kontrolle war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar (0,4±6.2%; p= 0,9554, $n_{Empagliflizin}$=6 vs. $n_{Kontrolle}$=7).

Die folgenden Abbildung 13 illustrieren diese Ergebnisse.

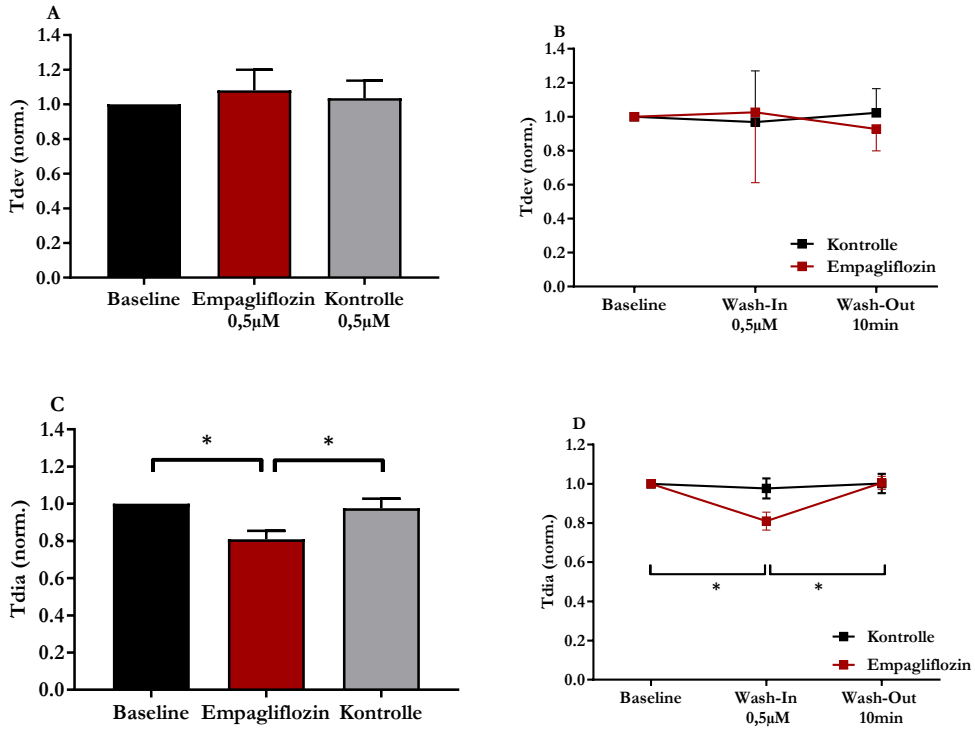

Abbildung 13: Kraftentwicklung der diabetischen murinen Trabekel. Dargestellt sind (**A**) die Mittelwerte der normalisierten systolischen Kraft (Tdev (norm.)) der Empagliflozin- (1,08; $n_{Empagliflozin}$=14) und Kontrollgruppe (1,036; $n_{Kontrolle}$=12) und (**B**) die normalisierte Tdev mit anschließendem Wash-Out nach 10min ($n_{Empagliflozin}$=5; DMSO $n_{Kontrolle}$=4). (**C**) zeigt die normalisierte Diastolische Kraft (Tdia norm.) von isolierten Papillarmuskeln eines diabetischen Mausmodells (db/db-Mäuse) nach Einspülen von 0,5µM Empagliflozinlösung und Kontrolle und (**D**) die normalisierte diastolische Spannung (Tdia) im Verlauf nach Wash-In von 0,5µM und nach darauffolgendem Wash-Out ($n_{Empagliflozin}$=6; Kontrolle $n_{Kontrolle}$=7); Die mit dem ***** gekennzeichneten signifikanten Unterschiede fnden sich beim Vergleich von Baseline vs. Empagliflozin 0,5µM (p=0,0003, $n_{Empagliflozin}$=14, $n_{Kontrolle}$=14);, Empagliflozin 0,5µM vs. Kontrolle 0,5µM (p=0,0232; $n_{Empagliflozin}$=14, $n_{Kontrolle}$=13) und Empagliflozin Wash-In 0,5µM vs. Wash-Out (P=0,0251 $n_{Empagliflozin}$=6).

3.2.1.2 Kontraktionskinetik

Zur weiteren Evaluation des Kontraktionsverhaltens wurden die normalisierte Kraftzunahmegeschwindigkeit (+df/dt norm.), die Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt) und die Zeit bis zur 90%igen Relaxation (RT90 %) analysiert. In Bezug auf die +df/dt ließ sich im Vergleich zur jeweiligen Baseline kein signifikanter Unterschied innerhalb der Interventions- (p=0,0816; $n_{Empagliflozin}$=16) bzw. Kontrollgruppe (p=0,476; $n_{Kontrolle}$= 13) beobachten. Auch die Veränderungen der Relaxationsparameter nach Wash-In der jeweiligen Gruppe waren statistisch nicht signifikant. Die -df/dt änderte sich unter Empagliflozingabe ebenso wenig (p=0,1328; $n_{Empagliflozin}$=14) wie die normalisierte RT90% (p=0,5539; $n_{Kontrolle}$=14) im Vergleich zur Baseline. Analog dazu ließ sich auch in der Kontrollgruppe keine signifikante Änderung nach Wash-In im Vergleich zur Baseline nachweisen (-dfdt: p=0,7482; $n_{Kontrolle}$=12; RT90% norm.: p=0,7553; $n_{Kontrolle}$=12). Auch ein Vergleich der

normalisierten RT90% zwischen Kontrolle und 0,5µM Empagliflozin zeigte keinen signifikanten Unterschied.

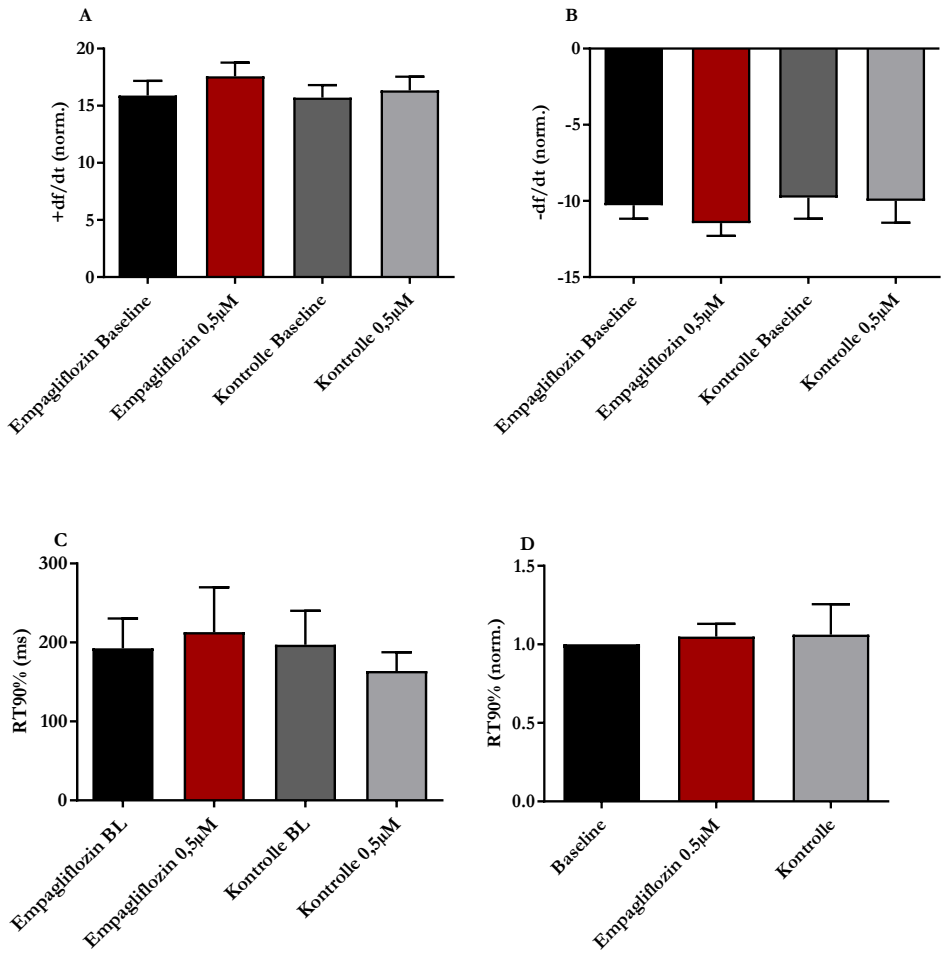

Abbildung 14: Kontraktionskinetik der murinen diabetischen Proben. Gezeigt sind (**A**) die normalisierte Kontraktionsgeschwindigkeit (+df/dt (norm.) in mN/mm²×s) im Vergleich zur jeweiligen Baseline der Gruppe, sowie die Relaxationsparameter (**B**)-(**D**): normalisierte Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt (norm.) in mN/mm²×s) und die 90%ige Relaxationszeit als absolut Werte (RT90% in ms) und normalisiert auf die Baseline (RT90% (norm.)). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich mit der jeweiligen Baseline (Empagliflozin: -df/dtp=0,1328; $n_{Empagliflozin}$=14; RT90% norm. p=0,5539; $n_{Empagliflozin}$=14; Kontrolle: -dfdt: p=0,7482; $n_{Kontrolle}$=12; RT90% norm.: p=0,7553; $n_{Kontrolle}$=12).

3.2.1.3 Kraft-Frequenz-Beziehung

Es zeigte sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der entwickelten systolischen Kraft mit der Baseline bei 4Hz.
Die normalisierten Mittelwerte der Empagliflozingruppe unterschieden sich zwischen der bei 4Hz gesetzten Baseline und dem Mittelwert bei 6Hz um 14,52% (p=0,0727 , $n_{Empagliflozin}$=9), bei 8Hz war die mittlere systolische Kraft zwar wieder stärker als bei 6Hz im Vergleich zur Baseline, aber dennoch um 6,3% reduziert (p=0,6850, $n_{Empagliflozin}$=9) und bei 10Hz fiel sie erneut stark ab um 23,52% (p=0,2366, $n_{Empagliflozin}$=9). Beim Vergleich der normalisierten

Mittelwerte der Interventions- mit der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied (6Hz: p= 0,6309, 8 Hz: p=0,7721; 10 Hz: p=0,5967, $n_{Empagliflozin}$= 14, $n_{Kontrolle}$= 12).
Äquivalent fanden sich innerhalb der Kontrollgruppe bei 6Hz verglichen mit der 4Hz Baseline eine Zunahme der Kraft um 1,3% (p=0,3123, $n_{Kontrolle}$=6) und bei 8Hz um 2,3% (p=0,1955, $n_{Kontrolle}$=5), bei 10Hz nahm die systolische Kraft dann jedoch um 13,86% im Vergleich zur Baseline ab (p=0,2666; $n_{Kontrolle}$=6).

Unter steigender Stimulationsfrequenz blieb die diastolische Spannung sowohl innerhalb der unter Empagliflozinwirkung stehenden Gruppe konstant als auch die Werte der Kontrollreihe.
Die normalisierten Mittelwerte der Empagliflozingruppe unterschieden sich zwischen der bei 4Hz gesetzten Baseline und dem Mittelwert bei 6Hz um 2,6% (p=0,2755, $n_{Empagliflozin}$=10), bei 8Hz um 3,33% (p=0,1856, $n_{Empagliflozin}$=10) und bei 10Hz um 2,7% (p=0,3874, $n_{Empagliflozin}$=10). Analog dazu fanden sich innerhalb der Kontrollgruppe bei 6Hz verglichen mit der Baseline bei 4Hz ein Unterschied von 3,35% (p=0,6365, $n_{Kontrolle}$=6), bei 8Hz 3,8% (p=0,6870, $n_{Kontrolle}$=5) und bei 10Hz 2,5% (p=0,7592, $n_{Kontrolle}$=6).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 15 veranschaulicht

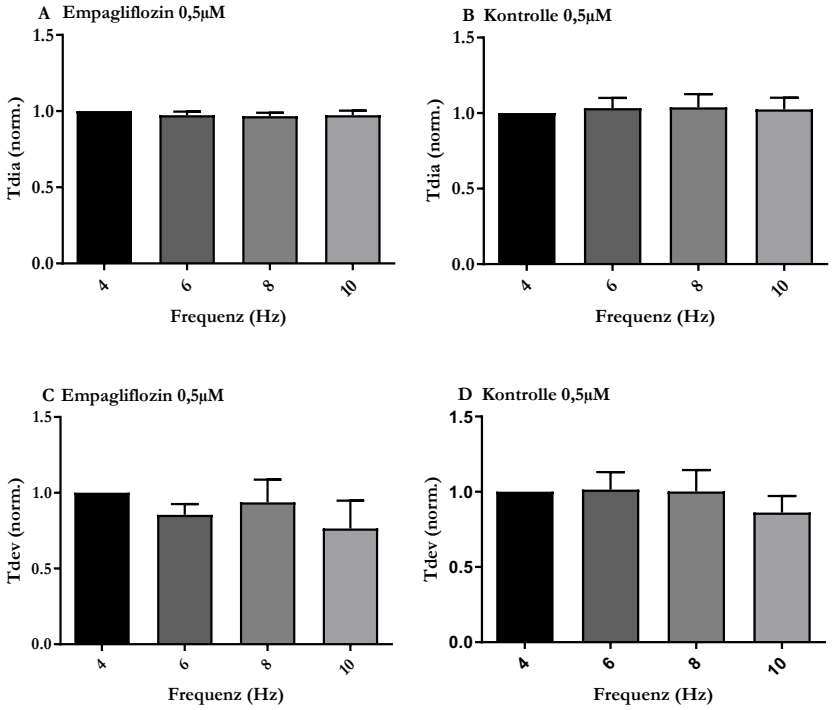

Abbildung 15: FFR: Kraftentwicklung der murinen, diabetischen Proben. (**A**) und (**B**) zeigen die Mittelwerte der normalisierten diastolischen Spannung unter Empagliflozinwirkung und Kontrolle bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen (4 Hz; 6 Hz; 8Hz; 10Hz) (Empagliflozin $n_{Empagliflozin}$=10; Kontrolle 4;6;10Hz $n_{Kontroll}$=6, 8Hz $n_{Kontroll}$=5) und analog dazu (**C**)-(**D**) die normalisierte mittlere systolischen Spannung (Tdev) der Interventions- und Kontrollgruppe (4Hz, 6Hz, 10Hz: $n_{Kontrolle}$=9; Empagliflozin 8Hz $n_{Empagliflozin}$=8; Kontrolle 8Hz $n_{Kontrolle}$=8).

Die Kontraktionsgeschwindigkeit änderte sich nicht signifikant unter Empagliflozin verglichen mit der Baseline (6 Hz, p=>0,9992; 8Hz: p=0,2293; 10Hz: p=0,6607; $n_{Empagliflozin}$=10). Bei der Kontrolle konnte im Vergleich zur Baseline bei 6Hz (23%; p=0,0399; $n_{Kontrolle}$=6) und bei 8Hz (14%; p=0,0101; $n_{Kontrolle}$=5) eine signifikante Verlängerung der Kontraktionszeit beobachtet werden, wohingegen bei 10Hz kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar war (+9%; p=0,146; $n_{Kontrolle}$=6). Beim Vergleich der Interventionsgruppe mit der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (+df/dt: 6Hz: p=0,4311; 8Hz: 0,3162, 10Hz: p=0,9676; $n_{Empagliflozin}$=8, $n_{Kontrolle}$= 6).

Auch die Relaxationszeit zeigte innerhalb der Interventionsgruppe keine signifikante Änderung (4Hz vs. 6Hz: p=0,0542; $n_{Empagliflozin}$=10; 4Hz vs. 8Hz p=0,3798; $n_{Empagliflozin}$=8; 4Hz vs.10Hz p=0,1816; $n_{Empagliflozin}$=10). Ebenso wichen die Zeiten der Kontrollgruppe bei 6Hz (p=0,1119; $n_{Kontrolle}$=6) und bei 8Hz (p=0,0814; $n_{Kontrolle}$=5) nicht signifikant von den Baselinewerten ab, allerdings zeigte sich bei 10Hz ein signifikanter Unterschied (p=0,0443 $n_{Kontrolle}$=6). Die Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe waren nicht signifikant (6Hz: p=0,3532; 8Hz: p=0,4876; 10Hz: p=0,9925 6Hz, 10Hz: $n_{Empagliflozin}$=10, $n_{Kontrolle}$= 6; 6Hz: $n_{Empagliflozin}$=8, $n_{Kontrolle}$= 5).

Die 90%ige Relaxationszeit zeigt innerhalb der Empagliflozingruppe eine signifikante Entwicklung. Wie auch in Abbildung 16 dargestellt, war, verglichen mit der Baseline bei 4Hz, der Unterschied bei auf 6Hz erhöhter Frequenz mit 9% (P=0,4025, $n_{Empagliflozin}$=8) und bei Stimulation mit 8Hz (2,8%, p=0,1005, $n_{Empagliflozin}$=8) noch nicht signifikant, bei 10Hz zeigte sich dann jedoch ein signifikanter Unterschied (51%, p=0,0078, $n_{Empagliflozin}$=8). Allerdings zeigte sich auch bei den Kontrollpapillarmuskeln ein ähnlicher Verlauf bei hohen Frequenzen im Vergleich zur Baseline(4Hz vs. 6Hz:23%, p=0,1772, $n_{Kontrolle}$=6; 4Hz vs. 8Hz: 49,5%, p=0,0145, $n_{Kontrolle}$=6; 4Hz vs. 10Hz: 52%, p=0,0028, $n_{Kontrolle}$=6). Die signifikanten Unterschiede jeweils innerhalb der Interventions- bzw. Kontrollgruppe zeigten sich abschließend nicht beim Vergleich zwischen Interventions- und Kontrollgruppe (6Hz: p=0,4311, 8Hz: p=0,3162, 10Hz: p=0,9676; : $n_{Empagliflozin}$=8, $n_{Kontrolle}$= 6). Die physiologisch zu erwartende Anpassung der Relaxation bei höheren Frequenzen wurde somit nicht durch Empagliflozin beeinflusst.

