

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung einer dualen SGLT-1/2 Inhibition mit Sotagliflozin auf
die Kardiomyozytenfunktion in einem Rattenmodell der
Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion

Effect of dual SGLT-1/2 inhibition with Sotagliflozin on
cardiomyocyte function in a rat model of heart failure with
preserved ejection fraction

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Börge Ritter

aus Rostock

Datum der Promotion: 03.03.2023

Vorwort

Vorläufige Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Postervortrag im Rahmen des Basic Science Meetings der Herztage 2019 der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (10.10.-12.10.2019) vorgestellt:

Ritter JB, Hohendanner F, Wakula P, Clemens L, Bode D, Hegemann N, Primessnig U, Pieske B, Messroghli D, Heinzel FR. Effects of dual SGLT-1 and SGLT-2 inhibition on contraction and myofilament sensitivity in a model of metabolic HFpEF. https://dgk.org/kongress_programme/ht2019/aBS258.html. Zugriff am 04.07.2020.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen und Definitionen	6
2. Abbildungsverzeichnis.....	10
3. Tabellenverzeichnis.....	12
4. Zusammenfassung	13
5. Abstract	15
6. Einleitung.....	17
6.1 Herzinsuffizienz.....	17
6.1.1 Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion	18
6.2 Physiologie des Herzens: Die elektromechanische Kopplung	20
6.2.1 Schlüsselstellen und Modulation der elektromechanischen Kopplung	22
6.2.2 Störung der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz mit reduzierter Pumpfunktion	24
6.3 Pathophysiologie von Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion	25
6.3.1 Neurohumorale Dysregulation	28
6.3.2 Myokardiales Remodeling und Hypertrophie.....	29
6.3.3 Störung der elektromechanischen Kopplung und Myofilament- Ca ²⁺ - Sensitivität.....	30
6.4 Bedeutung von Diabetes für die Pathogenese von Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion	35
6.4.1 Störung des kardialen Metabolismus und der elektromechanischen.....	36
Kopplung	36
6.5 Therapie von Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion	38
6.5.1 Inhibitoren des Natrium-Glukose-Cotransporters	40
6.5.2 Sotagliflozin	43
6.6 Hypothesen	44
7. Material und Methoden.....	45
7.1 ZSF-1 obese Rattenmodell	45
7.2 Versuchsdesign und -durchführung	46
7.3 Isolation der Ratten-Kardiomyozyten	47
7.4 Handhabung des Ca ²⁺ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs	51
7.5 Messaufbau	53
7.6 Versuchsprotokoll der in vitro Untersuchungen.....	56
7.7 Beurteilung der Myofilamentsensitivität.....	60
7.8 Verwendete Lösungen	62
7.9 Statistik	63

8.	Ergebnisse	64
8.1	In vivo Phänotypisierung	64
8.2	Optimierung der in vitro Versuchsbedingungen	66
8.3	Ca ²⁺ -Transienten und Zellverkürzung	66
8.3.1	Basale Stimulationsfrequenz: 1 Hz.....	67
8.3.2	Erhöhte Stimulationsfrequenz: 2 Hz und 4 Hz.....	72
8.3.3	Dosisabhängige Unterschiede bei der Behandlung mit Sotagliflozin.....	78
8.4	Koffein-induzierte Ca ²⁺ -Transienten.....	79
8.5	Myofilamentsensitivität und Relaxation	80
9.	Diskussion	87
9.1	Validierung des ZSF-1 Modell.....	89
9.2	Zelluläre Kompensation der diastolischen Dysfunktion	89
9.2.1	Gesteigerte Aktivität des Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauschers	93
9.2.2	Erhöhte Myofilamentsensitivität.....	96
9.3	Effekte von Sotagliflozin auf die Kardiomyozytenfunktion	98
9.3.1	Effekte von Sotagliflozin auf die Myofilamentsensitivität.....	98
9.3.2	Effekte von Sotagliflozin auf die Ca ²⁺ -Homöostase.....	100
9.3.3	Verbesserung der diastolischen Funktion in vivo	102
9.4	Limitationen.....	103
9.5	Conclusio und Ausblick.....	105
10.	Literaturverzeichnis.....	108
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	121
12.	Lebenslauf	123
13.	Danksagung.....	125
14.	Bescheinigung Statistik.....	126

1. Abkürzungen und Definitionen

(PPAR)- α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
[Ca ²⁺] _m	Mitochondriale Ca ²⁺ -Konzentration
[Ca ²⁺] _{SR}	Sarkoplasmatische Ca ²⁺ -Konzentration
[Na ⁺] _i	Intrazelluläre Na ⁺ -Konzentration
A-Bande	Anisotrope Bande
AGE	Advanced glycation end product
Akt	Proteinkinase B
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
ARNI	Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitor
Art.	Arteriell
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	Body weight
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung
CNP	Natriuretisches Peptid Typ C
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAD	Verspätete Nachdepolarisation

DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor; syn.: spannungsabhängiger L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
Diast.	Diastolisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
E/E'	Echokardiographischer Parameter für die diastolische Funktion des linken Ventrikels
ECC	Elektromechanische Kopplung
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
Enddiast.	Enddiastolisch
ESC	European Society of Cardiology
EZM	Extrazellulärmatrix
EZR	Extrazellulärraum
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDAR	Frequency-dependent activation of relaxation
FFA	Freie Fettsäure/n
FT	Farbteiler
GLUT	Glukosetransporter
HbA1C	Glykohämoglobin
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonsäure; Puffersubstanz
HF	Herzinsuffizienz
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mittelgradig reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion

HHR	Hypertrophic heart rat
HZV	Herzzeitvolumen
I-Bande	Isotrope Bande
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
I _r -Kanal	Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channel; syn.: HCN-Kanal
IL-6	Interleukin-6
K _d	Dissoziationskonstante
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
LA	Linkes Atrium
LAP	Linksatrialer Druck
LTCC	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
LV	Linker Ventrikel
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVP	Linksventrikulärer Druck
MFS	Myofilamentsensitivität
M-Line	Mittelscheibe
MCU	Mitochondrialer Ca ²⁺ -Uniporter
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein C
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
Na _v	Spannungsgesteuerter Na ⁺ -Kanal
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
NHE	Na ⁺ -H ⁺ -Austauscher
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	N-terminales Prohormon vom brain natriuretic peptide
PCWP	Lungenkapillaren-Verschlussdruck
PDE3 / PDE5	Phosphodiesterase 3 / 5
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLB	Phospholamban
PPG	Postprandiale Blutzuckerkonzentration
PV	Druck-Volumen
R ²	Bestimmtheitsmaß einer Regression
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA / SERCA2a	Sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SGK1	Serin/Threonin-Proteinkinase 1
SGLT	Na ⁺ -Glukose-Cotransporter
SL	Sarkomerlänge
SNS	Sympathisches Nervensystem
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TGF-β	Transforming growth factor β
TnC	Troponin C
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TnI	Troponin I
Tn-Komplex	Troponin-Komplex
TnT	Troponin T
UCP3	Mitochondrial uncoupling protein 3
UGE	Urin-Glukose-Extraktion
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
Z-Line / Z-Scheibe	Zwischenscheibe

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektromechanische Kopplung	S. 20
Abb. 2: Subsarkolemmaler fuzzy space	S. 21
Abb. 3: Pathogene Sequenz bei HFpEF	S. 26
Abb. 4: Herzzyklus	S. 27
Abb. 5: Hypothetische Störungen des ECC bei HFpEF	S. 32
Abb. 6: Struktureller Aufbau des Sarkomers	S. 33
Abb. 7: Substratbalance des kardialen Metabolismus	S. 37
Abb. 8: Wirkungsprofil von SGLT-2-Inhibitoren	S. 41
Abb. 9: Versuchsdesign und Zeitablauf	S. 47
Abb. 10: Präparation und Auffinden der Aorta	S. 48
Abb. 11: Kanülierung und Fixierung der Aorta	S. 48
Abb. 12: Aufbau des Langendorff-Perfusionssystems	S. 49
Abb. 13: Schematische Darstellung des Langendorff-Perfusionssystems	S. 50
Abb. 14: Bildbeispiel einer untersuchten linksventrikulären Kardiomyozyte in IonWizard 6.6 (IonOptix)	S. 51
Abb. 15: Exzitationsspektrum von Fura-2	S. 52
Abb. 16: Technisches Setup für die ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie und SL-Messung	S. 54
Abb. 17: Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung des Sarkomers	S. 56
Abb. 18: Beispielhafter Durchlauf des Versuchsprotokolls (Aufnahme aus IonWizard 6.6)	S. 58
Abb. 19: Transienten-Parameter	S. 59
Abb. 20: Hystereseschleife und Berechnung der Myofilamentsensitivität	S. 61
Abb. 21: In vivo Phänotypisierung nach 23 Wochen	S. 65
Abb. 22: Qualitative Veränderungen der Ca^{2+} - und SL-Transienten von ZSF-1 Kardiomyozyten bei 1 Hz	S. 67
Abb. 23: Diast. $[Ca^{2+}]_i$ bei 1 Hz	S. 68
Abb. 24: Peak $[Ca^{2+}]_i$ bei 1 Hz	S. 68
Abb. 25: $[Ca^{2+}]_i$ Amplitude bei 1 Hz	S. 68

Abb. 26: Zeit bis 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall bei 1 Hz	S. 69
Abb. 27: Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall bei 1 Hz	S. 69
Abb. 28: Time to peak $[Ca^{2+}]_i$ bei 1 Hz	S. 69
Abb. 29: Qualitative Veränderungen der Ca^{2+} - und SL-Transienten von ZSF-1 Kardiomyozyten durch Sotagliflozin 30mg/kg KG bei 1 Hz	S. 70
Abb. 30: Enddiastolische Sarkomerlänge bei 1 Hz	S. 71
Abb. 31: Amplitude der Sarkomerlänge bei 1 Hz	S. 71
Abb. 32: Anteilige Verkürzung der Sarkomere bei 1 Hz	S. 71
Abb. 33: Time to peak SL bei 1 Hz	S. 71
Abb. 34: Zeit bis 50% Relaxation bei 1 Hz	S. 72
Abb. 35: Zeit bis 90% Relaxation bei 1 Hz	S. 72
Abb. 36: Frequenzabhängige Änderungen der diast. $[Ca^{2+}]_i$	S. 73
Abb. 37: Frequenzabhängige Änderungen der Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall	S. 74
Abb. 38: Qualitative Unterschiede der Konfiguration der Hystereseschleifen	S. 83
Abb. 39: Myofilamentsensitivität bei 1 Hz	S. 83
Abb. 40: Myofilamentsensitivität bei 2 Hz	S. 83
Abb. 41: Myofilamentsensitivität bei 4 Hz	S. 84
Abb. 42: Dosisabhängige Veränderungen der MFS bei 1 Hz	S. 85
Abb. 43: Dosisabhängige Veränderungen der MFS bei 2 Hz	S. 85
Abb. 44: Dosisabhängige Veränderungen der MFS bei 4 Hz	S. 85
Abb. 45: Graphische Zusammenfassung der Studie	S. 88

3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Definitionen der untersuchten Parameter	S. 58 f.
Tab. 2: Zusammensetzung der Perfusionslösung	S. 62
Tab. 3: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung	S. 63
Tab. 4: Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und Zellzahl pro Versuchstier für die Analyse der Ca ²⁺ - und Kontraktionstransienten bei 1, 2 und 4 Hz	S. 66 f.
Tab. 5: Charakteristika der Ca ²⁺ - und Kontraktionstransienten bei 2 Hz	S. 75 f.
Tab. 6: Charakteristika der Ca ²⁺ - und Kontraktionstransienten bei 4 Hz	S. 76 f.
Tab. 7: Dosisabhängige Veränderungen der von Sotalolol beeinflussten Transientenparameter	S. 78
Tab. 8: Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und Zellzahl pro Versuchstier für die Analyse der Koffein-induzierten Ca ²⁺ -Transienten	S. 79
Tab. 9: Charakteristika der Koffein-induzierten Ca ²⁺ -Transienten	S. 80
Tab. 10: Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und Zellzahl pro Versuchstier für die Analyse der Myofilamentsensitivität	S. 81
Tab. 11: Ausschlussraten (MFS)	S. 82
Tab. 12: Versuchsgruppen übergreifende Konstanz von R ²	S. 86
Tab. 13: Dosisabhängiger Effekt von Sotalolol auf R ²	S. 86

4. Zusammenfassung

Einleitung: Über 50% der Patienten mit Herzinsuffizienz haben eine diastolische Dysfunktion bei erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Insbesondere Patienten mit metabolischem Syndrom haben ein erhöhtes Risiko HFpEF zu entwickeln. Wir konnten vorausgehend zeigen, dass kardioresenal bedingte HFpEF mit einer kardiomyozytären Dysfunktion in vitro einhergeht. Das neue Antidiabetikum Sotagliflozin, ein Inhibitor des Na⁺-Glukose-Cotransporters (SGLT-1 und SGLT-2), könnte die Kardiomyozytenfunktion bei HFpEF positiv beeinflussen. Wir überprüften in einem Herzinsuffizienzmodell der Ratte, ob die Ca²⁺-Homöostase und kontraktile Funktion linksventrikulärer Kardiomyozyten auch bei einer durch das metabolische Syndrom bedingten HFpEF gestört ist. Darüber hinaus überprüften wir, ob eine Langzeittherapie mit Sotagliflozin einen Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase und kontraktile Funktion der Kardiomyozyten hat.

Methoden: Ratten des ZSF-1- (HFpEF) oder Wildtyp-Stamms wurden im Alter von 17 bis 23 Wochen mit Sotagliflozin oder Vehiculum behandelt. Im Finalversuch wurden linksventrikuläre Kardiomyozyten gewonnen und die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und Sarkomerlänge (Kontraktion) simultan mittels Fluoreszenzphotometrie (Fura-2 AM) und Durchlichtvideomikroskopie bei verschiedenen chronotropen Anforderungen (1, 2, 4 Hz Stimulation) untersucht. Das intrazellulär gespeicherte Ca²⁺ wurde nach Freisetzung durch Koffein bemessen. Die Myofilamentsensitivität der intakten Zellen wurde aus der Sarkomerlänge als Funktion der [Ca²⁺]_i innerhalb eines Herzzyklus berechnet.

Ergebnisse: ZSF-1 Kardiomyozyten zeigten bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz eine unveränderte [Ca²⁺]_i und intrazellulär gespeichertes Ca²⁺, aber eine schnellere Zeit bis [Ca²⁺]_{i max}, sowie Hinweise auf einen schnelleren [Ca²⁺]_i Abfall. Analog zur [Ca²⁺]_i war die Kontraktion und Relaxation der Sarkomere beschleunigt. ZSF-1 Kardiomyozyten hatten eine höhere enddiastolische Sarkomerlänge, während die anteilige Sarkomerverkürzung unverändert blieb. Die Myofilamentsensitivität war stark erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ähnliche Beobachtungen konnten bei 2 und 4 Hz gemacht werden. ZSF-1 Kardiomyozyten zeigten Anzeichen einer erhöhten NCX-Aktivität. Die

Behandlung mit Sotagliflozin konnte die intrinsische Funktion der ZSF-1 Kardiomyozyten in vitro nicht verbessern.

Conclusio: In diesem Rattenmodell der durch das metabolische Syndrom bedingten HFpEF findet sich im untersuchten Krankheitsstadium eine gegenüber gesunden Tieren schnellere Kontraktion und Relaxation der Kardiomyozyten in vitro, welche sich möglicherweise durch eine schnellere Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten und Veränderung der Myofilamentsensitivität begründen lässt. Die Veränderungen in der Myofilamentsensitivität deuten auf eine komplexe subzelluläre Adaptation hin. Die Langzeitbehandlung mit Sotagliflozin hatte in diesem HFpEF-Modell keinen vorteilhaften Effekt auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten in vitro.

5. Abstract

Introduction: More than 50% of the patients with heart failure show a preserved ejection fraction, but diastolic dysfunction. In particular patients with metabolic syndrome have an increased risk for developing HFpEF. We have previously shown that cardiorenal HFpEF comes along with in vitro cardiomyocyte dysfunction. The new antidiabetic drug Sotagliflozin, an inhibitor of the sodium glucose cotransporter (SGLT-1 and SGLT-2), could have a positive effect on cardiomyocyte function in HFpEF. In a rat model of heart failure, we investigated if the Ca^{2+} homeostasis and contractile function of left ventricular cardiomyocytes is altered as well in metabolic syndrome related HFpEF. Furthermore, we tested whether a long-term application of Sotagliflozin influences the Ca^{2+} homeostasis and contractile function of cardiomyocytes.

Methods: ZSF-1 and Wildtype rats were treated with Sotagliflozin or vehicle from age 17 to 23 weeks. During the final experiment left ventricular cardiomyocytes were isolated and examined in vitro. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and sarcomere length were measured simultaneously by fluorescence photometry (Fura-2 AM) and transmitted light video microscopy under different chronotropic challenges (1, 2, 4 Hz stimulation). The intracellular Ca^{2+} store content was assessed after release through caffeine. The myofilament sensitivity of the intact cardiomyocytes was determined from the sarcomere length as a function of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during the cardiac cycle.

Results: Under 1 Hz stimulation ZSF-1 cardiomyocytes showed maintained $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and intracellularly stored Ca^{2+} , but a faster time to peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and signs of a faster $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decay. According to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ contraction and relaxation of the sarcomeres were accelerated. ZSF-1 cardiomyocytes had a longer enddiastolic sarcomere length, while fractional shortening remained unchanged. The myofilament sensitivity was heavily increased compared to the control group. Similar observations could be made at 2 and 4 Hz. ZSF-1 cardiomyocytes showed signs of enhanced NCX activity. Treatment with Sotagliflozin did not improve intrinsic function of ZSF-1 cardiomyocytes in vitro.

Conclusions: This rat model of metabolic syndrome related HFpEF shows at the examined state of disease a faster contraction and relaxation of the cardiomyocytes in

in vitro compared to control, which could be explained by faster kinetics of the intracellular Ca^{2+} transients and changes in myofilament Ca^{2+} sensitivity. The changes in myofilament sensitivity indicate a complex subcellular adaptation. Long-term treatment with Sotagliflozin had no beneficial effect on the contractile function of ZSF-1 cardiomyocytes in vitro.

6. Einleitung

6.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein Krankheitsbild diverser Ätiologie, bei dem die Pumpleistung des Herzens beeinträchtigt ist und nicht mehr genügt, um den Körper ausreichend mit Blut zu versorgen [1, 2]. Dabei wird die Durchblutung dem metabolischen Bedarf der Organe nicht mehr gerecht, wodurch es zur Ausbildung der Symptome kommt [3]. Zum Symptomkomplex der Herzinsuffizienz gehören typischerweise kardiale Ödeme, Dys- und Orthopnoe, sowie Nykturie. Hinzu kommen können Stauungszeichen, wie Stauungsleber und Stauungsniere mit Proteinurie, oder Pleuraergüsse und Aszites [2–4]. Ebenfalls können sich klinische Zeichen eines erhöhten Sympathikotonus präsentieren [2–4]. Dazu gehören unter anderem Tachypnoe, Palpitationen und vegetative Symptome, wie Kaltschweißigkeit und Verdauungsbeschwerden. Das klinische Erscheinungsbild der Patienten kann durch die vielfältige Ätiologie dieser Erkrankung und die häufig vorhandene Komorbidität variieren [1, 5].

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz ist stark altersabhängig und beträgt bezogen auf die Gesamtbevölkerung in Deutschland ca. 3,4% [6]. Die Häufigkeit nimmt im höheren Alter zu und steigt in der Altersgruppe der über 80-Jährigen auf 25% und mehr an [2]. Auf Grund der demographischen Umstrukturierung der Bevölkerung und einer wachsenden Lebenserwartung ist von einer weiter steigenden Inzidenz und einer erheblichen sozioökonomischen Belastung des Gesundheitssystems auszugehen [7, 8]. Herzinsuffizienz ist von einer hohen Morbidität gekennzeichnet und stellt die häufigste Krankheitsursache für Hospitalisierung beim Erwachsenen dar [2, 9, 10]. Patienten mit Herzinsuffizienz haben eine 1- und 5-Jahressterblichkeit von 20 bzw. 50% [2]. Diese hängt stark vom Alter, Komorbidität und dem Erhalt einer adäquaten Therapie ab [1]. Die Herzinsuffizienz rangiert in der Todesursachenstatistik in Deutschland auf Platz 3 [2].

Zu den häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz gehören die koronare Herzerkrankung, Myokardinfarkte, Erkrankungen der Herzklappen, arterielle Hypertonie, Herzrhythmusstörungen, pulmonale Hypertonie, sowie Kardiomyopathien und -myokarditiden [2]. Es kann eine Klassifikation nach dem zeitlichen Verlauf in akut und

chronisch, sowie nach der vorrangig betroffenen Kammer in Rechts-, Links- oder Globalinsuffizienz vorgenommen werden [2, 11]. Die therapeutisch relevanteste Einteilung ist jedoch die nach der linksventrikulären Ejektionsfraktion [2]. Hier unterscheidet man zwischen HFrEF (heart failure with reduced ejection fraction; LVEF<40%), HFmrEF (heart failure with midrange ejection fraction; LVEF 40-50%) und HFpEF (heart failure with preserved ejection fraction; LVEF>50%) [11]. Da diese Entitäten eine unterschiedliche Gewichtung an ätiologischen Risikofaktoren aufweisen und Differenzen in ihrer Pathophysiologie haben, könnte die differenzierte Betrachtung für die Auswahl der Therapie und möglicherweise auch die Prognose von Betroffenen bedeutsam sein [1, 11–13].

Häufig führen bei HFrEF eine art. Hypertonie, KHK und Myokardinfarkte zur muskulären Insuffizienz des Herzens [11]. Bei HFpEF hingegen haben art. Hypertonie, hohes Alter, weibliches Geschlecht und Diabetes mellitus eine vorrangige Bedeutung in der Entstehung der Herzinsuffizienz [11, 14–16]. Diese Gegebenheiten führen dazu, dass die Inzidenz von HFrEF auf Grund der besseren Infarktbehandlung in den Industrienationen deutlich abnimmt, während die von HFpEF stetig steigt [12, 17]. So ist die Inzidenz und Prävalenz von HFpEF schon heute größer als die von HFrEF (>50%; ca. 1,7% der Bevölkerung [16])) und nimmt weiter zu [11, 17].

Trotz der hohen Prävalenz von HFpEF gibt es bis heute keine etablierte Therapie, die das Überleben der Patienten nachweisbar verbessern konnte. Das liegt vor allem daran, dass die Pathophysiologie dieser Erkrankung noch wenig erforscht ist. Der hohe Leidensdruck und die erheblich reduzierte Lebenserwartung der Patienten, sowie die hohe Belastung des Gesundheitssystems machen diese Forschung dringend notwendig.

6.1.1 Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion

HFpEF ist per Definition dadurch gekennzeichnet, dass die prozentuale linksventrikuläre Ejektionsfraktion erhalten bleibt. Die gestörte und verminderte Füllung des linken Ventrikels führt jedoch trotzdem zu einem reduzierten Schlagvolumen und HZV [4, 11]. Die diastolische Füllung des linken Ventrikels auf ein normales enddiastolisches Volumen ist nur mit erhöhten Füllungsdrücken (LVEDP) möglich [3, 17]. Die Füllung der Ventrikel

verschlechtert sich vor allem bei Belastung, da bei erhöhter Herzfrequenz die Dauer der Diastole im Vergleich zur Systole abnimmt [18].

Die häufigsten Risikofaktoren für das Auftreten von HFpEF sind ein unkontrollierter art. Hypertonus, hohes Alter, weibliches Geschlecht, Niereninsuffizienz (kardiorenales Syndrom bei bis zu 60% der Patienten) und das metabolische Syndrom [3, 11, 13, 15]. Das metabolische Syndrom beschreibt die Kombination von gestörter Glukosetoleranz oder Diabetes mellitus Typ 2, abdomineller Adipositas, sowie Hyper- und Dyslipidämie. Die Komponenten des metabolischen Syndroms sind bedeutende Risikofaktoren, da sie in den Industrienationen bei nahezu einem Drittel der Bevölkerung vorhanden sind [19–21]. Weitergehend leiden Patienten mit HFpEF häufiger an Vorhofflimmern als Patienten mit HFrEF [3, 22].

Typischerweise haben Patienten mit HFpEF eine konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels mit erhöhter Wandstärke und verkleinerter Kammer, sowie eine Vergrößerung des linken Atriums, welche Zeichen der erhöhten Füllungsdrücke sind [22–24].

Die aktuellen diagnostischen Kriterien von HFpEF umfassen:

1. Klassische Zeichen und Symptome der Herzinsuffizienz
2. Erhöhte natriuretische Peptide (BNP>35 pg/ml und/oder NT-proBNP>125 pg/ml)
3. Normale oder geringfügig reduzierte EF
4. Min. ein Kriterium der strukturellen Herzerkrankung (LA-Dilatation, LV-Hypertrophie) oder einer diast. Dysfunktion (pathologischer LVEDP, PCWP, E/E') [11].

Für die Diagnose HFpEF müssen eine schwere Lungen- oder Herzklappenerkrankung, sowie eine myokardiale Ischämie durch koronare Herzerkrankung ausgeschlossen werden [25]. Ein Überblick über die Risikofaktoren und den Phänotyp von HFpEF verschafft Abbildung 3 (siehe 6.3).

Die vielfältige Ätiologie von HFpEF stellt eine bedeutende Hürde für die Erforschung der Pathophysiologie von HFpEF dar. Da der Anteil an durch das metabolische Syndrom induzierter HFpEF vermutlich hoch ist, kommt der Erforschung dieser Ätiologie ein besonderer Stellenwert zu.

6.2 Physiologie des Herzens: Die elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung (syn.: excitation contraction coupling, ECC) beschreibt den Prozess von der elektrischen Erregung des Myokards bis zu dessen Kontraktion (siehe Abb. 1). Dabei stellt Ca^{2+} , als ubiquitärer Signaltransduktor, das verbindende Glied zwischen Erregung und Kontraktion dar, da es der direkte Aktivator der Myofilamente ist [26, 27]. Folglich hängt die kardiale Funktion in hohem Maße von der korrekten Interaktion zwischen elektrischer Erregung, Ca^{2+} -Homöostase und kontraktilen Apparat ab [28, 29].

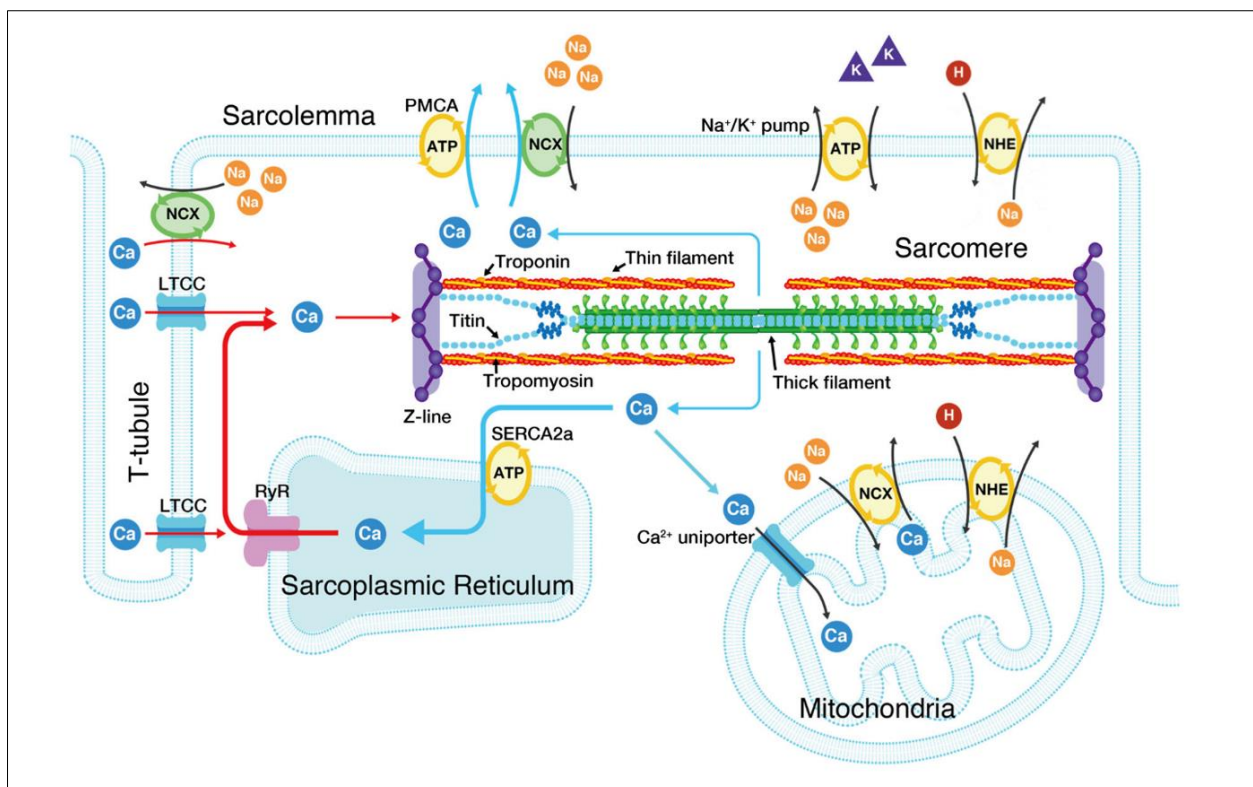


Abb. 1: Elektromechanische Kopplung; Abbildung modifiziert nach [30]

Die elektrische Erregung der Kardiomyozyte erfolgt durch die spannungsaktivierten Na⁺-Kanäle (v.a. kardialer Na_{v1.5}) [27, 31]. Sie sind durch ihr spannungsabhängiges Öffnungsverhalten sowohl für die Initiation als auch die Weiterleitung des Aktionspotentials verantwortlich [27, 32]. Bei der elektrischen Erregung öffnet sich der Na_{v1.5} schnell und verschiebt das Membranpotential in Richtung des Na⁺-Gleichgewichts bei +60mV. Dieses wird jedoch nicht erreicht (nur sog. overshoot bis +20mV), da der Na_{v1.5} sich ab einer Spannung von -40mV wieder zu schließen beginnt und deshalb die Öffnungsdauer nur ca. 1ms beträgt [18, 33]. Durch die Depolarisation werden ab einer

Membranspannung von -40mV die spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC; syn.: DHPR=Dihydropyridin-Rezeptor) geöffnet [26]. Diese bleiben langanhaltend geöffnet und tragen zur Plateauphase des Aktionspotentials bei [18]. Die LTCCs sind vor allem an den Sarkolemm-SR-Junktionen (syn.: Couplons, „fuzzy space“, siehe Abb. 2) lokalisiert [27, 34]. Das einströmende Ca^{2+} führt über die Ryanodin-Rezeptoren (RyRs) zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem eng benachbarten sarkoplasmatischen Retikulum (calcium induced calcium release; CICR) [26, 27, 35]. Die Summe aus dem von extrazellulär einströmenden und dem aus dem SR freigesetzten Ca^{2+} führt zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um das Hundertfache (10^{-7} mol/l im Vergleich zu 10^{-5} mol/l) [18]. Es bildet einen zytosolischen Ca^{2+} -Transienten. Die Bindung von Ca^{2+} an das myofibrilläre Regulatorprotein Troponin C löst die Kontraktion aus [27].

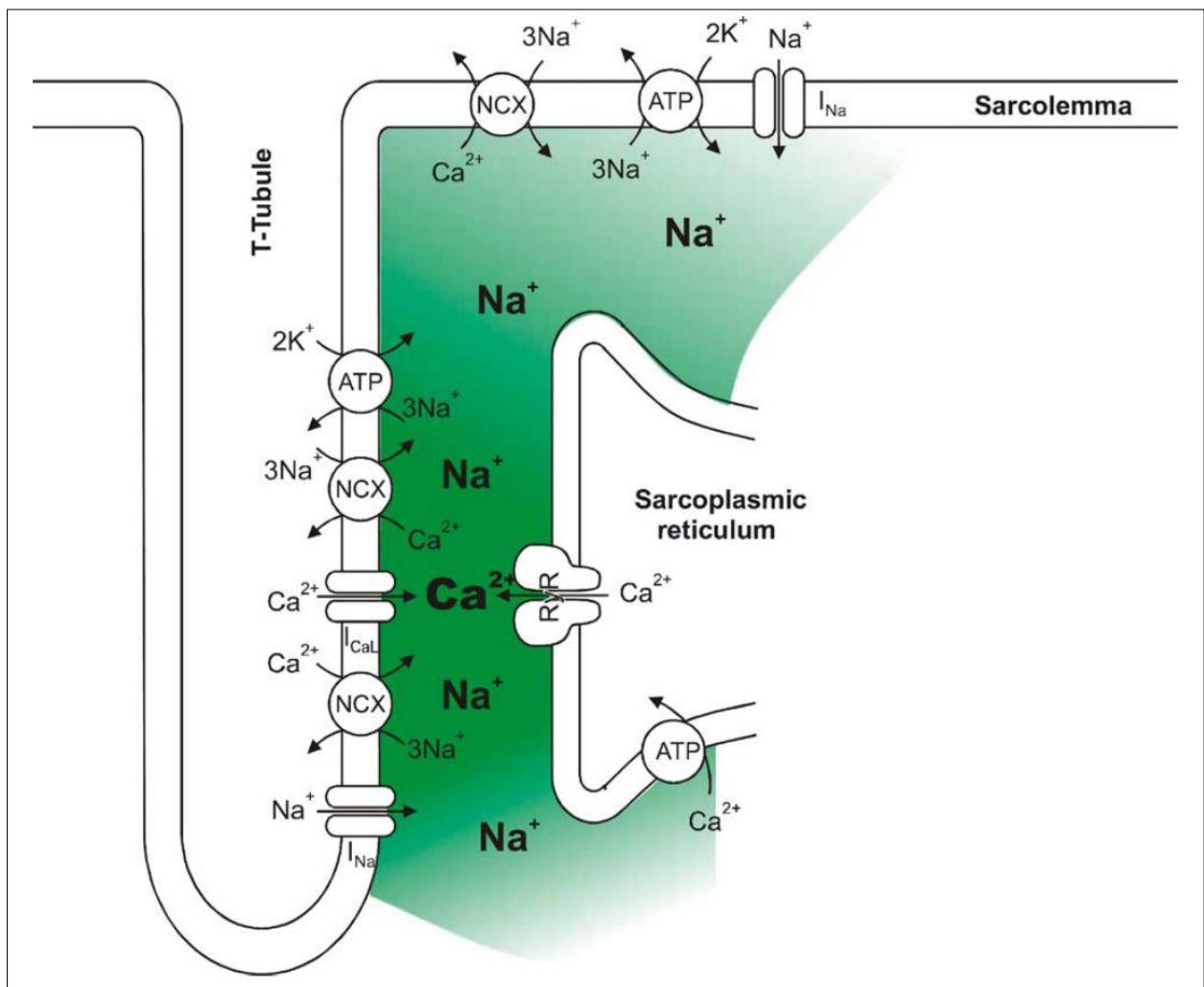


Abb. 2: Subsarkolemmaler fuzzy space. Hellgrün= Na^+ fuzzy space; dunkelgrün= Ca^{2+} fuzzy space/ Sarkolemm-SR-Junktion [34]

Für die Relaxation muss die $[Ca^{2+}]_i$ wieder abfallen, um die Abdiffusion des Ca^{2+} vom TnC zu ermöglichen [27]. Dafür muss Ca^{2+} aus dem Zytosol entfernt werden, was hauptsächlich durch die SR Ca^{2+} -ATPase SERCA2a und den sarkolemmalen NCX erreicht wird [26, 27]. Im Menschen trägt die SERCA2a zu 70% und der NCX zu 28% zur Ca^{2+} -Entfernung bei, während es bei der Ratte 92% bzw. 7% sind [26]. Die restlichen 2% bzw. 1% werden durch die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase (PMCA) nach extrazellulär, oder durch den mitochondrialen NCX und den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) in die Mitochondrien befördert (slow-system) [26]. In den Mitochondrien fungiert Ca^{2+} ebenfalls als Signaltransduktor und reguliert den Zellmetabolismus entsprechend des Energiebedarfs [35–37].

6.2.1 Schlüsselstellen und Modulation der elektromechanischen Kopplung

Der sarkolemmale NCX transportiert 3 Na^+ -Ionen gegen 1 Ca^{2+} -Ion über die Zellmembran, was einen elektrischen Gradienten verursacht [18, 35]. Der NCX kann im Vorwärts-Modus (Ca^{2+} Ausstrom und Na^+ Einstrom), sowie im Rückwärts-Modus (Ca^{2+} Einstrom und Na^+ Ausstrom) arbeiten [26, 27]. Bei hoher $[Ca^{2+}]_i$, deutlich negativem Membranpotential und niedriger $[Na^+]_i$ (frühdiastolische Verhältnisse) arbeitet der NCX im Vorwärts-Modus, während er bei positivem Membranpotential und/oder hoher $[Na^+]_i$ im Rückwärts-Modus arbeitet [18, 26, 27]. Daher fördert der NCX im normofrequenten Bereich hauptsächlich die Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol [26]. Bei höheren Frequenzen akkumuliert Na^+ durch den vermehrten Einstrom von Na^+ und die unzureichende NKA-Kapazität in der Zelle [27]. Der NCX arbeitet dann im Rückwärts-Modus und speist das SR mit extrazellulärem Ca^{2+} [29]. Das ist die Grundlage der positiven Frequenzinotropie, auch Bowditch-Effekt genannt [29, 38]. Der NCX befindet sich vor allem an den Sarkolemm-SR-Couplons in den T-Tubuli [27, 32] und ist mit der NKA-Isoform $\alpha 2$ kolokalisiert [35].

Das aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzte Ca^{2+} stellt den größten Anteil des Ca^{2+} -Transienten dar [26, 29]. Daher führt eine erhöhte sarkoplasmatische $[Ca^{2+}]_i$ direkt zu einer Erhöhung der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten und umgekehrt, da die $[Ca^{2+}]_{SR}$ die Offenwahrscheinlichkeit des RyR beeinflusst [26]. Das sorgt für eine Homöostase der $[Ca^{2+}]_{SR}$, da bei niedriger $[Ca^{2+}]_{SR}$ der CICR komplett ausfallen kann [26]. Die $[Ca^{2+}]_i$ bleibt dadurch niedrig, wodurch der NCX im Rückwärts-Modus die

erneute suffiziente Beladung des SR befördert [26]. Umgekehrt kann eine hohe $[Ca^{2+}]_{SR}$ auch zu spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen führen und so „aftercontractions“ und Arrhythmien triggern [39]. Die SERCA2a ist der effektivste Weg zur Ca^{2+} -Extrusion aus dem Zytosol und Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR [26]. Deshalb ist ihre Expression und Aktivität höchstentscheidend für den diastolischen Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ und damit für die Relaxation [27].

Die Stärke des Herzschlages (gemessen an der Auswurfleistung) ist direkt von der Amplitude und Dauer des Ca^{2+} -Transienten abhängig und wird vor allem durch dessen Modulation reguliert [26, 27]. Unter körperlicher Belastung oder in Stresssituationen muss das Herzzeitvolumen an die erhöhten Anforderungen angepasst werden. Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems kann die Kontraktionskraft des Herzens durch die Modulation des ECC erhöhen. Die β -adrenerge Stimulation (v.a. β_1 -Adrenorezeptor) führt cAMP-PKA-vermittelt zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung [26]. Die Phosphorylierung der beteiligten Ionenkanäle erhöht deren Leitfähigkeit und verstärkt dadurch auch den CICR [18, 26]. Zusätzlich wird die Ca^{2+} -Wiederaufnahme beschleunigt. Die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB), einem endogenen Inhibitor der SERCA2a [18], führt zu einer doppelten Inhibition und damit zu gesteigerter SERCA-Aktivität [26, 29]. Deshalb kommt es auch zu einer stärkeren Ca^{2+} -Beladung des SR [18, 26, 29]. Durch die Steigerung der Ca^{2+} -Amplitude und -Wiederaufnahmegeschwindigkeit ist unter β -adrenerger Stimulation sowohl die Kontraktionskraft (Inotropie) gestärkt, als auch die Relaxation (Lusitropie) verbessert. Die erhöhte Lusitropie führt zu einer verbesserten Füllung der Ventrikel und über den Frank-Starling-Mechanismus zu einer weiteren Steigerung der Inotropie [18].

Die beschriebenen Mechanismen sind vulnerable Strukturen, sodass pathogene Einflüsse eine erhebliche Verschlechterung der myokardialen Funktion verursachen können. Sie können aber auch pharmakologisch, beispielsweise durch β -Rezeptor-Agonisten (Suprarenin, Dobutamin etc.) oder β -Blocker (bspw. Propranolol), beeinflusst werden. Ein weiteres typisches pharmakologisches Target ist die NKA, welche durch Herzglykoside gehemmt werden kann [27, 37]. Durch die NKA-Hemmung erhöht sich die $[Na^+]_i$, was zu einer erhöhten NCX-Aktivität im Rückwärtsmodus führt [26, 27, 32]. Das erhöht, die $[Ca^{2+}]_i$ und die Speisung des SR mit Ca^{2+} und folglich die Kontraktionskraft [18, 29, 32].

6.2.2 Störung der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz mit reduzierter Pumpfunktion

Bei HFrEF zeigen sich Störungen im Ca^{2+} -Handling und ECC der Kardiomyozyte. Und da Ca^{2+} der direkte Aktivator der Myofilamente ist, führen diese Veränderungen unweigerlich zur Störung der Kontraktion und Relaxation [28].

Bei HFrEF kommt es zu einer Verminderung der Amplitude des Ca^{2+} -Transients bei gleichzeitig erhöhter diastolischer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [26, 35, 39]. Das ist vor allem einer geringeren Ca^{2+} -Beladung des SR geschuldet, die durch eine Störung der sarkolemmalen Ionenkanäle bedingt ist [26, 35, 40]. Vorrangig wird die Expression der SERCA2a runterreguliert [39], wodurch es zu einem relativen Übergewicht von PLB kommt [35]. Hinzu kommt, dass sich die RyR in einem hyperphosphorylierten Zustand befinden, sodass ein AP-unabhängiges Ca^{2+} -Leck ins Zytosol entsteht (fuzzy space; siehe Abb. 2) [26, 34, 35, 39]. Zusätzlich ist die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung und -Wiederaufnahme reduziert [26, 39]. Kompensatorisch steigt die Expression des NCX und dessen Aktivität im Vorwärtsmodus [35, 39]. Daraus folgt eine weitere Entladung des SR und eine Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ [35, 39]. Die hohe $[\text{Na}^+]_i$ führt durch die Rückwärtsaktivität des NCX zu einem diast. Ca^{2+} -Einstrom, was dyssynchronisierte Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR triggert [35, 36]. Außerdem kommt es zu einer Abnahme der NKA-Aktivität [35, 37, 39], die die weitere Akkumulation von Na^+ im Zytosol fördert und Repolarisationsstörungen begünstigt [31, 32, 36].

Die gestörte Ionenhomöostase führt durch den erhöhten ATP-Verbrauch der Ionenpumpen [35] zu einer enormen metabolischen Last [1]. Der Großteil der verfügbaren Energie wird für die Aufrechterhaltung der diast. Wandspannung benötigt und kann nicht mehr effektiv für die Kontraktion genutzt werden [35]. Die metabolische Last führt zu einer vermehrten Aufnahme von Glukose, die durch anaerobe Glykolyse verstoffwechselt wird [41, 42]. Dadurch kommt es zu einer intrazellulären Azidose, die wiederum den NHE stimuliert und den Circulus vitiosus verstärkt [27, 35–37, 43]. Die gestörte Ionenhomöostase hat negative Effekte auf die mitochondriale Energiebereitstellung, das oxidative Schutzsystem [32, 35] und die Genexpression der Zelle [18, 44].

6.3 Pathophysiologie von Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion

Es ist davon auszugehen, dass sich die Pathophysiologie von HFpEF und HFrEF grundlegend unterscheidet [45], da sich die etablierten Therapien für HFrEF bei HFpEF als wenig effektiv erweisen [11, 45, 46]. Bei HFpEF steht die gestörte diastolische Füllung der Herzkammern im Zentrum des Krankheitsgeschehens. Für die Entstehung und Progression der Erkrankung nehmen aber auch die neurohumorale Dysregulation [3] und das myokardiale Remodeling eine wichtige Rolle ein [23]. Sie stehen im engen kausalen Zusammenhang mit den jeweiligen Risikofaktoren und Komorbiditäten des Patienten [4, 15]. Die Begleiterkrankungen erzeugen unter anderem eine systemische Proinflammation und ein vermehrtes Aufkommen von oxidativem Stress, welche zu funktionellen und strukturellen Schäden an Herz und Gefäßsystem führen (siehe Abb. 3) [1, 4, 47]. Wie es genau zur Induktion von HFpEF durch die jeweiligen Risikofaktoren kommt und vor allem welche spezifischen kardialen Strukturen geschädigt werden, ist bisher kaum erforscht.

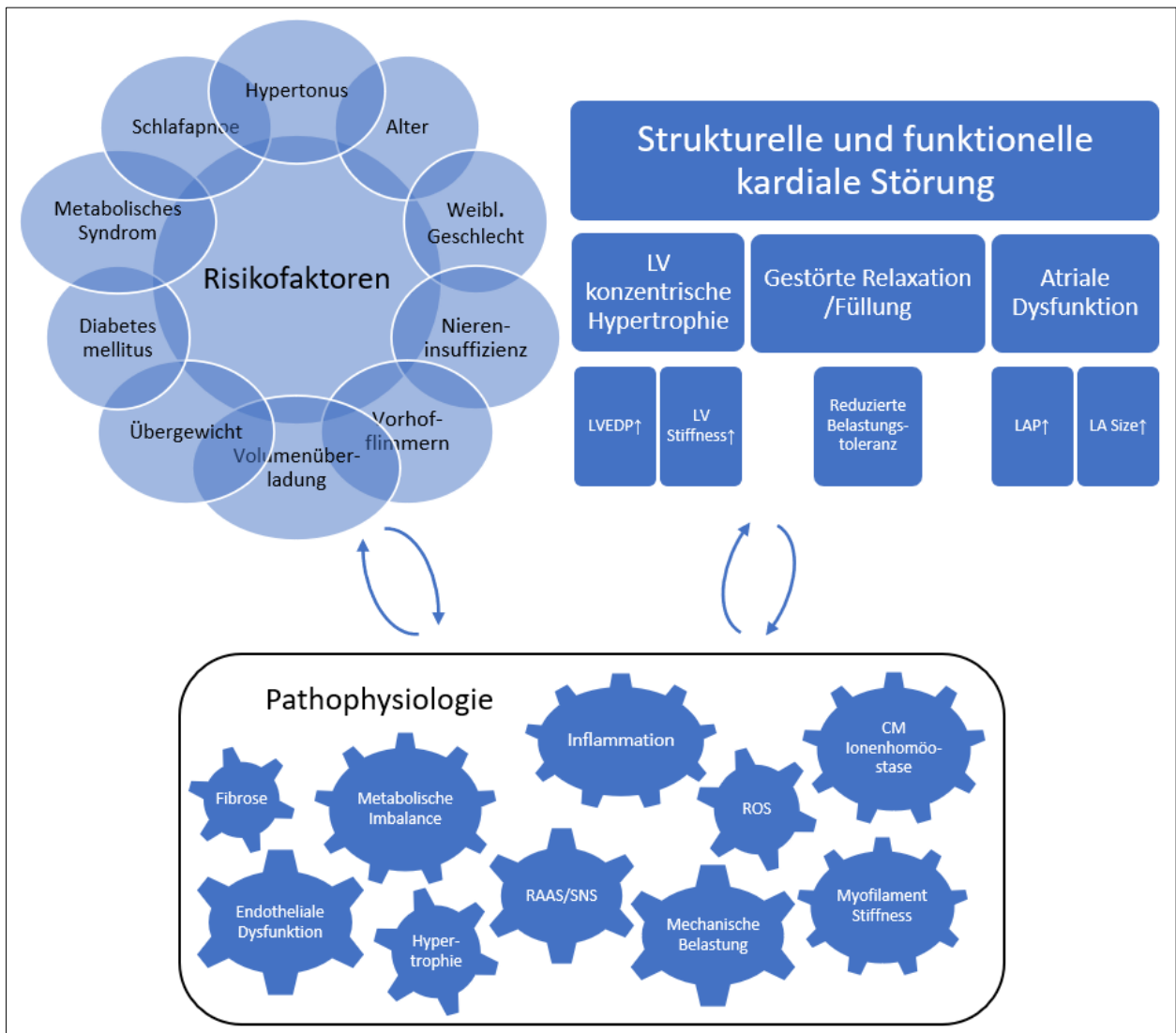


Abb. 3: Pathogene Sequenz bei HFpEF; Abbildung modifiziert nach [1]

Die Diastole teilt sich in drei Phasen (siehe Abb. 4). In der frühen Entspannungsphase (1) kommt es zu einer isovolumetrischen Relaxation (LVP sinkt bei gleichbleibendem Volumen) der Kammern. Danach folgt die Füllungsphase (2), in der der Druck in den Kammern den in den Vorhöfen unterschreitet und das Blut in die Ventrikel strömt. In dieser Phase ändert sich das Volumen schnell, was durch die elastischen Rückstellkräfte der Extrazellular- (v.a. Kollagen und Elastin) und Intrazellulärmatrix (v.a. Titin) bedingt ist [18]. Die Füllungsphase dauert so lange an, bis sich der Druck im LV dem im LA angeglichen hat. In der dritten Phase kommt es zur Kontraktion des linken Atriums, wodurch die Füllung des linken Ventrikels weiter zunimmt [18]. Dies ist besonders bei hoher Herzfrequenz und verkürzter Diastolendauer wichtig.

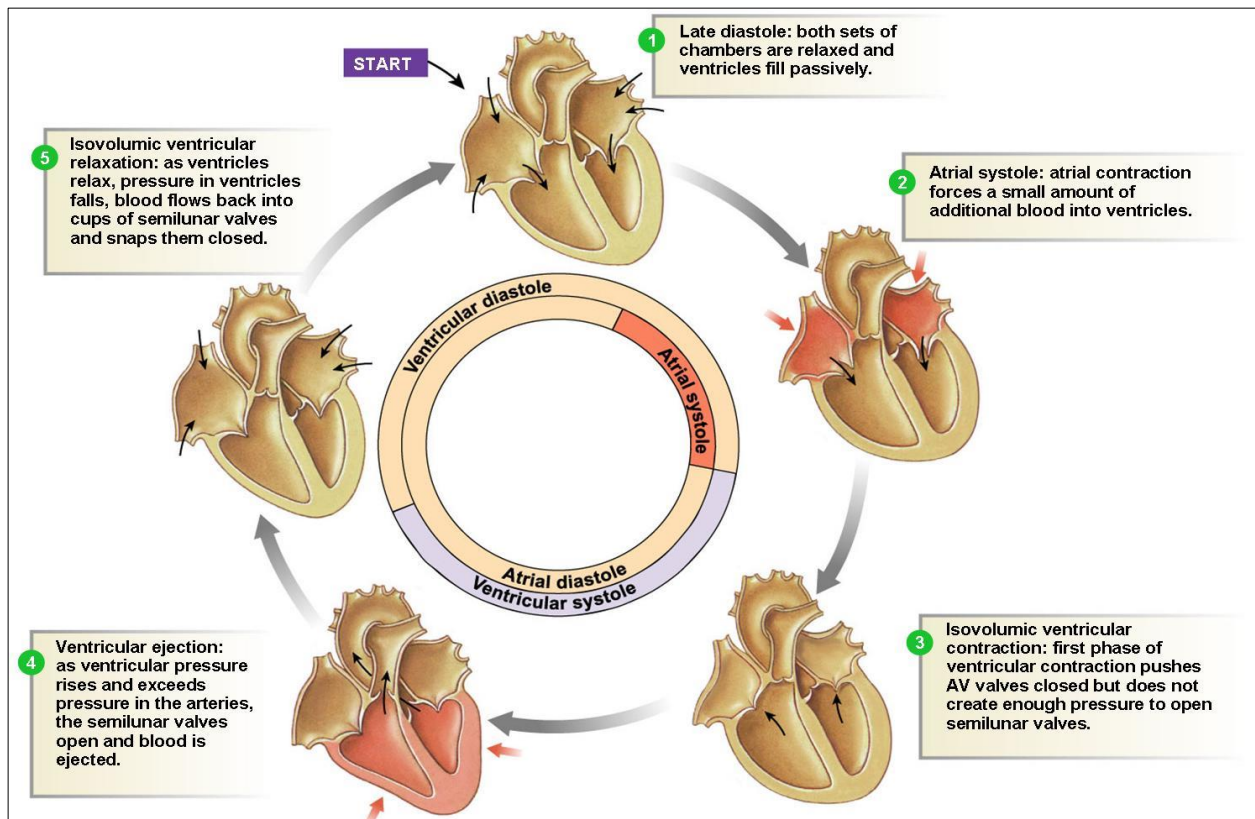


Abb. 4: Herzzyklus. 5=frühe Entspannungsphase, 1=Füllungsphase, 2=Kontraktion des linken Atriums [48]

Die diastolische Dysfunktion ergibt sich aus der Störung einer oder mehrerer Komponenten der Füllungsphase. Der Füllungsprozess des Herzens hängt im Wesentlichen von 3 Faktoren ab: Erstens von der frühdiastolischen Relaxation, die in vivo als Zeitkonstante des LVEDP-Abfalls während der isovolumetrischen Relaxation gemessen werden kann [29]. Während dieses Prozesses dissoziiert Ca^{2+} vom Troponin C und stoppt damit den Querbrückenzyklus, wodurch die erneute Elongation des Sarkomers und der Zelle ermöglicht wird [29]. Zweitens von der passiven Steifheit der Zelle und der Zelle im Verbund: Darunter fallen Veränderungen der Proteinstrukturen auf Sarkomerebene, sowie Interaktionen des Sarkomers mit der EZM [49, 50]. Ferner sind hier auch die Zusammensetzung der EZM, des Perikards und die Ventrikelkonfiguration relevant [1, 23, 24] (siehe 6.3.2). Und drittens von der synchronen Vorhofkontraktion nach der isotonen Füllungsphase, für dessen Beschreibung im Rahmen dieses Versuches ich auf Bode et al. [51] verweise. Störungen in diesen Bereichen führen dazu, dass höhere Füllungsdrücke (LVEDP, LAP) notwendig sind, um das EDV aufrecht zu erhalten [1]. Als Anpassung an die erhöhten Füllungsdrücke und die chronische Volumenbelastung kommt es unter anderem zu einer Vergrößerung des linken Atriums. Dieses Remodeling (siehe 6.3.2) führt später zum vermehrten Auftreten von Vorhofflimmern und pulmonaler

Hypertonie [1, 18, 52]. Die gestörte Diastole führt im Besonderen auch zu einer verminderten Steigerung des HZV bei hohen Frequenzen und einem verminderten Ansprechen auf beta-adrenerge Stimulation bei Belastung [7, 52].

6.3.1 Neurohumorale Dysregulation

Die Organsysteme Herz, Blutgefäße und Nieren sind eng miteinander verbunden. Die Niereninsuffizienz und endotheliale Dysfunktion, beispielsweise durch einen begleitenden Diabetes mellitus, stellen bedeutsame Risikofaktoren für das Auftreten von HFpEF dar [1, 53]. Die o.g. Organsysteme sind über drei neurohumorale Achsen miteinander verbunden, die bei HFpEF pathologisch aktiviert sind [3].

Durch den langfristig erhöhten Sympathikotonus (1) bei Herzinsuffizienz nimmt die β_1 -Rezeptordichte am Herzen ab (Downregulation) [13], sodass die extrakardialen Effekte der Katecholamine überwiegen und es zu einer Verschlechterung der Hämodynamik kommt [2, 18]. Die periphere Vasokonstriktion führt zum einen zu einer gesteigerten Nachlast und zum anderen zu einer verminderten Durchblutung der Nieren [18]. Daraus folgt die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und die Freisetzung von Vasopressin (2) [3], was zu einer Volumenüberladung führt und die Hämodynamik zusätzlich verschlechtert [2, 18]. Außerdem führt die neurohumorale Dysregulation zu molekularen und makroskopischen Umbauprozessen an Herz und Gefäßsystem, die unter dem Begriff Remodeling zusammengefasst werden [18, 23]. Ob bei HFpEF der Dysregulation von SNS und RAAS ein ähnlich großer Stellenwert in der Pathophysiologie wie bei HFrEF zukommt, steht noch zur Diskussion.

Die dritte Achse bilden die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP (3). Sie wirken allesamt vasodilatatorisch, natriuretisch-diuretisch und hemmen das SNS (1) und RAAS (2) [3]. Zusätzlich hemmen sie die Zellproliferation und die Gerinnung [3]. Vermittelt werden diese Effekte über PKG-abhängige Signalwege, dessen Aktivierung man sich auch therapeutisch zunutze machen kann [3, 12, 22]. Der Schweregrad der Herzinsuffizienz korreliert mit dem BNP-Spiegel, sodass dieser diagnostisch genutzt wird (siehe Diagnosekriterien, 6.1.1) [11]. Bei Herzinsuffizienz nimmt die Wirksamkeit der natriuretischen Peptide ab, da teilweise nur inaktive Fragmente sezerniert werden [2, 3].

Letztlich kommt es durch die Herzinsuffizienz an sich, als auch durch die Begleiterkrankungen, zu einem Anstieg verschiedener Entzündungsfaktoren wie z.B. IL-6 und TNF- α [1, 3, 47]. Infolge dessen kommt es vor allem im Gefäßsystem zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen und zur verminderten Sekretion von NO im Endothel [4, 24, 47]. Dadurch kommt es zu einer verminderten Aktivierung der PKG im Myokard [1, 4, 22], welche eine Reihe protektiver Effekte für das kardiale Remodeling hat [3, 4]. Die Proinflammation scheint für die Genese von HFpEF von besonderer Bedeutung zu sein [1, 47].

6.3.2 Myokardiales Remodeling und Hypertrophie

Durch die chronische Druckbelastung des linken Ventrikels und die neurohumorale Dysregulation kommt es zum myokardialen Remodeling [2, 3, 23]. Dieses beschreibt bei HFpEF in erster Linie die konzentrische Hypertrophie mit Veränderung der Geometrie des linken Ventrikels [23]. Dem liegt eine Hypertrophie der einzelnen Kardiomyozyten und eine vermehrte interstitielle Fibrose zugrunde [1, 23]. Es kommt sowohl zu einer Zunahme des Kollagengehalts, als auch zu einem relativen Kollagen-I-Überschuss und stärkerer Quervernetzung [1, 23]. Der Kollagen-Turnover ist verlängert, da es zu einer Erhöhung von Inhibitoren der Matrix-Metalloprotease-1 kommt [52]. Bei HFpEF sind erhöhte Gewebespiegel von TGF- β und anderen Entzündungsmediatoren wie IL-6 und TNF- α nachweisbar. Sie werden aus Monozyten freigesetzt und führen zur Fibroblasten- und Makrophagenaktivierung [1, 3, 4]. Die konsekutive Fibrose, Veränderung der Ventrikelgeometrie und relative Abnahme des kontraktiven Gewebes führen zur diastolischen Funktionsstörung [4, 23]. Das Ausmaß der Hypertrophie ist mit einem schlechteren Outcome der Patienten assoziiert und stellt einen eigenen Risikofaktor dar [23]. Eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie ist ein starker Prädiktor für eine diastolische Funktionsstörung und ist gleichzeitig die häufigste strukturelle Veränderung des Herzens bei HFpEF [13, 23].

Auf Sarkomerebene kann eine veränderte Titin-Isoform-Expression oder die posttranslationale Phosphorylierung von Titin zu einer gestörten Relaxation führen [49]. Auf zellulärer Ebene bestimmt das Protein Titin im Wesentlichen die passive Steifigkeit [1, 17]. Es hat eine elastische Region, die als molekulare Springfeder agiert [54]. Dadurch generiert es einerseits die passive Kraft bei Dehnung der Kardiomyozyten und

andererseits erzeugt es die elastischen Rückstellkräfte auf Sarkomerebene, wenn die Kardiomyozyten während der Kontraktion gestaucht werden [24, 54]. Gerade letztere Funktion ist für die frühe Phase der Diastole von Bedeutung. In Patienten mit HFrEF und HFpEF wurde eine erhöhte Expression der weniger steifen N2BA-Isoform gefunden, welches wahrscheinlich ein Kompensationsmechanismus gegen die erhöhte Steifigkeit der EZM ist [17, 54]. In Tiermodellen von HFpEF wurden teilweise kleine N2BA/N2B-Ratios gefunden, sodass der Isoform-Shift wohl auch von der Ätiologie abhängt [49, 54]. Zusätzlich kommt es bei HFpEF durch eine erhöhte PKC α - und verminderte PKA- und PKG-Aktivität zu einer Änderung des Phosphorylierungsmusters, was zu einer verminderten Compliance des Springfederelements führt [1, 4, 49, 50, 54].