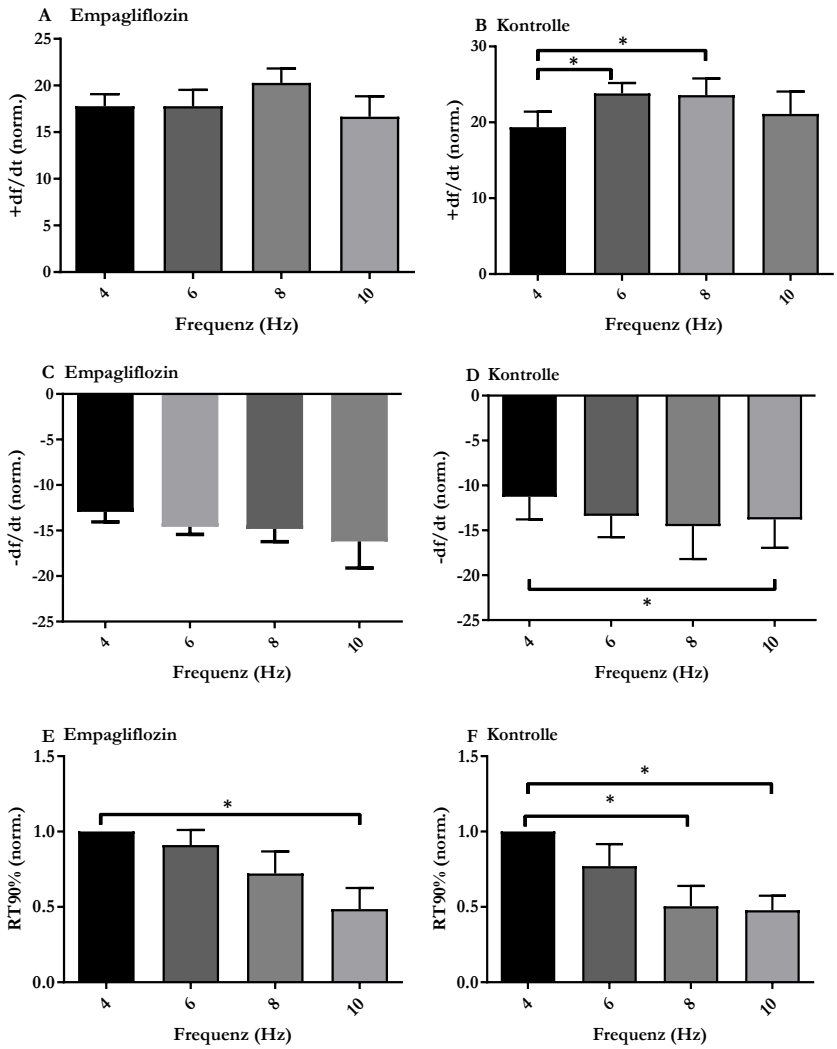

Abbildung 16: FFR: Kontraktionskinetik der murinen db/db-Proben. Gezeigt sind die normalisierte Kontraktionsgeschwindigkeit (+df/dt (norm.) in mN/mm²×s) im Vergleich zur jeweiligen Baseline der Gruppe bei unter-schiedlichen Frequenzen. (**A**) zeigt die von 0,5µM Empagliflozinlösung umspülten Proben und (**B**) die Kontrollgruppe. Außerdem stellen (**C**)-(**D**) die normalisierte Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt (norm.) in mN/mm²×s) und (E)-(F) die normalisierte 90%ige Relaxationszeit (RT90% (norm.)) dar. Die mit dem ***** gekennzeichneten signifikanten Unterschiede fanden sich bei der +df/dt in der Kontrollgruppe bei 6Hz vs. BL (23%; p=0,0399; $n_{Kontrolle}$=6) und 8Hz vs. BL (14%; p=0,0101; $n_{Kontrolle}$=5), bei der -df/dt in der Kontrollgruppe bei 10Hz vs. BL (p=0,0443 $n_{Kontrolle}$=6), sowie bei der RT90% norm. bei der Empagliflozingruppe bei 10Hz vs. BL (51%, p=0,0078, $n_{Empagliflozin}$=8) und in der Kontrollgruppe bei 8Hz vs. BL (49,5%, p=0,0145, $n_{Kontrolle}$=6) und 10Hz vs. BL (52%, p=0,0028, $n_{Kontrolle}$=6).

3.2.1.4 Post-Rest-Versuche

Hinsichtlich der Veränderung der Tdev afterRest/präRest-Quotienten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p=0,2309, 1sek $n_{Empagliflozin}$=6; 5sek, 10sek $n_{Empagliflozin}$=7; 1sek, 5sek, 10sek $n_{Kontrolle}$=7).

Wie durch Abbildung 17 gezeigt, beruht die Zunahme des Quotienten vor allem auf einer Veränderung der nach der Stimulationspause höheren entwickelten systolischen Kraft als auf einer Änderung der sich eher konstant haltenden Werten vor der Stimulationspause.

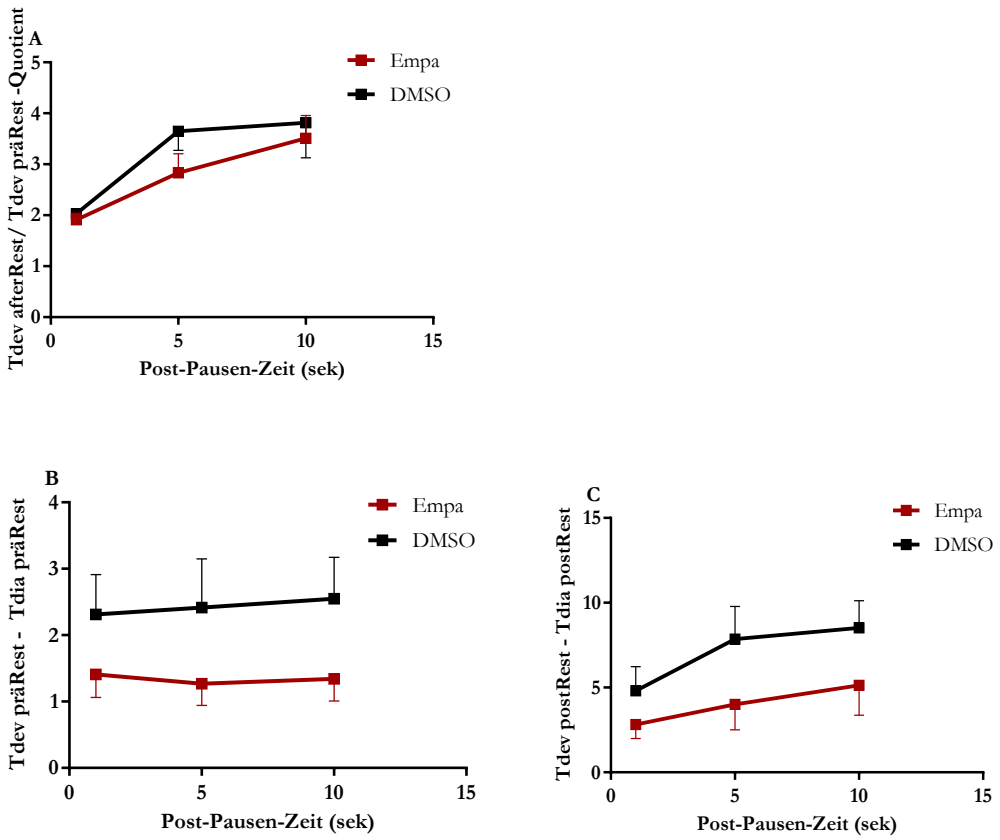

Abbildung 17: Post-Rest-Verhalten der db/db-Proben. (**A**) Dargestellt ist der Quotient aus der netto entwickelten Kraft (Tdev) der ersten Kontraktion nach der Stimulationspause normalisiert auf den letzten Wert vor der Pause und in Bezug zur Länge der Stimulationspause in Sekunden gesetzt und die Entwicklung der netto entwickelten Kraft (**B**) vor und (**C**) nach den unterschiedlich langen Stimulationspause (1sek, 5sek, 10sek), berechnet durch Subtraktion der jeweiligen diastolischen Grundspannung zum gegebenen Zeitpunkt (vor/nach Pause) von der entwickelten maximalen Kraft.

3.2.2 Nicht-diabetisches Mausmodell

Um einen möglichen diabetesunabhängigen Effekt zu untersuchten, wurden die Versuche auch mit Papillarmuskeln aus murinen Herzen des Wildtyps der Mausreihe deltaC (WT) durchgeführt. Diese zeigen keine metabolische Beeinträchtigung oder kardiale Dysfunktion. Sie können daher als Kontrollproben für einen diabetesunabhängigen Effekt herangezogen werden und lassen Rückschlüsse darauf zu, ob etwaig auftretende Effekte auch in gesundem Myokard auftreten.

Es wurden daher Daten der Kontraktilität und Kontraktionskinetikparameter erhoben, sowie Kraft-Frequenz -Versuche durchgeführt, soweit letzteres möglich war.

3.2.2.1 Kontraktilitätsmessung

Über den Verlauf des Wash-In entwickelten die Muskelstreifen zunehmend weniger Kraft während der Kontraktionsphase. Verglichen mit den Kontrollproben zeigte sich ein annährend gleiches Ausmaß der Kraftreduktion (-55,2%; 0,1µM, 1µM, 10µM $n_{Kontrolle}$=13, 0,5µM $n_{Kontrolle}$=23 vs. -49,1%, 0,1µM, 1µM, 10µM $n_{Empagliflozin}$=8, 0,5µM $n_{Empagliflozin}$=18). Demnach bewirken steigende Empagliflozinkonzentrationen (0,1; 0,5; 1,0 und 10µM) keine signifikante Änderung der systolischen Kraft (p=0,3581).

Die diastolische Kraft zeigte insgesamt eine geringe, aber signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle (p=0,0084, $n_{Empagliflozine}$=12 vs. $n_{Kontrolle}$=16). Im Mittel war die diastolische Spannung nach dem Wash-In im Vergleich zur Baseline bei den Kontrollstreifen um 8,56% reduziert, während die Spannung der Kontrollstreifen um 4,52% absank. Die mit Empagliflozin umspülten Proben wiesen am Endpunkt bei einer Konzentration von 10µM Empagliflozin eine Reduktion der diastolischen Spannung um 18,57% auf und unterschieden sich somit um etwa 12,8% von den Kontrollstreifen (p=0,141; $n_{Empagliflozin}$=12 vs. $n_{Kontrolle}$=16). Beim direkten Vergleich nur der klinisch relevanten Konzentration von 0,5µM Empagliflozin gegen die Kontrolle zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p= >0,999).

Die Kraftentwicklung unter steigenden Konzentrationen ist in den folgenden Abbildung 18 dargestellt.

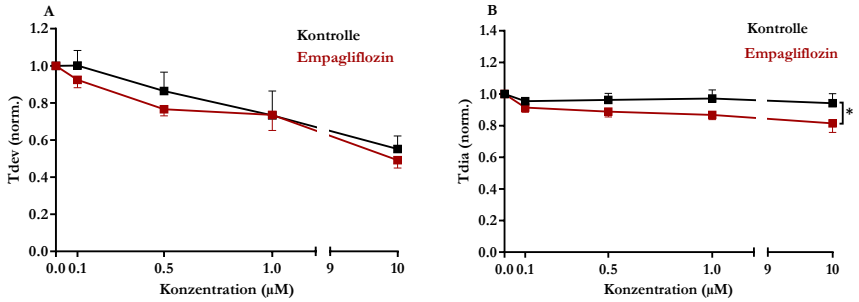

Abbildung 18: Kraftentwicklung der WT Proben bei steigenden Konzentrationen. Dargestellt sind **(A)** die normalisierte diastolische Spannung (Tdia (norm.) in mN/mm²) von isolierten Papillarmuskeln aus Herzen des herzinsuffizienten Mausmodells (deltaC Mäuse) nach Wash-In Empagliflozins($n_{Empagliflozin}$=12) in steigenden Konzentrationen (0,1µM; 0,5µM; 1µM, 10µM) und der Kontrolle ($n_{Kontrolle}$=16) und **(B)** die Mittelwerte der zeitgleich erhobenen normalisierte systolischen Kraft (Tdev (norm.)) der Empagliflozin- (0,1; 1; 10µM $n_{Empagliflozin}$=8; 0,5µM $n_{Empagliflozin}$=18) und Kontrollgruppe (0,1;1;10µM $n_{Kontrolle}$=13; 0,5µM $n_{Kontrolle}$=23) unter schrittweise steigenden Konzentrationen (0,1; 0,5; 1; 10µM). ***:** Signifikanter Unterschied (10µM: Empagliflozin vs. Kontrolle: p=0,0084, $n_{Empagliflozin}$ =12$n_{Kontrolle}$=16) Kontraktionskinetik

Analog zu den Versuchsreihen an humanen und den diabetischen murinen Proben wurden auch in den Experimenten mit Papillarmuskeln des WT-Mausmodells Kontraktionsparameter, wie die Kontraktionsgeschwindigkeit, die Relaxationsgeschwindigkeit und die 90%ige Relaxationszeit, erhoben.

Es konnte keine signifikante Änderung der Kinetikparameter innerhalb der Interventions- oder Kontrollgruppe verglichen mit der jeweiligen Baseline nach Wash-In beobachtet werden.

Bei der klinisch relevanten Dosis von 0,5µM Empagliflozin reduzierte sich die Kontraktionsgeschwindigkeit um etwa 1,3% (p=0,7432; $n_{Empagliflozin}$=18), während die Relaxationsgeschwindigkeit nicht relevant zunahm (p=0,9731; $n_{Empagliflozin}$=21) und die benötigte Zeit bis zur 90%igen Relaxation um 38,7% zunahm (p=0,0646; $n_{Empagliflozin}$=19).

Innerhalb der Kontrollgruppe stellte sich eine ähnliche Entwicklung dar. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nahmen um 4,5% (p=0,1763; $n_{Kontrolle}$=23) bzw. 4% (p=0,1512; $n_{Kontrolle}$=17) ab, während die benötigte Zeit bis zur 90%igen Relaxation 1,5-mal so lang war (p=0,0055; $n_{Kontrolle}$=26).

Der Vergleich der Empagliflozingruppe bei der klinisch relevanten Dosis von 0,5µM gegen die Kontrolle zeigte ebenso wenig einen signifikanten Unterschied für die Kinetikparameter (+dfdt: p=0,5337, $n_{Empagliflozin}$=18, $n_{Kontrolle}$=23; -df/dt: p=0,685, $n_{Empagliflozin}$=21, $n_{Kontrolle}$=26, RT90% (norm): p=0,7029, $n_{Empagliflozin}$=19, $n_{Kontrolle}$=26).

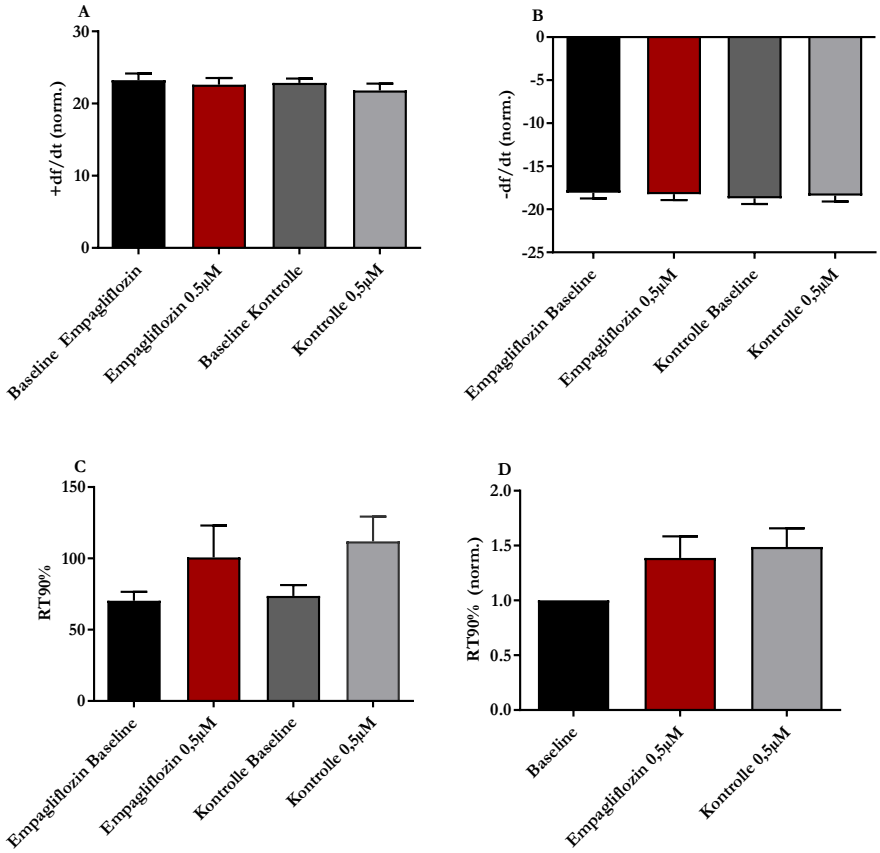

Abbildung 19: Kontraktionskinetik der murinen herzinsuffizienten Proben. Gezeigt sind **(A)** die normalisierte Kontraktionsgeschwindigkeit (+df/dt (norm.) in mN/mm²×s) im Vergleich zur jeweiligen Baseline der Gruppe, sowie die Relaxationsparameter **(B)-(D):** normalisierte Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt (norm.) in mN/mm²×s) und die 90%ige Relaxationszeit als absolut Werte (RT90% in ms) und normalisiert auf die Baseline (RT90% (norm.)). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich

mit der jeweiligen Baseline (Empagliflozin: +df/dt: p=0,7432; $n_{Empagliflozin}$=18; -df/dt: p=0, 9731; $n_{Empagliflozin}$=21; RT90% norm.: p=0,0646; $n_{Kontrolle}$=19; Kontrolle: +df/dt: p=0,1763; $n_{Kontrolle}$=23; -dfdt: p=0, 1512; $n_{Kontrolle}$=17; RT90% norm.: p=0,0055; $n_{Kontrolle}$=26) oder im abschließenden Vergleich miteinander (Empagliflozin vs. Kontrolle: +dfdt: p=0,5337, $n_{Empagliflozin}$=18, $n_{Kontrolle}$=23; -df/dt: p=0,685, $n_{Empagliflozin}$=21, $n_{Kontrolle}$=26, RT90% (norm): p=0,7029, $n_{Empagliflozin}$=19, $n_{Kontrolle}$=26).

3.2.2.2 Kraft-Frequenz-Beziehung

Bei steigenden Frequenzen zeigte sich, der physiologischen Reaktion entsprechend, sowohl in der Interventionsgruppe als auch bei der Kontrollgruppe eine Zunahme der entwickelten Kraft. Bei steigender Stimulationsfrequenz zeigten sich zwar höhere systolische Werte, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Bei maximaler Stimulation ergab sich innerhalb der Empagliflozingruppe ein Unterschied von 26% und bei der Kontrollgruppe ein Unterschied von 68% (4Hz vs. 10Hz $p_{Empagliflozin}$=0,2828; $n_{Empagliflozin}$=14; $p_{Kontrolle}$=0,1285; $n_{Kontrolle}$=12).

Die diastolische Grundspannung blieb bei höheren Frequenzen innerhalb der Interventionsgruppe und auch bei der Kontrollgruppe annährend stabil. Die normalisierten diastolischen Mittelwerte der Empagliflozingruppe unterschieden sich zwischen der bei 4Hz gesetzten Baseline und dem Mittelwert bei 6Hz um 6,7% (p=0,5866, $n_{Empagliflozin}$=15), bei 8Hz um 12,4% (p=0,277, $n_{Empagliflozin}$=15) und bei 10Hz um 13,01% (p=0,2779, $n_{Empagliflozin}$=15). Die Papillarmuskeln der Kontrollgruppe zeigten äquivalent dazu nur sehr geringe Abweichungen von den Werten der 4Hz Baseline. Bei 6Hz wichen sie um 0,2% (p= 0,8957; $n_{Kontrolle}$=12), bei 8Hz 2,1% (p=0,3942, $n_{Kontrolle}$=12) und bei 10Hz 4,2 % (p=0,1741, $n_{Kontrolle}$=12) ab.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 20 veranschaulicht.

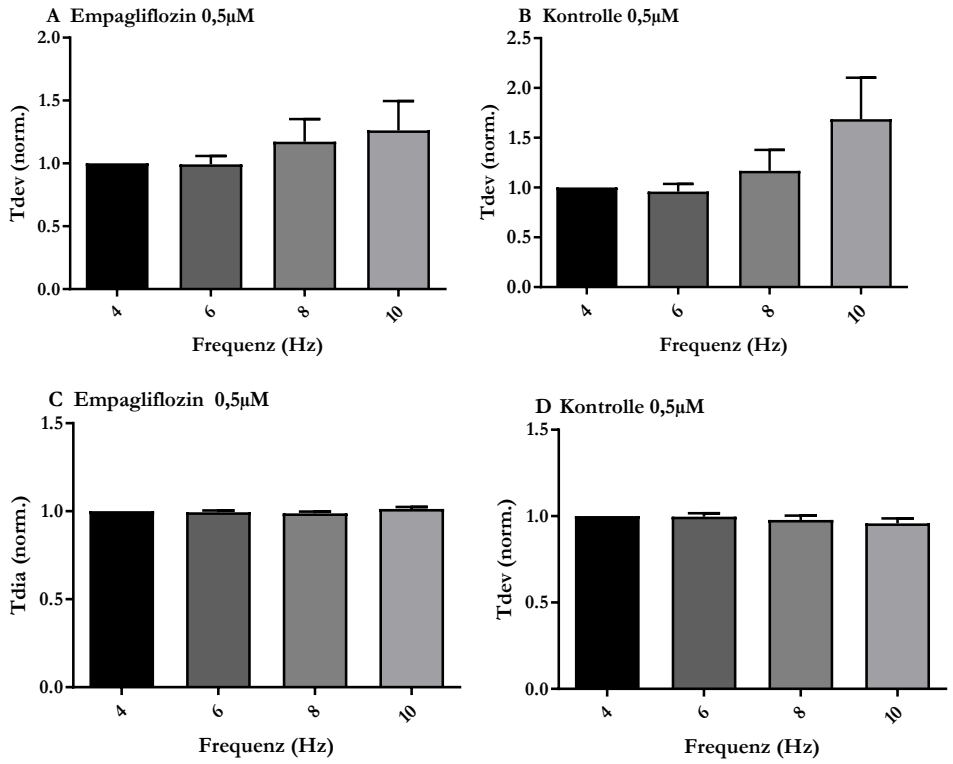

Abbildung 20: FFR: Kraftentwicklung der murinen WT-Proben. Es werden die Mittelwerte der normalisierten systolischen Kräfte unter **(A)** Empagliflozinwirkung und **(B)** Kontrolle bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen (Tdev: 4 Hz; 6 Hz; 8Hz; 10Hz) ($n_{Empagliflozin}$=14; $n_{Kontrolle}$=12) und analog dazu **(C)-(D)** die normalisierte mittlere diastolische Spannung (Tdia (norm.)) der Interventions- und Kontrollgruppe ($n_{Empagliflozin}$=15; $n_{Kontrolle}$=12).

Die Kontraktionsgeschwindigkeit änderte sich bei 6Hz und 8Hz unter Empagliflozin zunächst nur wenig (6Hz p=0,5127; 8Hz p= 0,0752; $n_{Empagliflozin}$=14), bei einer Stimulationsfrequenz von 10Hz kontrahierten die Streifen jedoch signifikant schneller (-14%; p=0,015; $n_{Empagliflozin}$=14). In der Kontrollgruppe ließ sich keine signifikante Änderung der Kontraktionskraft beobachten (6Hz p=0,7557; 8Hz p=0,7728; 10Hz p=0,2289,; $n_{Kontrolle}$=13). Der Vergleich zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe erbrachte keinen signifikanten Unterschied (+df/dt: 6Hz: p=0,9253, 8Hz: p=0,0684, 10Hz: p=0,5508; $n_{Empagliflozin}$= 14, $n_{Kontrolle}$= 13).

Auch die Relaxationszeit zeigte innerhalb der Interventionsgruppe keine signifikante Änderung bei 6Hz (p=0,3525; $n_{Empagliflozin}$=14), allerdings bei 8Hz (p=0,0259; $n_{Empagliflozin}$=15) und 10Hz p=0,008; $n_{Empagliflozin}$=14). Die Zeiten der Kontrollgruppe wichen weder bei 6Hz (p=0,158; $n_{Kontrolle}$=13), 8Hz (p=0,1481; $n_{Kontrolle}$=13) oder 10Hz (p=0,0782 $n_{Kontrolle}$=13) signifikant von den Baselinewerten ab. Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe (-df/dt Kontrolle vs. Empagliflozin: 6Hz: p=0,3755, 8Hz: p=0,3755; 10Hz: p=0,2333 ; $n_{Empagliflozin}$= 14, $n_{Kontrolle}$= 13).

Die zur Beurteilung der Entspannung herangezogene 90%ige Relaxationszeit zeigt innerhalb der Empagliflozingruppe schwankende mittlere Werte. Wie in Abbildung 21 dargestellt, war, verglichen mit der Baseline bei 4Hz, der Unterschied bei auf 6Hz erhöhter Frequenz (p=0,4546, $n_{Empagliflozin}$=14) und bei Stimulation mit 10Hz (p=0,4282, $n_{Empagliflozin}$=14) nicht signifikant, bei 8Hz zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied (-37%, p=0,0057, $n_{Empagliflozin}$=14). In der Kontrollgruppe zeigte sich ein bei 6Hz noch kein signifikanter Unterschied (p=0,3784, =13), jedoch bei steigenden Frequenzen (8Hz p=0,0288; 10Hz p=0,0068; $n_{Kontrolle}$=13). Der Vergleich der Interventions- mit der Kontrollgruppe zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied (RT90% (norm.): 6Hz: p= 0,3002, 8Hz: p= 0,2750, 10Hz: p=0,5006; $n_{Empagliflozin}$= 14, $n_{Kontrolle}$= 13).

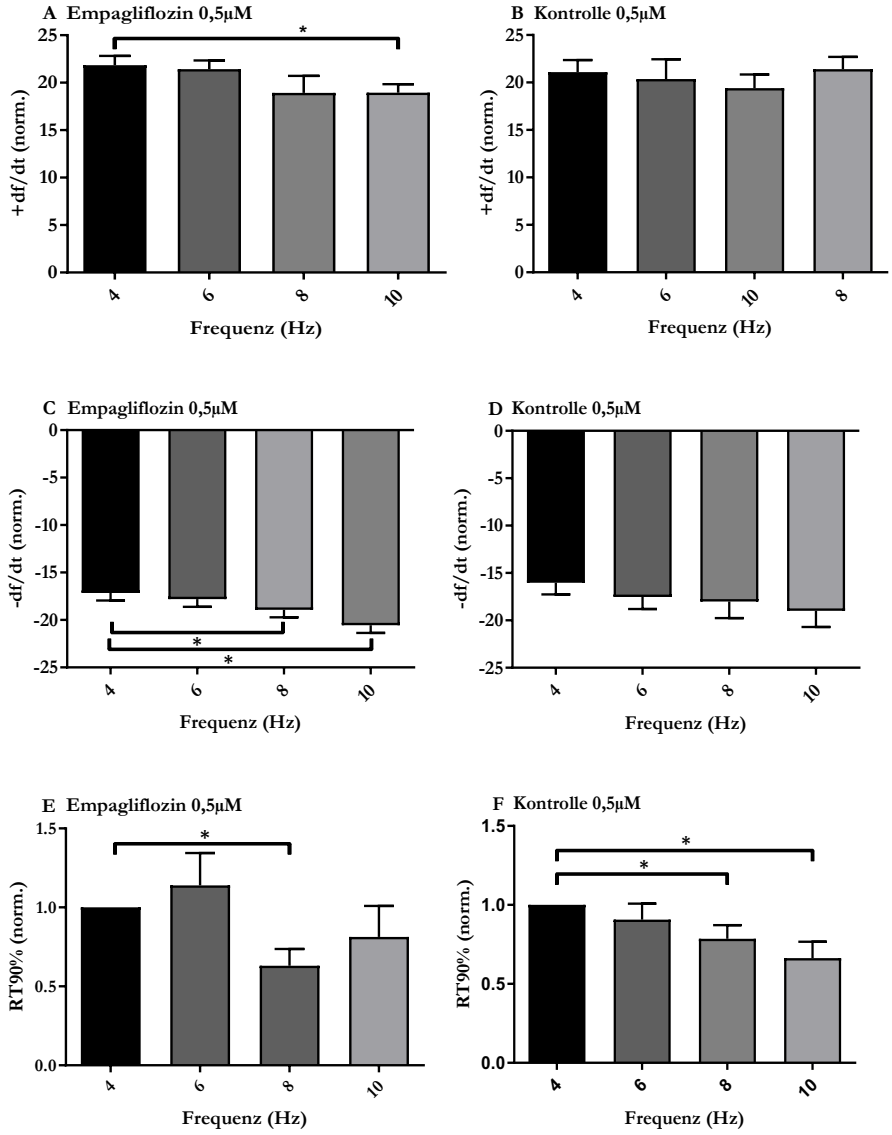

Abbildung 21: FFR: Kontraktionskinetik der murinen WT-Proben. Gezeigt sind die normalisierte Kontraktionsgeschwindigkeit (+df/dt (norm.) in mN/mm²×s) im Vergleich zur jeweiligen Baseline der Gruppe bei unterschiedlichen Frequenzen der **(A)** Empagliflozin- und **(B)** der Kontrollgruppe. Außerdem sind **(C)-(D)** die normalisierte Relaxationsgeschwindigkeit (-df/dt (norm.) in mN/mm²×s) und **(E)-(F)** die

normalisierte 90%ige Relaxationszeit (RT90% (norm.)) dargestellt. Die mit ***** gekennzeichneten signifikanten Unterschiede fanden sich in der Interventionsgruppe bei der +df/dt bei 10Hz (10Hz vs. 4Hz: p=0,015; $n_{Empagliflozin}$=14), der -df/dt bei 8Hz und 10Hz verglichen mit der Baseline (8Hz: p=0,0259; $n_{Empagliflozin}$=15; 10Hz: p=0,008; $n_{Empagliflozin}$=14), sowie der RT90% bei 8Hz (p=0,0057, $n_{Empagliflozin}$=14). Des Weiteren zeigten sich in der Kontrollgruppe für die RT90% signifikante Veränderungen bei Hz und 10 Hz (8Hz: p=0,0288; 10Hz: p=0,0068; $n_{Kontrolle}$=13). Der Vergleich zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe erbrachte für keine Frequenz einen signifikanten Unterschied (+df/dt: 6Hz: p=0,9253, 8Hz: p=0,0684, 10Hz: p=0,5508; -df/dt Kontrolle vs. Empagliflozin: 6Hz: p=0,3755, 8Hz: p=0,3755; 10Hz: p=0,2333, RT90%: RT90% (norm.): 6Hz: p= 0,3002, 8Hz: p= 0,2750, 10Hz: p=0,5006; $n_{Empagliflozin}$= 14, $n_{Kontrolle}$= 13).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit konnte erstmalig zeigen, dass Empagliflozin direkte pleiotrope Effekte auf die diastolische Funktion in isoliertem humanen und murinen Myokard aufweist, ohne die systolische Kraft zu kompromittieren. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Wirkung diabetesunabhängig auftritt.

4.1 Klinische Konzentration

Im Rahmen der EMPA-REG-Studie wurde Patient:innen entweder 10mg und 25mg Empagliflozin verabreicht. Laut Angaben der Europäischer Medicine Agency (EMA) entspricht dies bei 10mg einer maximalen Plasmakonzentration (c_{max}) von 259nM und bei 25mg einer c_{max} von 687nM. Dies wurde im Rahmen von Untersuchung an gesunden Probanden, sowie an DM2-Patient:innen ermittelt.

Beide Kollektive zeigen eine lineare Steigerung der Urin-Glukose-Exkretion bis Dosiserhöhungen auf 25mg. Bei gesunden Probanden konnte eine Fortführung der lineare Wirksteigerung bis 100mg beobachtet werden, bei den Diabetiker:innen schien dieser Effekt bei 25mg gedeckelt zu sein und brachte selbst bei einer Vervierfachung der Empagliflozindosis auf 100mg/Tag keine signifikante Steigerung mehr (Seman et al. 2013).

Zudem weist Empagliflozin eine niedrige Akkumulationsrate auf (Scheen 2014). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die postulierte c_{max} durch die effektive Wirkdosis erreicht wird.

Ausgehend von den beschriebenen Grundlagen wurde für diese Arbeit zunächst ein Studiendesign gewählt, das unterschiedliche Konzentrationsschritte (0,1; 0,5, 1, 10µM) und somit auch die klinisch eingesetzten Konzentrationen beinhaltete. Im Verlauf der Experimente wurde ersichtlich, dass die zeitintensiven Konzentrationsreihen-Experimente besonders die Vitalität des murinen Myokards beeinflussten, dass anschließend durchgeführte Versuche zum frequenzabhängigen Verhalten nur eingeschränkt aussagekräftig waren. Im Sinne der Leitfrage dieser Arbeit nach möglichen pleiotropen Effekten Empagliflozins auf humane und murine myokardiale Trabekel, wurde der Versuchsfokus daher auf die klinisch relevante und für die Behandlung suffiziente Dosis von 0,5µM gelegt. Aufgrund methodischer Einschränkungen wurden die FFR-Versuche der humanen Reihe bei 10µM durchgeführt. Unterschiedliche Reaktionen auf steigende c_{max} wären jedoch im Sinne der vorangegangen beschriebenen gedeckelten Urin-Glukose-Exkretion der Diabetiker:innen vor allem beim Vergleich von Diabetiker:innen mit Nicht-Diabetiker:innen zu erwarten. In dieser Arbeit wurde zum einen auf eine solche Subgruppeneinteilung verzichtet, zum anderen wurden Vergleiche innerhalb der einzelnen Versuchskollektive bei derselben Konzentration von 10µM gezogen. Als Kontrolle dienten immer zeitgleich erhobene Daten desselben Kollektivs, dh. innerhalb einer Gewebegruppe mit derselben Reaktion auf die c_{max}. So wurden die murine Daten nur innerhalb der

diabetischen Gruppe, bzw. innerhalb der nicht-diabetische WT-Gruppe verglichen. Die FFR-Ergebnisse sind somit nicht in ihrer Beurteilbarkeit eingeschränkt.

Die Endzahl der humanen Proben ließ keine Unterteilung in Subgruppe von nicht-DM2- und DM2- Patient:innen zu und konnte aufgrund limitierter Verfügbarkeit nicht erhöht werden. Überdies wurden keine Versuche an Kardiomyozyten aus gesundem, also nicht HF-Myokard gemacht. Vertiefende Untersuchungen eines größeren Probenkollektivs, die diese Unterscheidung ermöglichen, wären daher von großem Interesse.