Durch die Änderung der kardialen Genexpression kommt es zum elektrischen Remodeling, bei dem sich die Anzahl und das Muster der Ionenkanäle im Reizleitungssystem ändert [18]. Ein großer Teil der Patienten mit HFpEF entwickelt im Verlauf ein Vorhofflimmern, welches die diastolische Füllung der Ventrikel zusätzlich verschlechtert [1, 11, 18].

6.3.3 Störung der elektromechanischen Kopplung und Myofilament- Ca²⁺-Sensitivität

Die Diastole ist auf zellulärer Ebene hauptsächlich durch den Abfall der [Ca²⁺]_i bestimmt [26, 29]. Da die Entfernung des Ca²⁺ aus dem Zytosol durch energieabhängige Transporter (v.a. SERCA2a und NCX) bewerkstelligt wird, ist die Diastole anfällig für Veränderungen im kardialen Metabolismus [4, 42]. Die Diastole hängt ebenfalls von der K_d der Myofilamente für Ca²⁺ ab, welche durch die Bindungsaffinität vom TnC zum Ca²⁺ bestimmt wird [49, 55]. Störungen dieser Mechanismen und Strukturen könnten die diastolische Dysfunktion bei HFpEF erklären. Jedoch sind sie im Kontext von HFpEF bislang kaum untersucht.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen der Ca²⁺-Homöostase von Kardiomyozyten bei HFpEF lieferten teilweise widersprüchliche Ergebnisse, sodass dessen Bedeutung für die Pathogenese noch nicht klar ist. Es zeichnet sich ab, dass die Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung stark vom untersuchten Krankheitsmodell abhängt. Es konnten Veränderungen der [Ca²⁺]_i als auch der Ca²⁺-Transientenkinetik

nachgewiesen werden, die auf Änderungen der Expressions- und Phosphorylierungsmuster der Schlüsselproteine des Ca^{2+} -Handlings zurückzuführen sind [45, 53]. Die gestörte Ca^{2+} -Homöostase führte in den bisherigen Versuchen ebenfalls zu einer veränderten kontraktilen Funktion der Kardiomyozyten [45, 53]. Zusätzlich zeigte sich eine erhöhte Proarrhythmogenität, die durch spontane und dyssynchrone Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR gekennzeichnet zu sein scheint [45, 53].

Obwohl der direkte Nachweis einer erhöhten $[\text{Na}^+]_i$ bei HFpEF bisher nicht gelang, ist eine Störung der Na^+ -Homöostase als Mitursache eines gestörten ECC wahrscheinlich. Dies geht vor allem aus den Beobachtungen der Behandlung von HFpEF mit SGLT-Inhibitoren hervor (siehe 6.5.1). SGLT-Inhibitoren greifen in den kardiomyozytären Metabolismus und in die Na^+ -Homöostase durch NHE-Inhibition ein [56]. Der kardiomyozytäre Metabolismus und die $[\text{Na}^+]_i$ beeinflussen sich gegenseitig und haben einen synergistisch nachteiligen Effekt auf die Kontraktions-Relaxationskopplung. Es könnte durch einen gestörten Zellstoffwechsel zu einem reduzierten Pool an Reduktionsäquivalenten (v.a. NADH und FADH_2) und zu einer verminderten Elimination von ROS kommen [35, 41]. ROS haben wiederum weitreichende Effekte auf das ECC, da die meisten Ionenkanäle und -transporter redox-sensibel sind [35]. Letztlich begünstigen ROS auch das kardiale Remodeling, da sie eine Reihe von Signalwegen aktivieren, die Hypertrophie, Fibrose und Apoptose induzieren [35, 42, 47]. Eine Zusammenschau der vermuteten Störungen im ECC bei HFpEF zeigt Abbildung 5:

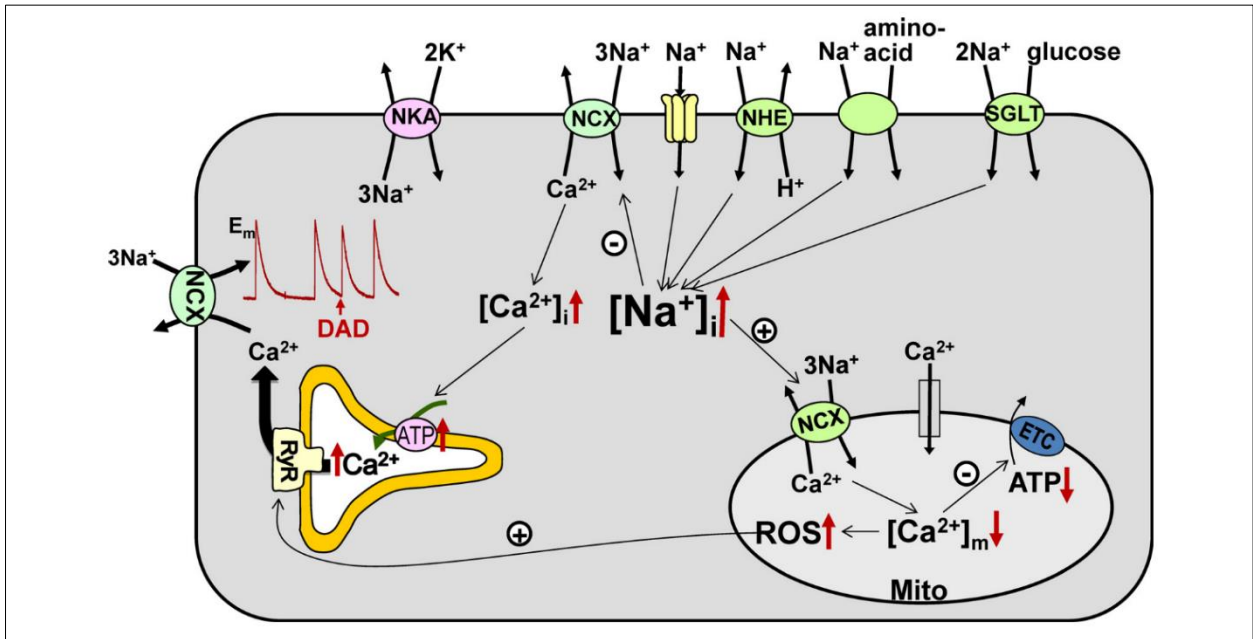


Abb. 5: Hypothetische Störungen des ECC bei HFpEF [37]

Die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung des Kontraktionszyklus wird durch den kardialen Troponin-Komplex vermittelt. Der Troponin-Komplex besteht aus 3 Untereinheiten, die jeweils ihre eigene Funktion haben, sich aber auch gegenseitig in ihrer Aktivität modulieren [55]. Troponin C (TnC) bindet das Ca^{2+} , Troponin T (TnT) ist fest an Tropomyosin gebunden und Troponin I (TnI) stellt die inhibitorische Einheit dar, die den Querbrückenzyklus bei niedriger $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unterdrückt (siehe Abb. 6) [55, 57, 58]. Wenn Ca^{2+} in der Systole ansteigt, bindet es in der regulatorischen Bindungstasche des TnC. Dies löst eine Konformationsänderung des TnC an seinem N-Terminus aus, der mit dem regulatorischem C-Terminus des TnI interagiert [55, 58]. Dadurch bewegt sich der inhibitorische Teil des TnI und löst Tropomyosin aus der Myosin-Tasche des Aktinfilaments [29, 55, 58, 59]. Die Bindungsstelle für das Myosinköpfchen wird freigelegt und der Querbrückenzyklus kann beginnen (siehe Abb. 6). In der Diastole sinkt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ab und Ca^{2+} löst sich vom TnC [55]. Die folgende Konformationsänderung im TnI und TnT positioniert Tropomyosin wieder in seiner inhibitorischen Position auf dem Aktin-Filament und initiiert die Relaxation [29, 55]. TnT organisiert den Troponin-Komplex und fixiert ihn auf dem dünnen Filament [58]. Teilweise trägt auch TnI durch die Bindung an Tropomyosin zu dieser Fixierung bei [58].

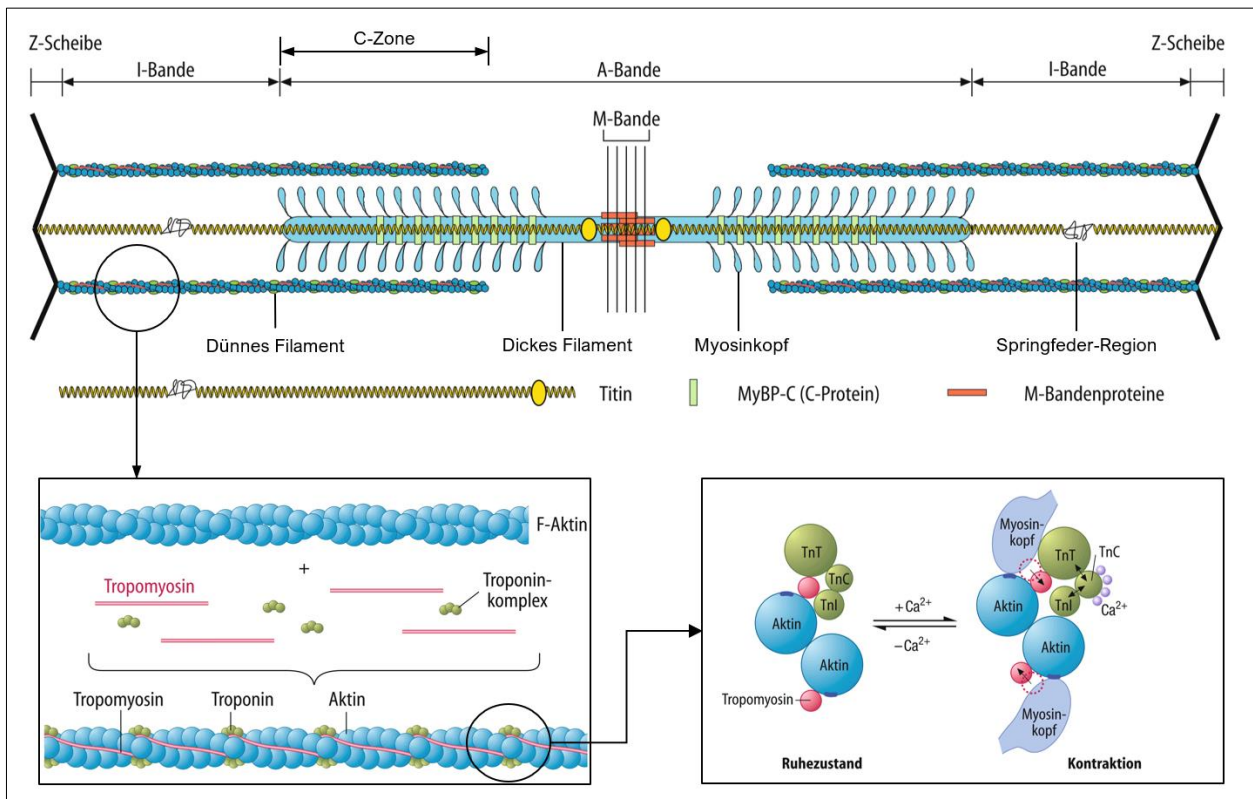


Abb. 6: Struktureller Aufbau des Sarkomers; Abbildung modifiziert nach [60]

Die Stärke der Kontraktion und Geschwindigkeit der Relaxation wird neben der Morphologie des Ca^{2+} -Transients auch durch die „Gate-keeper“-Funktion des Troponin-Komplex bestimmt [26]. Das hierfür entscheidende Maß ist die Affinität vom TnC zum Ca^{2+} [29, 57]. Die K_d des TnC ist ein Teilaspekt der Myofilamentsensitivität, die die Stärke der Kontraktion pro Ca^{2+} -Einheit darstellt. Die Myofilamentsensitivität des Troponin-Komplex wird dynamisch von Schlag zu Schlag moduliert, wie es das Frank-Starling-Gesetz beschreibt [26, 57, 61]. Eine erhöhte Vorlast führt zu einer Streckung der Sarkomere, was die Interaktion von Aktin und Myosin verbessert und die Kontraktionskraft pro Ca^{2+} -Einheit erhöht [30, 57, 58]. Die Myofilamentsensitivität kann auch langfristig reguliert werden und Ursache von pathologischer Kontraktion und Relaxation sein. Genetische Mutationen [57, 62], ein Isoform-Switch, posttranskriptionale Modifikation durch alternatives Splicing oder posttranslationale Modifikation im Troponin-Komplex können die kontraktile Funktion weitreichend beeinflussen [29, 55, 58]. Die posttranslationale Phosphorylierung ist funktionell am bedeutendsten [58].

Die Ca^{2+} -Affinität vom TnC wird hauptsächlich durch die Interaktion mit TnI und TnT moduliert [29]. Es sind bis heute keine posttranslationalen Modifikationen am TnC

bekannt [29]. Die Phosphorylierung von TnI hat unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen eine hohe Bedeutung für die Myofilamentsensitivität [63]. TnI wird durch die Proteinkinasen PKA, PKC und PKG in spezifischen Mustern phosphoryliert, wodurch die Myofilamentsensitivität verändert werden kann [49, 58, 59]. TnT wird nur von der PKC phosphoryliert [58]. Der Effekt auf die Myofilamentsensitivität ist jedoch stark von der PKC-Isoform abhängig, aber verringert tendenziell die Myofilamentsensitivität [58].

Weiterführend wird die PKA-Aktivität in der Mikrodomäne der Myofibrille durch den cAMP-Abbau der PDE3 moduliert, die dadurch auch Einfluss auf die Myofilamentsensitivität hat [64].

Troponine reagieren hoch sensibel auf pH-Wert-Veränderungen [58]. Bei hoher $[H^+]$, Phosphat-, sowie Mg^{2+} -Konzentration ist die Myofilamentsensitivität reduziert, da die Ionen um die Bindungsstelle am TnC konkurrieren [26]. Das trägt zum Beispiel bei einer kardialen Ischämie zu einer massiv reduzierten Myofilamentsensitivität bei [65], aber auch bei HFpEF ist die intrazelluläre Azidose von Bedeutung [26].

Ein weiteres Schlüsselprotein in der Regulation der Myofilamentsensitivität ist das Myosin-binding-Protein-C (MyBP-C). Es ist an das dicke Filament in der C-Zone des Sarkomers angelagert, also dort, wo der Querbrückenzyklus (C=crossbridge) stattfindet [66]. Es interagiert mit Myosin und Titin und sichert als Strukturprotein die korrekte Positionierung des dicken Filaments zwischen den dünnen Filamenten (siehe Abb. 6) [66]. Es beeinflusst aber auch durch die Bindung an das leichte Meromyosin, welches das Rückgrat des dicken Filaments darstellt, die Kontraktion [66]. MyBP-C ist eine „Bremse“ für den Querbrückenzyklus, da es die Aktivität der Actomyosin-ATPase reduziert [67]. Eine Phosphorylierung hingegen führt zu einer doppelten Inhibition, sodass die Actomyosin-ATPase desinhibiert wird und die Geschwindigkeit des Querbrückenzyklus zunimmt [63, 66, 67]. MyBP-C löst sich durch Phosphorylierung vom Myosin und gibt dem Myosinköpfchen mehr Flexibilität und Bewegungsfreiheit [67]. Das ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Myofilamentsensitivität, wodurch die Inotropie auf Kosten der Lusitropie zunimmt. MyBP-C wird typischerweise von der PKA phosphoryliert, kann aber unter pathologischen Bedingungen auch durch die PKC

phosphoryliert werden [63, 66]. Genetische Mutationen im MyBP-C sind bei der HCM häufig [66, 67].

Es ist möglich, dass Änderungen der Myofilamentsensitivität eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung einnehmen, da selbst im gesunden Herzen das Relaxationsverhalten erheblich durch die aktive Steifigkeit beeinflusst wird. Die Untersuchung der Myofilamentsensitivität trägt daher zum pathophysiologischen Verständnis der gestörten Relaxation bei HFpEF bei.

6.4 Bedeutung von Diabetes für die Pathogenese von Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion

Ein Diabetes mellitus Typ 2 erhöht das Risiko für HFpEF um das 2,5-fache [43, 68] und stellt im Hinblick auf die weltweite Adipositas-Epidemie einen bedeutenden Risikofaktor dar [19, 20]. Heute haben ca. 20% der Menschen mit Herzinsuffizienz einen T2DM [43]. In der Kohorte der wegen Herzinsuffizienz Hospitalisierten steigt diese Rate auf bis zu 40% an [43]. Darüber hinaus hat T2DM enorme Folgen für die Prognose dieser Patienten [21]. Herzinsuffizienzpatienten mit einem begleitenden T2DM haben, im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes, ein um 75% erhöhtes Risiko durch ein kardiovaskuläres Ereignis zu versterben [43].

Diabetes kann auch ohne zusätzliche Risikofaktoren Ursache einer Kardiomyopathie sein [43, 69]. Diese wird als diabetische Kardiomyopathie bezeichnet und hat einen restriktiven, HFpEF-ähnlichen Phänotyp [43, 70]. Die diabetische Mikroangiopathie des Herzens, welche durch endotheliale Dysfunktion und Inflammation gekennzeichnet ist [15, 43], und die Hyperinsulinämie führen zu einem umfassenden Remodeling mit Hypertrophie [15, 70]. Herzen mit diabetischer Kardiomyopathie zeigen typischerweise eine erhöhte Steifigkeit des LV und eine diastolische Funktionsstörung, wie man sie auch bei HFpEF findet [43]. Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Lipotoxizität führen zu einer vermehrten Fibrose und Bildung von advanced glycation end products (AGE), die das Kollagen-Crosslinking verstärken [17, 43, 71]. Das Ausmaß der diastolischen Dysfunktion korreliert mit der Höhe des HbA1C, dem Nüchternblutzucker, BMI und weiteren Markern

der Insulinresistenz [43]. Die Ejektionsfraktion ist bei diesen Patienten meist nicht beeinträchtigt [43, 69].

Diese Überschneidungen im Phänotyp und in der Pathogenese, lassen eine hohe Bedeutung von Diabetes bei HFpEF vermuten [68]. Daher könnte die pathologische Stoffwechsellage ein effektiver Ansatz zur Therapie von HFpEF sein [68, 71].

6.4.1 Störung des kardialen Metabolismus und der elektromechanischen Kopplung

Zur Deckung des Energiebedarfs werden im gesunden Herzen ca. 70% freie Fettsäuren und 30% Glukose verstoffwechselt [41, 43]. Diese Verteilung ist hoch variabel. Sie wird durch den Randle Zyklus reguliert, in dem FFAs und Glukose miteinander konkurrieren [41]. Bei erhöhtem Energiebedarf kann der Stoffwechsel in Richtung Glukose-Metabolismus verlagert und dadurch die O₂-Effizienz gesteigert werden. Die Aufnahme von Glukose in die Zelle kann über den GLUT1, GLUT4 (zu geringen Anteilen auch über andere Transporter der GLUT-Familie) und SGLT-1 erfolgen [71, 72], wobei im gesunden Herzen der GLUT4 für 70% der Glukoseaufnahme verantwortlich ist [72]. GLUT4 wird in intrazellulären Membranvesikeln gespeichert und kann je nach Energiebedarf (durch die Kontraktion via AMPK) oder durch Insulinfreisetzung an die Membran befördert werden [61, 72, 73]. GLUT1 befindet sich hingegen fast dauerhaft an der Membran und wird nur durch langfristige Hungerzustände oder Ischämie reguliert [72]. GLUT1 sorgt für die basale Glukoseaufnahme [61, 72].

Sowohl GLUT1 als auch GLUT4 sind bei Herzinsuffizienz und Diabetes vermindert exprimiert [71, 72, 74]. Hingegen ist die Expression von SGLT-1 um fast das Zweifache kompensatorisch gesteigert [71, 75]. Das weist darauf hin, dass die Bedeutung des SGLT-1 für den kardialen Metabolismus in pathologischen Konstellationen zunimmt [74]. Einhergehend führt die Erhöhung der SGLT-1-Expression zu einer gesteigerten Na⁺-Aufnahme in die Zelle [37, 75].

Bei Diabetes wird durch die Insulinresistenz die Aufnahme von Glukose in die Zelle vermindert [1, 41]. Kompensatorisch werden vermehrt FFAs aufgenommen (thrifty substrate hypothesis) [1, 41, 70]. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des

Transkriptionsfaktors (PPAR)- α und zu einer Steigerung der Expression der Proteine der FFA-Oxidation [41–43, 71]. Die metabolische Flexibilität wird stark eingeschränkt, da vorrangig nur noch FFAs metabolisiert werden können (siehe Abb. 7) [71, 72]. Das verstärkt den Energiemangel im geschädigten Herzen zusätzlich, da die FFA-Oxidation 11% mehr O_2 benötigt als die Glukose-Oxidation [43, 72]. FFAs induzieren das mitochondriale uncoupling Protein 3 (UCP3) durch (PPAR)- α , wodurch die mitochondriale Energiegewinnung noch ineffizienter wird [43]. Parallel führt die systemische Substatüberladung durch die Insulinresistenz (mehr Lipolyse, sowie hepatische Lipo- und Gluconeogenese) zu Schäden am Herzen durch Lipo- und Glukotoxizität [15, 41, 43]. Es ergibt sich ein direkter Zusammenhang von hohen FFA Plasmaspiegeln und diastolischer Dysfunktion [43].

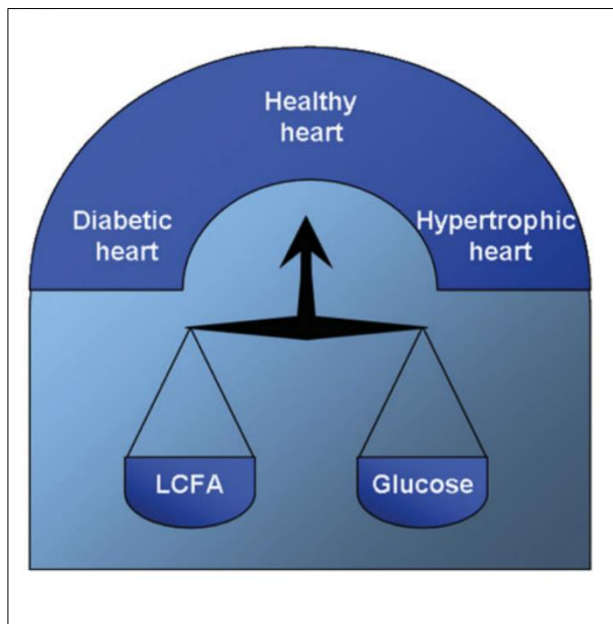


Abb. 7: Substratbalance des kardialen Metabolismus [73]

Die Entgleisung des kardiomyozytären Metabolismus beeinträchtigt die Ionenhomöostase der Zelle (siehe 6.2.2 und 6.3.3). Man findet bei der diabetischen Kardiomyopathie einen verminderten Ca^{2+} -Gehalt des SR, eine verminderte Amplitude der Ca^{2+} -Transienten und eine erhöhte $[Na^+]_i$ [37, 43, 75]. Ob es bei durch das metabolische Syndrom induzierter HFpEF ähnliche pathologische Veränderungen des myokardialen Stoffwechsels gibt, ist bislang nicht bekannt.

Durch die endotheliale Dysfunktion kommt es zu einer Störung des NO-GC-cGMP-PKG-Wegs [1, 4]. Die bereits beschriebene Hypophosphorylierung der Myofilamente könnte zur Erhöhung der aktiven (Tn-Komplex) und passiven Steifigkeit (Titin) führen. Die begleitende Hyperinsulinämie hemmt die PKA-Aktivität, sodass dieser Effekt verstärkt wird [76]. Gleichzeitig ist bei T2DM durch die Hyperglykämie-induzierte Mehrsynthese von Diacylglycerol die PKC hochreguliert, sodass es durch Phosphorylierung von TnI und TnT an den PKC-Phosphorylierungsstellen zu einer Reduktion der Myofilamentsensitivität kommt [69, 77].

Bei Diabetes kommt es zur Akkumulation von advanced glycation end products (AGE). Eines davon ist Methylglyoxal, das als Nebenprodukt der Glycolyse anfällt [78]. Methylglyoxal ist in der Lage, Proteine an Argininen und Lysinen zu modifizieren [78]. Unter anderem betrifft das auch die Myofilamente bei Patienten mit T2DM und Herzinsuffizienz [29]. Methylglyoxal bindet vor allem an Aktin und die schwere Kette des Myosins. Es kommt zu einer Fehlausrichtung der Myosinköpfchen, wodurch die Myofilamentsensitivität abnimmt [78]. Eine O-Glykosylierung am TnI führt ebenfalls zur Abnahme der Myofilamentsensitivität [29].

6.5 Therapie von Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion

Die klassische Herzinsuffizienztherapie für HFrEF hat sich in Bezug auf Mortalität, Morbidität und Hospitalisierungsrate bei HFpEF als wenig effektiv erwiesen [11, 24, 46]. Es gibt bis heute keine etablierte Therapie, die das Überleben der Patienten mit HFpEF verbessern konnte [11, 46]. Deshalb wird bisher nur symptomatisch behandelt, um die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern. Hierbei gilt es die Flüssigkeitsretention zu vermindern und das Herz durch Frequenzkontrolle und Einstellung einer optimalen Vorhofkontraktion zu entlasten, um akuten Dekompensationen vorzubeugen [7, 12, 16]. Des Weiteren sollten vorhandene Komorbiditäten behandelt werden, um die Komplikations- und Hospitalisierungsrate zu senken [12, 24]. Die Behandlung der Begleiterkrankungen, die einen Risikofaktor für HFpEF darstellen, könnte das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen.

Nach den aktuellen europäischen Leitlinien (ESC, 2016 [11]) ist der Einsatz von typischer Herzmedikation wie β -Blocker, Nitrate, Herzglykoside, PDE-5-Hemmer und Kalziumantagonisten bei HFpEF nicht vorteilhaft [7, 16]. Es wird lediglich die Therapie der Flüssigkeitsretention mit Diuretika (Empfehlungsgrad IB) und die Abklärung und Behandlung von Komorbiditäten (Empfehlungsgrad IC) empfohlen [11, 12]. In ersten Studien konnten deutliche Unterschiede zwischen Präparaten einer Substanzklasse gezeigt werden, sodass die Auswahl des jeweiligen Wirkstoffs möglicherweise bedeutsam ist. Beispielsweise konnte ein Vorteil von Torasemid im Vergleich zu Furosemid validiert werden [7]. Torasemid greift in den Kollagenstoffwechsel ein und hat Einfluss auf die kardiale Fibrose und diastolische Funktion [7]. Ein weiteres Beispiel ist der Aldosteronantagonist Spironolacton. Dieser wirkt sich positiv auf eine Fibrose und Hypertrophie aus und verbessert ebenfalls die Diastole [79]. In Studien (ALDO-DHF-Studie [80], TOPCAT-Studie [81]) konnte eine Reduktion der Hospitalisierungsrate mit Spironolacton gezeigt werden. Da diese Studien ihre Endpunkte teilweise nicht erreicht haben und die Fallzahlen mitunter gering sind, kann hier noch keine generelle Empfehlung ausgesprochen werden. Die sich zurzeit in der Rekrutierungsphase befindende SPIRIT-HF-Studie könnte hier Klarheit schaffen.

In Phase-II-Studien (proof-of-concept) konnten positive Effekte von Ivabradin (I_f -Kanal-Blocker) [82], Ranolazin (Hemmer des späten Na^+ -Einstroms, RA-LI-DHF-Studie [83]) und LCZ 696 (kombinierter AT1-Rezeptorantagonist und Nephrylsin-Inhibitor; ARNI, PARAMOUNT-Studie [84]) bestätigt werden. In der folgenden Phase-III-Studie mit LCZ 696 (PARAGON-HF-Studie [85]), dessen Ergebnisse auf dem Kongress der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) 2019 vorgestellt wurden, konnte keine Wirksamkeit in Patienten mit erhaltener Ejektionsfraktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Phase-III-Studie für Ivabradin (EDIFY-Studie) im großen Patientenkollektiv stehen noch aus.

Körperliche Aktivität schützt vor dem Auftreten von HFpEF und verbessert die Leistungsfähigkeit der Betroffenen, jedoch steht das Ausmaß der idealen Belastung noch zur Diskussion [12, 16]. Weiterführend gibt es experimentelle Ansätze zur Device-Therapie (linksatrialen Dekompression mittels interatrialer Shuntanlage).

6.5.1 Inhibitoren des Natrium-Glukose-Cotransporters

Natrium-Glukose-Cotransporter (SGLT) sind eine Carrier-Proteinfamilie, die Na⁺-Ionen zusammen mit Glukose über Membranen transportieren. Sie sind ubiquitär im Körper vorhanden und haben mindestens 6 Isoformen [74]. Ihre Aktivität ist durch den elektrochemischen Gradienten von Na⁺ bestimmt und daher an die NKA-Aktivität auf der basolateralen Seite gekoppelt [41, 74]. Die metabolisch relevantesten SGLTs sind SGLT-1 und SGLT-2. SGLT-1 wird vor allem in distalem Dünndarm, Niere, Leber, Lunge, und in den Koronarkapillaren ausgebildet [41]. Außerdem wird SGLT-1 in erheblichem Maße auf dem Sarkolemm von Kardiomyozyten exprimiert [74, 86]. SGLT-2 befindet sich hauptsächlich im ersten und zweiten Abschnitt des proximalen Tubulus der Niere und in den α -Zellen des Pankreas [41]. Es gibt keinen SGLT-2 in Kardiomyozyten [86].

In der Niere resorbiert SGLT-2 ca. 80-90% der filtrierten Glukose des Primärharns [41]. SGLT-1 resorbiert im dritten Abschnitt des proximalen Tubulus beinahe den gesamten Rest [70, 74]. Die Abwesenheit von SGLT-2 (Gen-Knockout) sorgt für die Exkretion von ca. 30% der filtrierten Glukose [74]. Das bedeutet, dass die SGLT-1-Aktivität kompensatorisch steigt, wenn die Glukose-Konzentration im dritten Segment des proximalen Tubulus erhöht ist. Der SGLT-1 hat eine hohe Affinität zu Glukose und eine kleine Transportkapazität, während der SGLT-2 wenig affin ist, aber mit einer hohen Kapazität Glukose transportieren kann [70]. Eine kombinierte Abwesenheit von SGLT-2 und SGLT-1 sorgt für eine Urin-Glukose-Extraktion von ca. 90% [74].