4.2 Pleiotrope Wirkung Empagliflozins auf Myokardtrabekel

Die multiplen Effekte Empagliflozins sind bereits zu Teilen untersucht und ihre systemischen Auswirkungen in großer Bandbreite diskutiert worden. Natürlich lässt sich nicht von der Hand weisen, dass eine verbesserte Herzleistung auch auf die nachweislich positiven pharmakodynamischen Effekte auf Blutdruck, Blutglukosespiegel, Plasmavolumen oder Gefäße (Lytvyn et al. 2017; Lin et al. 2014) zurückzuführen sein könnte. Vorarbeiten zeigen, dass eine durch Veränderungen der kardiovaskulären Risikofaktoren bedingte Reduktion der Mortalität zwar auftritt (Gæde et al. 2008), diese jedoch erst nach Jahren und nicht innerhalb des in der EMPA-REG-Studie beschriebenen Zeitraums von drei Monaten evident wird. Die Ergebnisse der EMPA-REG-Studie legten somit die Vermutung einer von den systemischen Stellgrößen unabhängigen, direkten kardialen Wirkung nahe. Mit dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Empagliflozin die diastolische Grundspannung verringert, ohne die systolische Kraft zu reduzieren. Weiterhin zeigte sich kein Effekt auf die Kontraktionskinetik, das frequenzabhängige oder das Post-Rest-Verhalten

Dabei wurde die Wirkung Empagliflozins erstmalig in einem Kontext untersucht, der die Beeinflussung über systemische Effekte ausschließt, indem isolierte myokardiale Trabekel verwendet wurden. So konnten die gezeigten Ergebnisse eindeutig auf eine direkte Wirkung auf Trabekelebene zurückgeführt werden. Sowohl in den humanen als auch in der murinen Proben zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe hinsichtlich der diastolischen Grundspannung. Überdies zeigen die Wash-Out-Versuche der murinen db/db-Proben dieser Arbeit deutlich, dass die zunächst signifikante Reduktion nur unter Anwesenheit Empagliflozins auftrat und reversibel war. Der zeitliche Zusammenhang zwischen der erneuten Zunahme der diastolischen Spannung und dem Auswaschen kann als weiterer Beleg einer direkten kardialen Wirkung gewertet werden.

In diesem Sinne untersuchte eine in-vivo-Studien mögliche Effekte des Wirkstoffs bei KHK-Patient:innen. Es zeigte sich nach dreimonatiger Behandlung mit 10mg/Tag echokardiografisch eine verbesserte diastolische Funktion in Form einer gesteigerten Füllungsgeschwindigkeit in der frühen Diastole sowie ein verminderter linksventrikulärer Masseindex. Die Daten dieser prospektiv, aber unkontrollierte Studien suggerierten eine

durch Empagliflozin bedingte Umkehr des linksventrikulären *Remodellings*, welches nicht durch eine Blutdrucksenkung und ein vermindertes linksventrikuläres Volumen erklärbar war (Verma et al. 2016).

Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie an diabetischen, übergewichtigen db/db-Mäusen, die trotz ausbleibender Blutdrucksenkung und ohne dass signifikante Änderungen der Körpermaße nachweisbar waren, einen vorteiligen Effekt auf die in-vivo erhobenen Blutdruckparameter postulierten (Habibi et al. 2017).

In die humanen und murinen Ergebnisse reihte sich die Arbeit von Shi et al. (2017) ein. Zebrafischembryonen, die durch eine Behandlung mit Aristolochiasäure regulär innerhalb von drei Lebenstagen eine Herzhypertrophie, Bradykardie und schwerem Herzversagen zeigen, wiesen bei Vorbehandlung mit Empagliflozin eine dosisabhängige verbesserte histopathologische kardiale Struktur und eine geringere Expression an Herzinsuffizienzmarkern auf.

In diesem Zusammenhang sind auch die Daten der in-vivo-Experimente an Zucker *diabetic fatty* Rats (ZDF-Ratten) als weiterer Hinweis auf eine direkte kardiale Wirkung zu betrachten (Pabel et al. 2018). Bei den Ratten, die eine diastolische Dysfunktion aufweisen, konnte echokardiografisch beobachtet werden, dass die eigentlich pathologisch verlängerte Relaxationszeit sich bereits 30min nach intravenöser Empagliflozingabe verkürzte und die Ratio aus früher zu später Füllungsgeschwindigkeit sich verbesserte, während die EF unverändert blieb (Pabel et al. 2018).

Die Mehrzahl der in-vivo Studien zeigte eine reduzierende Wirkung sowohl auf systolische als auch auf diastolische Blutdruckparameter (Baker et al. 2014). In in-vivo Studien an Patient:innen mit DM2 und Hypertension ließ sich bei beiden Geschlechtern eine Verbesserung des diastolischen und systolischen Blutdrucks unter Therapie mit Empagliflozin beobachten (Hach et al. 2012, Tikkanen et al. 2015).

Entgegen dieser in-vivo-Daten konnte diese Arbeit in-vitro keinen Einfluss auf die systolische Kontraktionskraft nachweisen. In in-vivo-Experimenten können systemische Effekte über eine Verkettung indirekt die kardiale Funktion, in diesem Falle z.B. die systolische Kontraktionskraft beeinflussen. Anzuführen sind hier unter anderem die Reduktion des intravasalen Volumens (Inzucchi et al. 2018a), sowie die signifikante Verbesserung der mit systolischen Druckparametern assoziierten arteriellen Steifigkeit und dem vaskulären Widerstand (Chilton et al. 2015). Durch das Experimentdesign dieser Arbeit konnte derartige Confoundereffekte jedoch ausgeschlossen werden und die ausbleibende Veränderung unter Empagliflozingabe kann daher als Evidenz für einen fehlenden Einfluss auf die systolische Kontraktionskraft gewertet werden.

Erstmalig konnte mit dieser Arbeit eine direkte Veränderung der diastolische Grundspannung nachgewiesen werden - unabhängig von systemischen Einflussfaktoren wie dem Volumenstatus oder Gefäßwiderstand und damit auch dem Blutdruck. Es konnte somit

gezeigt werden, dass Empagliflozin das maßgebliche Kriterium einer diastolischen Dysfunktion verbessern kann.

Hinweise darauf konnten auch in zwei Studien mit Wirkstoffen derselben Medikamentenklasse gefunden werden. Diese maßen die linksventrikuläre diastolische Funktion mittels Echokardiografie bei Typ 2-Diabetiker:innen unter Canagliflozin nach drei (Matsutani et al. 2018) und unter Dapagloflozin nach sechs Monaten (Shim et al. 2021). In beiden Studien wurde eine signifikante Verbesserung diastolischer Funktionsparameter nachwiesen.

In einem prädiabetischen Rattenmodell wurde mittels implantierter Radiotelemetrie der arterielle Blutdruck kontinuierlich überwacht. Nach 10-wöchiger Empagliflozingabe konnte kein signifikanter Unterschied der Blutdruckparameter nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung zeichnete sich jedoch ein abnehmender Trend der diastolischen Blutdruckwerte innerhalb der Empagliflozingruppe ab, wohingegen die Werten der Kontrollgruppe relativ konstant blieben (Kusaka et al. 2016). Zu bemerken ist hierbei, dass eine Abnahme des diastolischen Blutdrucks nur ein indirekter Hinweis auf verbesserte Relaxationsfähigkeit und damit absinkende diastolische myokardiale Grundspannung sein könnte.

Eine genauere Untersuchung ließen die in-vivo-Versuchen an weiblichen db/db-Mäusen von Habibi et al. (2017) zu. Diese konnte ebenfalls keine Reduktion der Blutdruckparameter reproduzieren, fanden jedoch Hinweise für eine Verbesserung der diastolischen Steifigkeit, in die sich die Daten dieser Arbeit einreihen lassen. Hierfür fütterten die Autoren die Mäusen mit Empagliflozin und betrachteten die Wirkung auf Blutdruck, Herzfunktion und Diabetesparametern, wie dem HbA1c und Nüchternblutglukoseleveln. Hinsichtlich der kardialen Parameter zeigte sich echokardiografisch zu Beginn in beiden Gruppen eine beeinträchtigte diastolische Funktion (E´/A´-Ratio und E/E´-Ratio). Im Verlauf verbesserten sich in der Empagliflozingruppe die Relaxationsparameter, ohne dass die Blutdruckwerte alternierten. Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der echokardiografisch kontrollierten diastolischen Funktion kamen auch Versuche einer anderen Gruppe an einem diabetischen Mausmodell (Hammoudi et al. 2017).

Die bis dato durchgeführten Studien untersuchten nur in indirekter Form, echokardiografisch (Habibi et al. 2017, Hammoudi et al. 2017) oder radiotelemetrische (Kusaka et al. 2016) oder im Kontext des ganzen Organismus den Einfluss Empagliflozins oder verwandter SGLT-2-Inhibitoren auf die kardiale Funktion. Die Daten dieser Arbeit zeichnet somit aus, dass sie die ersten in-vitro-Daten darstellen, die im Gegensatz zu den beschriebenen Untersuchungen eine isolierte Betrachtung unabhängig von systemischen Effekten zulassen und die diastolische Veränderung als singuläres direktes Target Empagliflozins ausmachen.

In Zusammenschau der in dieser Arbeit gezeigten Beobachtungen und den in Vorarbeiten nachgewiesenen Veränderungen lassen sich die Effekte Empagliflozins bezogen auf die

kardiovaskuläre Prognoseverbesserung generell in kurzfristige, direkte oder mittel- bis langfristige Effekte differenzieren.

Damit trägt diese Arbeit entscheidend zur Aufklärung der Ergebnisse der EMPA-REG-Studie bei, wirft aber im Folgenden die Frage nach möglichen zugrunde liegenden Mechanismen auf.

4.3 Diabetes-(un-)abhängige Wirkung

Diese Arbeit konnte erstmalig im direkten Vergleich nachweisen, dass Empagliflozin in diabetischem und nicht-diabetischem HF-Myokard seine Wirkung in annährend gleichem Maße entfaltete.

Grundsätzlich war die EMPA-REG Studie auf ein Patient:innenkollektiv begrenzt, dass ausschließlich aus DM2-Patient:innen bestand (Zinman et al. 2015). Die existierenden murinen Daten stammten meist aus diabetischen Tiermodellen ohne vergleichende gesunde Gruppen (Habibi et al. 2017, Hammoudi et al. 2017, Zhou et al. 2017). Eine später veröffentlichte Subgruppenanalyse der EMPA-REG-Studie ergab erste konkrete Hinweise auf eine Diabetesunabhängigkeit (Inzucchi et al. 2018a). Bei dem nach HbA1c-Werten und -senkung stratifizierte Patient:innenkollektiv, war zu beobachten, dass die positiven kardiovaskulären Effekte in allen Subgruppen in konstanten Raten auftraten unabhängig vom Ausgangs-HbA1c oder dem Ausmaß der HbA1c-Reduktion (Inzucchi et al. 2018b).

Erste Daten aus Nagermodellen zeigten, dass in kardial vorerkrankten Nagern die positiven kardialen Effekte auch in Abwesenheit einer diabetischen Stoffwechsellage nachweisbar waren. Die Arbeitsgruppe um Connelly et al. (2019) beschrieb eine verbesserte kardiale Funktion bei weiblichen Ratten mit HFpEF im Sinne einer reduzierten Kardiomyozytenhypertrophie und dadurch verminderten linksventrikulären Masse, sowie einer verbesserten diastolischen Funktion. Allerdings konnten sie nicht belegen, dass die Effekte durch direkte kardiale Wirkung hervorgerufen wurden.

Dies gelang der Arbeitsgruppe um Byrne et al. (2017). Hierfür wurden nicht-diabetische Mäuse mit einer EF <45% nach zweiwöchiger Fütterung mit Empagliflozin oder einem Placebo in-vivo echokardiografiert. Anschließend wurden die explantierten Herzen noch in einem ähnlichen Versuchsaufbau wie in dieser Arbeit ex-vivo und abschließend histologisch untersucht. Es zeigte sich hier in-vivo eine signifikante Verbesserung der Ejektionsfraktion, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo- und Empagliflozingruppe in Bezug auf die diastolischen Funktionsparameter wie den linksventrikulären Füllungsdruck oder der diastolischen Steifigkeit. Allerdings lohnt auch hier ein genauer Blick, der zeigt, dass sich in der Empagliflozingruppe, wenn auch nicht signifikant, doch einen Trend der Verbesserung der diastolischen Parameter zeigte. Zudem diskutieren die Autor:innen nicht, dass eine verbesserte Relaxation auch zum nachgewiesenen signifikanten Unterschied des systolischen Auswurfs beigetragen haben kann (Vasan 2003). Die Studie kommt abschließend zu dem

Schluss, Empagliflozin wirke zwar auch in nicht-diabetischen Individuen, bedinge dann jedoch andere Effekte.

Es sollte in der Tat die Frage gestellt werden, ob Empagliflozin absolut diabetesunabhängig wirkt oder zumindest ein unterschiedliches Dosis-Wirkverhalten bei unterschiedlichen anwesenden Glukosespiegeln zu beobachten ist. Die Glukose-Ausscheidung im Urin scheint zumindest bei Diabetes-Patient:innen ein Wirkmaximum bei 25mg Empagliflozin aufzuweisen, während bei gesunden Probanden die Rate bis 100mg Empagliflozin weiter gesteigert werden konnte (Michel et al. 2015). Aufgrund methodischer Einschränkungen konnte in dieser Arbeit die erhobenen Daten diabetischer muriner Proben nur mit der klinisch relevanten Konzentration getestet werden. Ein Vergleich der kardialen Reagibilität diabetischer und nicht-diabetischer-Proben auf unterschiedlichen Konzentrationen wäre daher von weiterem Interesse.

Auf Grund von Limitationen in der Verfügbarkeit explantierter humaner Herzen konnte die Anzahl der gewonnen Proben nicht beliebig erweitert werde. Eine Einteilung in Subgruppe, die den Unterschied zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Patienten:innen erlauben, war aufgrund zu kleiner Endzahlen nicht möglich, wäre jedoch weiterführend bedeutend. Aufgrund ethischer Gesichtspunkte konnte eine vergleichende Versuchsreihe an gesunden humanen Herzen nicht durchgeführt werden.

Zu Beginn dieser Arbeit hatte lediglich die Phase I Studie zum Medikament Empagliflozin an gesunden menschlichen Probanden hinsichtlich Sicherheit, Pharmakokinetik und -dynamik getestete. Dabei wurden allerdings keine expliziten kardialen Parameter erhoben, sondern unspezifisch geschaut, ob unerwünschte Wirkungen nach Einnahme auftraten (Sarashina et al 2013).

Wie bereits in der Einleitung erläutert, spielt das RAAS-System und damit auch die Niere eine kritische Rolle in der Entwicklung der Herzinsuffizienz. Es ist daher nicht verwunderlich, dass ein nephroprotektiver Effekt sich prognostisch günstig auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz auswirkt. Insbesondere für Patient:innen mit einer diastolischen Dysfunktion ist eine Verschlechterung der Nierenfunktion mit einem Anstiegt der Mortalität assoziiert (Roth et al. 2017). Daher darf die Studienlage bezüglich SGLT-2-Inhibitoren und der Niere an diesem Punkt nicht unerwähnt bleiben. Die Studie Dapagliflozin on Renal Outcomes and Cardiovascular Mortality in Patients With Chronic Kidney Disease (Dapa-CKD) (Heerspink HJL et al. 2020) und die Canagliflozin on Renal and Cardiovascular Outcomes in Participants With Diabetic Nephropathy (CREDENCE-) Studie (Mahaffey, KW et al. 201) 9zeigte jeweils eine starken positiven Effekt auf das renale Outcome definiert als Progression einer chronischen Niereninsuffizienz, terminalem Nierenversagen und Tod. Es zeigte sich, dass eine SGLT2-Inhibition aufgrund der geringeren Na^+-Resorption und damit höheren Na^+-Konzentration an der Macula densa zu einer Verstärkung des tubuloglomerulären Feedbacks führt. Die konsekutiv folgende Vasokonstriktion der glomerulären Arteriolen und der dadurch verringerte

transglomerulären Druck, schütze folglich die glomeruläre Funktion (Mahaffey, KW et al. 2019; Heerspink HJL et al. 2020).

2020 erschienen mehrere Studien, wie die DAPA-HF-Studie (McMurray, JJV et al. 2020) oder die EMPEROR-reduced-Studie (Packer M et al. 2020), die den vermuteten Klasseneffekt der SGLT2-Inhibitoren unabhängig einer diabetischen Stoffwechsellage in Individuen mit einer HFrEF bestätigten. Zudem erschienen die Ergebnisse der EMPEROR-preserved-Studie (Anker, SD et al. 2020), die erstmalig die Wirkung Empagliflozins in nicht-diabetischen HFpEF-Patient:innen untersuchte. Beim Verfassen dieser Arbeit stand noch die Veröffentlichung der Ergebnisse der DELIVER-Studie (Solomon et al. 2021) die die gleichen Endpunkte unter Dapagliflozintherapie betrachtete aus. In Zusammenschau kamen die genannten Studien zu ähnlichen Ergebnissen: Signifikant geringe Hospitalisierungsraten und weniger kardiovaskulärbedingte Todesfälle unabhängig eines pathologisch veränderten Zuckerhaushalts. Eine groß angelegte Metaanalyse bestätigte ebenfalls, dass Patient:innen mit eingeschränkter kardialer Funktion mit erhaltener oder reduzierter, mit oder ohne Diabeteserkrankung von einer SGLT2-Inhibitor-Therapie in Bezug auf die kardiovaskulären Endpunkte profitieren (Singh, AK et al. 2021).Die Daten dieser Arbeit ließen zwar nur die Schlussfolgerung der diabetesunabhängigen Wirkung in HF-Myokard zu, boten damit aber bereits erste Evidenz für die potentiellen positiven Effekte bei kardial erkrankten Patienten ohne Diabetes mit diastolischer Dysfunktion. Mögliche Targets

Offen blieb bisher die Frage nach möglichen Targets von Empagliflozin am (menschlichem) Herzen, die eine Reduktion der Grundspannung bewirken. Diese Arbeit liefert Belege dafür, dass ein Eingriff in den Ionenhaushalt der Kardiomyozyten nicht als ursächlich zu betrachten ist. Grundsätzlich bleiben somit Änderungen der Relaxation auf Ebene der kontraktilen Elemente der Kardiomyozyten oder inter- und intrazelluläre Veränderung im Sinne einer Fibrosierung zu erwägen, da diese als weitere maßgebliche Stellgrößen der myokardialen Steifigkeit gelten (Franssen und Gonzales Miqueo, 2016).

Habibi et al. (2017) konnten eine Reduktion profibrotischer und hypertrophieinduzierender Signalwege durch Empagliflozin nachweisen. Sie zeigten, dass durch Empagliflozin die linksventrikuläre Hypertrophie reduziert werden konnte, welche in anderen Studien klar mit der diastolischen Dysfunktion in Verbindung gebracht wurde (Yue et al. 2007, Mandavia et al. 2013). Den größeren Anteil an der diastolischen Funktionsverbesserung schrieben sie jedoch doch reduzierenden Wirkung auf fibrotische, interstitielle Prozesse zu (Habibi et al. 2017). Dieser Erklärungsansatz, also eine Wirkung auf chronische Regulatoren wie Fibrose oder eine veränderte Herzgeometrie zurückzuführen, ist in Anbetracht des unmittelbaren Wirkeintritts der in dieser Arbeit nachgewiesenen Effekte jedoch nicht ausreichend. Hinzu kommt, dass in dieser Arbeit durch den in-vitro-Versuchsaufbaus mit isolierten Muskeltrabekeln systemische Effekte ausgeklammert wurden. Es erscheint daher sinnvoll, nicht starr nach einen singulären Wirkmechanismus Empagliflozins zu suchen, sondern vielmehr die Erwägung in Betracht zu ziehen, dass Empagliflozin wie bereits beschrieben

über verschiedenen Mechanismen – direkte und indirekte- die diastolische Funktion beeinflusst.

Natürlich wirft dies die Frage auf, über welche Targets Empagliflozin die direkte diastolische Funktionsverbesserung bewirkt. Auch hierfür liefert diese Arbeit erste Hinweise. Als wichtiger unmittelbaren Regulator der myokardialen Kontraktilität sollten Eingriffe in den Ca^{2+}-Haushalt der Kardiomyozyten in Betracht gezogen werden (Sossalla et al. 2010a). Mit der Herzinsuffizienz sind typischerweise erhöhe diastolische Ca^{2+}-Spiegel und erniedrigte systolische Ca^{2+}-Transienten assoziiert (Fischer et al. 2013). Folglich ist mehr Ca an Troponin C gebunden. Konsekutiv ist die Grundspannung während der Diastole erhöht. Die aufgebrachte Kontraktionskraft ist aufgrund der reduzierten Ca^{2+}-Level und der bereits bestehenden erhöhten diastolischen Grundspannung nicht mehr so stark steigerbar, wie es aus einem völlig entspannten Grundzustand mit normalen Ca^{2+}-Leveln möglich ist (Bers 2002). Die Ergebnisse der humanen FFR-Versuche dieser Arbeit zeigte eine dem physiologischen Kraft-Frequenz-Verhalten entsprechende Entwicklung und auch die murinen Daten zeigen einen dementsprechenden Verlauf. Auch das PR-Verhalten zeigte sich unter Empagliflozin nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusammenfassend ergab sich in den FFR- und PR-Versuchen dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Veränderung der Ionen-Homöostase durch Empagliflozin.

In-vivo-Experimente zur systolischen Funktion zeigten, dass weder bei Patient:innen mit Herzversagen (Verma et al. 2016) noch im Maus- (Habibi et al. 2017, Hammoudi et al. 2017) oder Rattenmodell (Pabel et al. 2018) relevante Änderungen der EF unter Empagliflozingabe auftraten. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass der primäre Wirkmechanismus nicht bei stark alternierenden Ca^{2+}-Spiegel zu finden ist. Diese Hypothese validierten weitere Untersuchungen des Ca^{2+}-Haushalt muriner und humaner Kardiomyozyten. Die systolische Ca^{2+}-Transienten-Amplitude zeigte sich dabei unbeeinflusst von Empagliflozin, ebenso die Ca^{2+}-Ausstromrate und auch die diastolischen Ca^{2+}-Spiegel waren unter Empagliflozin nicht verändert (Pabel et al. 2018). Pabel et al. (2020) leiteten in einer verblindeten Versuchsreihe Kardiomyozyten aus humanen pluripotenten Stammzellen ab, die sie mit Empagliflozin bzw. einem Placebo behandelten. Nach zwei und nach acht Wochen maßen sie mit einem Epifluoreszenzmikroskop die Ca^{2+}-Transienten-Amplitude und -Kinetik, die diastolischen Ca^{2+}-Level und den Ca^{2+}-Gehalt des SR. Zudem untersuchten sie konfokal-mikroskopisch, ob während der Diastole vermehrt proarrhythmogene Ca^{2+}-Funken auftraten. Sie ergänzten die Untersuchung zum Einfluss Empagliflozins auf das EC-Coupling um Versuche mittels *patch-clamp*-Technik, um die Aktionspotentialdauer, -amplitude und das Ruhemembranpotential nach achtwöchiger Empagliflozinbehandlung zu evaluieren. Es zeigte sich, dass in gesunden Kardiomyozyten keines der Parameter durch die Behandlung mit Empagliflozin signifikant verändert wurde. Weiterhin zeigte die Gruppe, dass Empagliflozin einen neutralen Effekt auf die Expression der für die Ionenhomöostase essenziellen Proteine und den dazugehörigen Genen, wie den Ryanoidrezeptor, die SERCA2a, Phospholamban und der CaMKII aufwies (Pabel et al. 2020). Die Daten von

Baartscher et al (2017) stehen den Daten bezüglich der unveränderten Ca^{2+}-Spiegeln zunächst kontrastierend gegenüber. In-vitro untersuchten sie den Einfluss Empagliflozins auf die zytoplasmatischen Na^{+}- und Ca^{2+}-Spiegel in isolierten Kaninchen- und Ratten-Myozyten. Sie zeigten, dass Empagliflozin den Na^{+}/H^{+}-Austauscher inhibiert und so die durch extrazellulär hohe Glukosespiegel erhöhte intrazellulären Na^{+}- und Ca^{2+}-Spiegel, senkte. Zu bemerken ist jedoch, dass der Na^{+}/ H^{+}-Austauscher insbesondere im pathologisch veränderten HF-Organismus überproportional stark aktiv ist (Yokoyama et al. 2000). Dementsprechend wirkt sich eine Inhibierung des Na^{+}/ H^{+}-Austauscher im gesunden Myokard weniger stark aus (Baartscher et al. 2005). Dies bietet möglicherweise einen Erklärungsansatz für die Daten von Pabel et al. (2020), da die von letzteren verwendeten Zellen aus gesunden pluripotenten Stammzellen stammen, vermutlich also eine nicht pathologisch veränderte Na^{+}/ H^{+}-Austauscher -Aktivität aufwiesen.

Geht man davon aus, dass die Gen- und Proteinexpression der im Vorfeld genannten Proteine nicht verändert ist, bleibt als mögliches Target Empagliflozins noch die Regulation der Proteinaktivität selbst. Diese weicht im kranken Myokard vom physiologischen Zustand ab (Yokoyama et al. 2000). Abhängig davon wirken sich eine Aktivitätsänderungen stärker oder eben weniger stark aus.

In Anbetracht erhöhter CaMKII -Aktivität in der Herzinsuffizient ist damit einhergehend erhöhter Ca^{2+}-Spiegel führt eine Normalisierung der CaMKII-Aktivität in der Herzinsuffizienz zu reduzierten ergo veränderten Ca^{2+}-Spiegeln, wohingegen eine weitere Normalisierung einer ohnehin nicht veränderten CaMKII-Aktivität zu keiner Änderung der Ionenspiegel führt. So lassen sich die Daten aus Experimenten mit murine und humane HF-Kardiomyozyten mit denen von Pabel et al. (2020) vereinen, die in vitro nach einer 24-stündigen Behandlung mit Empagliflozin eine deutliche Abnahme der CaMKII-Aktivität und ein damit einhergehendes reduziertes SR-Ca^{2+}-Leck zeigten (Mustroph et al 2018). Hammoudi et al. (2017) beobachteten, dass die durch Empagliflozin bedingte erhöhte Phospholamdanphosphorylierung reduzierend auf die SERCA2-Aktivität wirkt und so konsekutiv zu niedrigeren Ca^{2+}-Level führte.

Zu erwähnen sei auch, dass in einem HFpEF-Modell mit Dapagliflozin zwar in-vivo Effekte auf den Ca^{2+}- und Na^{+}-Haushalt nachweisen konnten, diese jedoch bei der Behandlung isolierter Kardiomyozyten nicht zeigen konnten (Cappetta et al 2020).

Weitere maßgeblich die Grundspannung und Kontraktionskraft bestimmende Faktoren sind die regulatorischen Proteine der Myofilamente selbst, also Myosin, Aktin und Troponin unabhängig der umgebenen Ionenkonzentrationen (Borberly et al. 2009). Typischerweise zeigt sich eine Veränderung der Myofilamentenfunktion bei verschiedenen Erkrankungen des Herzens und der HF (Hamdani et al. 2008, van der Velden 2011) und konnte mit einer erhöhten diastolischen Grundspannung in Verbindung gebracht werden (Hamdani et al. 2013). Unter anderem daran beteiligt ist eine Veränderung des Titins, dass durch posttranslationale Modifikation in Form von Oxidation oder Phosphorylierung in seine

zweite Isoform überführt werden kann (Hamdani, Bishu et al. 2014). Vorarbeiten konnten die diastolische Dysfunktion mit verminderten Phosphorylierungsleveln myofilamentarer Regulatorproteine in Verbindung bringen (van Heerebeek et al. 2006, Linke 2008, Borbely et al. 2009). Die physiologischen funktionalen Phosphorylierungslevel wieder herzustellen, reduziert dementsprechend die diastolische Steifigkeit der Myofilamente und verbessert die myokardiale Funktion bei Herzkrankheiten (Hamdani et al. 2009, Hamdani et al. 2013).

Tatsächlich bewirkte Empagliflozin in den demembranisierten (skinned) Kardiomyozyten aus HFpEF-Proben eine insgesamt reduzierte passive Myofilamentsteifigkeit, während die Kraftentwicklung unbeeinflusst blieb. Es zeigte sich, dass Empagliflozin die Gesamtphosphorylierung der Myofilamentproteine Titin, MyBPC und TnI verbessert (Pabel et al. 2018). Folglich scheint Empagliflozin bei schwerer diastolischer Dysfunktion dem Pathomechanismus der reduzierten Phosphorylierung der Myofilamentproteine entgegenzuwirken.

Es ist denkbar, dass Empagliflozin über noch nicht erforschte Signalwege oder lokale Alterierung in sogenannten Microdomänen über den Na^+/Ca^{2+}-Haushalt Einfluss auf die Phosphorylierung der Myofilamente nimmt (Pabel et al. 2018).

Bis dato noch nicht erläutert wurde die Diskussion um die namensgebende Wirkung selbst. Kontrovers diskutiert wurde dahingehend vor allem die kardioprotektive Wirkung der SGLT2-Inhibitoren insbesondere aufgrund der Tatsache, dass der SGLT2 in kardialem Gewebe nur sehr schwach exprimiert wird. Dies gilt zumindest für Kardiomyozyten unter normalen oder ischämischen und hypertrophischen Konditionen (Zhou et al. 2003, Chen et al. 2010, Vrhovac et al. 2015). Im Gegensatz dazu wird der SGLT1 am Herzen vermehrt exprimiert (von Lewinski et al. 2010). Eine Studie konnte jedoch zeigen, dass Endothelzellen in den Koronararterien des Schweins, die normalerweise kein SGLT2 tragen, bei hohen Glukosespiegeln die SGLT2-Expression hochregulieren (Park et al. 2018). Die Vermutung über eine mögliche vermehrte SGLT2-Expression an Kardiomyozyten in hyperglykämen Zuständen liegt hierbei nahe. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit lässt die Hypothese jedoch eine Frage offen: unter physiologischen, nicht diabetischen Bedingungen wäre der SGLT2-Expressionsreiz nicht vorhanden, ein weiterer Hinweis auf möglicherweise pleiotrope Targets als Grundlage der im Vorfeld beschriebenen Effekte.

Eine diabetische und nicht-diabetische Stoffwechsellagen berücksichtigendes Modell bietet die These zur verbesserten myokardialen Funktion durch vermehrten Glukoseaufnahme. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass in euglykämen-hyperinsulinämen db/db-Mäusen durch 8-wöchige Empagliflozingabe (10mg/T) der zur Verfügung stehende Blutglukosespiegel mit erhöhter Geschwindigkeit gesenkt wurde und Leber, Niere und Herz eine erhöhte Glukoseaufnahme aufwiesen (Kern et al. 2016). Die Ergebnisse suggerierten, dass die festgestellte verbesserte myokardiale Funktion durch die vermehrten kardiale Glukoseaufnahme bedingt war. Unter physiologischen Bedingungen gewinnen Kardiomyozyten ihre Energie hauptsächlich aus der β-Oxidation von Fettsäuren.

Herzinsuffizienz ist jedoch auch durch eine gestörte Fettsäuren-Oxidation gekennzeichnet (Shao et al. 2015; Booij et al. 2017). Müssen die Kardiomyozyten ihre Energie über den Glukosestoffwechsel generieren, nehmen sie das Substrat über GLUT-Transporter auf (Shao et al. 2015). Studien deuten darauf hin, dass in der Herzinsuffizienz unter anderem der GLUT1 und GLUT4 herunterreguliert sein können (Razeghi et al. 2002, Booij et al 2017) und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch transgenen Überexpression des GLUT1 verhindert werden kann (Liao et al. 2002). Eine ohnehin vom physiologischen Zustand abweichende Energiegewinnung gepaart mit einer nicht optimalen Versorgung mit Glukose mündet erklärlicherweise in einer Funktionseinbuße. Im Umkehrschluss kann eine Verbesserung der Glukoseaufnahme auch zu einer verbesserten Leistung der Kardiomyozyten führen und stellt somit ein zu beachtendes Target Empagliflozins dar. Basierend auf diesen Überlegungen konnten Mustroph et al. (2019) zeigen, dass nach einer 24-stündigen Exposition von humanem und murinem herzinsuffizienten Gewebe gegenüber Empagliflozin die GLUT1-Expression signifikant erhöht war, während die Expression der anderen Transporter der GLUT-Familie nicht verändert war (Mustroph et al. 2019). Sie zeigten auch, dass durch die vermehrten Transportmöglichkeiten, die intrazellulären Glukosespiegel in allen drei Gewebeproben erhöht waren. Andere Gruppen konnten jedoch auch eine starke Zunahme der zuvor stark verminderten Aktivität der GLUT4 und weiterer für die β-Oxidation essentiellen Marker beobachten (Yuristas et al. 2019). In diesem Sinne wäre auch eine Verbesserung der kardialen Leistung in einem nicht-diabetischem herzinsuffizienten Organismus erklärbar. Weiterhin führt die gestörte β-Oxidation im HF-Organismus zu einem verstärkten Energiegewinnung aus Ketonkörpern. Diese ist zum einen beim Diabetes mellitus erkrankten beobachtbar (Aubert et al. 2016), jedoch auch in Zeiten vermindertem Sauerstoffangebots. Letzteres kann auch in gesunden Herzen auftreten, relativ gesehen bei vermehrter Herzarbeit und nur begrenzt steigerbarem Blutfluss (Bing 1955). Essenziell ist, dass die Verwertung von Ketonkörpern verglichen mit der Oxidation von Fettsäuren energieeffizienter in Bezug auf ATP-Verfügbarkeit pro investiertes Mol Sauerstoff ist (Kashiwaya et al. 1994; Sato et al. 1995; Veech 2004). Empagliflozin führt zu einem erhöhten Level an zirkulierenden Ketonkörpern. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass nicht nur die Serumkonzentration erhöht war, sondern auch die Bioverfügbarkeit intrazellulär, indem Empagliflozin zu einer vermehrten Expression von Ketontransportern und zwei weiteren für die Ketoneogenese essenziellen Enzymen führt. Dies konnte schlussendlich mit einer erhöhten kardialen ATP-Produktion assoziiert werden (Yurista et al 2019).