Die bislang pharmakologisch entwickelten und z.T. klinisch getesteten SGLT-Inhibitoren sind größtenteils Inhibitoren mit verschieden hoher Affinität zum SGLT-2 und geringer bis nicht relevanter Affinität zum SGLT-1 [87]. Der bekannteste Vertreter dieser Substanzgruppe ist Empagliflozin, der große Erfolge in klinischen Studien erzielen konnte und bereits mit einer IIa/B-Empfehlung für die Prävention von symptomatischer Herzinsuffizienz bei Risikopatienten mit Diabetes in die ESC-Leitlinien eingegangen ist [11]. In der EMPA-REG-OUTCOME-Studie [88] konnte der SGLT-Inhibitor mit hoher Affinität zum SGLT-2 das relative Risiko für Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse und die Hospitalisierungsrate auf Grund von Herzinsuffizienz um 38% bzw. 35% senken [88]. Empagliflozin wird bislang als Add-on-Therapie zu Metformin bei Diabetes eingesetzt [12].

Es gibt mehrere Hypothesen, die den positiven Effekt auf das kardiovaskuläre Outcome erklären sollen. Die SGLT-2-Inhibition in der Niere führt zu einer verstärkten Glukosurie, Natriurese und Diurese [41, 70]. Dies bewirkt einerseits seine verbesserte Blutglukose-Kontrolle bei fehlendem Hypoglykämierisiko [41, 70, 74] und andererseits eine Volumenkontraktion, welche das Herz entlastet und kardiale Ödeme mindert [41, 70]. Unter der Therapie mit Empagliflozin kann eine durchschnittliche Erhöhung des Hämatokrit um ca. 5% beobachtet werden [88]. Zusätzlich bewirkt die SGLT-2-Blockade eine Reduktion der viszeralen Adipositas, Hyperinsulinämie, Blutdruck, Albuminurie und arterieller Wandverhärtung [41, 70]. Eine Zusammenfassung des Wirkungsprofils von SGLT-2-Inhibitoren ist in Abbildung 8 zu sehen.

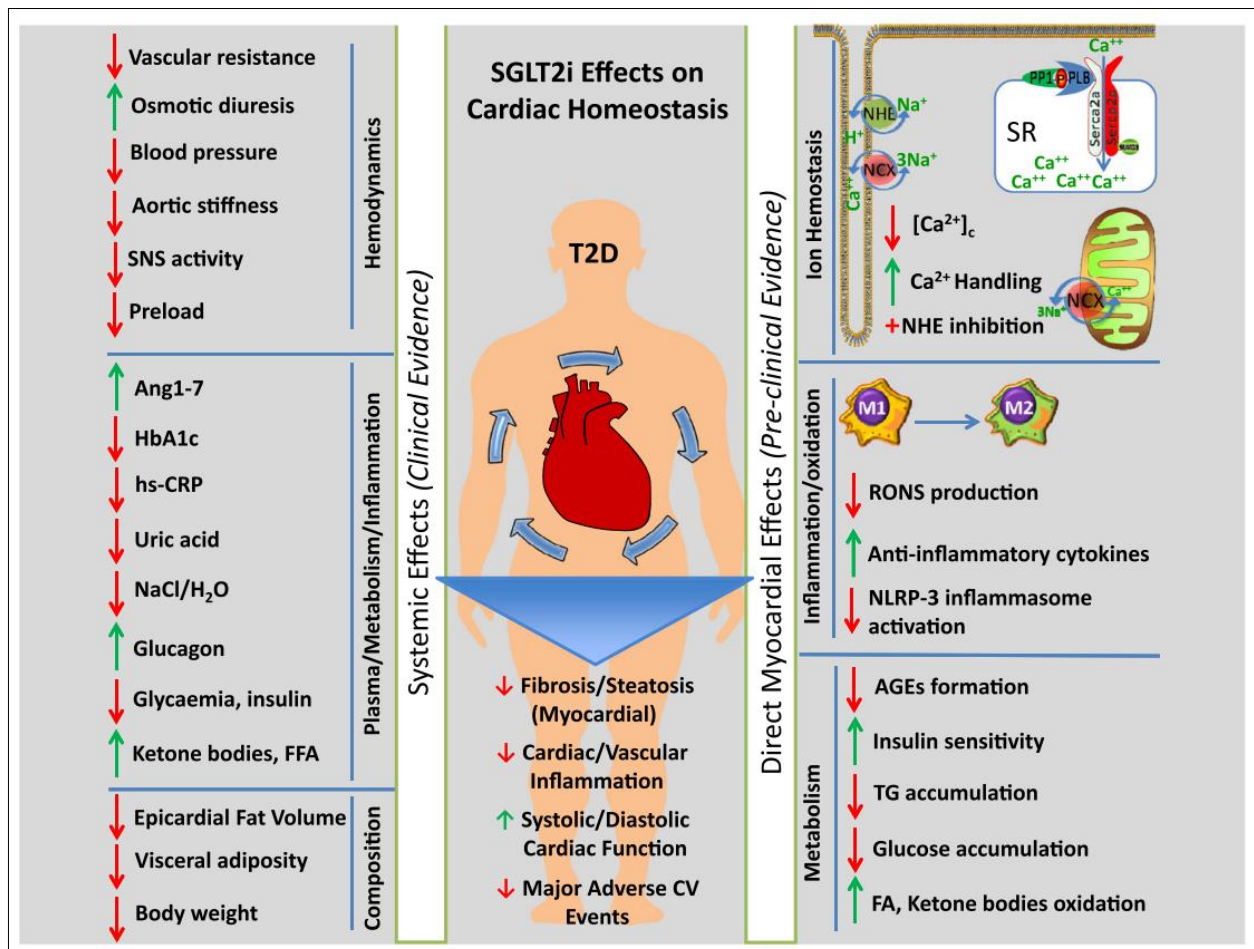


Abb. 8: Wirkungsprofil von SGLT-2-Inhibitoren [86]

SGLT-Inhibitoren sind bislang die einzigen Antidiabetika am Markt, die die kardiovaskuläre Mortalität und Hospitalisierungsrate in relevantem Maße senken können [15]. Es ist jedoch anzumerken, dass diese Reduktion bei anderen SGLT-Inhibitoren als Empagliflozin deutlich geringer ausfällt, obwohl die Effekte auf HbA1c, Körpergewicht und Blutdruck vergleichbar sind [41, 74]. Daher gibt es wohl keinen Substanzklasseneffekt bei SGLT-2-Inhibitoren [12]. Das macht es wahrscheinlich, dass der direkte Effekt von Empagliflozin auf das Herz – und eher weniger die Glukosekontrolle und Volumenkontraktion – für die Verbesserung des kardiovaskulären Outcomes ursächlich ist [41, 56, 89].

Bislang konnten die folgenden Effekte zum Großteil nur bei Behandlung mit Empagliflozin nachgewiesen werden. Daher bezieht sich der folgende Abschnitt exemplarisch auf Empagliflozin, als bedeutendsten Vertreter dieser Substanzklasse.

Durch die Reduktion der Blutglukose wird die Ketonkörper-Produktion (v.a. β -Hydroxybutyrat) in der Leber stimuliert. Dies führt zu einem leicht hyperketogenem Status des Körpers (siehe Abb. 8) [15, 41, 70]. Nach der Aufnahme in den Herzmuskel agieren die Ketonkörper kompetitiv mit der β -Oxidation der Fettsäuren, sowie der Glykolyse. Es werden vermehrt Ketonkörper oxidiert. Dies hat einen kardioprotektiven Effekt, da die Ketonkörperoxidation (gemessen an der ATP-Ausbeute pro O_2 -Molekül) deutlich effektiver als die Fettsäure- oder Glukoseoxidation ist [41, 70]. Deshalb werden Ketonkörper auch als „super fuel“ für das Herz bezeichnet [15, 41]. Die Erhöhung des Hämatokrit durch die Volumenkontraktion führt gleichzeitig zu einer Verbesserung des O_2 -Angebots, sodass das Herz metabolisch entlastet wird [41, 70]. Das führt auch zu einer geringeren ROS-Emission der Mitochondrien, weshalb Ketonkörper als antioxidativ und antiarrhythmogen gelten [41]. Durch die Unterdrückung der anaeroben Glykolyse wird weniger Laktat und Pyruvat produziert. Das wirkt einer intrazellulären Azidose und erhöhter NHE-Aktivität mit folgender Erhöhung der $[Na^+]_i$ entgegen.

Baartscheer et al. konnten eine direkte NHE-Inhibition durch Empagliflozin nachweisen (siehe Abb. 8) [56, 89]. Es ist wahrscheinlich, dass die weiteren Effekte auf die Ionenhomöostase sekundär und durch den sarkolemmalen und mitochondrialen NCX vermittelt sind [56, 89]. Zu diesen Effekten gehören eine gesunkene $[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$, sowie eine erhöhte $[Ca^{2+}]_m$, die einem metabolischen Mismatch entgegenwirkt [41, 56,

89]. Neben der direkten NHE-Hemmung reduziert Empagliflozin die NHE-Aktivität auch langfristig. Dies erfolgt vermutlich über die Aktivierung des Akt-SGK1-Signalwegs, welcher zu einer Phosphorylierung und Aktivitätsminderung des NHE führt [41].

6.5.2 Sotagliflozin

Sotagliflozin (syn.: LX4211, Zynquista) ist ein dualer SGLT-1- und SGLT-2-Inhibitor. Er weist eine 20-fach höhere Affinität zu SGLT-2 im Vergleich zu SGLT-1 auf, sodass die SGLT-1-Inhibition als mild zu bezeichnen ist [74]. Die IC₅₀ für SGLT-2 beträgt 0,0018 µM und für SGLT-1 0,036 µM [74].

Die kombinierte SGLT-1- und SGLT-2-Inhibition erscheint aus mehreren Gründen vorteilhaft: Einerseits verhindert man die Teilkompensation einer einfachen SGLT-2 Blockade durch den SGLT-1 und steigert dadurch den glukosuretischen, natriuretischen, und diuretischen Effekt [74]. Andererseits lässt sich durch die SGLT-1 Blockade die Glukoseaufnahme im Dünndarm reduzieren, was zu einer verbesserten Blutglukose-Kontrolle führt [74]. Während diese mit einem reduziertem HbA_{1c}, Nüchternblutzucker und PPG klinisch nachweisbar ist, konnte keine weitere Steigung der UGE durch SGLT-1-Inhibition im Menschen beobachtet werden [74]. Daher ist gesamtmetabolisch gesehen vor allem die intestinale SGLT-1-Blockade relevant. Es besteht die Hoffnung, den kardialen Metabolismus über den SGLT-2 am Koronarendothel und den SGLT-1 an den Kardiomyozyten zu beeinflussen. Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass SGLT-1 abhängig vom Glukosemetabolismus der Kardiomyozyte reguliert und bei hochgradiger Herzinsuffizienz sowie Diabetes mellitus Typ 2 vermehrt exprimiert wird [37, 41]. Vermutlich wird dies durch die FFA-induzierte Insulinresistenz verursacht und stellt eine kompensatorische Anpassung an die Hyperinsulinämie und Herunterregulierung von GLUT1 und GLUT4 dar. Durch die zusätzliche SGLT-1-Inhibition könnte der kardiomyozytäre Metabolismus in Richtung Ketonkörperoxidation verschoben werden. Gleichzeitig würde einer, durch die erhöhte SGLT-1-Aktivität, verstärkten Na⁺-Aufnahme in die Zelle entgegengewirkt werden [37]. Möglicherweise können dadurch die positiven Effekte der reinen SGLT-2-Inhibitoren (NHE-Hemmung) auf die Kardiomyozyten ausgebaut werden.

Die Testung von dualen SGLT-1- und SGLT-2-Inhibitoren könnte eine bedeutende Weiterentwicklung in der Therapie von HFpEF sein. Möglicherweise offenbart die Erforschung des molekularen Wirkmechanismus neue therapeutische Zielstrukturen. Das Aufdecken der zugrundeliegenden Wirkmechanismen könnte auch neue Indikationen für den Wirkstoff bei Patientengruppen mit Herzinsuffizienz ohne Diabetes schaffen.

6.6 Hypothesen

Aus der oben beschriebenen Thematik ergeben sich folgende Hypothesen:

1. Bei durch das metabolische Syndrom bedingter HFpEF ist die intrinsische Funktion und die zytosolische Ca^{2+} -Homöostase der linksventrikulären Kardiomyozyten bei basaler oder erhöhter Frequenz gestört.
2. Durch das metabolische Syndrom induzierte HFpEF geht mit Veränderungen der Myofilamentsensitivität einher.
3. Eine Langzeittherapie mit dem SGLT-1- und SGLT-2-Inhibitor Sotagliflozin führt zu einer Verbesserung der kontraktilen Funktion in linksventrikulären Kardiomyozyten.

7. Material und Methoden

7.1 ZSF-1 obese Rattenmodell

Die ZSF-1 Ratte (ZSF1-Lepr^{fa}Lepr^{cp}/Crl) entsteht durch Kreuzung von heterozygoten ZDF (Zucker diabetic fatty) Weibchen und heterozygoten SHHF (spontaneously hypertensive heart failure) Männchen [90]. Die ZSF-1 Ratte ist somit eine Hybride, die zwei Leptin-Rezeptor Mutationen trägt [91]. Aus dieser Kreuzung geht die ZSF-1 lean und ZSF-1 obese Ratte hervor. Während ZSF-1 lean Ratten nur moderat hypertensiv werden, entwickeln ZSF-1 obese Ratten zusätzlich Übergewicht, einen Diabetes mellitus Typ 2 mit Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, sowie eine Hypertriglyzeridämie und Hypercholesterinämie [90]. Des Weiteren entwickeln sie eine kompensierte Niereninsuffizienz und ab einem Alter von 20 Wochen eine diastolische Herzinsuffizienz ([50, 90, 92]; sowie Vorstudie unserer Arbeitsgruppe am Haus [93]).

Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass männliche und weibliche ZSF-1 Ratten einen vergleichbaren Phänotyp von HFpEF ausbilden. Da das bislang aber noch nicht überprüft wurde, haben wir in diesem Versuch nur männliche Tiere untersucht, um zyklusbedingte hormonelle Einflussfaktoren zu umgehen. Nichtsdestotrotz sollten mögliche geschlechterspezifische Unterschiede im Phänotyp, sowie Unterschiede in der Wirkung der Therapie im weiteren Verlauf evaluiert werden. Wir denken jedoch, dass dies für die Beantwortung der hier vorliegenden Fragestellung vorerst erlässlich ist.

Als Gesundheitskontrolle diente die ingezüchtete Wistar Kyoto Ratte (WKY/KyoRj), welche als Wildtyp-Kontrolle für ZSF-1 Ratten etabliert ist [90, 92].

Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit der Tierschutz-Richtlinie der Charité – Universitätsmedizin Berlin und unter Einhaltung der geltenden Landesgesetze und Regularien des Landesamts für Gesundheit und Soziales (LAGeSo Berlin, Aktenzeichen R 0317/17, vom 04. Mai 2018) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM, Charité – Universitätsmedizin Berlin) am Campus Virchow Klinikum unter konventionellen Bedingungen in Kleingruppen von bis zu 5 Tieren pro Käfig gehalten. Die Fütterung

erfolgte ad libitum. Trinkwasser stand ebenfalls ad libitum zur Verfügung. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug 12 Stunden.

7.2 Versuchsdesign und -durchführung

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe zu diesem Versuchsvorhaben wurde die Pharmakokinetik von Sotagliflozin im ZSF-1 Tiermodell validiert. Durch die Kontrolle der Plasmaspiegel nach per os Applikation wurde, auch im Hinblick auf eine eingeschränkte Nierenfunktion und mögliche Verdauungsstörungen, die Auswahl einer adäquaten Dosierung gewährleistet.

Die Dosis von 1 mg/kg KG ist ausreichend, um bei Ratten den SGLT-2 in allen Gewebetypen zu inhibieren. Diese Dosis entspricht ebenfalls der erforderlichen Substanzmenge, die nötig ist um eine wirksame Plasmakonzentration im Menschen zu erreichen [94]. Der SGLT-1 der Ratte ist im Vergleich zum Menschen weniger affin für Sotagliflozin [94]. Daher ist eine höhere Dosis von 30 mg/kg KG notwendig, um eine zuverlässige Inhibition von SGLT-1 zu erreichen (proof-of-concept) [94].

Daraus ergaben sich zur Testung unserer Hypothesen folgende Versuchsgruppen:

1. WT + Vehiculum
2. WT + Sotagliflozin 30 mg/kg KG
3. ZSF-1 + Vehiculum
4. ZSF-1 + Sotagliflozin 1 mg/kg KG
5. ZSF-1 + Sotagliflozin 30 mg/kg KG

Alle Tiere wurden ab einem Alter von 11 Wochen mit formulab 5008 hochkalorisch ernährt. Ab einem Alter von 17 Wochen begann die Langzeitbehandlung (6 Wochen) mit Sotagliflozin 1 mg/kg KG, Sotagliflozin 30 mg/kg KG oder Vehiculum. Nach 23 Wochen wurden die Tiere der in vivo Phänotypisierung mittels Echokardiographie und invasiver Hämodynamik (PV Katheteruntersuchung und PV Loop Analyse) unterzogen (siehe Abb. 9).

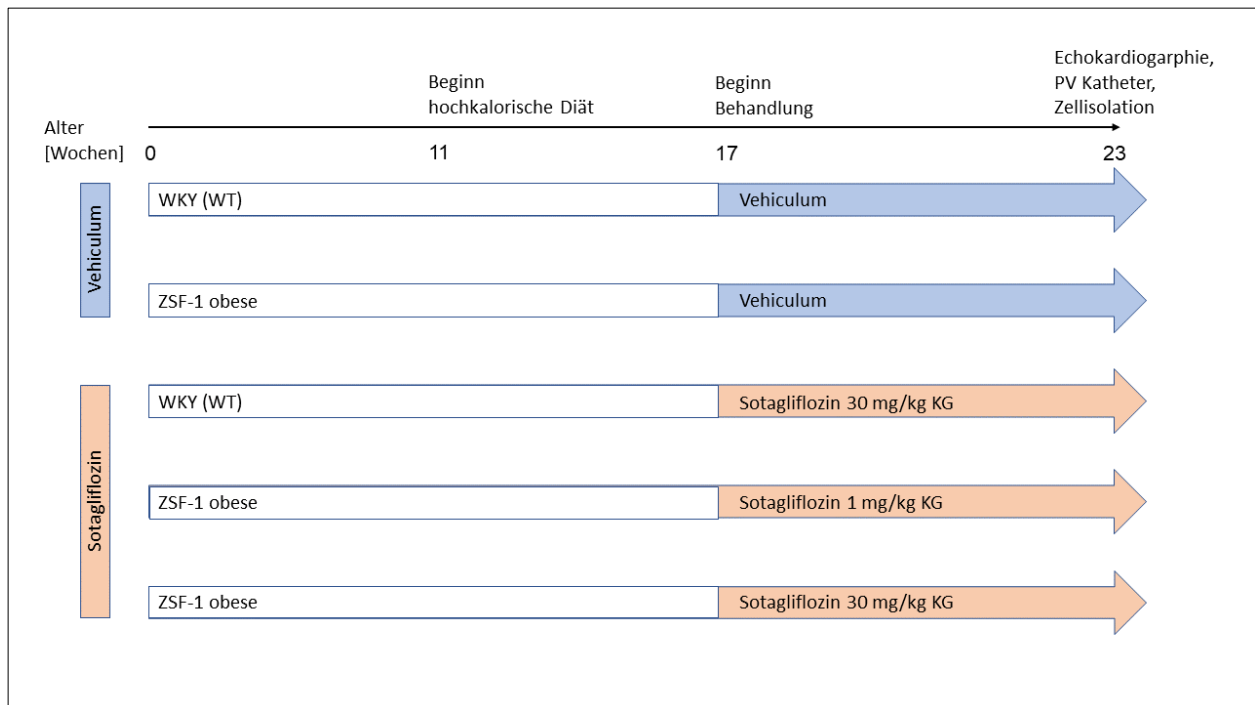


Abb. 9: Versuchsdesign und Zeitablauf

Alle Untersuchungen wurden unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran durchgeführt.

Nach Beendigung der PV Katheteruntersuchung wurden alle Tiere unter Fortsetzung der Anästhesie mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet. Das Herz wurde anschließend zügig exzidiert und zur Isolation der Kardiomyozyten für die in vitro Untersuchungen präpariert (siehe Abb. 9).

7.3 Isolation der Ratten-Kardiomyozyten

Als erstes wurde, durch Inzision der Haut und Durchtrennung der Rippen, die Brusthöhle eröffnet. Nach Darstellung der Aorta ascendens und des Arcus aortae wurden die Gefäße der Lunge durchtrennt und die einzelnen Lungenlappen vom Herz entfernt. Anschließend wurde die Aorta ascendens direkt unterhalb des Abgangs des Truncus brachiocephalicus durchtrennt. Danach wurde das Herz aus dem Mediastinum gelöst. Nach der Entnahme wurde das Herz direkt in ein Becherglas mit gekühlter (4°C, 1 mM [Ca²⁺]) Kanülierungslösung (Zusammensetzung siehe 7.8) transferiert. Dadurch wurde das Herz gekühlt, eine Kardioplegie herbeigeführt und etwaige Blutrückstände gelöst, um die Feinpräparation im folgenden Schritt zu erleichtern. Zur Präparation und Kanülierung der

Aorta ascendens wurde das Herz in eine mit gekühlter (4°C, 1 mM [Ca²⁺]) Kanülierungslösung befüllte Petrischale gelegt. In der Petrischale wurde die Aorta ascendens mit einer modifizierten Spritzenadel (16 G), welche an eine mit gekühlter (4°C, 1 mM [Ca²⁺]) Kanülierungslösung befüllten 10ml Spritze konnektiert war, kanüliert (siehe Abb. 10). Dabei war darauf zu achten, dass die Kanüle noch vor der Aortenklappe zu liegen kam und mit einem Doppelknoten (Seraflex, Serag-Wiessner GmbH & Co. KG) sicher in der Aorta fixiert und abgedichtet wurde (siehe Abb. 11). Hierdurch konnte eine gute anterograde Perfusion der Koronarien bei geschlossener Aortenklappe gewährleistet werden. Anschließend wurden die Koronarien mit der Kanülierungslösung gespült, um eine thromboembolische Infarzierung des Herzens während der Zellisolation zu vermeiden. Es ist zu beachten, dass bis zu diesem Schritt das Herz ischämisch ist. Daher sollte die Exzision und Kanülierung des Herzens nicht länger als 3 Minuten in Anspruch nehmen, um einen Ischämieschaden zu vermeiden.

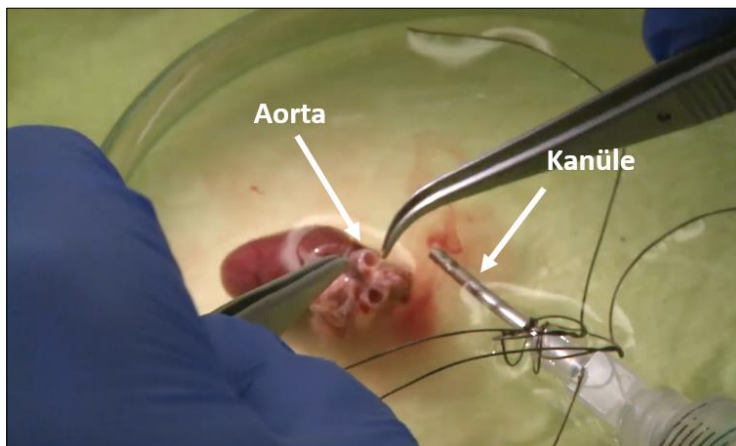


Abb. 10: Präparation und Auffinden der Aorta; Abbildung modifiziert nach [95]

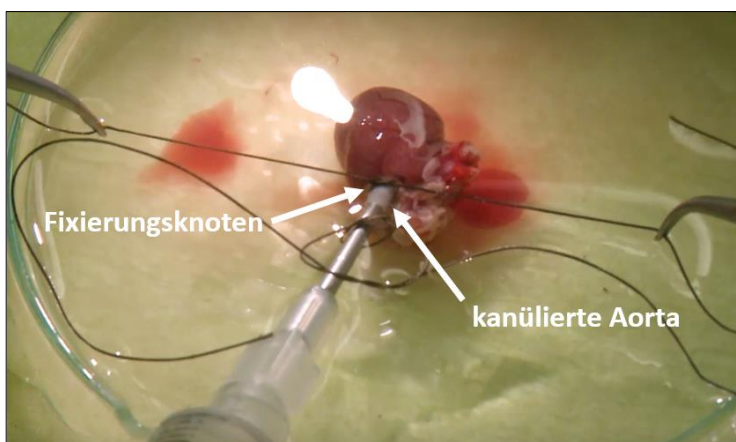


Abb. 11: Kanülierung und Fixierung der Aorta; Abbildung modifiziert nach [95]

Nun wurde die Kanüle mit Herz von der Spritze diskonnektiert und an ein Langendorff-Perfusionssystem angeschlossen, welches die temperatur- und flussgeschwindigkeitskontrollierte Perfusion des Herzens ermöglichte (siehe Abb. 12, 13). Eine Temperatur des Perfusats von 37°C ist streng einzuhalten, da die Enzymaktivität, der in der Verdauungslösung enthaltenen Kollagenase und Peptidase Thermolysin (Liberase TM, Roche Diagnostics GmbH) temperaturabhängig und zwischen 35°C und 37°C optimal ist. Eine Perfusionsgeschwindigkeit von 3 ml/min wurde für die Isolation von Ratten-Kardiomyozyten am Standort etabliert [95].

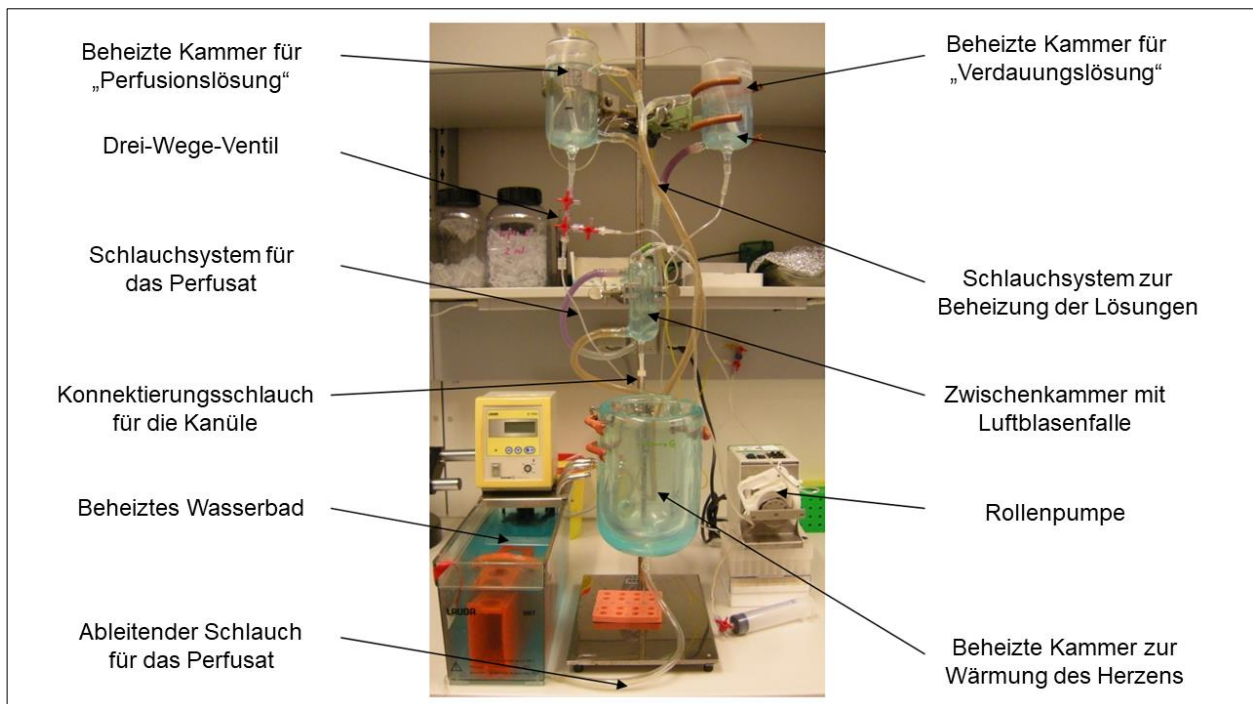


Abb. 12: Aufbau des Langendorff-Perfusionssystems; Abbildung modifiziert nach [96]

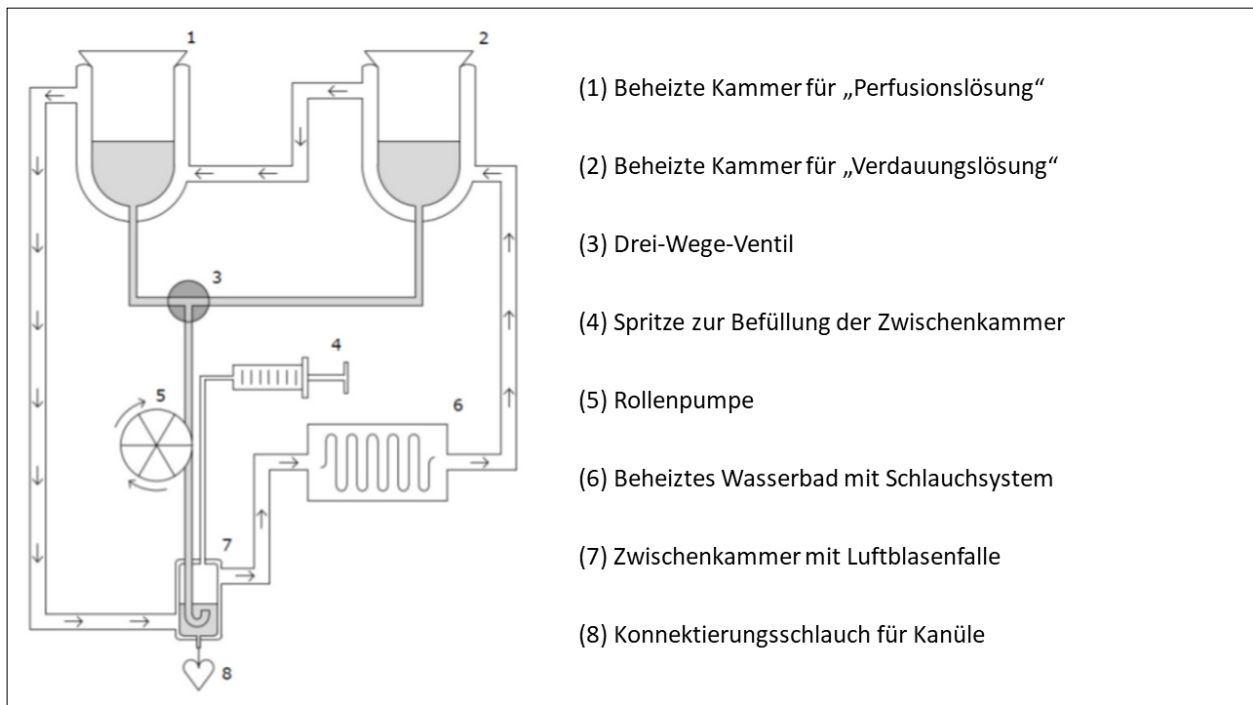


Abb. 13: Schematische Darstellung des Langendorff-Perfusionssystems; Abbildung modifiziert nach [95]

Das Herz wurde nach Anschluss an das Langendorff-Perfusionssystem für 3 Minuten mit einer Ca^{2+} -freien Perfusionslösung (Zusammensetzung siehe Tab. 2) perfundiert. Dann wurde das Perfusat zu einer Verdauungslösung ($0,0125 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]$) mit $0,075 \text{ mg/ml}$ Liberase TM (Roche Diagnostics GmbH) (Zusammensetzung siehe 7.8) gewechselt. Nach einer Perfusionsdauer von 15-18 Minuten waren die interzellulären Verbindungen der Kardiomyozyten ausreichend gelöst, sodass der linke Ventrikel am Langendorff-Perfusionssystem abgeschnitten und in ein Wägeschiffchen mit Stopp-Lösung (Zusammensetzung siehe 7.8) transferiert werden konnte. Die Stopp-Lösung enthält 10 mg/ml bovines Serumalbumin, welches die Verdauungsenzyme inaktiviert und damit den Gewebeverdau beendet. Gleichzeitig stellt sie mit $0,014 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]$ die erste Ca^{2+} Aufbaulösung dar.

Im Wägeschiffchen wurde der linke Ventrikel in der Stopp-Lösung mit einer Schere zerkleinert. Anschließend wurden die Kardiomyozyten durch mehrmaliges behutsames Aufziehen und Resuspendieren der Myokardfragmente mit einer Transferpipette mit großem Durchmesser mechanisch vom verbliebenen Zellgerüst gelöst. Die Zellsuspension wurde hinterher durch eine Nylongaze mit geeigneter Maschengröße in ein Zentrifugenröhrchen gefiltert.

Nach ca. 10 Minuten Wartezeit hatten sich die vitalen Kardiomyozyten vollständig am Boden des Zentrifugenröhrchens abgesetzt. Der Überstand konnte abpipettiert, verworfen und mit der zweiten Ca^{2+} -Aufbaulösung (4,7 mg/ml BSA, 0,125 mM $[\text{Ca}^{2+}]$; Zusammensetzung der Aufbaulösungen siehe 7.8) ersetzt werden. Um die Zellen an eine normale extrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ zu readaptieren, wurde dieser Schritt weitere zwei Mal mit Ca^{2+} -Aufbaulösungen der nächst höheren Ca^{2+} -Konzentration (4,7 mg/ml BSA, 0,25 mM bzw. 0,5 mM $[\text{Ca}^{2+}]$) durchgeführt. Die Lagerung der Kardiomyozyten erfolgte in normaler Tyrode-Lösung mit 1mM $[\text{Ca}^{2+}]$ (Zusammensetzung siehe Tab. 3). Zum Schluss wurde die Qualität der Isolation lichtmikroskopisch (20-fache Vergrößerung) anhand der Viabilität der Zellpopulation und zellmorphologischen Kriterien überprüft. Diese beinhalteten unter anderem: eine stäbchenförmige Form mit einem Seitenverhältnis von $\geq 3:1$, eine regelmäßige Sarkomerstruktur, Abwesenheit von Membranunregelmäßigkeiten und spontaner Kontraktilität (siehe Abb. 14).

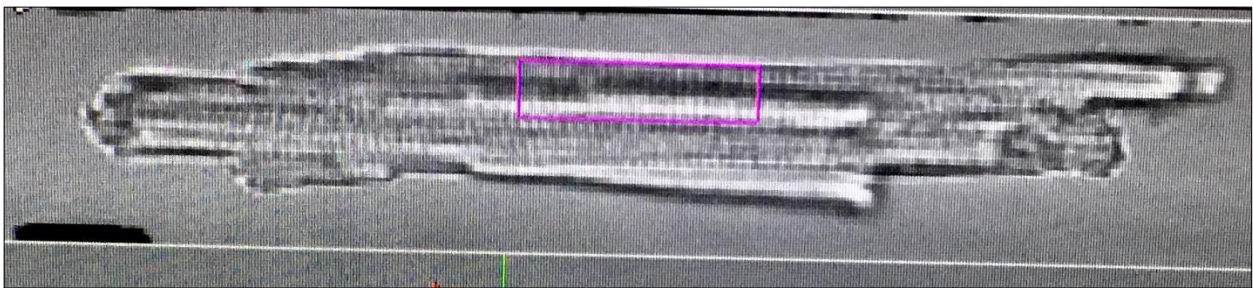


Abb. 14: Bildbeispiel einer untersuchten linksventrikulären Kardiomyocyte in IonWizard 6.6 (IonOptix)

7.4 Handhabung des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs

Das Farbstoffmolekül Fura-2 (Invitrogen) ist negativ geladen und kann die Zellmembran nicht frei passieren. Deshalb wird das Molekül mit 4 AM (Acetoxymethyl)-Estergruppen modifiziert, um eine freie Diffusion über die Zellmembran zu ermöglichen. Im Zytosol werden die lipophilen AM-Estergruppen durch nichtspezifische Esterasen abgespalten. Ohne diese verbleibt der Farbstoff in der Zelle und wird nur langsam durch membranständige Anionen-Transporter aus der Zelle entfernt. Dadurch bleibt die Beladung der Zelle für längere Zeit erhalten. Die Abspaltung der AM-Estergruppen ist essenziell für die Ca^{2+} -Bindung und Voraussetzung für die Ca^{2+} -abhängige Änderung der Fluoreszenzemission des Farbstoffmoleküls. Fura-2 hat eine gute Ca^{2+} -Affinität und Fluoreszenzquantenausbeute, sodass Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ohne signifikanten Puffer-Effekt möglich sind [97]. Fura-2 wird mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm

angeregt und emittiert Licht mit weniger Energie in einem Spektrum um 510 nm. Im Ca^{2+} -gebundenen Zustand verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 363 nm für den ungebundenen Farbstoff zu 335 nm, während das Emissionsspektrum weitgehend konstant bleibt. Am isosbestischen Punkt bei 360 nm ist die Lichtabsorption unabhängig von der Ca^{2+} -Bindung. Bei höheren Wellenlängen ist das Verhalten invers. Hier führt eine steigende $[\text{Ca}^{2+}]$ zu einem Abfall der Absorptionskapazität. Um 380 nm ist die Absorption und Emission im Vergleich zu 340 nm kleiner, jedoch ist in diesem Bereich die Sensitivität für Änderungen in der $[\text{Ca}^{2+}]$ am größten (siehe Abb. 15). Durch die Bildung der Ratio zwischen F340 und F380, können beide Vorteile genutzt und die zytosolische $[\text{Ca}^{2+}]$ unabhängig von der Menge des intrazellulären Farbstoffes, Photobleaching, Zelldicke und weiteren disruptiven Faktoren gemessen werden [97].

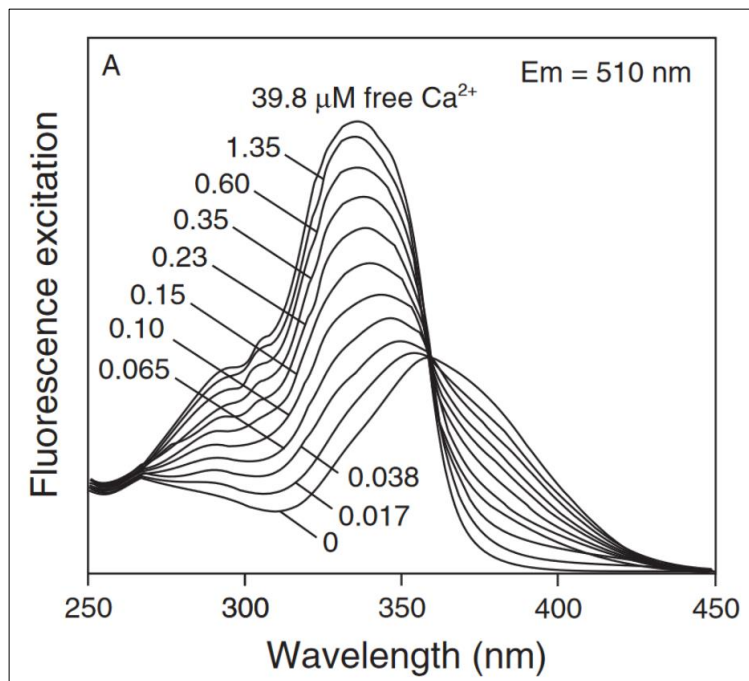


Abb. 15: Exzitationsspektrum von Fura-2 [97]

Die isolierten Kardiomyozyten wurden in Laminin (Invitrogen)-beschichteten Zellbädern (Willco Wells) untersucht. Fura-2 AM wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) zu einer 1 mM Stammlösung gelöst. Um die Löslichkeit des hydrophoben Fura-2 AM – und damit die Beladung – zu verbessern, wurde die Stammlösung zunächst mit dem nicht-ionischen Surfactant Pluronic F-127 (20% Lösung in DMSO, Invitrogen) im Verhältnis 1:1 vermengt. Für das Herstellen einer Beladungslösung wurde dieses Gemisch in Tyrode-Lösung mit 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ (Zusammensetzung siehe Tab. 3) gelöst, sodass die finale Konzentration von Fura-2 AM 5 μM betrug. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten in

der Beladungslösung inkubiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert, verworfen und mit Tyrode-Lösung mit 1 mM $[Ca^{2+}]$ ersetzt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, um den nicht deesterifizierten intrazellulären Farbstoff auszuwaschen und auch den extrazellulär verbliebenen Farbstoff zu entfernen. Hierdurch wurde eine stabile Farbstoffkonzentration für die Zeit des Versuchs gewährleistet.

7.5 Messaufbau

Es wurde ein invertiertes Mikroskop (Zeiss Axiovert 200) mit Epifluoreszenzeingang verwendet. Das Exzitationslicht wurde von einer polychromatischen Xenonlampe mit 75 W Leistung (Cairn) generiert. Um das Exzitationslicht für die Messungen mit Fura-2 auf die Wellenlängen 340 nm und 380 nm zu beschränken, wurde das polychromatische Licht durch einen Spiegel mit einer Schaltrate von 1 ms auf zwei verschiedene Lichtwege mit Schmalbandfiltern für 340 nm und 380 nm geleitet (IonOptix Hyperswitch). Beide Lichtwege trafen auf eine Sammellinse, die das Licht über einen flüssigkeitsgefüllten Lichtleiter zum Epifluoreszenzport des Mikroskops leitete. Da sich das Exzitationslicht im UV-Spektrum befindet und somit zytotoxisch ist, war direkt hinter der Lichtquelle ein optischer Verschlussmechanismus eingerichtet. Dieser wurde über die Software (IonWizard 6.6) gesteuert und beschränkte das Exzitationslicht auf die Zeit der Messung. Das eingehende Licht wurde im Mikroskop über einen dichroitischen Spiegel zum Objektiv (40x mit Immersionsöl) geleitet. Das emittierte Licht der Untersuchungsprobe ging zurück in das Objektiv und passierte eben diesen dichroitischen Spiegel, der als Farbteiler bei 500 nm fungierte. So gelangte die Lichtemission von Fura-2 entweder zum Emissionsport oder den Okularen des Mikroskops. Eine angeschlossene Bildblende begrenzte das weitergeleitete Licht auf die Lichtemission der untersuchten Zelle. An dem Emissionsport war eine Photomultiplier-Röhre (PMT400) zur Quantifizierung des Emissionslichts (Photonen-Zählmodus) angeschlossen. Die Fluoreszenzsignale F340, F380 und die daraus errechnete Ratio wurden mithilfe der Software IonWizard 6.6 (IonOptix) aufgezeichnet. Eine schematische Darstellung der Messeinrichtung ist in Abbildung 16 zu sehen (s.u.).

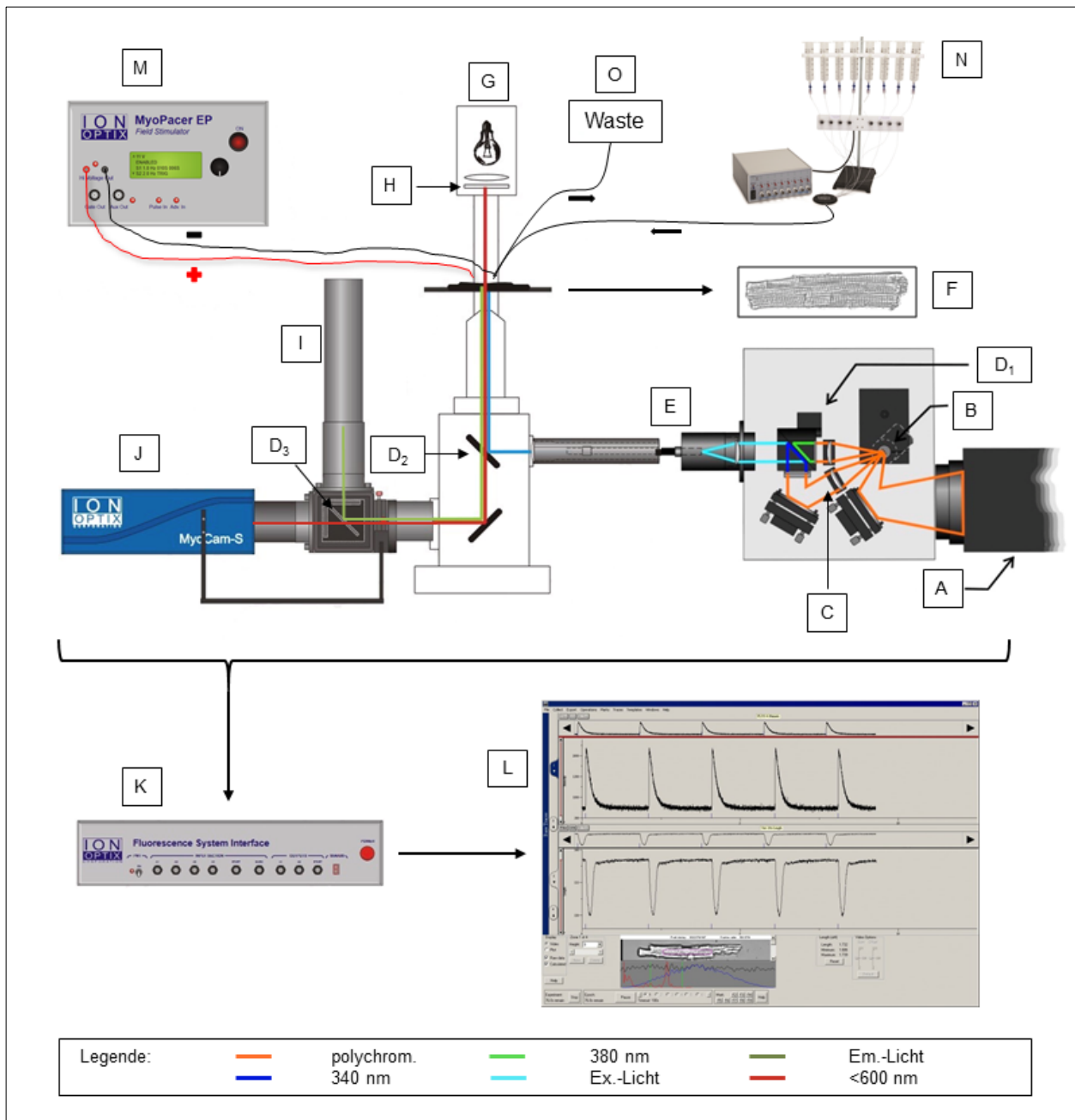


Abb. 16: Technisches Setup für die ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie und SL-Messung; A=polychromatische Lichtquelle, B=Schaltspiegel, C=Schmalbandfilter für 340nm und 380nm, D₁=dichroitischer Spiegel (FT360), D₂=dichroitischer Spiegel (FT500), D₃=dichroitischer Spiegel (FT520), E=Lichtleiter und Epifluoreszenzport, F=Untersuchungsprobe im Zellbad auf Objektisch, G=Halogenleuchte, H=Rotfilter, I=Photomultiplier-Röhre, J=CCD-Kamera, K=Fluorescence System Interface (zur Migration aller Daten an den PC), L= Aufnahme mit IonWizard 6.6, M=Feldstimulator, N=rapid perfusion-System mit Heizmodul, O=Absaugpumpe; Abbildung modifiziert nach [98]

Zur Messung der Sarkomerlänge wurde das Licht der Halogenleuchte des Mikroskops genutzt. Dieses wurde noch vor der Untersuchungsprobe durch einen Rot-Filter (>600nm Langpassfilter) gefiltert, sodass es nicht mit dem Exzitations- und Emissionslicht der

Messungen mit Fura-2 interferierte. Das Rotlicht passierte den dichroitischen Spiegel (FT500) und wurde ebenfalls zum Epifluoreszenzport (siehe Abb. 16) geleitet. Im Epifluoreszenzport wurde es von einem weiteren dichroitischen Spiegel (FT520) vom Emissionslicht des Fura-2 separiert und von einer angeschlossenen CCD-Videokamera (IonOptix MyoCam-S) aufgenommen. Die Aufzeichnung und Verarbeitung des Videosignals erfolgte ebenfalls mit Ion-Wizard 6.6 (siehe Abb. 18).

Die Sarkomerlänge beschreibt den Abstand zwischen zwei Z-Scheiben, welche aber lichtmikroskopisch nicht sichtbar sind. Man kann sich jedoch die sarkomertypische Hell-Dunkel-Streifung, die durch die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der dicken und dünnen Filamente bedingt ist, zur Messung der Sarkomerlänge zunutze machen. Die dicken Filamente sind optisch dichter (A-Bande), als die dünnen Filamente (I-Bande). Daher beschreibt die Sarkomerlänge lichtmikroskopisch die Strecke von der Mitte einer I-Bande bis zur Mitte der Nächsten (siehe Abb. 17). Um die Genauigkeit dieser Messung zu verbessern, wird die Frequenz der Sarkomerstreifung (Anzahl der Sarkomere pro μm) mithilfe einer schnellen Fourier-Transformation berechnet. Von der Frequenz der A- und I-Banden kann mit einem Fehler von $<1\%$ auf die Sarkomerlänge von einer Reihe von Sarkomeren geschlossen werden. Zur Kalibrierung des Systems wurde ein Mikrometer verwendet, mit dem eine Strecke von $10\ \mu\text{m}$ einer Referenzfrequenz zugeordnet wurde.

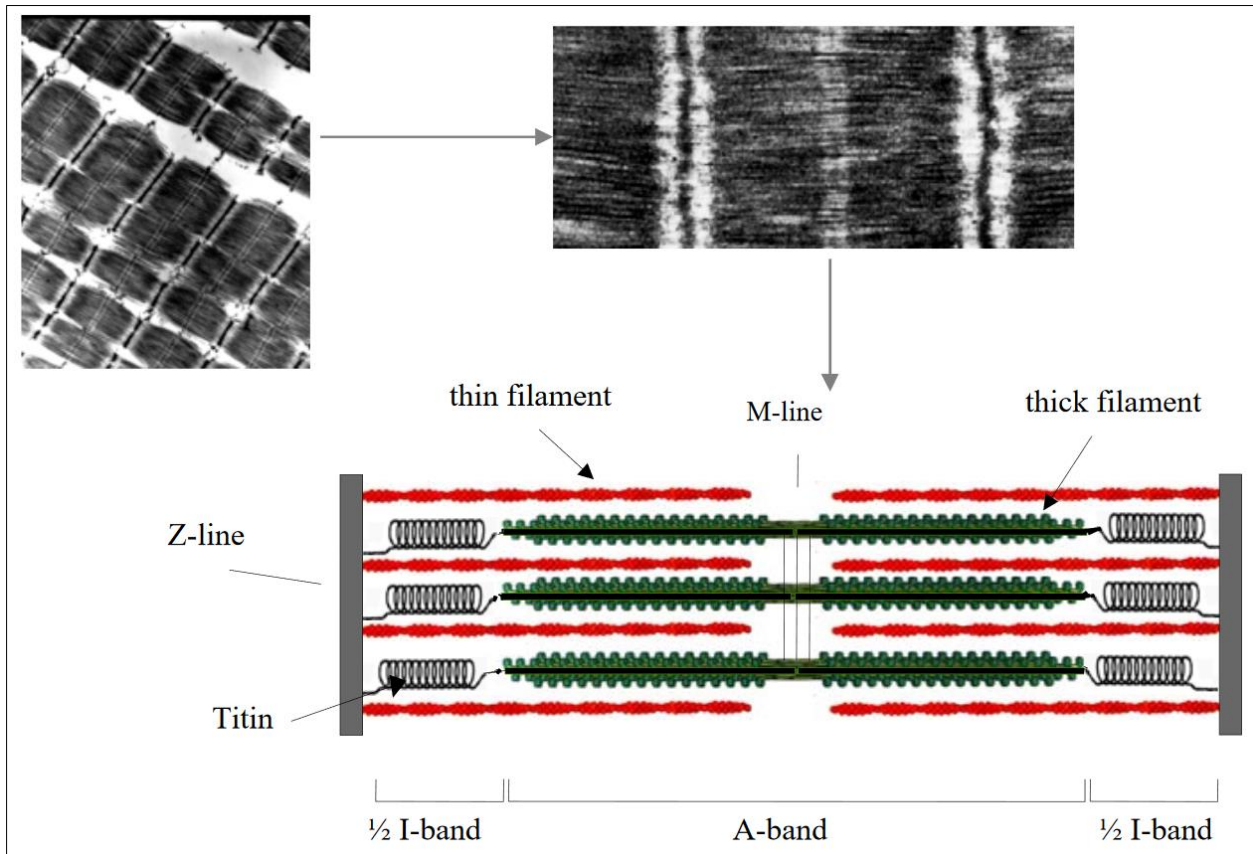


Abb. 17: Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung des Sarkomers [99]

7.6 Versuchsprotokoll der in vitro Untersuchungen

Alle Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Über ein Rapid Perfusion-System mit Heizmodul und eine Absaugpumpe, konnte ein schnelles Ein- und Auswaschen der verwendeten Lösungen, sowie Temperaturstabilität während der Messung realisiert werden. Es wurden nur Zellen gemessen, die eine stäbchenförmige Form mit einem Seitenverhältnis von $\geq 3:1$, eine regelmäßige Sarkomerstruktur und keine Membranunregelmäßigkeiten aufwiesen (siehe Abb. 14). Spontan kontraktile und arrhythmische Zellen wurden von der Messung ausgeschlossen.

Zur elektrischen Stimulation des Zellbades wurden zwei gegenüberliegende Platinelektroden in das Zellbad eingebracht. Die Stimulation erfolgte durch einen Feldstimulator (IonOptix MyoPacer), dessen Signal durch die Software IonWizard 6.6 in die Aufzeichnungen des Fluoreszenz- und Kontraktionssignals integriert wurde. Die Zellen wurden mit 20 V bipolaren Impulsen von 5 ms Dauer stimuliert. Jede Zelle wurde einer Frequenztreppe von 1 Hz, 2 Hz und 4 Hz Stimulation unterzogen. Die Stimulation

der Zelle mit einer Frequenz erfolgte so lange, bis sich eine stabile Amplitude von Ca^{2+} -abhängigem Fluoreszenzsignal und Kontraktion einstellte (steady state). Die Messung unter der jeweiligen Stimulationsfrequenz erfolgte anschließend für je 10 s (siehe Abb. 18). Zellen, die keinen steady state erreichten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Vor der Analyse wurden die Messwerte von Hintergrundsignal (erhoben in einem zellfreien Areal neben der gemessenen Zelle) und Autofluoreszenz (gemittelt aus 5 unbeladenen Zellen eines jeden Versuchstages) bereinigt. Für die Analyse der Ca^{2+} - und Kontraktionstransienten wurden je 10 Transienten nach Erreichen des stabilen Zustandes gemittelt und in Microsoft Excel ausgewertet.

Nach Durchlaufen der Frequenztreppe wurde durch Induktion eines Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten die sarkoplasmatische $[\text{Ca}^{2+}]$ und die zytosolische Ca^{2+} -Elimination gemessen. Dafür wurde die Stimulation gestoppt, um den Ca^{2+} -Influx durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zu beenden. Der Koffein-induzierte Ca^{2+} -Transient wurde durch Superfusion der Zelle mit einer Tyrode-Lösung, welche 20 mM Koffein enthielt (Zusammensetzung siehe 7.8), ausgelöst (siehe Abb. 18). Koffein bewirkt die Öffnung aller Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums, sodass sich dessen gesamter Ca^{2+} -Gehalt in das Zytosol entleert. Da die Ryanodin-Rezeptoren geöffnet bleiben, kann die SERCA effektiv nicht zur zytosolischen Ca^{2+} -Elimination beitragen. Der anschließende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Abfall ist daher hauptsächlich durch die Aktivität des sarkolemmalen NCX im Vorwärtsmodus bestimmt [40]. Zellen, bei denen der Koffein-induzierte Ca^{2+} -Transient später als 1 s nach der letzten Stimulation bei 4 Hz ausgelöst wurde, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Analyse erfolgte in IonWizard 6.6.

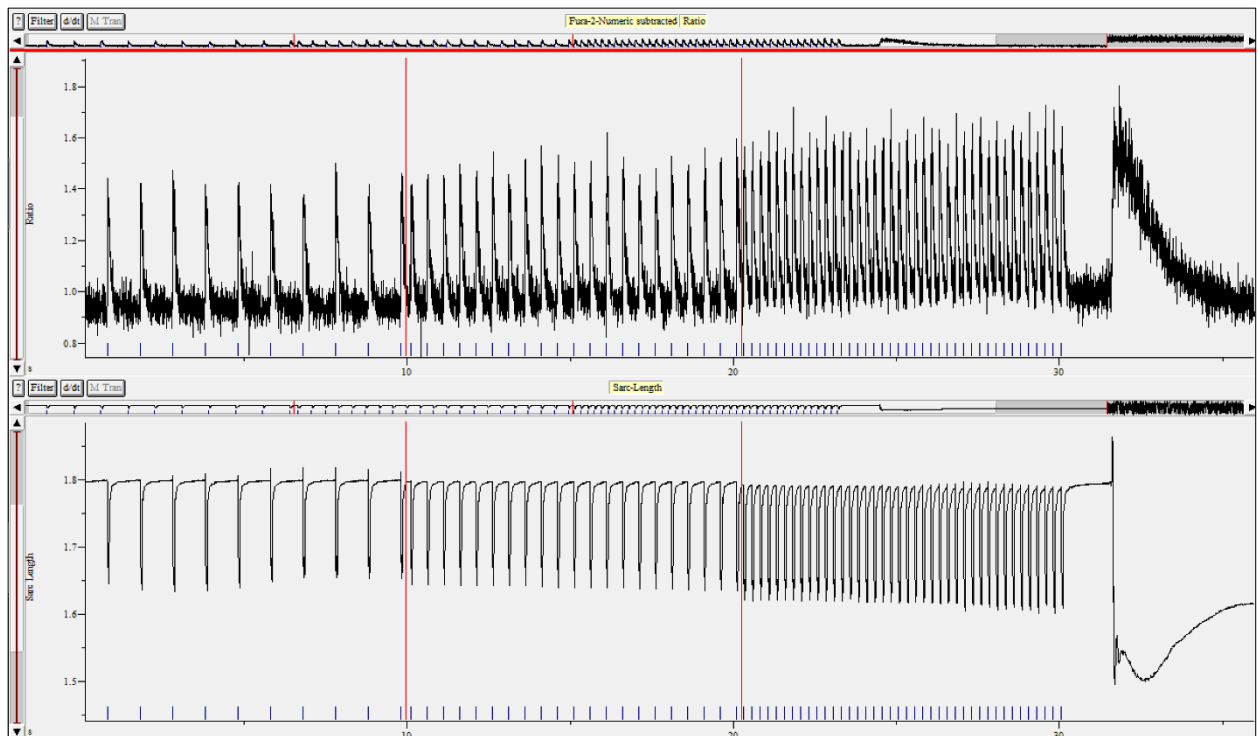


Abb. 18: Beispielhafter Durchlauf des Versuchsprotokolls; Aufnahme aus IonWizard 6.6: oben F340/380, unten SL, TTL-Marker des Feldstimulators in blau

Die Definitionen der untersuchten Parameter sind in Tabelle 1 zu sehen. Eine graphische Darstellung der jeweiligen Transienteneigenschaften findet sich in Abbildung 19.