Weiterreichend bedeutet eine suffiziente Energiegewinnung verringerten oxidativen Stress. Sowohl zu hohe Blutglukosekonzentrationen (Bonnefont-Rousselot 2002), als auch eine vermehrte Fettsäurenverwertung konnten mit einer vermehrten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Verbindung gebracht werden, insbesondere verglichen mit der Ketonkörperverwertung (Sato et al. 1995; Veech 2004; Murphy 2009). Dass Empagliflozin sich direkt reduzierend auf den oxidativen Stress und entzündliche Prozesse in den

Kardiomyozyten auswirkt, konnten auch Kusaka et al. (2016) nachweisen. Es führt außerdem zu einer insgesamt verbesserten Endothelfunktion und einer Reduktion entzündlich bedingter erhöhter Endothelaktivierung (Steven et al. 2017), was konsekutiv wiederrum den oxidativen Stress verminderte. Letzterer stört die Funktion der Proteinkinase G (PKG) und des cyclischen Guanosin-Monophosphat- (cGMP-)Signalweges, die mit kardialer Steifigkeit und damit der HFpEF in direktem Zusammenhang gebracht werden konnten (Franssen et al. 2016). Wie Eingangs beschrieben ist in der HFpEF eine pathologisch reduzierte PKG-Aktivität nachweisbar. Empagliflozin scheint bereits nach wenigen Wochen in diabetischen Mäusen den Nitridoxid- (NO-)abhängigen cGMP-PKG-Signalweg positiv zu beeinflussen (Xue et al 2019), indem die NO-Verfügbarkeit durch Empagliflozin erhöht wurde und so schlussendlich die physiologischen Phosphorylierungslevel PKG-abhängiger Myofilamente wiederhergestellt wurde (Kolijn et al 2021). Die Schlüsselrolle des NO zeigten auch Versuche an Schweinen, die zwei Monate nach einem künstlich provozierten Herzinfarkt nach Empagliflozingabe eine deutlich verbesserte NO-Verfügbarkeit und damit aktivere PKG aufwiesen (Santos-Gallego et al. 2021). Eine Beeinflussung dieses Signalweges scheint sich somit indirekt auf die Phosphorylierung der Myofilamente auswirken.

Weiterhin ist in diesem Zusammenhang zu beachten, dass konstant hohe Blutzuckerspiegel in direktem Zusammenhang mit den sogenannten *Advanced Glycation Products* (AGEs) stehen. Habibi et al zeigten, dass sich auch bei db/db-Mäusen eine vermehrte myokardiale AGE-Expression fand mit besonders im linken Ventrikelmyokard und der Gefäßmuskulatur betonter Verteilung. Neuere Daten zeigen, dass auch die Kontraktionsproteine Troponin I, C und T Ziel eine Glykation sind (Janssens et al. 2018). So wurde insbesondere Troponin I vermehrt in direkter Nachbarschaft der Phosphorylierungsstellen glykiert Es könnte daher vermutet werden, dass über potenzielle Interaktionen dies zu den von Pabel et al. (2020) postulierten Phosphorylierungen führen. Allerdings zeigen andere Vorarbeiten, dass Empagliflozin trotz eines moderat verbesserten HbA1c-Wertes keinen Einfluss auf AGE-Produktion und Akkumulation bei einer geringen Tagesdosis bewirkt (Habibi et al. 2017). Erst höhere Dosen bewirken eine Reduktion der AGE-Expression (Oelze et al. 2014). Es bleibt also weiteren Nachforschungen überlassen, die genaue Interaktion von AGEs und Myofilamentphosphorylierung nachzugehen. Auch bleibt offen, inwieweit Empagliflozin im nicht-diabetischen Myokard wirkt.

Ein weiterer diskutierter Signalweg läuft über die Aktivierung der SGK1. In Zeiten kardialen Stresses wird hierüber die ENaK-Kanal-Expression hochreguliert. Weiterhin schien SGK1 direkt am myokardialen Remodelling, Fibrosierung und einer linksventrikulären Hypertrophie beteiligt zu sein (Aoyama, Matsui et al. 2005, Das, Aiba et al. 2012). Es zeigte sich, dass Empagliflozin die kardiale Fibrosierung reduzierte und konnte mit dem am Herzen profibrotisch und hypertrophierend wirkenden Proteine SGK1 und ENaC in Verbindung gebracht werden (Habibi et al. 2017). Die erklärt möglicherweise auch die Ergebnisse von Kusaka et al., die nach 10-wöchiger Empagliflozinbehandlung diabetischer Ratten ein signifikant geringeres linksventrikuläre Gewicht, eine reduzierte kardiale interstitielle Fibrose

und verkleinerte Kardiomyozytendurchmesser feststellten. Zurückzuführen war dies, auf eine Normalisierung der erhöhten SGK1 und ENaK Expression. Einschränkend muss an dieser Stelle jedoch erwähnt werden, dass auch erhöhte Blutglukoselevel starken Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine haben. Da diese durch Empagliflozingabe signifikant verbessert werden, bleibt eine dadurch bedingte Beeinflussung natürlich nicht aus (Hills et al. 2006). Der SGK1-Signalweg stellt ein sehr schnell wirkendes System dar. Die Regulation der SGK1-Transkripte bedarf lediglich 20 Minuten (Waldegger et al. 1997). Die beobachteten direkten Effekte Empagliflozin könnten somit eventuell über einen möglichen Link zwischen der SGK1-Expression und der Phosphorylierung der Myofilamente erklärt werden.

Neben den erläuterten Überlegungen existieren noch viele weitere. Die für die Beobachtungen dieser Arbeit nicht direkt relevanten Studien fanden an dieser Stelle keinen Eingang in die Diskussion. Es sei aber erwähnt, dass der aktuelle Stand der Forschung ein differenziertes Bild zeichnet, in dem kurz- und langfristige Wirkmechanismen potentiell synergistisch wirken können und so dem therapeutischen Feld eine Vielzahl an möglichen Ansatzpunkten hinzufügen.

4.4 Klinische Translation

In der Kardiologie steht bis dato keine ausreichende Behandlung der diastolischen Dysfunktion zur Verfügung. Eine erhöhte passive Steifigkeit ist ein zentraler Pathomechanismus der Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion (Borbely et al. 2009, Kötter et al. 2013, Ponikowski et al. 2016), einer verschlechterten ventrikulären Füllung, Koronarperfusion und Kontraktion (Westermann et al. 2008).

In der Gruppe der Menschen über 65 Jahren, die mit Kurzatmigkeit bei Anstrengung in der Grundversorgung vorstellig werden, hat eine von sechs Personen eine nicht diagnostizierte Herzinsuffizienz. Die meisten HF-Patient:innen sind dem Spektrum der HFpEF zuzuordnen (van Riet et al. 2014). Diese präsentiert sich mit einer linksventrikulären Beeinträchtigung auf Grund einer gestörten Relaxation und erhöhter linksventrikulärer Steifigkeit trotz erhaltener EF von über 50% (Zile et al. 2004, Paulus et al. 2007). Und auch die meisten der herzinsuffizienten Patient:innen mit einer reduzierten Ejektionsfraktion (HFrEF) weisen eine eingeschränkte diastolische Funktion auf (Ponikowski et al. 2016). Die Anzahl wegen HFpEF hospitalisierter Patient:innen steigt kontinuierlich an, während die Ätiologie der Krankheit weiter Fragen aufwirft. Die für die HFrEF etablierten Therapieschema scheinen bei HFpEF Patient:innen keinen prognostischen Nutzen zu haben. Dementsprechend besteht ein großes Interesse an neuen pharmazeutischen Ansatzpunkten für die Behandlung der HFpEF. Die durch uns gezeigten Effekte Empagliflozins, die diabetesunabhängig auftraten, eröffnen die Möglichkeit der Behandlung einer breiten Population. Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten eine neue Rationale für weitere

translationale Studien zur Wirkung Empagliflozins in der diastolischen Dysfunktion und bei HFpEF- Patient:innen.

5 Zusammenfassung

Der als orales Antidiabetikum eingesetzte Na^+-Glukose-Kotransporter-2-Inhibitor Empagliflozin wurde 2015 in der EMPA-REG-Studie hinsichtlich seiner kardiovaskulären Sicherheit überprüft. Die dabei beobachtete signifikante Reduktion der Mortalität und der Hospitalisierungsrate aufgrund von Herzinsuffizienzsymptomen, war nicht ausschließlich mit der Minimierung der kardiovaskulären Risikofaktoren erklärbar. Die Fragen nach direkten kardialen Effekten und zugrundeliegenden Mechanismen blieben unbeantwortet.

Die vorliegende Arbeit untersuchte daher mögliche pleiotrope Effekte Empagliflozins in isoliertem humanen Ventrikelmyokard, sowie an murinen Proben sowohl eines diabetischen als auch eines nicht-diabetischen Mausmodells.

Mittels Muskelstreifenmethode konnten Parameter der Kraftentwicklung, wie die systolische und diastolische Kraft, sowie Parameter der Kontraktionskinetik erhoben werden. Es wurde die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen, insbesondere der klinisch relevanten Dosis von 0,5µM Empagliflozin, die Kontraktion bei variierenden Frequenzen und das Post-Rest-Verhalten beobachtet.

Es zeigte sich in den humanen Proben eine signifikante Reduktion der diastolischen Spannung, während die systolische Kraft nicht beeinflusst wurde. Analoge Ergebnisse zeigten auch die murinen Experimenten. Letztere zeigten deutlich, dass die diastolische Spannung im diabetischen Mäusemyokard gegenüber dem nicht-diabetischen Myokard massiv erhöht war. Die isolierten Effekte auf die diastolische Steifigkeit, die unmittelbar nach Hinzugabe des Wirkstoffs auftraten, widerlegen die These eine allein über systemische Veränderung bewirkten Verbesserung und suggerieren direkte Effekte auf die diastolische Funktion der Myokardtrabekel. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Empagliflozin behandelten Proben und den Kontrollstreifen in Bezug auf das Kraft-Frequenz - oder das Post-Rest-Verhalten, was die Vermutung nahelegt, dass die nachgewiesenen direkten Effekte eher nicht auf einer Beeinflussung des Ionenhaushalts beruhen.

Diese Arbeit konnte somit erstmalig direkte, Diabetesunabhängige kardiale Effekte nachweisen. Insbesondere die Reduktion der diastolischen Spannung ohne eine Beeinflussung der systolischen Kontraktionskraft bieten einen neuen Ansatzpunkt in der bis dato sehr limitierten Therapie der diastolischen Herzinsuffizienz und der Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion. Sie fügt den Ergebnissen der EMPA-REG-Studie einen neuen mechanistischen Erklärungsansatz hinzu und liefert eine neue Rationale für weiterführende translationale Studien.

6 Literaturverzeichnis

Abe, T, Ohga, Y, Tabayashi, N, Kobayashi, S, Sakata, S, Misawa, H, Tsuji, T, Kohzuki, H, Suga, H, Taniguchi, S, Takaki, M (2002): Left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus model rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 282, 138-148

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005): Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in heart failure. Circ Res 97, 1314-1322

Allen DG and Kurihara S (1982): The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. J Physiol 327,79-94

Almers W and Palade PT (1981): Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline-gap technique. J Physiol 312,159-176

Alpert NR, Leavitt BJ, Ittleman FP, Hasenfuss G, Pieske B, Mulieri LA (1998): A mechanistic analysis of the force-frequency relation in non-failing and progressively failing human myocardium. Basic Res Cardiol 93, 23-32

Anderson ME, Brown JH, Bers DM (2011): CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. J Mol Cell Cardiol 51, 468-473

Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, Brunner-La Rocca HP, Choi DJ, Chopra V, Chuquiure-Valenzuela E et al. (2020): Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. N Engl J Med 385, 1451-1461

Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF (2004): Pharmacology of brain Na+/Ca2+ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. Pharmacol Rev 56, 633-654

Aubert G, Martin OJ, Horton JL, Lai L, Vega RB, Leone TC, Koves T, Gardell SJ, Krüger M, Hoppel CL (2016): The failing heart relies on ketone bodies as a fuel. Circulation 133, 698–705

Baartscheer A, Schumacher CA, Wüst RC, Fiolet JW, Stienen GJ, Coronel R, Zuurbier CJ (2017): Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na+ through inhibition of the cardiac Na+/H+ exchanger in rats and rabbits. Diabetologia 60, 568-573

Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MMGJ, Belterman CNW, Coronel R, Opthof T, Fiolet JWT (2005): Chronic inhibition of Na+/H+-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. Cardiovasc Res 65, 83–92

Baker WL, Smyth LR, Riche DM, Bourret EM, Chamberlin KW, White WB (2014): Effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. J Am Soc Hypertens 8, 262-275

Beckman JA, Creager MA, Libby P (2002): Diabetes and Atherosclerosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. JAMA 287, 2570-2581

Belke DD, Swanson EA, Dillmann WH (2004): Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. Diabetes 53, 3201-3208

Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. Nature 415, 198-205

Bertoni AG, Hundley WG, Massing MW, Bonds DE, Burke GL, Goff DC Jr (2004): Heart failure prevalence, incidence, and mortality in the elderly with diabetes. Diabetes Care 27, 699-703

Bing RJ (1955): The metabolism of the heart. Harvey Lect 50, 27-70

Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeyer TJ, Pende A, Raynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC et al. (2000): Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. J Mol Cell Cardiol 32, 817-830

Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C (1988): Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. J Cell Biol 107, 2587-2600

Bodiga VL, Eda SR, Bodiga S (2014): Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy. Heart Fail Rev 19, 49-63

Bonnefont-Rousselot D (2002): Glucose and reactive oxygen species. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5, 561-568

Booij HG, Koning AM, van Goor H, de Boer RA, Westenbrink BD (2017): Selecting heart failure patients for metabolic interventions. Expert Rev Mol Diagn 17, 141–152

Borbély A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J et al. (2009): Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. Circ Res 104, 780-786

Brilla CG and Rupp H (1994): Myocardial collagen matrix remodeling and congestive heart failure. Cardiologia. 39, 389-93

Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT (1994): Collagen Metabolism in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts: Response to Angiotensin II and Aldosterone. J Mol Cell Cardiol 26, 809-820

Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R (1989): Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. Mol Pharmacol 35, 295-303

Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Larrabee P, Skerl L, Klein JW, Anderson FL, Murray J, Mestroni L, Karwande SV (1992): Beta-adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms. J Clin Invest 89, 803-815

Byrne NJ, Parajuli N, Levasseur JL, Boisvenue J, Beker DL, Masson G, Fedak PWM, Verma S, Dyck JRB (2017): Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an Experimental Model of Pressure Overload-Induced Heart Failure. J Am Coll Cardiol Basic Transl Sci 2, 347-354

Cappetta D, De Angelis A, Ciuffreda LP, Coppini R, Cozzolino A, Miccichè A, Dell'Aversana C, D'Amario D, Cianflone E, Scavone et al. (2020): Amelioration of diastolic dysfunction by dapagliflozin in a non-diabetic model involves coronary endothelium. Pharmacol Res 157, 104781

Camors E and Valdivia HH (2014): CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. Front Pharmacol 5, 101

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE (1996): Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell 84, 491-495

Chen J, Williams S, Ho S, Loraine H, Hagan D, Whaley JM, Feder JN (2010): Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. Diabetes Ther 1, 57-92

Cherney DZ and Perkins BA (2014): Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. Circulation 129, 587-597

Chilton R, Tikkanen I, Cannon CP, Crowe S, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE (2015): Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab 17, 1180-1193

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N (2000): Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol 35, 569-582

Connelly KA, Zhang Y, Visram A, Advani A, Batchu SN, Desjardins JF, Thai K, Gilbert RE (2019): Empagliflozin Improves Diastolic Function in a Nondiabetic Rodent Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. J AM Coll Cardiol Basic Transl Sci 4, 27-37

Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Nyce MR, Zhang P, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Bauer TL, Moore JH (1996): Mutation Screening and Identification of a Sequence Variation in the Human OB Gene Coding Region. Biochemical and Biophysical Research Communications 220, 735-739

Cook SA, Varela-Carver A, Mongillo M, Kleinert C, Khan MT, Leccisotti L, Strickland N, Matsui T, Das S, Rosenzweig A (2009): Abnormal myocardial insulin signalling in type 2 diabetes and left-ventricular dysfunction. Eur Heart J 31, 100-111

Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, Federici M, Filippatos G, Grobbee DE, Hansen TB et al. (2019): ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: The Task Force for diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Eur Heart J 41, 255-323

Crozatier B (1998): Force-frequency relations in nonfailing and failing animal myocardium. Basic Res Cardiol 93, 46-50

Damluji AA, Cohen ER, Moscucci M, Myerburg RJ, Cohen MG, Brooks MM, Rich MW, Forman DE (2017): Insulin provision therapy and mortality in older adults with diabetes mellitus and stable ischemic heart disease: Insights from BARI-2D trial. Int J Cardiol 241, 35-40

Daniels L, Bell JR, Delbridge LM, McDonald FJ, Lamberts RR, Erickson JR (2015): The role of CaMKII in diabetic heart dysfunction. Heart Failure Reviews 20, 589-600

de la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier JJ, Marotte F, Wisnewsky C, Brovkovich V, Schwartz K, Lompré AM (1990): Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca2(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. Circ Res 66, 554-564

DeSantiago J, Maier LS, Bers DM (2002): Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not Phospholamban. J Mol Cell Cardiol 34, 975-984

Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM, Bers DM (2002): Intracellular Na(+) concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. Circulation 105, 2543-2548

DiFrancesco D and Tortora P (1991): Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. Nature 351, 145-147

Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefèbvre PJ, Murray GD (2005): Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. Lancet 366, 1279-1289

Eikemo H, Moltzau LR, Hussain RI, Nguyen CH, Qvigstad E, Levy FO, Skomedal T, Osnes JB (2016): CaMKII in addition to MLCK contributes to phosphorylation of regulatory light chain in cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun 471, 219-225

Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW (2017): Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. Circ Res 121, 181-195

Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM (2013): Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. Nature 502, 372-376

Eurich DT, Weir DL, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Johnson JA, Tjosvold L, Vanderloo SE, McAlister FA (2013): Comparative safety and effectiveness of metformin in patients with diabetes mellitus and heart failure: systematic review of observational studies involving 34,000 patients. Circ Heart Fail 6, 395-402

Fawcett DW and McNutt NS (1969): The ultrastructure of the cat myocardium. I Ventricular papillary muscle. J Cell Biol 42, 1-45

Feher J: Quantitative Human Physiology: The Cellular Basis of Cardiac Contractility. 2. Auflage; Academic Press, Boston, 2012, 547-555

Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, Lorell BH (1993): Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. Circ Res 73, 184-192

Ferrannini E (2017): Sodium-Glucose Co-transporters and Their Inhibition: Clinical Physiology. Cell Metab 26, 27-38

Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, Baldi S, Mari A, Heise T, Broedl UC, Woerle HJ (2014): Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. J Clin Invest 124, 499-508

Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Förster A, Schmitto JD, Gummert J (2013): Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in human cardiac pathology. Circulation 128, 970-981

Fitchett D, Lee J, George J, Mattheus M, Woerle H (2017): Empagliflozin (EMPA) reduces heart failure irrespective of of blood pressure (BP), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and HbA1C Control. Can J Cardiol 33,172

Franssen C, Chen S, Unger A, Korkmaz HI, De Keulenaer GW, Tschöpe C, Leite-Moreira AF, Musters R, Niessen HW, Linke WA (2016): Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. J Am Coll Cardiol Heart Fail 4, 312-324

Franssen C, González Miqueo A (2016): The role of titin and extracellular matrix remodelling in heart failure with preserved ejection fraction. Neth Heart J 24, 259-67

Gerstein HC, Jung H, Rydén L, Diaz R, Gilbert RE, Yusuf S (2018): Effect of Basal Insulin Glargine on First and Recurrent Episodes of Heart Failure Hospitalization: The ORIGIN Trial (Outcome Reduction With Initial Glargine Intervention). Circulation 137, 88-90

Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F (2008): Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. N Engl J Med 358, 2545-2559

Gerstein HC, Swedberg K, Carlsson J, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Pfeffer MA, Yusuf S (2008): The hemoglobin A1c level as a progressive risk factor for cardiovascular death, hospitalization for heart failure, or death in patients with chronic heart failure: an analysis of the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity (CHARM) program. Arch Intern Med 168, 1699-1704

Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM (2005): The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. Trends Endocrinol Metab 16, 120-126

Glynn P, Musa H, Wu X, Unudurthi SD, Little S, Qian L, Wright PJ, Radwanski PB, Gyorke S, Mohler PJ et al. (2015): Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. Circulation 132, 567-577

Goldner MG, Knatterud GL, Prout TE (1971): Effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. 3. Clinical implications of UGDP results. JAMA 218, 1400-1410

Goodwill AG, Dick GM, Kiel AM, Tune JD (2017): Regulation of Coronary Blood Flow. Compr Physiol 7, 321-382

Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966): The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. J Physiol 184, 170-192

Grant AO (2009): Cardiac ion channels. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2, 185-94

Gray RP, McIntyre H, Sheridan DS, Fry CH (2001): Intracellular sodium and contractile function in hypertrophied human and guinea-pig myocardium. Pflugers Arch 442, 117-123

Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, Buse JB, Engel SS, Garg J, Josse R, Kaufman KD, Koglin J, Korn S (2015): Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. N Engl J Med 373, 232-242

Look AHEAD Research Group, Gregg EW, Jakicic JM, Blackburn G, Bloomquist P, Bray GA, Clark JM, Coday M, Curtis JM, Egan C et al. (2016): Association of the magnitude of weight loss and changes in physical fitness with long-term cardiovascular disease outcomes in overweight or obese people with type 2 diabetes: a post-hoc analysis of the Look AHEAD randomised clinical trial. Lancet Diabetes Endocrinol 4, 913-921

Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE, Bakker RA, Mark M, Klein T, Eickelmann P (2012): Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. Diabetes Obes Metab 14, 83-90

Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. J Clin Invest 56, 56-64

Gwathmey JK and Hajjar RJ (1990): Relation between steady-state force and intracellular [Ca2+] in intact human myocardium. Index of myofibrillar responsiveness to Ca2+. Circulation 82, 1266-1278

Gwathmey JK, Hajjar RJ, Solaro RJ (1991): Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. Circ Res 69, 1280-1292

Habibi J, Aroor AR, Sowers JR, Jia G, Hayden MR, Garro M, Barron B, Mayoux E, Rector RS, Whaley-Connell A et al. (2017): Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. Cardiovascular diabetology 16, 9-9

Hach T, Lambers Heerspink HJ, Pfarr E, Lund S, Ley L, Broedl UC, Woerle H-J (2012): The sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor empagliflozin lowers blood pressure independent of weight or HbA1c changes. Diabetologia 55, 317

Hale SL, Shryock JC, Belardinelli L, Sweeney M, Kloner RA (2008): Late sodium current inhibition as a new cardioprotective approach. J Mol Cell Cardiol 44, 954-967

Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA (2013): Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. Cardiovasc Res 97, 464-471

Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA (2014): Left ventricular diastolic dysfunction and myocardial stiffness in diabetic mice is attenuated by inhibition of dipeptidyl peptidase 4. Cardiovasc Res 104, 423-431

Hamdani N, Kooij V, van Dijk S, Merkus D, Paulus WJ, Remedios CD, Duncker DJ, Stienen GJ, van der Velden J (2008): Sarcomeric dysfunction in heart failure. Cardiovasc Res 77, 649-658

Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, Krüger M, Backs J, Linke WA (2013): Crucial role for Ca2(+)/calmodulin-dependent protein kinase-II in

regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. Circ Res 112, 664-674

Hamdani N, Paulus WJ, van Heerebeek L, Borbély A, Boontje NM, Zuidwijk MJ, Bronzwaer JG, Simonides WS, Niessen HW, Stienen GJ et al. (2009): Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction. Eur Heart J 30, 1863-1872

Hammoudi N, Jeong D, Singh R, Farhat A, Komajda M, Mayoux E, Hajjar R, Lebeche D (2017): Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. Cardiovasc Drugs Ther 31, 233-246

Hartog JW, Voors AA, Bakker SJ, Smit AJ, van Veldhuisen DJ (2007): Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications. Eur J Heart Fail 9, 1146-1155

Hasenfuss G and Pieske B (2002): Calcium cycling in congestive heart failure. J Mol Cell Cardiol 34, 951-969

Hegyi B, Bers DM, Bossuyt J (2019): CaMKII signaling in heart diseases: Emerging role in diabetic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 127, 246-259

Hibberd MG and B R Jewell (1979): Length-dependence of the sensitivity of the contractile system to calcium in rat ventricular muscle [proceedings]. J Physiol 290, 30-31

Hicks KA, Mahaffey KW, Mehran R, Nissen SE, Wiviott SD, Dunn B, Solomon SD, Marler JR, Teerlink JR, Farb A (2018): 2017 Cardiovascular and Stroke Endpoint Definitions for Clinical Trials. Circulation 137, 961-972

Hidalgo CG, Chung CS, Saripalli C, Methawasin M, Hutchinson KR, Tsaprailis G, Labeit S, Mattiazzi A, Granzier HL (2013): The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKIIδ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. J Mol Cell Cardiol 54, 90-97

Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL (1966): Diabetes, a new mutation in the mouse. Science 153, 1127-1128

Huxley AF and Simmons RM (1971): Proposed mechanism of force generation in striated muscle. Nature 233, 533-538

Huxley HE (1969): The Mechanism of Muscular Contraction. Science 164, 1356-1366

Inzucchi SE, Zinman B, Fitchett D, Wanner C, Ferrannini E, Schumacher M, Schmoor C, Ohneberg K, Johansen OE, George JT et al. (2018): How Does Empagliflozin Reduce Cardiovascular Mortality? Insights From a Mediation Analysis of the EMPA-REG OUTCOME Trial. Diabetes Care 41, 356-363

Inzucchi SE, Kosiborod M, Fitchett D, Wanner C, Hehnke U, Kaspers S, George JT, Zinman B (2018): Improvement in Cardiovascular Outcomes With Empagliflozin Is Independent of Glycemic Control. Circulation 138, 1904-1907

Itzhaki BZO, Kornowski R, Goldenberg I, Klempfner R, Toledano Y, Biton Y, Fisman EZ, Tenenbaum A, Golovchiner G, Kadmon E (2017): Admission blood glucose and 10-year

mortality among patients with or without pre-existing diabetes mellitus hospitalized with heart failure. Cardiovascular diabetology 16, 102

Jaimovich E, Venosa RA, Shrager P, Horowicz P (1976): Density and distribution of tetrodotoxin receptors in normal and detubulated frog sartorius muscle. J Gen Physiol 67, 399-416

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E (1989): Nature and site of phospholamban regulation of the Ca2+ pump of sarcoplasmic reticulum. Nature 342, 90-92

Janssens JV, Ma B, Brimble MA, Van Eyk JE, Delbridge LMD, Mellor KM (2018): Cardiac troponins may be irreversibly modified by glycation: novel potential mechanisms of cardiac performance modulation. Sci Rep 8, 16084

Jelicks L and Siri FM (1995): Effects of hypertrophy and heart failure on [Na+]i in pressure-overloaded guinea pig heart. Am J Hypertens 8, 934-943

Jia G, DeMarco VG, Sowers JR (2016): Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. Nat Rev Endocrinol 12, 144-153

Jorgensen AO, Shen AC, Arnold W, Leung AT, Campbell KP (1989): Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. J Cell Biol 109, 135-147

Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP (1974): Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. Am J Cardiol 34, 29-34

Kappel BA, Lehrke M, Schütt K, Artati A, Adamski J, Lebherz C, Marx N (2017): Effect of Empagliflozin on the Metabolic Signature of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. Circulation 136, 969-972

Kashiwaya Y, Sato K, Tsuchiya N, Thomas S, Fell DA, Veech RL, Passonneau JV (1994): Control of glucose utilization in working perfused rat heart. J Biol Chem 269, 25502-14

Kemp C D and Conte JV (2012): The pathophysiology of heart failure. Cardiovasc Pathol 21, 365-371

Kenny HC and Abel ED (2019): Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. Circ Res 124, 121-141

Kern M, Klöting N, Mark M, Mayoux E, Klein T, Blüher M (2016): The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves insulin sensitivity in db/db mice both as monotherapy and in combination with linagliptin. Metabolism 65, 114-123

Kirsch GE, Nichols RA, Nakajima S (1977): Delayed rectification in the transverse tubules: origin of the late after-potential in frog skeletal muscle. J Gen Physiol 70, 1-21

Kolijn D, Pabel S, Tian Y, Lódi M, Herwig M, Carrizzo A, Zhazykbayeva S, Kovács Á, Fülöp GÁ, Falcão-Pires I et al. (2021): Empagliflozin improves endothelial and cardiomyocyte function in human heart failure with preserved ejection fraction via reduced pro-inflammatory-oxidative pathways and protein kinase Gα oxidation. Cardiovasc Res. 117, 495-507

Kosiborod M, Cavender MA, Fu AZ, Wilding JP, Khunti K, Holl RW, Norhammar A, Birkeland KI, Jørgensen ME, Thuresson M et al. (2017): Lower Risk of Heart Failure and Death in Patients Initiated on Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors Versus Other Glucose-

Lowering Drugs: The CVD-REAL Study (Comparative Effectiveness of Cardiovascular Outcomes in New Users of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors): Circulation 136, 249-259

Kosta S, Dauby PC (2021): Frank-Starling mechanism, fluid responsiveness, and length-dependent activation: Unravelling the multiscale behaviors with an in silico analysis. PLoS Comput Biol 17, e1009469

Kötter S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Müller AE, Helling S, Marcus K, Dos Remedios C, Linke WA, Krüger M (2013): Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. Cardiovasc Res 99, 648-56

Krug AW, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildenberger S, Govindan MV, Gekle M (2003): Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. J Biol Chem 278, 43060-43066

Kusaka H, Koibuchi N, Hasegawa Y, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S (2016): Empagliflozin lessened cardiac injury and reduced visceral adipocyte hypertrophy in prediabetic rats with metabolic syndrome. Cardiovascular diabetology 15, 157

Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D, Wie L, Leslie B, List J (2013): Dapagliflozin a glucose-regulating drug with diuretic properties in subjects with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab 15, 853-862

Lehrke M and Marx N (2017): Diabetes Mellitus and Heart Failure. Am J Cardiol 120, 37-47

Lemaire S, Piot C, Leclercq F, Leuranguer V, Nargeot J, Richard S (1998): Heart rate as a determinant of L-type Ca2+ channel activity: mechanisms and implication in force-frequency relation. Basic Res Cardiol 93, 51-59

Liakos A, Karagiannis T, Athanasiadou E, Sarigianni M, Mainou M, Papatheodorou K, Bekiari E, Tsapas A (2014): Efficacy and safety of empagliflozin for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Obes Metab 16, 984-993

Liao R, Jain M, Cui L, D'Agostino J, Aiello F, Luptak I, Ngoy S, Mortensen RM, Tian R (2002): Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice. Circulation 106, 2125-2131

Liedtke AJ, DeMaison L, Eggleston AM, Cohen LM, Nellis SH (1988): Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. Circ Res 62, 535-542

Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, Ma M, Nakagawa T, Kusaka H, Kim-Mitsuyama S (2014): Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. Cardiovasc diabetol 13, 148

Linke WA (2008): Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. Cardiovasc Res 77, 637-648

MacDonald MR, Petrie MC, Varyani F, Ostergren J, Michelson EL, Young JB, Solomon SD, Granger CB, Swedberg K, Yusuf S et al. (2008): Impact of diabetes on outcomes in patients with low and preserved ejection fraction heart failure: an analysis of the Candesartan in Heart

failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme. Eur Heart J 29, 1377-1385

Mahaffey KW, Jardine MJ, Bompoint S, Cannon CP, Neal B, Heerspink HJL, Charytan DM, Edwards R, Agarwal R, Bakris G, et al. (2019): Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Kidney Disease in Primary and Secondary Cardiovascular Prevention Groups. Circulation. 140, 739-750

Maier LS and Bers DM (2002): Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. J Mol Cell Cardiol 34, 919-939

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM (2003): Transgenic CaMKIIdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca2+ handling: reduced SR Ca2+ load and activated SR Ca2+ release. Circ Res 92, 904-911

Malhotra A and Sanghi V (1997): Regulation of contractile proteins in diabetic heart. Cardiovasc Res 34, 34-40

Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RS, Silverman N, Lesch M, Undrovinas AI (1998): Novel, Ultraslow Inactivating Sodium Current in Human Ventricular Cardiomyocytes. Circulation 98, 2545-2552

Mandavia CH, Aroor AR, Demarco VG, Sowers JR (2013): Molecular and metabolic mechanisms of cardiac dysfunction in diabetes. Life Sci 92, 601-608

Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA, Nissen SE, Pocock S, Poulter NR, Ravn LS (2016): Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. N Engl J Med 375, 311-322

Masuo K, Straznicky NE, Lambert GW, Katsuya T, Sugimoto K, Rakugi H, Socratous F, Hastings J, Lambert EA, Ogihara T (2008): Leptin-Receptor Polymorphisms Relate to Obesity through Blunted Leptin-Mediated Sympathetic Nerve Activation in a Caucasian Male Population. Hypertension Research 31, 1093-1100

Matsutani D, Sakamoto M, Kayama Y, Takeda N, Horiuchi R, Utsunomiya K (2018): Effect of canagliflozin on left ventricular diastolic function in patients with type 2 diabetes. Cardiovasc Diabetol 17, 73

Mazidi M, Rezaie P, Gao HK, Kengne AP (2017): Effect of Sodium-Glucose Cotransport-2 Inhibitors on Blood Pressure in People With Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of 43 Randomized Control Trials With 22 528 Patients. J Am Heart Assoc 6, 6

McMurray JJV, Wheeler DC, Stefánsson BV, Jongs N, Postmus D, Correa-Rotter R, Chertow GM, Hou FF, Rossing P, Sjöström CD et al. (2021): Effects of Dapagliflozin in Patients With Kidney Disease, With and Without Heart Failure. JACC Heart Fail. 9, 807-820

Michel MC, Mayoux E, Vallon V (2015): A comprehensive review of the pharmacodynamics of the SGLT2 inhibitor empagliflozin in animals and humans. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 388, 801-816

Mishra S, Sabbah HN, Jain JC, Gupta RC (2003): Reduced Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase activity and expression in LV myocardium of dogs with heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 284, H876-883

Mosterd A and Hoes AW (2007): Clinical epidemiology of heart failure. Heart 93, 1137-1146

Murphy MP (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J 417, 1-13

Mustroph J, Lücht CM, Wagemann O, Sowa T, Hammer KP, Sag CM, Tarnowski D, Holzamer A, Pabel S, Beuthner BE et al. (2019): Empagliflozin enhances human and murine cardiomyocyte glucose uptake by increased expression of GLUT1. Diabetologia 62, 726-729

Mustroph J, Lebek S, Maier LS, Neef S (2018): Mechanisms of cardiac ethanol toxicity and novel treatment options. Pharmacol Ther. 197, 1-10

Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondu N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews DR (2017): Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. N Engl J Med 377, 644-657

Netticadan T, Temsah RM, Kawabata K, Dhalla NS (2000): Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Is Altered in Heart Failure. Circ Res 86, 596-605

Nordström V, Willershäuser M, Herzer S, Rozman J, von Bohlen und Halbach O, Meldner S, Rothermel U, Kaden S, Roth FC, Waldeck C et al. (2013): Neuronal Expression of Glucosylceramide Synthase in Central Nervous System Regulates Body Weight and Energy Homeostasis. PLOS Biology 11, e1001506

Oelze M, Kröller-Schön S, Welschof P, Jansen T, Hausding M, Mikhed Y, Stamm P, Mader M, Zinßius E, Agdauletova S (2014): 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 9, e112394

Ogrodowczyk M, Dettlaff K, Jelinska A (2016): Beta-Blockers: Current State of Knowledge and Perspectives. Mini Rev Med Chem 16, 40-54

Pabel S, Wagner S, Bollenberg H, Bengel P, Kovács Á, Schach C, Tirilomis P, Mustroph J, Renner A, Gummert J (2018): Empagliflozin directly improves diastolic function in human heart failure. Eur J Heart Fail 20, 1690-1700