Parameter	Definition
diast. $[Ca^{2+}]_i$	Diastolische $[Ca^{2+}]_i$
t to peak $[Ca^{2+}]_i$	Dauer vom Zeitpunkt der Stimulation bis zum Zeitpunkt $[Ca^{2+}]_{i \max}$
peak $[Ca^{2+}]_i$	$[Ca^{2+}]_{i \max}$
$[Ca^{2+}]_i$ amplitude	$[Ca^{2+}]_{i \max} - \text{diast. } [Ca^{2+}]_i ; \Delta[Ca^{2+}]_i$
t to 50% $[Ca^{2+}]_i$ decay	Dauer vom Zeitpunkt peak $[Ca^{2+}]_i$ bis zum Zeitpunkt 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall
t to 90% $[Ca^{2+}]_i$ decay	Dauer vom Zeitpunkt peak $[Ca^{2+}]_i$ bis zum Zeitpunkt 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall

Tab. 1: Definitionen der untersuchten Parameter

Parameter	Definition
enddiast. SL	SL_{max} ; SL_0
t to peak SL	Dauer vom Zeitpunkt der Stimulation bis zum Zeitpunkt SL_{min}
peak SL	SL_{min}
SL amplitude	$SL_{max} - SL_{min}$; ΔSL
fractional shortening	$\Delta SL / SL_0$
t to 50% relaxation	Dauer vom Zeitpunkt peak SL bis zum Zeitpunkt 50% Relaxation
t to 90% relaxation	Dauer vom Zeitpunkt peak SL bis zum Zeitpunkt 90% Relaxation
slope MFS	Steigung m der linearen Regressionsgerade ($y=m*x+b$)
R ² MFS	Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionsanalyse
tau decay const.	Zeitkonstante der Funktion des monoexponentiellen Fit des $[Ca^{2+}]_i$ Abfall

Tab. 1 (Fortsetzung): Definitionen der untersuchten Parameter

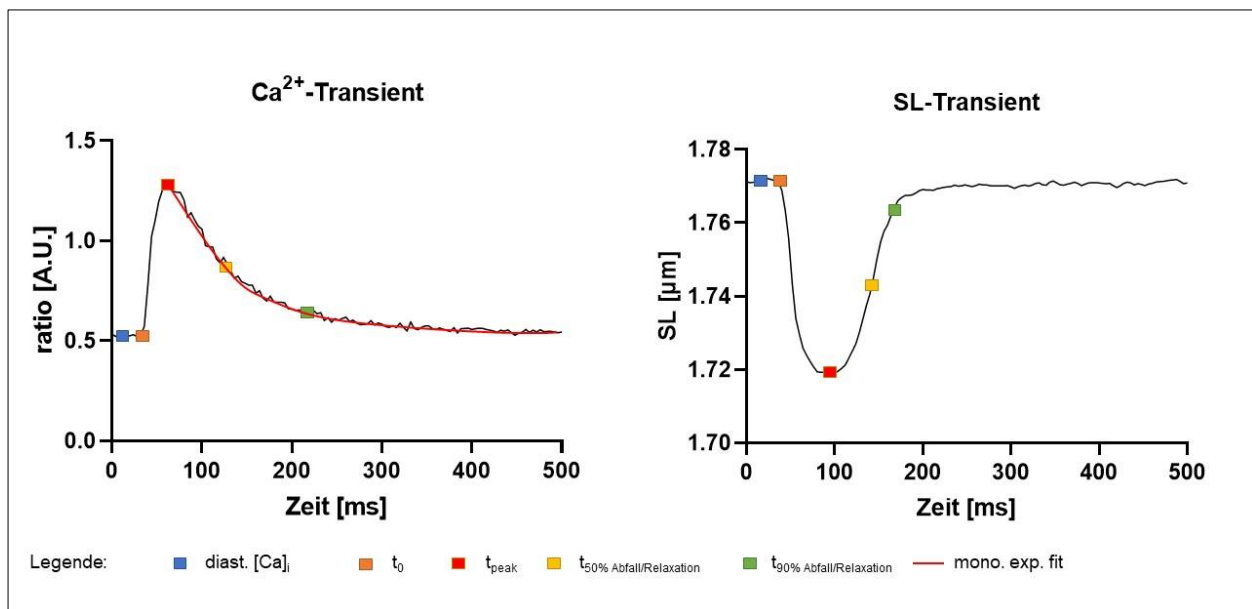


Abb. 19: Transienten-Parameter

7.7 Beurteilung der Myofilamentsensitivität

Für die Ableitung der Myofilamentsensitivität aus intakten Kardiomyozyten wurde die Sarkomerlänge als eine Funktion der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die daraus entstehende Hystereseschleife kann in ihrer Form und Lage beschrieben werden (siehe Abb. 20). Der Verlauf der Kurve ist während der Diastole zwischen t bis 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall und t bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall annähernd linear. Die Auswahl dieses Zeitraumes zur Abschätzung der Myofilamentsensitivität bietet mehrere Vorteile: Einerseits hat man in diesem Bereich bei einer gegebenen Sampling-Frequenz des Messsystems von 4 ms eine gute zeitliche Auflösung, da sich die Kinetik des Ca^{2+} -Transienten schon deutlich verlangsamt hat. Andererseits sind t bis 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall und t bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall dynamische und für jeden Transienten individuelle Größen, sodass das Erfassen des korrekten Abschnittes des Transienten stets gewährleistet und unabhängig von der Kinetik des Transienten ist. Unter der Annahme, dass zwischen t bis 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall und t bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall eine annähernd lineare Abhängigkeit der Sarkomerlänge zur $[Ca^{2+}]_i$ besteht, wurde eine lineare Regressionskurve durch die Datenpunkte dieses Bereichs gelegt (siehe Abb. 20). Die Steigung dieser Kurve beschreibt den $[Ca^{2+}]_i$ -Gradienten zwischen Myofilamenten und Zytosol, der für die Abdiffusion des Ca^{2+} vom Troponin, und somit für die Relaxation benötigt wird. Da $[Ca^{2+}]_i$ der unabhängige Parameter ist, wird dieser auf der x-Achse dargestellt. Nähert sich die Steigung der Kurve 0 an, bedeutet das, dass im Verhältnis zum Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ die Elongation der Sarkomerlänge kleiner ausfällt. Folglich ist die Myofilamentsensitivität größer. Anders herum wird bei einer zunehmend negativen Steigerung, die Änderung der Sarkomerlänge im Verhältnis zum Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ größer – die Myofilamentsensitivität nimmt ab. Die Analyse der Hystereseschleifen erfolgte in Microsoft Excel.

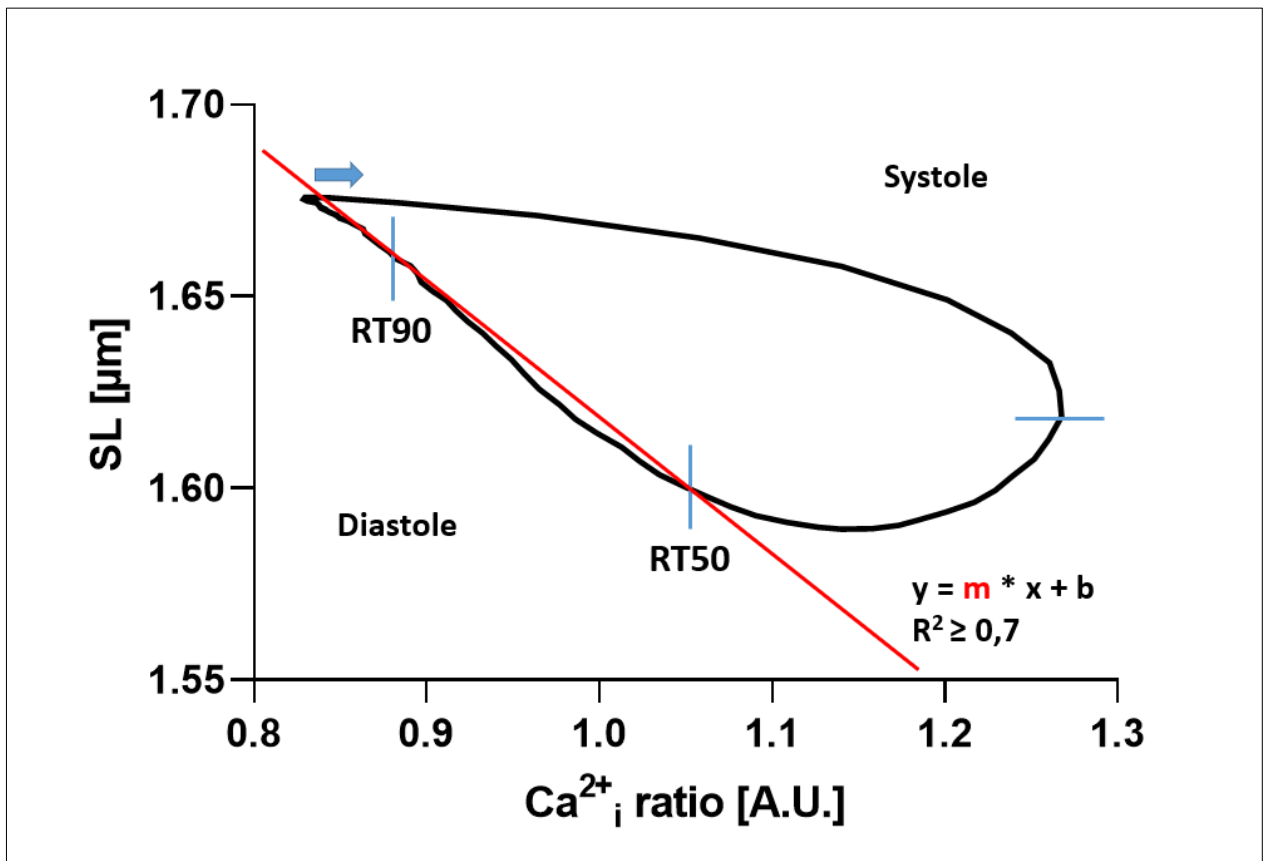


Abb. 20 : Hystereseschleife und Berechnung der Myofilamentsensitivität; RT50 bzw. RT90= Zeitpunkt bei 50% bzw. 90% [Ca²⁺]_i Abfall

Das Bestimmtheitsmaß R^2 beschreibt die Anpassungsgüte der Regressionskurve zu den Messpunkten. R^2 liegt zwischen 0 und 1. Je näher R^2 an 1 liegt, desto kleiner ist die Streuung um die Regressionsgerade und umso besser passt das lineare Modell. Ab einem $R^2 > 0,7$ haben wir einen starken linearen Zusammenhang angenommen. Einerseits kann durch R^2 die Güte dieser Methode bestätigt werden, andererseits können auch Phänotyp-abhängige Abweichungen des linearen Relaxationsverhaltens in der Diastole quantifiziert werden.

Zellen, die nach einem erfolgten Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten im selben Zellbad gemessen wurden, wurden von der Analyse der Myofilamentsensitivität ausgeschlossen, da Koffein die Myofilamentsensitivität beeinflusst [100]. Alle Zellen mit $R^2 < 0,7$ wurden ausgeschlossen, da die Güte des linearen Modells für diese Zellen nicht ausreichend ist und keine korrekte Interpretation zulässt.

7.8 Verwendete Lösungen

Der pH-Wert aller verwendeten Lösungen wurde mit NaOH auf 7,4 bei 37°C adjustiert.

1. Perfusionslösung (siehe Tab. 2)

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	135
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	0,6
Na ₂ HPO ₄	0,6
MgSO ₄	1,2
HEPES	10
Taurin	30
Glukose	10
BDM	10

Tab. 2: Zusammensetzung der Perfusionslösung

2. Kanülierungslösung: Entspricht der Perfusionslösung mit zusätzlich 1 mM CaCl₂.

3. Verdauungslösung: Entspricht der Perfusionslösung mit zusätzlich 0,0125 mM CaCl₂ und 0,075 mg/ml Liberase TM.

4. Stopp-Lösung: Entspricht der Perfusionslösung mit zusätzlich 0,014 mM CaCl₂ und 10 mg/ml BSA.

5. Ca²⁺-Aufbaulösungen: Entspricht der Perfusionslösung mit zusätzlich 4,7 mg/ml BSA und 0,125 mM, 0.25 mM oder 0.5 mM CaCl₂.

6. Tyrode-Lösung (siehe Tab. 3)

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	136
KCl	4
MgCl	1
HEPES	10
Glukose	10
CaCl ₂	1

Tab. 3: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung

7. Koffeinlösung: Entspricht der Tyrode-Lösung mit zusätzlich 20 mM Koffein.

7.9 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angeben, welche sich in den Abbildungen und Tabellen auf die Mittelwerte der Einzelzellmessungen pro Tier beziehen. In Abbildungen stellen rote Datenpunkte die Mittelwerte der Einzelzellmessungen pro Tier und graue Datenpunkte die den Mittelwerten zugrunde liegenden Einzelzellmessungen dar. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und Zellzahl pro Versuchstier sind am Anfang des Ergebnisteils des jeweiligen Versuchsprotokolls angegeben (siehe 8.3 Tab. 4, 8.4 Tab. 8 und 8.5 Tab. 10). In Tabellen beschreibt n die Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe.

Es besteht eine Abhängigkeit der Variablen, da mehrere Zellen eines Versuchstiers untersucht wurden. Daher verwendeten wir ein lineares gemischtes Modell, welches die Abhängigkeit der Einzelzellmessungen vom untersuchten Individuum berücksichtigt, um die Versuchsgruppen paarweise zu vergleichen. Eine Normalverteilung der Stichproben wird hierfür angenommen. Das Signifikanzniveau beträgt $p \leq 0,05$.

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 27.0.0.0 und GraphPad Prism 8.0.1. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 8.0.1 und Microsoft Excel.

8. Ergebnisse

8.1 In vivo Phänotypisierung

Nach 23 Wochen konnte mittels Echokardiographie und invasiver Hämodynamik die Ausbildung des HFpEF-typischen Phänotyps der ZSF-1 Ratten bestätigt werden (siehe Abb. 21). In den ZSF-1 Ratten konnten sowohl Zeichen einer strukturellen Herzerkrankung (LA- und LV-Dilatation), als auch Zeichen einer diastolischen Dysfunktion (pathologischer LVEDP, E/E') nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp ein erhöhtes Schlagvolumen bei erhaltener EF. Die chronische Behandlung der ZSF-1 Ratten mit Sotagliflozin konnte den erhöhten LVEDP senken und die Dilatation des LA signifikant reduzieren. Sotagliflozin hatte in der Gesundheitskontrolle keinen Effekt auf die untersuchten Parameter.

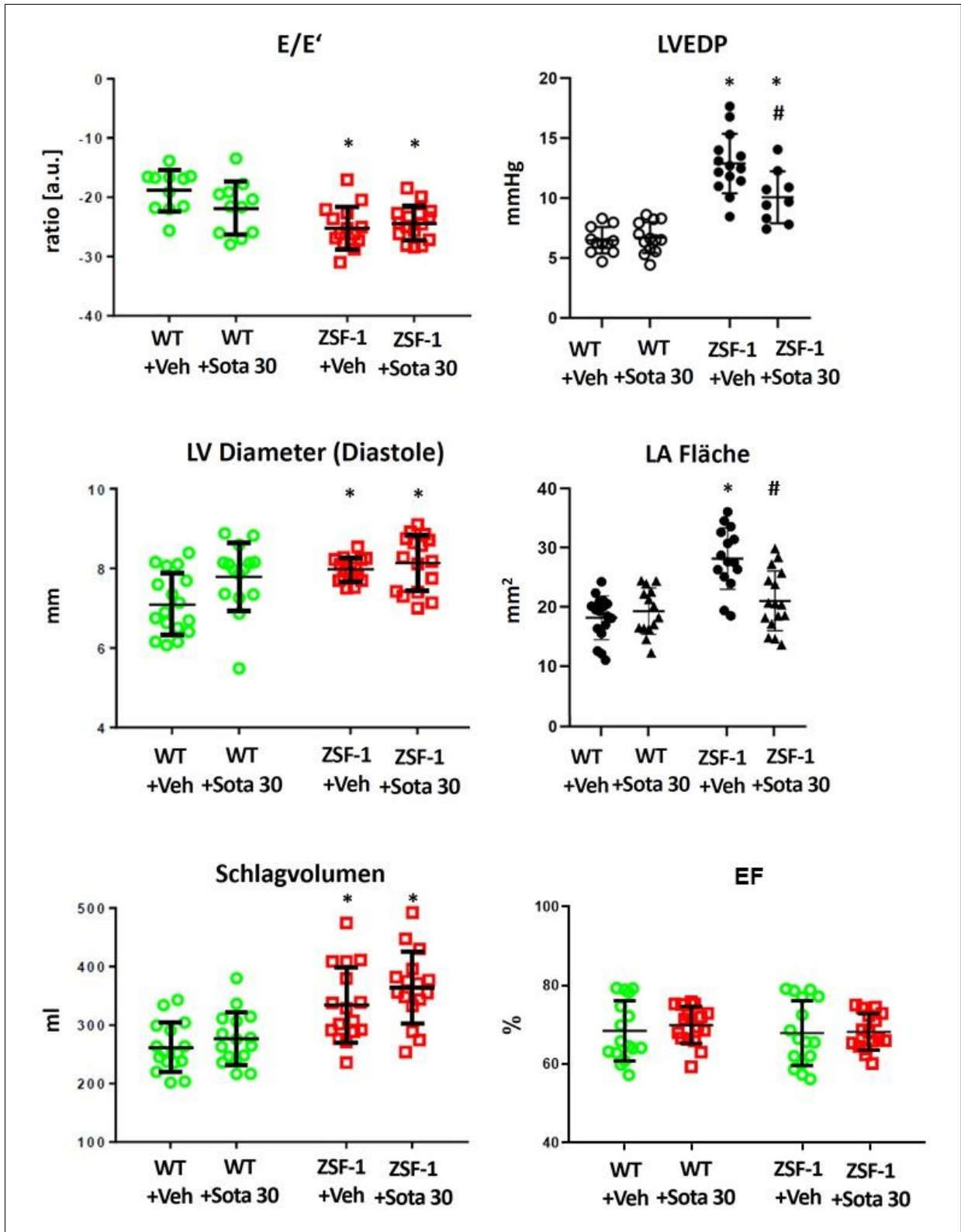


Abb. 21: In vivo Phänotypisierung nach 23 Wochen. ZSF-1+Sotagliflozin 1mg/kg KG nicht dargestellt.

*= $p < 0,05$ vs. WT+Vehiculum, #= $p < 0,05$ vs. ZSF-1+Vehiculum. Die dargestellten Daten und Abbildungen entstammen einer Interimsanalyse für die Vorstellung bei den DGK Herztagen 2019 [101] und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. Uwe Primessnig (ventrikuläre Daten vor Veröffentlichung; atriale Daten siehe Bode et al. [51]). Statistische Analyse mittels two-way ANOVA und Fisher's LSD post-hoc Test.

8.2 Optimierung der in vitro Versuchsbedingungen

Durch die Abschirmung des Messplatzes von Tageslicht und künstlichen Lichtquellen betrug das Hintergrundsignal <5% des Gesamtfluoreszenzsignals. Die Autofluoreszenz der unbeladenen Zellen lag im Mittel für F340 bei $405 \pm 71,57$ AU und für F380 bei $247,2 \pm 44,74$ AU und stellte rund 25% des Gesamtfluoreszenzsignals dar. Es konnten keine Unterschiede in der Autofluoreszenz, die hauptsächlich durch die Reduktionsäquivalente der Zelle bedingt ist, zwischen den Gruppen festgestellt werden (340 nm: WT+Veh $406,933 \pm 84,451$ (n=4) vs. ZSF-1+Veh $408,742 \pm 60,826$ (n=4) vs. WT+Sota 30mg $372,381 \pm 45,433$ (n=5) vs. ZSF-1+Sota 30mg $412,73 \pm 82,354$ (n=3) vs. ZSF-1+Sota 1mg $408,7 \pm 60,83$ (n=4) ; 380 nm: WT+Veh $247,141 \pm 57,853$ (n=4) vs. ZSF-1+Veh $247,236 \pm 35,042$ (n=4) vs. WT+Sota 30mg $223,972 \pm 29,389$ (n=5) vs. ZSF-1+Sota 30mg $251,943 \pm 47,84$ (n=3) vs. ZSF-1+Sota 1mg $247,2 \pm 35,04$ (n=4)).

8.3 Ca²⁺-Transienten und Zellverkürzung

Gruppe	Anzahl Versuchstiere	Anzahl Zellen pro Gruppe	Anzahl Zellen pro Versuchstier
Gesamt	20	332	332
WT+Vehicleum	4	37	9
			14
			1
			13
WT+Sotagliflozin 30mg	5	56	13
			10
			20
			7
			6
ZSF-1+Vehicleum	4	84	20
			22
			21
			21

Tab. 4: Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und Zellzahl pro Versuchstier für die Analyse der Ca²⁺- und Kontraktionstransienten bei 1, 2 und 4 Hz

Gruppe	Anzahl Versuchstiere	Anzahl Zellen pro Gruppe	Anzahl Zellen pro Versuchstier
ZSF-1+Sotagliflozin 1mg	4	90	30
			14
			22
			24
ZSF-1+Sotagliflozin 30mg	3	65	21
			9
			35

Tab. 4 (Fortsetzung): Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und Zellzahl pro Versuchstier für die Analyse der Ca^{2+} - und Kontraktionstransienten bei 1, 2 und 4 Hz

8.3.1 Basale Stimulationsfrequenz: 1 Hz

Unter basaler Stimulation bei 1 Hz konnten keine Unterschiede in der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zwischen Wild-Typ und ZSF-1 Kardiomyozyten festgestellt werden (siehe Abb. 22 links).

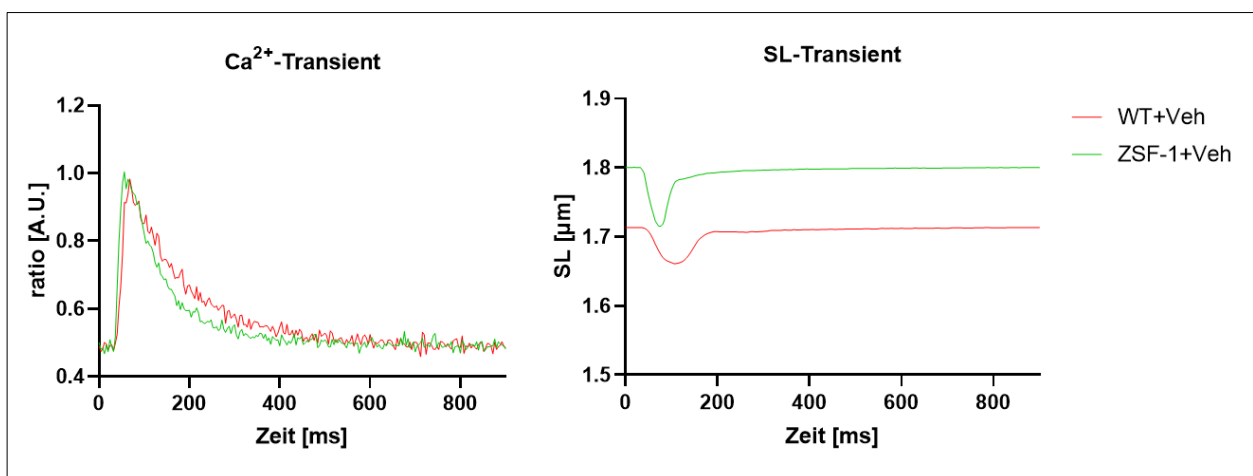


Abb. 22: Qualitative Veränderungen der Ca^{2+} - und SL-Transienten von ZSF-1 Kardiomyozyten bei 1 Hz

Sowohl die peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum; siehe Abb. 24), als auch die Amplitude des Ca^{2+} -Transienten (WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum; siehe Abb. 25) blieben unverändert. Eine erhöhte diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigte sich nicht (WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum; siehe Abb. 23).

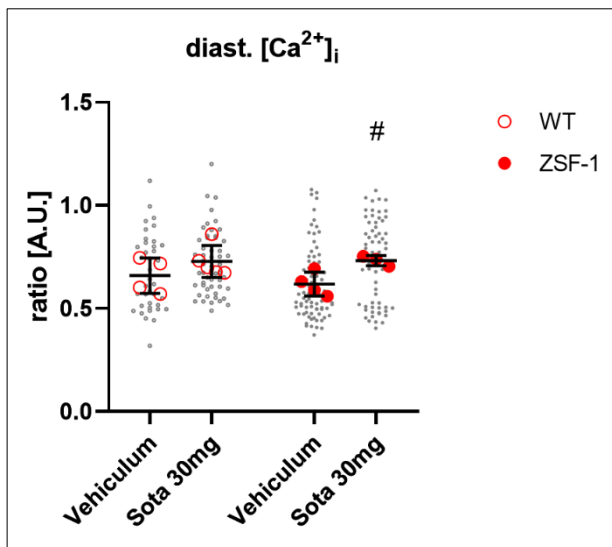


Abb. 23: Diast. $[Ca^{2+}]_i$ bei 1 Hz; # = $p < 0,05$ vs. ZSF-1+Vehicle

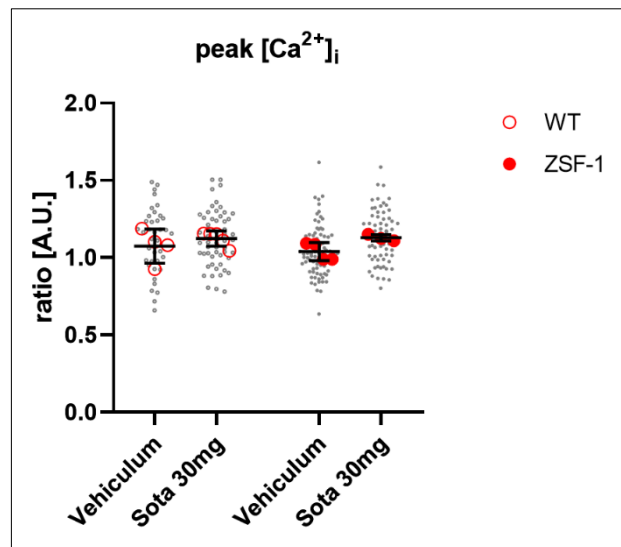


Abb. 24: Peak $[Ca^{2+}]_i$ bei 1 Hz

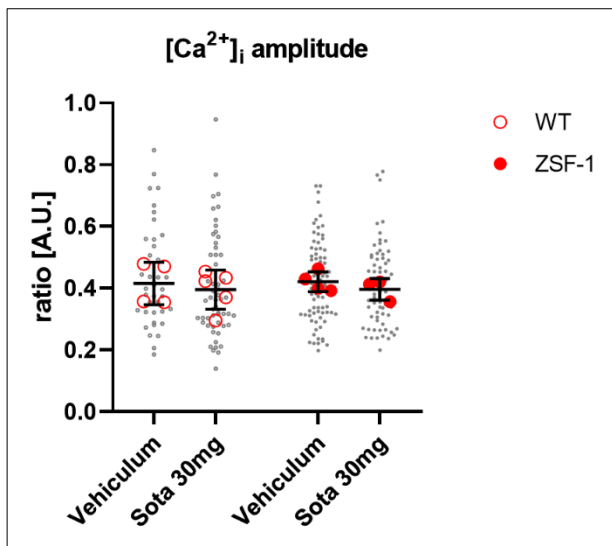


Abb. 25: $[Ca^{2+}]_i$ Amplitude bei 1 Hz

Im Gegensatz zur $[Ca^{2+}]_i$ ist die Kinetik der Ca^{2+} -Transienten in den von unbehandelten ZSF-1 Ratten gewonnenen Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrolle sichtbar verändert (siehe Abb. 22 links). Es zeigte sich eine Verkürzung der Zeit bis zur maximalen $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 28) um beinahe 30%. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Verkürzung der Zeit bis 50% und 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall (siehe Abb. 22 links, 26, 27). Obwohl die Unterschiede in den Zeiten des $[Ca^{2+}]_i$ Abfall zwischen ZSF-1 und WT Kardiomyozyten die statistische Signifikanz knapp verfehlen ($p = 0,069$ für die Zeit bis 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall und $p = 0,053$ für die Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall), findet sich bei 1 Hz Stimulationsfrequenz immerhin eine Mittelwertdifferenz von 23 ms für die Zeit bis 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall, was einer

Beschleunigung des $[Ca^{2+}]_i$ Abfall bei ZSF-1 Kardiomyozyten von ca. 23% entspricht. Die Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall war sogar um 96 ms bzw. 30% verkürzt.

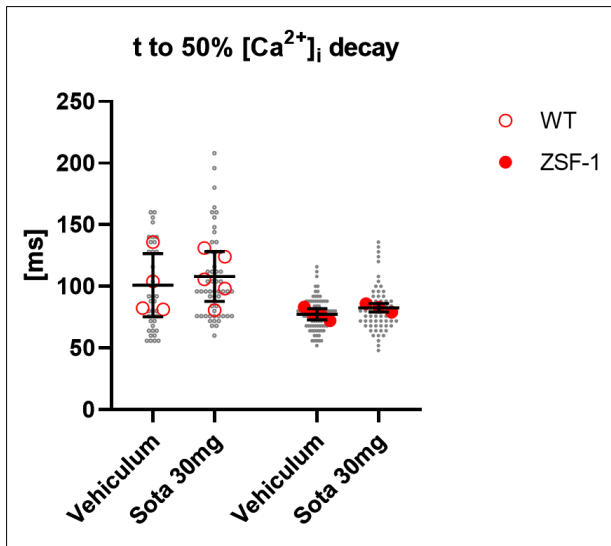


Abb. 26: Zeit bis 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall bei 1 Hz

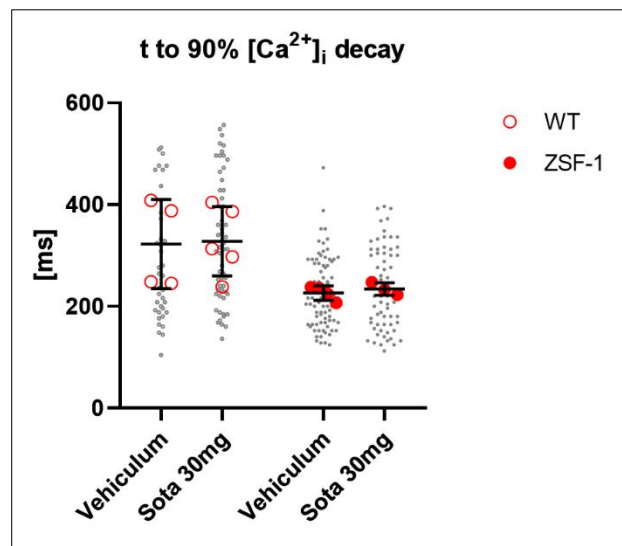


Abb. 27: Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall bei 1 Hz

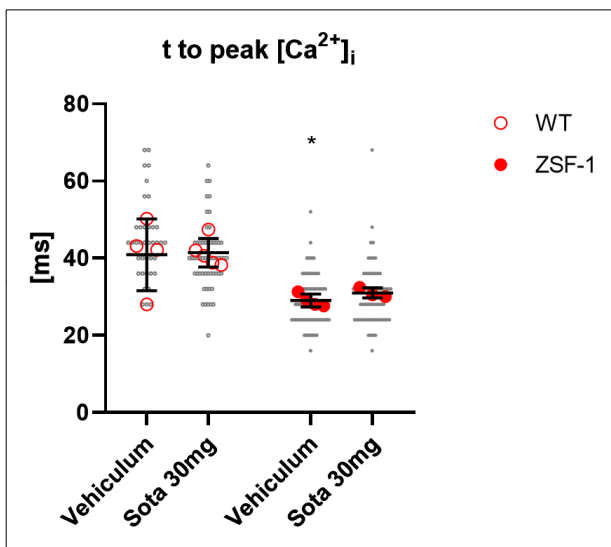


Abb. 28: Time to peak $[Ca^{2+}]_i$ bei 1 Hz;

*= $p \leq 0,05$ vs. WT+Vehiculum

Die Langzeitbehandlung mit Sotagliflozin 30mg/kg KG erhöhte bei ZSF-1 Ratten den diastolischen Ca^{2+} -Gehalt der Kardiomyozyten in den in vitro Untersuchungen signifikant (ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+Sotagliflozin 30mg/kg KG; siehe Abb. 23 und 29 links). Die maximale zytosolische $[Ca^{2+}]_i$ war im selben Ausmaß erhöht (jedoch Signifikanzniveau mit $p=0,066$ knapp nicht erreicht), sodass die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten konstant blieb (siehe Abb. 24, 25). Die Erhöhung der maximalen zytosolischen $[Ca^{2+}]_i$ ist erst bei

höheren Stimulationsfrequenzen statistisch signifikant (siehe Tab. 5, 6). Da sich die $[Ca^{2+}]_i$ Amplituden jedoch nicht unterschieden, ist auch bei 1 Hz von diesem Effekt auszugehen. Die Effekte von Sotalolol auf die diast. $[Ca^{2+}]_i$ und maximale zytosolische $[Ca^{2+}]_i$ konnten bei Wildtyp Kardiomyozyten nicht beobachtet werden. Es war kein Effekt von Sotalolol 30mg/kg KG auf die Kinetik der Ca^{2+} -Transienten nachweisbar.

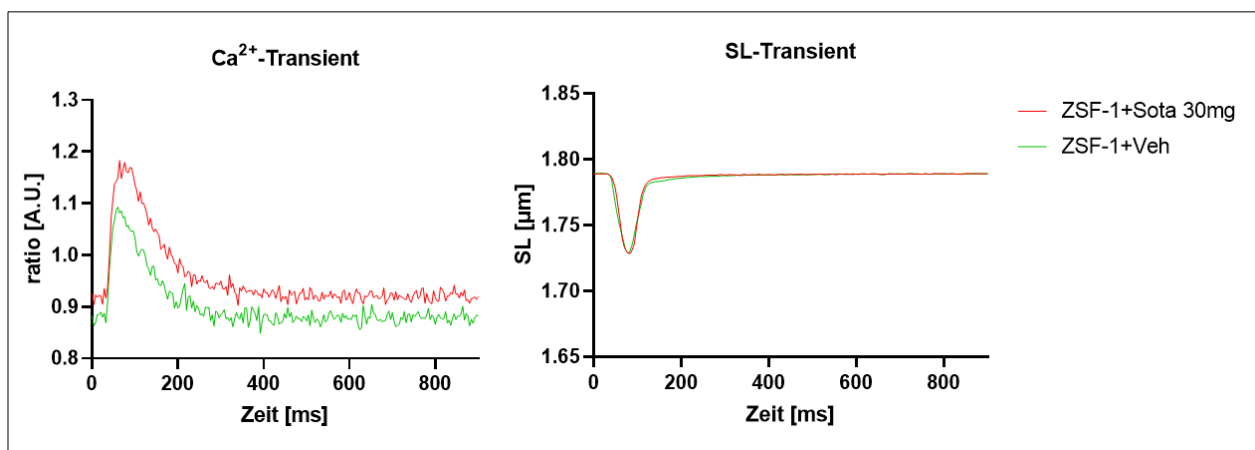


Abb. 29: Qualitative Veränderungen der Ca^{2+} - und SL-Transienten von ZSF-1 Kardiomyozyten durch Sotalolol 30mg/kg KG bei 1 Hz

In Analogie zu der weitgehend unveränderten Ca^{2+} -Homöostase, blieb die anteilige Verkürzung und Amplitude der Sarkomerverkürzung von ZSF-1 Kardiomyozyten konstant (siehe Abb. 22 rechts und Abb. 31, 32). Wie bei der $[Ca^{2+}]_i$ war die Kontraktion der isolierten Kardiomyozyten im ZSF-1 Modell im Vergleich zur Kontrolle deutlich schneller (siehe Abb. 22). Ebenfalls war eine beschleunigte Relaxation bei den ZSF-1 Kardiomyozyten zu beobachten. ZSF-1 Kardiomyozyten kontrahierten 44% schneller (siehe Abb. 33), und zeigten eine um 65% verkürzte Zeit bis 50% bzw. um 45% verkürzte Zeit bis 90% Relaxation (siehe Abb. 34, 35). Kardiomyozyten von ZSF-1 Ratten hatten in vitro eine signifikant längere enddiastolische Sarkomerlänge (siehe Abb. 22 rechts und 30).

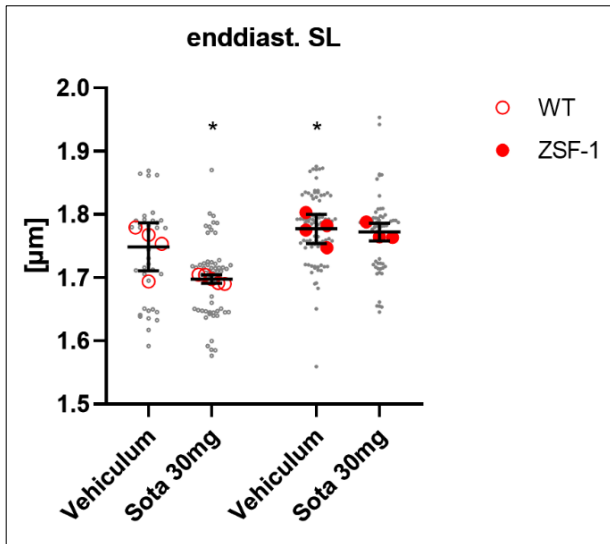


Abb. 30: Enddiastolische Sarkomerlänge bei 1 Hz;
 *= $p \leq 0,05$ vs. WT+Vehiculum

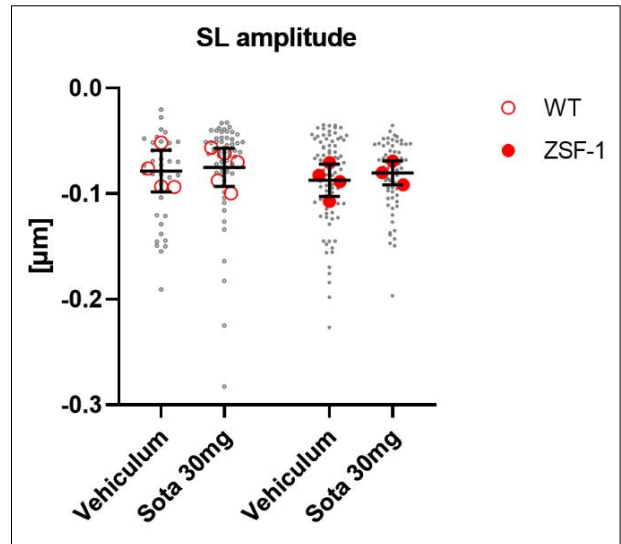


Abb. 31: Amplitude der Sarkomerlänge bei 1 Hz

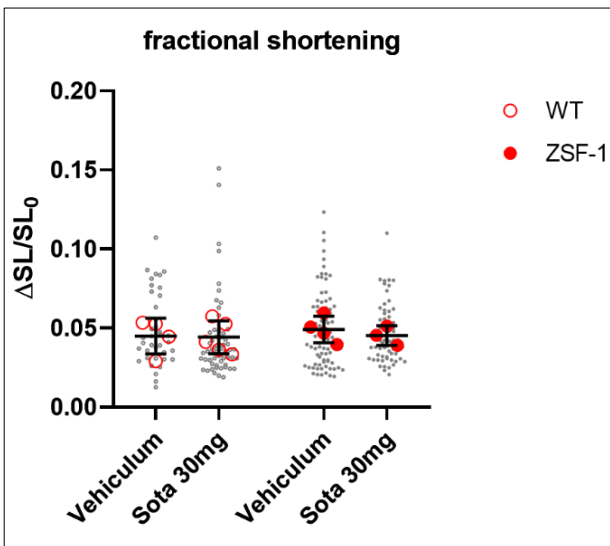


Abb. 32: Anteilige Verkürzung der Sarkomere
 bei 1 Hz

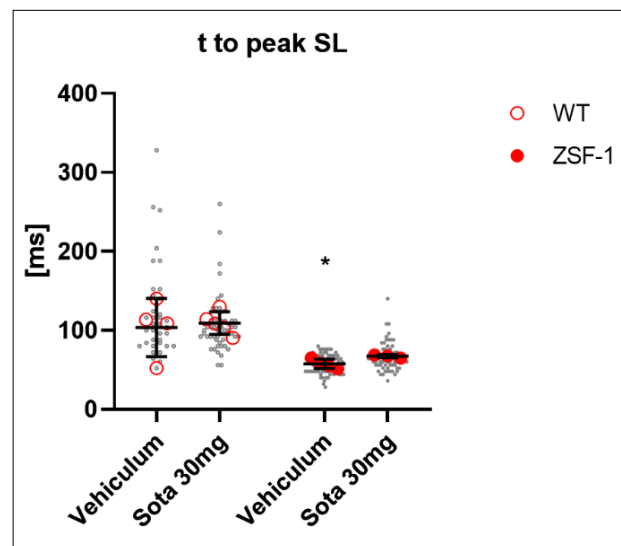


Abb. 33: Time to peak SL bei 1 Hz;
 *= $p \leq 0,05$ vs. WT+Vehiculum

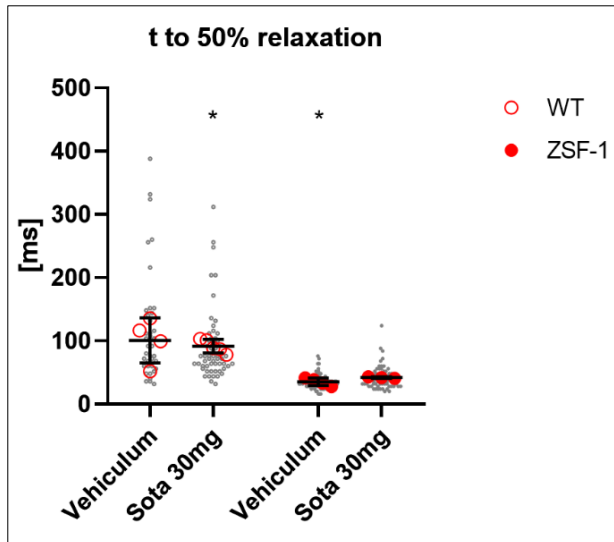


Abb. 34: Zeit bis 50% Relaxation bei 1 Hz;

*= p<0,05 vs. WT+Vehiculum

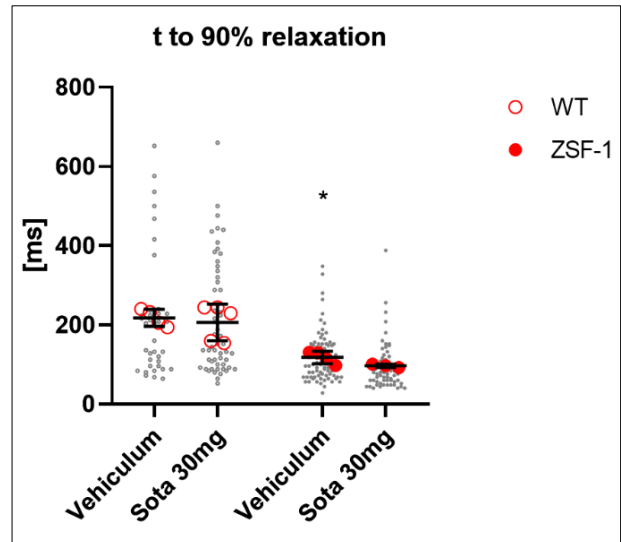


Abb. 35: Zeit bis 90% Relaxation bei 1 Hz;

*= p<0,05 vs. WT+Vehiculum

Es konnte kein Effekt von Sotagliflozin auf die kontraktile Funktion der aus ZSF-1 oder WT Ratten isolierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden (siehe Abb. 29-35). Lediglich im Wildtyp verkürzte Sotagliflozin 30mg/kg KG die diastolische Sarkomerlänge (siehe Abb. 30) und die Zeit bis 50% Relaxation der Kardiomyozyten in vitro geringfügig (siehe Abb. 34).

8.3.2 Erhöhte Stimulationsfrequenz: 2 Hz und 4 Hz

Man konnte bei allen Gruppen einen Anstieg der diast. $[Ca^{2+}]_i$, peak $[Ca^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ Amplitude bei höherer Stimulationsfrequenz in den in vitro Messungen feststellen (siehe Abb. 36, Tab. 5, 6). Ebenfalls war bei allen Gruppen eine Beschleunigung der $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg- und Abfallkinetik, sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der isolierten Kardiomyozyten zu beobachten (siehe Abb. 37, Tab. 5, 6, vgl. Bowditch-Effekt und FDAR). Grundsätzlich konnten bei 2 und 4 Hz ähnliche Beobachtungen wie bei 1 Hz Stimulationsfrequenz gemacht werden (siehe Tab. 5, 6). Einzige Auffälligkeit ist die abfallende peak $[Ca^{2+}]_i$ von ZSF-1 Kardiomyozyten im Vergleich zum Wildtyp bei 2 Hz, sowie bei 4 Hz (siehe Tab. 5, 6). Die geringfügig um 5,4% (bei 2 Hz) und 6,8% (bei 4 Hz) abfallende peak $[Ca^{2+}]_i$ hatte keinen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ Amplitude, sodass die diast. $[Ca^{2+}]_i$ in einem vergleichbaren Ausmaß abgenommen haben muss, was jedoch nicht statistisch signifikant ist (p=0,121 bei 2 Hz und p=0,062 bei 4 Hz; siehe Tab. 5, 6). Die (bei 1 Hz) gesteigerte Geschwindigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ Abfalls in ZSF-1 Kardiomyozyten glich

sich mit steigender Stimulationsfrequenz dem Wildtyp an (siehe Abb. 37 und Tab. 5, 6). Die Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall war bei 2 Hz nur noch um ca. 16% verkürzt (vgl. 30% kürzer bei 1 Hz) und bei 4 Hz nicht mehr unterschiedlich zum Wildtyp. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Zeit bis 50% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall gemacht werden. Die Annäherung von WT und ZSF-1 ist beispielhaft in Abbildung 37 für die Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall gezeigt. Jedoch handelt es sich hierbei nur um numerische Unterschiede zwischen den Mittelwerten, welche analog zur Beobachtung bei 1 Hz, auch bei 2 Hz das Signifikanzniveau knapp verfehlten. Dennoch ist dies ein deutlicher Hinweis auf eine Annäherung von ZSF-1 und Wildtyp hinsichtlich der Geschwindigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ Abfalls.

Bei der Relaxationskinetik war ebenfalls eine Annäherung von ZSF-1 Kardiomyozyten an den Wildtyp zu verzeichnen, wobei diese im Vergleich immer noch deutlich akzeleriert war (siehe Tab 5, 6). Die Kontraktionsamplitude blieb bei isolierten Kardiomyozyten vom WT und ZSF-1 unverändert und unterschied sich weiterhin nicht (siehe Tab. 5, 6).

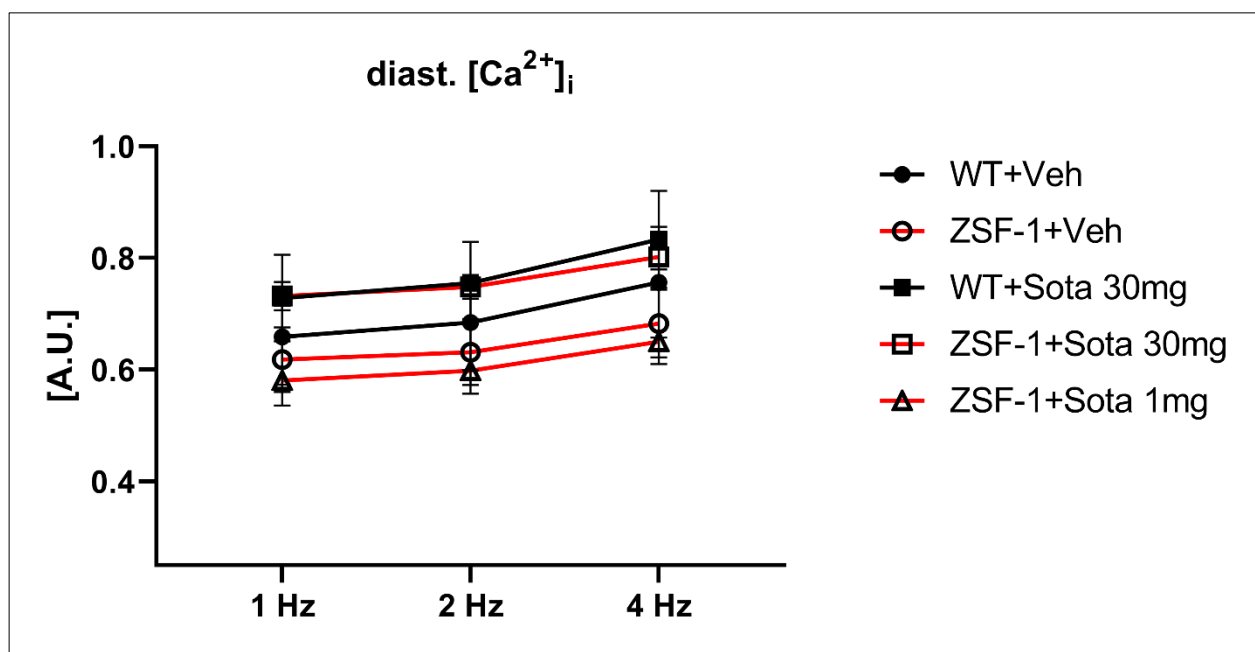


Abb. 36: Frequenzabhängige Änderungen der diast. $[Ca^{2+}]_i$. Darstellung als Mittelwert pro Gruppe \pm Standardabweichung

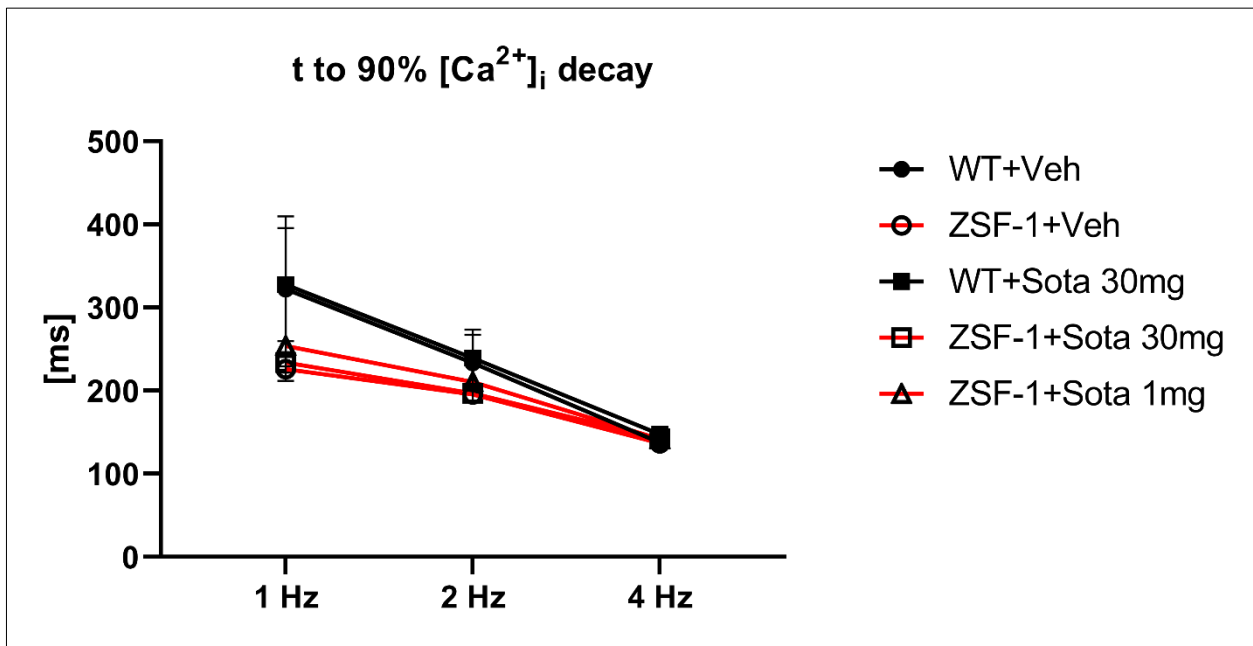


Abb. 37: Frequenzabhängige Änderungen der Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall. Darstellung als Mittelwert pro Gruppe \pm Standardabweichung

Die Behandlung mit Sotalglofizin 30mg/kg KG erhöhte bei den ZSF-1 Kardiomyozyten bei 2 Hz und 4 Hz Stimulationsfrequenz die diast. $[Ca^{2+}]_i$ und die peak $[Ca^{2+}]_i$ signifikant (siehe Abb. 36, Tab. 5, 6). Dieser Effekt konnte bei Kardiomyozyten vom Sotalglofizin-behandelten Wild-Typ nicht beobachtet werden. Sotalglofizin hatte auch bei höherer Stimulationsfrequenz keinen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ Kinetik von ZSF-1 Kardiomyozyten (siehe Tab. 5, 6). Ebenfalls blieb die kontraktile Funktion von ZSF-1 Kardiomyozyten aus der mit Sotalglofizin behandelten Gruppe unverändert. Wie bei 1 Hz bewirkte Sotalglofizin 30mg/kg KG bei 2 Hz im Wildtyp eine Verkürzung der enddiastolischen Sarkomerlänge der Kardiomyozyten in vitro (siehe Tab. 5). Dieser Effekt trat bei 4 Hz nicht mehr auf (siehe Tab. 6). Zusätzlich führte die Behandlung des Wildtyps mit Sotalglofizin in den isolierten Kardiomyozyten zu einer Verlängerung der Zeit bis 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall bei 4 Hz (siehe Tab. 6), sowie zu einer Verkürzung der Zeit bis 50% Relaxation bei 2 Hz (siehe Tab. 5), welche jedoch ein kaum relevantes Ausmaß hatten.

Parameter	WT +Veh	WT +Sota	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota	*	#
n	4	5	4	3		
[Ca ²⁺] _i						
diast. [Ca ²⁺] _i [A.U.]	0,684±0,086	0,755±0,074	0,632±0,059	0,748±0,021	0,121 (ns)	0,016
t to peak [ms]	42,63±7,457	40,387±3,896	29,865±2,536	31,488±3,22	<0,001	0,648 (ns)
peak [Ca ²⁺] _i [A.U.]	1,1±0,136	1,158±0,064	1,038±0,067	1,156±0,017	0,045	0,033
[Ca ²⁺] _i amplitude [A.U.]	0,415±0,096	0,402±0,059	0,406±0,027	0,408±0,028	0,43 (ns)	0,918 (ns)
t to 50% [Ca ²⁺] _i decay [ms]	83,173±15,598	88,405±10,075	71,322±1,925	75,865±4,358	0,103 (ns)	0,506 (ns)
t to 90% [Ca ²⁺] _i decay [ms]	222,702±33,54	239,29±34,359	195,457±7,988	196,948±0,674	0,076 (ns)	0,925 (ns)
SL						
enddiast. SL [μm]	1,744±0,034	1,694±0,003	1,774±0,023	1,771±0,014	0,011	0,842 (ns)
t to peak [ms]	94,209±32,247	101,78±11,928	56,117±6,599	65,156±2,547	<0,001	0,291 (ns)
peak SL [μm]	1,667±0,045	1,617±0,022	1,7±0,028	1,689±0,007	0,01	0,516 (ns)
SL amplitude [μm]	0,077±0,02	0,077±0,019	0,074±0,016	0,082±0,009	0,425 (ns)	0,5 (ns)

Tab. 5: Charakteristika der Ca²⁺- und Kontraktionstransienten bei 2 Hz; Sota= Sotagliflozin 30mg/kg KG, * = p-Wert für WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum, # = p-Wert für ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+Sota 30mg/kg KG

Parameter	WT +Veh	WT +Sota	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota	*	#
SL						
fractional shortening [%]	4,437±1,187	4,545±1,123	4,18±0,882	4,612±0,475	0,354 (ns)	0,506 (ns)
t to 50% relaxation [ms]	88,545±25,548	84,747±12,051	34,957±6,216	41,994±0,923	<0,001	0,168 (ns)
t to 90% relaxation [ms]	162,173±30,974	155,215±35,792	109,617±16,312	84,809±3,274	0,014	0,138 (ns)

Tab. 5 (Fortsetzung): Charakteristika der Ca²⁺- und Kontraktionstransienten bei 2 Hz; Sota= Sotagliflozin 30mg/kg KG, *= p-Wert für WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum, #= p-Wert für ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+Sota 30mg/kg KG

Parameter	WT +Veh	WT +Sota	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota	*	#
n	4	5	4	3		
[Ca²⁺]_i						
diast. [Ca ²⁺] _i [A.U.]	0,757±0,099	0,834±0,087	0,683±0,061	0,802±0,022	0,062 (ns)	0,022
t to peak [ms]	39,628±10,335	39,192±1,833	30,768±0,906	30,239±0,419	0,005	0,852 (ns)
peak [Ca ²⁺] _i [A.U.]	1,219±0,169	1,288±0,088	1,136±0,076	1,281±0,012	0,04	0,044
[Ca ²⁺] _i amplitude [A.U.]	0,462±0,13	0,455±0,063	0,454±0,03	0,479±0,012	0,419 (ns)	0,68 (ns)

Tab. 6: Charakteristika der Ca²⁺- und Kontraktionstransienten bei 4 Hz; Sota= Sotagliflozin 30mg/kg KG, *= p-Wert für WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum, #= p-Wert für ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+Sota 30mg/kg KG

Parameter	WT +Veh	WT +Sota	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota	*	#
[Ca²⁺]_i						
t to 50% [Ca ²⁺] _i decay [ms]	59,981±8,05	65,976±5,664	57,996±2,762	62,832±4,654	0,294 (ns)	0,218 (ns)
t to 90% [Ca ²⁺] _i decay [ms]	137,72±4,87	147,828±5,574	136,976±11,118	142,269±9,143	0,873 (ns)	0,435 (ns)
SL						
enddiast. SL [μm]	1,719±0,038	1,679±0,006	1,759±0,024	1,761±0,016	0,001	0,848 (ns)
t to peak [ms]	75,393±19,912	83,912±5,477	53,187±5,636	62,942±5,958	<0,001	0,069 (ns)
peak SL [μm]	1,644±0,054	1,589±0,032	1,678±0,03	1,659±0,015	0,019	0,404 (ns)
SL amplitude [μm]	0,076±0,017	0,091±0,032	0,082±0,016	0,102±0,004	0,993 (ns)	0,198 (ns)
fractional shortening [%]	4,391±1,024	5,368±1,929	4,649±0,933	5,767±0,201	0,903 (ns)	0,223 (ns)
t to 50% relaxation [ms]	66,479±8,529	65,193±10,038	32,106±3,768	37,088±0,562	<0,001	0,188 (ns)
t to 90% relaxation [ms]	116,104±22,67	98,985±14,541	76,427±6,043	69,676±1,716	<0,001	0,334 (ns)

Tab. 6 (Fortsetzung): Charakteristika der Ca²⁺- und Kontraktionstransienten bei 4 Hz; Sota= Sotalidol 30mg/kg KG, *= p-Wert für WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum, #= p-Wert für ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+Sota 30mg/kg KG

8.3.3 Dosisabhängige Unterschiede bei der Behandlung mit Sotagliflozin

Die bei ZSF-1 Ratten durch Sotagliflozin herbeigeführte Erhöhung der diast. $[Ca^{2+}]_i$ und peak $[Ca^{2+}]_i$ der isolierten Kardiomyozyten konnte nur mit einer Dosis von 30mg/kg KG herbeigeführt werden (siehe Tab. 7). Bei einer Dosis von 1mg/kg KG wurden keine signifikanten Veränderungen erreicht. Dies gilt für alle Stimulationsfrequenzen.

Parameter	Stim.- Freq.	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota 1mg	ZSF-1 +Sota 30mg	*	#
n		4	4	3		
$[Ca^{2+}]_i$						
diast. $[Ca^{2+}]_i$ [A.U.]	1	0,618±0,058	0,581±0,045	0,732±0,025	0,29 (ns)	0,004
	2	0,632±0,059	0,599±0,042	0,748±0,021	0,337 (ns)	0,004
	4	0,683±0,061	0,65±0,04	0,802±0,022	0,389 (ns)	0,006
peak $[Ca^{2+}]_i$ [A.U.]	1	1,039±0,058	1,015±0,087	1,128±0,021	0,683 (ns)	0,033
	2	1,038±0,067	1,03±0,089	1,156±0,017	0,985 (ns)	0,032
	4	1,136±0,076	1,137±0,114	1,281±0,012	0,9 (ns)	0,054 (ns)

Tab. 7: Dosisabhängige Veränderungen der von Sotagliflozin beeinflussten Transientenparameter; *= p-Wert für ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+Sota 1mg/kg KG, #= p-Wert für ZSF-1+Sota 1mg/kg KG vs. ZSF-1+Sota 30mg/kg KG

8.4 Koffein-induzierte Ca^{2+} -Transienten

Gruppe	Anzahl Versuchstiere	Anzahl Zellen pro Gruppe	Anzahl Zellen pro Versuchstier
Gesamt	19	105	105
WT+Vehiculum	3	9	2
			4
			3
WT+Sotagliflozin 30mg	5	21	2
			4
			2
			6
			7
ZSF-1+Vehiculuim	4	27	8
			5
			7
			7
ZSF-1+Sotagliflozin 1mg	4	29	10
			4
			6
			9
ZSF-1+Sotagliflozin 30mg	3	19	6
			4
			9

Tab. 8: Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und Zellzahl pro Versuchstier für die Analyse der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ und NCX-Aktivität zwischen allen Gruppen festgestellt werden (siehe Tab. 9). Jedoch lässt der Vergleich der Mittelwerte eine möglicherweise reduzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Amplitude der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten und damit verminderte Ca^{2+} -Beladung des SR vermuten (siehe Tab. 9), was im Einklang mit der verminderten peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Ca^{2+} -Transienten bei 2 und 4 Hz steht (siehe Tab. 5, 6). Die NCX-Aktivität, gemessen an der tau Zeitkonstante des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Abfalls, war bei den ZSF-1 Kardiomyozyten um fast 44% erhöht (vs. WT+Vehiculum), sodass in der Zusammenschau mit der ebenfalls verminderten Zeit bis 50% bzw. 90% $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Abfall eine erhöhte NCX-Aktivität vermutet werden kann (siehe Tab. 9). Sotagliflozin hatte keinen relevanten Effekt auf den SR Ca^{2+} -Gehalt oder die NCX-Aktivität (siehe Tab. 9).