Pabel S, Reetz F, Dybkova N, Shomroni O, Salinas G, Mustroph J, Hammer KP, Hasenfuss G, Hamdani N, Maier LS (2020): Long-term effects of empagliflozin on excitation-contraction-coupling in human induced pluripotent stem cell cardiomyocytes. J Mol Med 98, 1689-1700

Pabel S, Hamdani N, Singh J, Sossalla S (2021): Potential Mechanisms of SGLT2 Inhibitors for the Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Front Physiol 12, 752370

Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Zannad F (2017): Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors for the Treatment of Patients With Heart Failure: Proposal of a Novel Mechanism of Action JAMA Cardiol 2, 1025-1029

Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, Januzzi J, Verma S, Tsutsui H, Brueckmann M, et al. (2020): EMPEROR-Reduced Trial Investigators. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin. Heart Failure. N Engl J Med 383,1413-1424

Pappachan JM, Sebastian J, Bino BC, Jayaprakash K, Vijayakumar K, Sujathan P, Adinegara LA (2008): Cardiac autonomic neuropathy in diabetes mellitus: prevalence, risk factors and utility of corrected QT interval in the ECG for its diagnosis. Postgrad Med J 84, 205-210

Park SH, Belcastro E, Hasan H, Matsushita K, Marchandot B, Abbas M, Toti F, Auger C, Jesel L, Ohlmann P (2018): Upregulation of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) expression in cultured senescent endothelial cells and in arterial sites at risk in vivo in rats. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements 10, 224

Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF (2007): How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. Eur Heart J 28, 2539-2550

Perreault CL, Bing OH, Brooks WW, Ransil BJ, Morgan JP (1990): Differential effects of cardiac hypertrophy and failure on right versus left ventricular calcium activation. Circ Res 67, 707-712

Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. Circulation 92, 1169-1178

Pieske B, Maier LS, Piacentino V 3rd, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S (2002): Rate dependence of [Na+]i and contractility in nonfailing and failing human myocardium. Circulation 106, 447-453

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC)Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J 37, 2129-2200

Porter KE and Turner NA (2009): Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. Pharmacol Ther 123, 255-278

Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W (2000): Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. Diabetes 49, 1561-1570

Razeghi P, Young ME, Ying J, Depre C, Uray IP, Kolesar J, Shipley GL, Moravec CS, Davies PJ, Frazier OH (2002): Downregulation of metabolic gene expression in failing human heart before and after mechanical unloading. Cardiology 97, 203-209

Revel JP and Karnovsky MJ (1967): Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. J Cell Biol 33, C7-C12

Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Smit JW, Diamant M, Bax JJ, Hammer S, Romijn JA, de Roos A, Lamb HJ (2008): Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. J Am Coll Cardiol 52, 1793-1799

Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH (1998): Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. Mol Cell Biochem 180, 53-57

Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A (1972): New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. Am J Cardiol 30, 595-602

Sanders DB, Kelley T, Larson D (2000): The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. Perfusion 15, 97-104

Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, Ishikawa K, Watanabe S, Picatoste B, Flores E, Garcia-Ropero A, Sanz J, Hajjar RJ et al. (2019): Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics. J Am Coll Cardiol 73, 1931-1944

Sarashina A, Koiwai K, Seman LJ, Yamamura N, Taniguchi A, Negishi T, Sesoko S, Woerle HJ, Dugi KA (2013): Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single doses of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, in healthy Japanese subjects. Drug Metab Pharmacokinet 28, 213-9

Sato K, Kashiwaya Y, Keon CA, Tsuchiya N, King MT, Radda GK, Chance B, Clarke K, Veech RL (1995): Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction. FASEB J 9, 651-8

Sayer G, Bhat G (2014): The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. Cardiol Clin 32, 21-32

Schillinger W, Lehnart SE, Prestle J, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Meyer M, Just H, Hasenfuss G (1998): Influence of SR Ca(2+)-ATPase and Na(+)-Ca(2+)-exchanger on the force-frequency relation. Basic Res Cardiol 93, 38-45

Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, Ohman P, Frederich R, Wiviott SD, Hoffman EB (2013): Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. N Engl J Med 369, 1317-1326

Scirica BM, Braunwald E, Raz I, Cavender MA, Morrow DA, Jarolim P, Udell JA, Mosenzon O, Im K, Umez-Eronini AA (2015): Heart Failure, Saxagliptin, and Diabetes Mellitus: Observations from the SAVOR-TIMI 53 Randomized Trial. Circulation 132, e198

Seman L, Macha S, Nehmiz G, Simons G, Ren B, Pinnetti S, Woerle HJ, Dugi K (2013): Empagliflozin (BI 10773), a Potent and Selective SGLT2 Inhibitor, Induces Dose-Dependent Glucosuria in Healthy Subjects. Clin Pharmacol Drug Dev 2, 152-161

Sha S, Polidori D, Heise T, Natarajan J, Farrell K, Wang SS, Sica D, Rothenberg P, Plum-Mörschel L (2014): Effect of the sodium glucose co-transporter 2 inhibitor canagliflozin on plasma volume in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetes Obes Metab 16, 1087-1095

Shao D and Tian R (2015): Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. Compr Physiol 6, 331-351

Sharma K, McCue P, Dunn SR (2003): Diabetic kidney disease in the db/dbmouse. American Journal of Physiology-Renal Physiology 284, F1138-F1144

Shim CY, Seo J, Cho I, Lee CJ, Cho IJ, Lhagvasuren P, Kang SM, Ha JW, Han G, Jang Y et al (2021): Randomized, Controlled Trial to Evaluate the Effect of Dapagliflozin on Left Ventricular Diastolic Function in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: The IDDIA Trial. Circulation 143, 510-512

Sibley DR and Lefkowitz RJ (1985): Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. Nature 317, 124-129

Singh AK, Singh R, Misra A (2021): Do SGLT-2 inhibitors exhibit similar cardiovascular benefit in patients with heart failure with reduced or preserved ejection fraction? J. Diab. 13, 596–600

Sjostrand FS, Andersson-Cedergren E, Dewey MM (1958): The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. J Ultrastruct Res 1, 271-287

Solomon SD, de Boer RA, DeMets D, Hernandez AF, Inzucchi SE, Kosiborod MN, Lam CSP, Martinez F, Shah SJ, Lindholm D et al. (2021): Dapagliflozin in heart failure with preserved and mildly reduced ejection fraction: rationale and design of the DELIVER trial. Eur J Heart Fail 23, 1217-1225

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J et al. (2010): Inhibition of elevated Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. Circ Res 107, 1150-1161

Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, Maurer U, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G et al. (2010): Altered Na(+) currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium. J Am Coll Cardiol 55, 2330-2342

Sossalla S, Maurer U, Schotola H, Hartmann N, Didié M, Zimmermann WH, Jacobshagen C, Wagner S, Maier LS (2011): Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKIIδC can be reversed by inhibition of late Na+ current. Basic Res Cardiol 106, 263-272

Sossalla S, Wagner S, Rasenack EC, Ruff H, Weber SL, Schöndube FA, Tirilomis T, Tenderich G, Hasenfuss G, Belardinelli L (2008): Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts--role of late sodium current and intracellular ion accumulation. J Mol Cell Cardiol 45, 32-43

Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Kashani F, Roohani S, Welschof P, Kopp M, Gödtel-Armbrust U, Xia N, Li H (2017): The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. Redox Biol 13, 370-385

Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR (2000): Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. BMJ 321, 405-412

Strehler EE,Zacharias DA (2001): Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. Physiol Rev 81, 21-50

Striepe K, Jumar A, Ott C, Karg MV, Schneider MP, Kannenkeril D, Schmieder RE (2017): Effects of the Selective Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Empagliflozin on Vascular Function and Central Hemodynamics in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. Circulation 136, 1167-1169

Sundgren NC, Giraud GD, Schultz JM, Lasarev MR, Stork PJ, Thornburg KL (2003): Extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositol-3 kinase mediate IGF-1 induced proliferation of fetal sheep cardiomyocytes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285, 1481-1489

Swiderek K, Jaquet K, Meyer HE, Schächtele C, Hofmann F, Heilmeyer LM Jr (1990): Sites phosphorylated in bovine cardiac troponin T and I Characterization by 31P-NMR spectroscopy and phosphorylation by protein kinases. Eur J Biochem 190, 575-582

Tanaka H, Takano K, Iijima H, Kubo H, Maruyama N, Hashimoto T, Arakawa K, Togo M, Inagaki N, Kaku K (2017): Factors Affecting Canagliflozin-Induced Transient Urine Volume Increase in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Adv Ther 34, 436-451

Tikkanen I, Narko K, Zeller C, Green A, Salsali A, Broedl UC, Woerle HJ; EMPA-REG BP Investigators (2015): Empagliflozin reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes and hypertensioN Diabetes Care 38, 420-428

Tong CW, Wu X, Liu Y, Rosas PC, Sadayappan S, Hudmon A, Muthuchamy M, Powers PA, Valdivia HH, Moss RL (2015): Phosphoregulation of Cardiac Inotropy via Myosin Binding Protein-C During Increased Pacing Frequency or β1-Adrenergic Stimulation. Circ Heart Fail 8, 595-604

Tsien RW, Bean BP, Hess P, Lansman JB, Nilius B, Nowycky MC (1986): Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. J Mol Cell Cardiol 18, 691-710

Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ (1995): Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg2+ and phosphorylatioN Science 267, 1997-2000

Van den Bergh A, Vanderper A, Vangheluwe P, Desjardins F, Nevelsteen I, Verreth W, Wuytack F, Holvoet P, Flameng W, Balligand JL et al. (2007): Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. Cardiovasc Res 77, 371-379

van der Velden, J (2011): Diastolic myofilament dysfunction in the failing human heart. Pflugers Arch 462, 155-163

an Heerebeek L, Borbély A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ (2006): Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. Circulation 113, 1966-1973

van Riet EE, Hoes AW, Limburg A, Landman MA, van der Hoeven H, Rutten FH (2014): Prevalence of unrecognized heart failure in older persons with shortness of breath on exertion. Eur J Heart Fail 16, 772-777

Vasan RS (2003): Diastolic heart failure. BMJ (Clinical research ed.) 327, 1181–1182

Vasilakou D, Karagiannis T, Athanasiadou E, Mainou M, Liakos A, Bekiari E, Sarigianni M, Matthews DR, Tsapas A (2013): Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med 159, 262-274

Veech RL (20014): The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 70, 309-19

Venosa RA and Horowicz P (1981): Density and apparent location of the sodium pump in frog sartorius musclE The Journal of Membrane Biology 59, 225-232

Verma S (2019): Potential Mechanisms of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor-Related Cardiovascular Benefits. American Journal of Cardiology 124, 36-44

Verma S, Garg A, Yan AT, Gupta AK, Al-Omran M, Sabongui A, Teoh H, Mazer CD, Connelly KA (2016): 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 39, e212-e213

Verma S, McMurray JJV, Cherney DZI (2017): The Metabolodiuretic Promise of Sodium-Dependent Glucose Cotransporter 2 Inhibition: The Search for the Sweet Spot in Heart Failure. JAMA Cardiol 2, 939-940

von Lewinski D, Rainer PP, Gasser R, Huber MS, Khafaga M, Wilhelm B, Haas T, Mächler H, Rössl U, Pieske B (2010): Glucose-transporter-mediated positive inotropic effects in human myocardium of diabetic and nondiabetic patients. Metabolism 59, 1020-1028

von Lewinski D, Stumme B, Maier LS, Luers C, Bers DM, Pieske B (2003): Stretch-dependent slow force response in isolated rabbit myocardium is Na+ dependent. Cardiovasc Res 57, 1052-1061

Vrhovac I, Balen Eror D, Klessen D, Burger C, Breljak D, Kraus O, Radović N, Jadrijević S, Aleksic I, Walles T et al. (2015): Localizations of Na(+)-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. Pflugers Arch 467, 1881-1898

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH et al. (2006): Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na+ channels. J Clin Invest 116, 3127-3138

Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F (1997): Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 4440-4445

Wan N, Rahman A, Hitomi H, Nishiyama A (2018): The Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors on Sympathetic Nervous Activity. Front Endocrinol (Lausanne) 9, 421

Wanner C, Lachin JM, Inzucchi SE, Fitchett D, Mattheus M, George J, Woerle HJ, Broedl UC, von Eynatten M, Zinman B et al. (2018): Empagliflozin and Clinical Outcomes in Patients With

Type 2 Diabetes Mellitus, Established Cardiovascular Disease, and Chronic Kidney Disease. Circulation 137, 119-129

Warner JJ, Crook HL, Whelan KM, Bleser WK, Roiland RA, Hamilton Lopez M, Saunders RS, Wang TY, Hernandez AF, McClellan MB et al. (2020): Improving Cardiovascular Drug and Device Development and Evidence Through Patient-Centered Research and Clinical Trials. Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes 13, e006606

Weber KT (1989): Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. J Am Coll Cardiol 13, 1637-52

Westermann D, Kasner M, Steendijk P, Spillmann F, Riad A, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP (2008): Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. Circulation 117, 2051-2060

Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, Garrido V, Díaz A, Verdejo HE, Castro PF, García L, Lavandero S (2016): New Molecular Insights of Insulin in Diabetic Cardiomyopathy. Front Physiol 7, 125

White WB, Cannon CP, Heller SR, Nissen SE, Bergenstal RM, Bakris GL, Perez AT, Fleck PR, Mehta CR, Kupfer S (2013): Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. N Engl J Med 369, 1327-1335

Wolfe JT, Wang H, Perez-Reyes E, Barrett PQ (2002): Stimulation of recombinant Cav3.2, T-type, Ca2+ channel currents by CaMKIIγC. J Physiol 538, 343-355

Xu YZ, Zhang X, Wang L, Zhang F, Qiu Q, Liu ML, Zhang GR, Wu XL (2013): An increased circulating angiotensin II concentration is associated with hypoadiponectinemia and postprandial hyperglycemia in men with nonalcoholic fatty liver disease. Intern Med 52, 855-861

Xue M, Li T, Wang Y, Chang Y, Cheng Y, Lu Y, Liu X, Xu L, Li X, Yu X et al. (2019): Empagliflozin prevents cardiomyopathy via sGC-cGMP-PKG pathway in type 2 diabetes mice. Clin Sci 133, 1705-1720

Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, Xia S, Xu M, Carlson EC, Epstein PN (2004): Catalase Protects Cardiomyocyte Function in Models of Type 1 and Type 2 Diabetes. Diabetes 53, 1336-1343

Ye G, Metreveli NS, Ren J, Epstein PN (2003): Metallothionein Prevents Diabetes-Induced Deficits in Cardiomyocytes by Inhibiting Reactive Oxygen Species Production. Diabetes 52, 777-783

Yokoyama H, Gunasegaram S, Harding SE, Avkiran M (2000): Sarcolemmal Na+/H+ exchanger activity and expression in human ventricular myocardium. J Am Coll Cardiol 36, 534–540

Yuan, W and D M Bers (1994): Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 267, 982-993

Yue P, Arai T, Terashima M, Sheikh AY, Cao F, Charo D, Hoyt G, Robbins RC, Ashley EA, Wu et al. (2007): Magnetic resonance imaging of progressive cardiomyopathic changes in the db/db mouse. Am J Physiol Heart Circ Physiol 292, 2106-18

Yurista SR, Silljé HHW, Oberdorf-Maass SU, Schouten EM, Pavez Giani MG, Hillebrands JL, van Goor H, van Veldhuisen DJ, de Boer RA, Westenbrink BD (2019): Sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Eur J Heart Fail 21, 862-873

Zhao G, Qiu Y, Zhang HM, Yang D (2019): Intercalated discs: cellular adhesion and signaling in heart health and diseases. Heart Failure Reviews 24, 115-132

Zhou L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT (2003): Human cardiomyocytes express high level of Na+/glucose cotransporter 1 (SGLT1). J Cell Biochem 90, 339-346

Zhou, Y and Wu W (2017): The Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Empagliflozin, Protects against Diabetic Cardiomyopathy by Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. Cell Physiol Biochem 41, 2503-2512

Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH (2004): Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. N Engl J Med 350, 1953-1959

Zinman B, Mathieu C, Kaspers S, Mattheus M, Woerle HJ, Fitchett D (2017): Empagliflozin reduces mortality in analyses adjusted for control of blood pressure, low density lipoprotein cholesterol and HbA1c over time. Eur. Heart J. 38, suppl_1

Zinman B, Lachin JM, Inzucchi SE (2015): Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. N Engl J Med 373, 2117-2128

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Samuel Sossalla für die Überlassung des hochaktuellen und spannenden Dissertationsthemas danken, für das Vertrauen in mich und dafür, dass jede Frage und jedes Anliegen ernstgenommen und beantwortet wurden.

Einen besonderen Dank möchte ich an meinen Betreuer Steffen Pabel richten, für die hervorragende und zuverlässige Betreuung, für all die Erklärungen, Ratschläge und Unterstützung und für die Motivation und Anregung, wenn es mal nicht weiterging. Ohne diese zwei wäre die Durchführung und das Schreiben dieser Arbeit in der Form nicht möglich gewesen.

Ebenfalls großer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Samuel Sossalla. Hier möchte ich insbesondere Timo Schulte, Yvonne Metz und Frau Dr. rer. nat. Nataliya Dybkova für die technischen und praktischen Hilfen danken.

Ohne die Hilfe meiner Mitdoktoranden wäre ein erfolgreiches Abschließen der Arbeit nicht möglich gewesen, daher gilt mein Dank zum Abschluss insbesondere auch Petros Tirilomis und Philipp Bengel.

Zum Schluss möchte ich der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin für den Erhalt des Peter-Scriba- Promotionsstipendium danken. Die Daten dieser Arbeit wurde auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) im Rahmen eines Vortrags präsentiert und diskutiert.