Parameter	WT +Veh	WT +Sota	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota	*	#
n	3	5	4	3		
[Ca²⁺]_i						
peak [Ca ²⁺] _i [A.U.]	1,368±0,123	1,385±0,144	1,282±0,056	1,333±0,116	0,481 (ns)	0,704 (ns)
[Ca ²⁺] _i amplitude [A.U.]	0,627±0,086	0,585±0,205	0,446±0,054	0,497±0,091	0,215 (ns)	0,646 (ns)
t to 50% [Ca ²⁺] _i decay [s]	1,25±0,732	1,173±0,259	0,915±0,134	0,95±0,013	0,094 (ns)	0,867 (ns)
t to 90% [Ca ²⁺] _i decay [s]	2,533±1,262	2,841±0,768	2,101±0,315	2,19±0,482	0,253 (ns)	0,718 (ns)
tau decay const. [ms]	2,148±1,342	1,935±0,793	1,396±0,376	1,412±0,148	0,107 (ns)	0,987 (ns)

Tab. 9: Charakteristika der Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten; Sota= Sotagliflozin 30mg/kg KG, *= p-Wert für WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum, #= p-Wert für ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+Sota 30mg/kg KG

8.5 Myofilamentsensitivität und Relaxation

Insgesamt wurden 15,98% der Zellen von der statistischen Analyse ausgeschlossen, da der Regressionskoeffizient der dazugehörigen Hysterese-Schleife <0,7 betrug. Die Ausschlussmengen der einzelnen Gruppen sind, zusammen mit der Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und der untersuchten Zellzahl pro Gruppe, der Tabelle 10 und 11 zu entnehmen. Die akzeptable Ausschlussrate repräsentiert die Güte des Modells und belegt die adäquate Auswahl des analysierten Zeitraums zwischen der Zeit bis 50% und 90% [Ca²⁺]_i Abfall. Es konnten keine relevanten Unterschiede in der Qualität des linearen Fit (R²) zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Tab. 12, 13).

Stim.- Freq.	Gruppe	Anz. Versuchstiere	Anz. gemessene Zellen/ Gruppe	Anz. Zellen/ Versuchstier	Anz. Zellen R<0,7/ Tier
1 Hz	WT+Veh	4	33	6/14/1/12	0/4/0/4
	WT+Sota 30mg	5	39	10/6/5/6/12	2/1/0/1/1
	ZSF-1+Veh	4	74	17/20/19/18	1/2/3/4
	ZSF-1+Sota 1mg	4	70	21/11/18/20	2/2/2/2
	ZSF-1+Sota 30mg	3	50	15/5/30	3/1/6
2 Hz	WT+Veh	4	33	6/14/1/12	1/5/0/3
	WT+Sota 30mg	5	39	10/6/5/6/12	2/0/0/2/1
	ZSF-1+Veh	4	74	17/20/19/18	1/3/2/3
	ZSF-1+Sota 1mg	4	70	21/11/18/20	3/1/2/1
	ZSF-1+Sota 30mg	3	50	15/5/30	3/1/5
4 Hz	WT+Veh	4	33	6/14/1/12	0/3/0/3
	WT+Sota 30mg	5	39	10/6/5/6/12	3/1/1/0/0
	ZSF-1+Veh	4	74	17/20/19/18	2/3/4/3
	ZSF-1+Sota 1mg	4	70	21/11/18/20	4/1/2/3
	ZSF-1+Sota 30mg	3	50	15/5/30	1/0/7

Tab. 10: Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe und Zellzahl pro Versuchstier für die Analyse der Myofliamentsensitivität

	WT +Veh	WT +Sota 30mg	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota 1mg	ZSF-1 +Sota 30mg	Σ
n gesamt	33	39	74	70	50	266
1Hz	25	34	64	62	40	225
Auss.-Rate 1Hz [%]	24,24	12,82	13,51	11,43	20,0	16,4
2Hz	24	34	65	63	41	227
Auss.-Rate 2Hz [%]	27,27	12,82	12,16	10,0	18,0	16,05
4Hz	27	34	62	60	42	225
Auss.-Rate 4Hz [%]	18,18	12,82	16,22	14,29	16,0	15,5
Σ [%]	23,23	12,82	13,96	11,91	18	15,98

Tab. 11: Ausschlussraten (MFS)

Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Ca^{2+} -abhängigen Verhalten der Myofilamente (siehe Abb. 38). ZSF-1 Kardiomyozyten hatten eine stark erhöhte Myofilamentsensitivität (bei 1 Hz Feldstimulation) im Vergleich zum Wildtyp, welche durch eine geringere Steigung der linearen Regressionsgerade bezeichnet ist (siehe Abb. 38, 39).

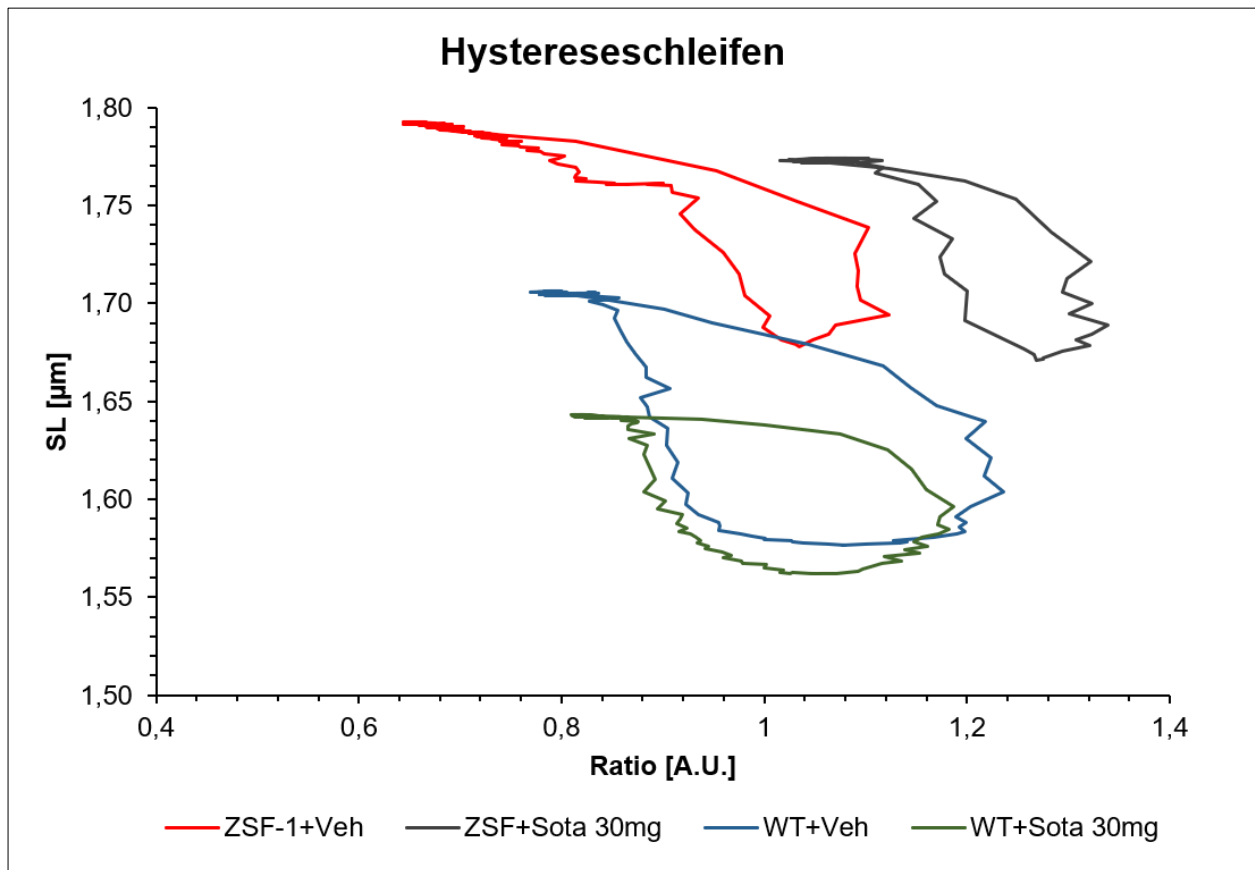


Abb. 38: Qualitative Unterschiede der Konfiguration der Hystereseschleifen zwischen den Gruppen WT+Vehiculum, WT+Sotagliflozin 30 mg/kg KG, ZSF-1+Vehiculum und ZSF-1+Sotagliflozin 30 mg/kg KG bei 1 Hz

Eine ähnliche Beobachtung konnte bei 2 und 4 Hz Feldstimulation gemacht werden (siehe Abb. 40, 41).

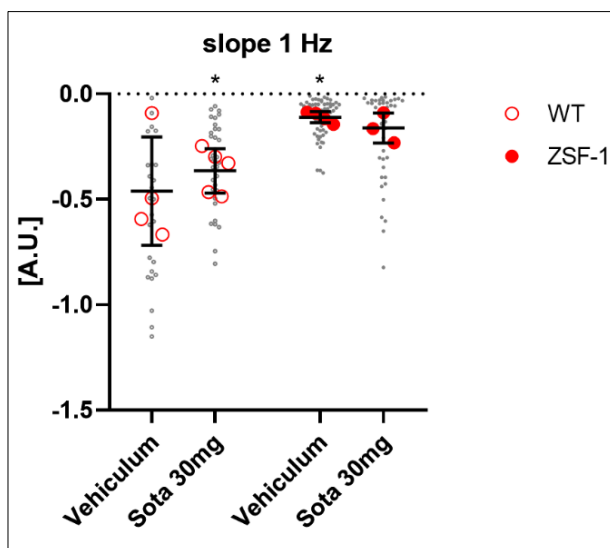


Abb. 39: Myofilamentsensitivität bei 1 Hz;

*= $p \leq 0,05$ vs. WT+Vehiculum

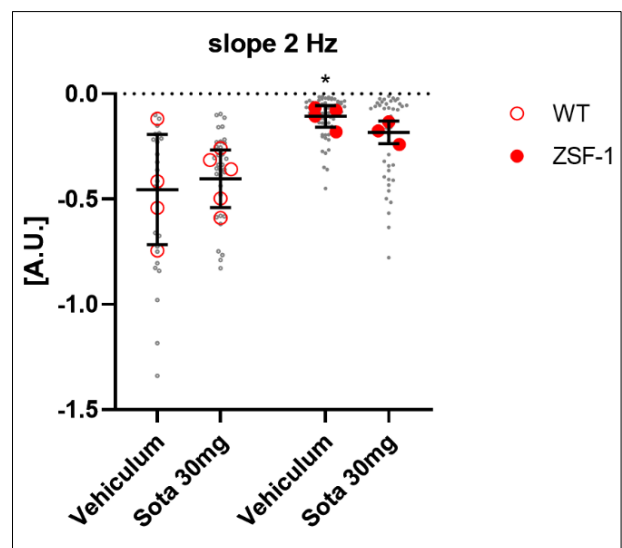


Abb. 40: Myofilamentsensitivität bei 2 Hz;

*= $p \leq 0,05$ vs. WT+Vehiculum

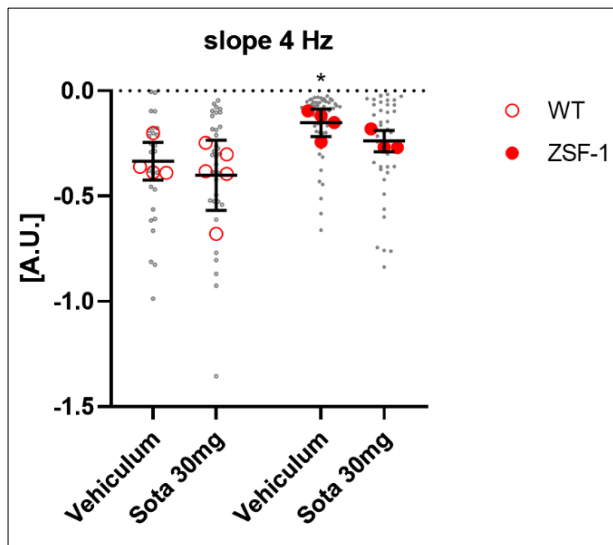


Abb. 41: Myofilamentsensitivität bei 4 Hz;

*= $p \leq 0,05$ vs. WT+Vehiculum

In den aus mit Sotagliflozin 30mg/kg KG behandelten ZSF-1 Ratten isolierten Kardiomyozyten lässt sich eine Abnahme der Myofilamentsensitivität unter Sotagliflozin vermuten. Der Betrag der negativen Steigung der linearen Regressionsgerade war bei allen Stimulationsfrequenzen um durchschnittlich 58% erhöht, welches ein Zeichen für eine geringere Ca^{2+} -Affinität der Myofilamente ist (siehe Abb. 39-41). Bei einer Dosis von 1mg/kg KG konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden (siehe Abb. 42-44). Dennoch blieb die Myofilamentsensitivität im Vergleich zur Kontrolle auch nach der Behandlung mit Sotagliflozin erhöht (siehe Abb. 39-41). Trotz der im Schnitt um 58% höheren Steigung bei 30mg/kg KG und 86% bei 1mg/kg KG war keiner dieser Effekte von Sotagliflozin statistisch signifikant. Konträr zu dieser Beobachtung erhöhte Sotagliflozin in WT Kardiomyozyten bei einer Dosis von 30mg/kg KG die Myofilamentsensitivität bei 1 Hz signifikant (siehe Abb. 39).

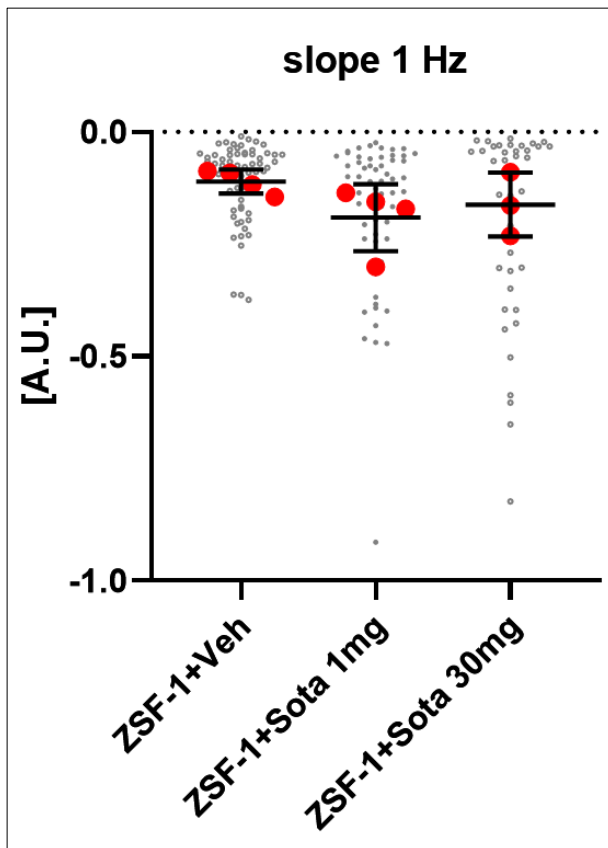


Abb. 42: Dosisabhängige Veränderungen der MFS bei 1 Hz

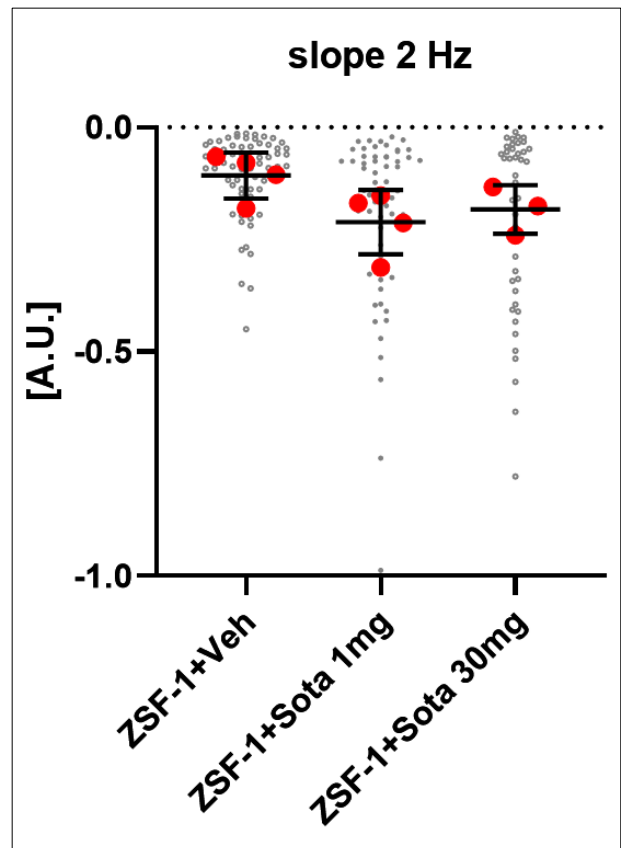


Abb. 43: Dosisabhängige Veränderungen der MFS bei 2 Hz

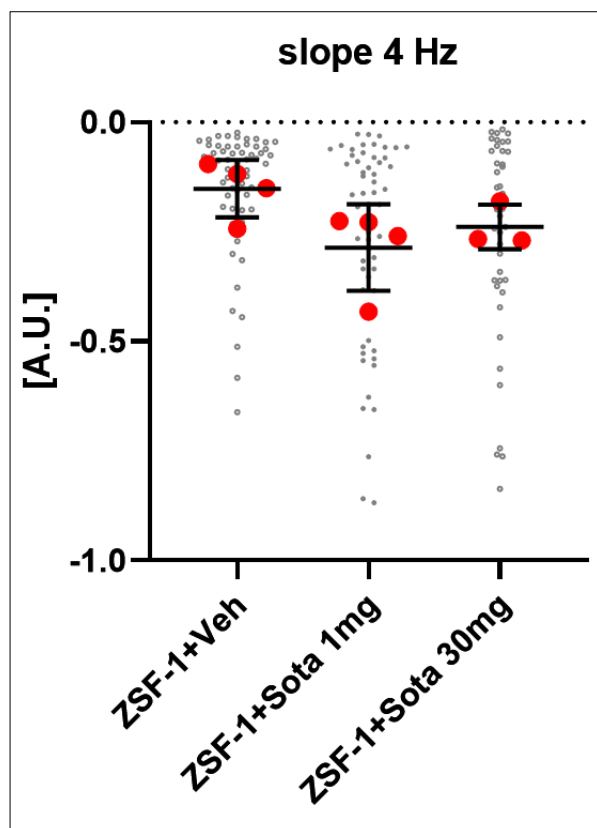


Abb. 44: Dosisabhängige Veränderungen der MFS bei 4 Hz

Der sich zwischen den Gruppen nicht relevant unterscheidende Regressionskoeffizient R^2 zeigt, dass das lineare Modell, auch bei beeinflusstem kontraktilem Apparat und veränderter Myofilamentsensitivität, zu einer guten Annäherung führt. Er zeigt, dass sich die Sarkomerlänge selbst bei einem starken Anstieg der Myofilamentsensitivität in der Zeit zwischen 50% und 90% $[Ca^{2+}]_i$ Abfall linear zur $[Ca^{2+}]_i$ verhält (siehe Tab. 12, 13). Lediglich bei 2 Hz unterschied sich R^2 zwischen den Gruppen ZSF-1+Vehiculum und ZSF-1+Sotagliflozin 30mg/kg KG in einem nicht relevanten Ausmaß (siehe Tab. 12).

Frequenz	WT +Veh	WT +Sota	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota	*	#
n	4	5	4	3		
1 Hz	0,8216±0,095	0,8126±0,036	0,845±0,035	0,798±0,03	0,052 (ns)	0,234 (ns)
2 Hz	0,811±0,077	0,824±0,043	0,846±0,009	0,799±0,012	0,073 (ns)	0,026
4 Hz	0,826±0,044	0,826±0,031	0,811±0,019	0,837±0,018	0,912 (ns)	0,391 (ns)

Tab. 12: Versuchsgruppen übergreifende Konstanz von R^2 ; Sota= Sotagliflozin 30mg/kg KG; *= p-Wert für WT+Vehiculum vs. ZSF-1+Vehiculum, #= p-Wert für ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+Sota 30mg/kg KG

Frequenz	ZSF-1 +Veh	ZSF-1 +Sota 1mg	ZSF-1 +Sota 30mg	*	#
n	4	4	3		
1 Hz	0,845±0,035	0,833±0,03	0,798±0,03	0,236 (ns)	0,887 (ns)
2 Hz	0,846±0,009	0,835±0,023	0,799±0,012	0,456 (ns)	0,118 (ns)
4 Hz	0,811±0,019	0,841±0,014	0,837±0,018	0,110 (ns)	0,555 (ns)

Tab. 13: Dosisabhängiger Effekt von Sotagliflozin auf R^2 ; *= p-Wert für ZSF-1+Vehiculum vs. ZSF-1+ Sota 1mg/kg KG, #= p-Wert für ZSF-1+Sota 1mg/kg KG vs. ZSF-1+Sota 30mg/kg KG

9. Diskussion

In dieser Studie haben wir gezeigt, dass bei durch das metabolische Syndrom bedingter HFpEF die diastolische Dysfunktion in vivo nicht mit einer Störung der kardiomyozytären Ca^{2+} -Homöostase und Relaxation in vitro einhergeht. Kardiomyozyten von ZSF-1 Ratten zeigen nach 23 Wochen einen akzelerierten Ca^{2+} - und Kontraktionszyklus, sowie eine erhöhte Myofilamentsensitivität. Sotalgliflozin hat keinen vorteilhaften Effekt auf die kontraktile Funktion der ZSF-1 Kardiomyozyten in vitro. Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Studie sind in der Abbildung 45 graphisch zusammengefasst.

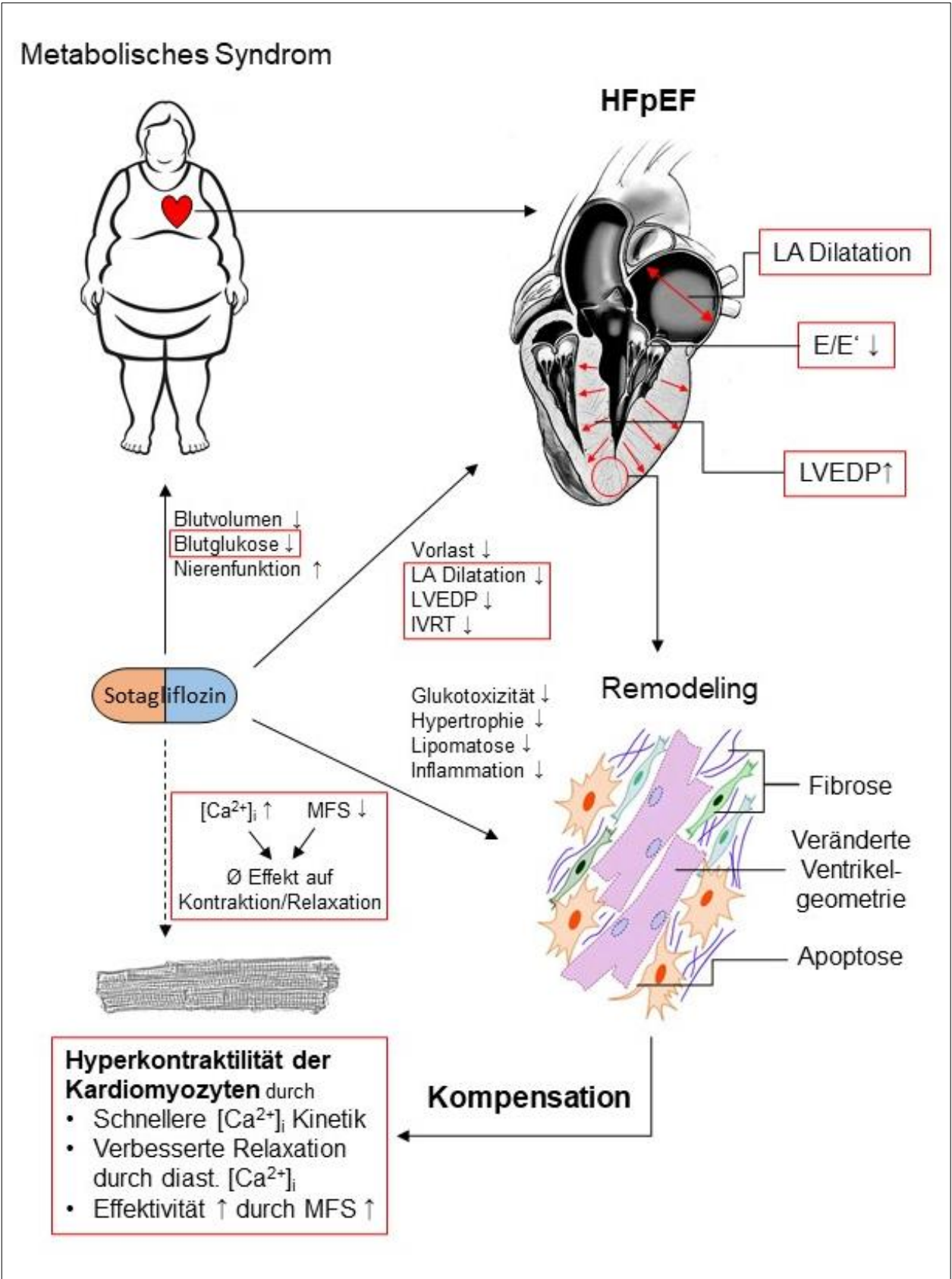


Abb. 45: Graphische Zusammenfassung der Studie. Direkte Erkenntnisse dieser Studie rot umrandet. In vivo Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. Uwe Primessnig. Atriale Daten siehe Bode et al. [51]. Grafikelemente modifiziert nach [102–104].

9.1 Validierung des ZSF-1 Modell

Die ZSF-1 obese Ratte entwickelte während der Versuchsdauer ein erhöhtes Körpergewicht und zeigte erhöhte Blutglukosekonzentrationen, was zur metabolischen Induktion einer Herzinsuffizienz mit diastolischer Dysfunktion führte (Primessnig DGK Herztage 2019 [101]). Zum Zeitpunkt der in vitro Untersuchungen zeigte die ZSF-1 obese Ratte deutliche Zeichen einer strukturellen Herzerkrankung mit erhöhtem Herzgewicht, LV-Masse und LV-Wandstärke, sowie dilatiertem LA (Primessnig DGK Herztage 2019 [101]). Eine diastolische Dysfunktion bei erhaltener Pumpfunktion konnte in der Echokardiographie mit den dargestellten Parametern (siehe 8.1) und einer erhöhten isovolumetrischen Relaxationszeitkonstante (IVRT/HR) nachgewiesen werden (Primessnig DGK Herztage 2019 [101]). Die hämodynamische Katheteruntersuchung bestätigte diese Befunde. Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen bereits durchgeführter Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen mit dem ZSF-1 Modell (Vorstudie unserer Arbeitsgruppe [93], [50, 90, 92, 105]). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die ZSF-1 Ratte ein durchaus geeignetes Modell zur Erforschung von HFpEF mit metabolischer Komponente ist und der menschlichen Pathologie sehr nahekommt. Die stabile Ausprägung des HFpEF-typischen Phänotyps in vivo bot daher die ideale Grundlage zur Überprüfung der Hypothesen dieser Arbeit in den in vitro Untersuchungen.

9.2 Zelluläre Kompensation der diastolischen Dysfunktion

In diesem Krankheitsmodell von HFpEF kontrastiert der in vitro Phänotyp der Kardiomyozyten drastisch mit der gestörten diastolischen Funktion in vivo.

Parallel zur erhaltenen Pumpfunktion in vivo konnte nach 23 Wochen keine Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$ Amplitude der Kardiomyozyten in vitro festgestellt werden. Folglich zeigten die ZSF-1 Kardiomyozyten keine eingeschränkte Kontraktilität, was dem typischen klinischen Bild von HFpEF entspricht und auch im Einklang mit den vorrausgegangenen in vivo Untersuchungen dieser Versuchsreihe steht (siehe 8.1 und 9.1). Erstaunlicherweise ist die in vivo diastolische Dysfunktion in diesem Versuch nicht auf eine gestörte Relaxation der isolierten Kardiomyozyten zurückzuführen. Vielmehr konnten wir eindrucksvoll zeigen, dass ZSF-1 Kardiomyozyten sich in diesem Stadium der Erkrankung in einem

hyperkontraktilen Zustand befinden. Die akzelerierte Kontraktions-/Relaxationskinetik und die erhöhte enddiastolische Sarkomerlänge deuten auf einen zellulären Kompensationsmechanismus, als Folge der diastolischen Dysfunktion in vivo hin. Dem zugrunde liegend fanden wir eine intakte $[Ca^{2+}]_i$ Homöostase mit beschleunigter Ca^{2+} -Freisetzungs- und -Abfallkinetik im Zytosol. Die erhöhte enddiastolische Sarkomerlänge bei ZSF-1 Kardiomyozyten lässt sich ebenfalls durch die von uns vermutete akzelerierte Kinetik des Ca^{2+} -Abfalls erklären, da es eine gewisse Zeitverzögerung zwischen Ca^{2+} -Anstieg/Abfall und Kontraktion/Relaxation gibt. Diese Verzögerung stellt die Zeit dar, die es benötigt bis das Ca^{2+} aus dem Zytosol dem Konzentrationsgefälle folgend in das Subkompartiment des Sarkomers diffundiert ist und umgekehrt, sowie die Zeit für die mechanische Myofilamentaktivität. Da sich bei schnellerem Ca^{2+} -Abfall das Sarkomer länger in niedrigerer $[Ca^{2+}]_i$ befindet, kommt es zu einer vermehrten Inaktivierung des Querbrückenzyklus und zu einer stärkeren Relaxation bis zur nächsten Kontraktion. Darüber hinaus ist durch die abfallende peak $[Ca^{2+}]_i$ unter höherer Stimulationsfrequenz bei gleichbleibender $[Ca^{2+}]_i$ Amplitude zu vermuten, dass die $[Ca^{2+}]_i$ insgesamt abgenommen hat. Durch die gleichzeitige Steigerung der Myofilaments sensitivität hat sich möglicherweise ein neues Gleichgewicht eingestellt, in dem die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten (Kontraktionsamplitude und fractional shortening) auf einem niedrigeren $[Ca^{2+}]_i$ Niveau gehalten werden konnte. Durch die verminderte diast. $[Ca^{2+}]_i$ kommt es in unserem Versuch, trotz gesteigerter Myofilaments sensitivität, zu einer stärkeren Relaxation der ZSF-1 Kardiomyozyten. Die Hypothese der erhöhten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ Abfallgeschwindigkeit als Ursache einer zellulären Relaxationsstörung, die zur diastolischen Dysfunktion führt, kann damit abgelehnt werden. Ob die diast. $[Ca^{2+}]_i$ und Relaxation der Kardiomyozyten unter Lastbedingungen (in diesem Versuch „unloaded cardiomyocytes“) und in Gegenwart neuroendokriner und parakriner Faktoren, direkter Zell-Zell-Kontakte und unter den metabolischen Bedingungen in vivo mit den Bedingungen in vitro vergleichbar sind, können wir jedoch nicht sagen. Die Ergebnisse dieser Studie belegen aber, dass die intrinsische Funktion der Kardiomyozyten nicht die Ursache der diastolischen Dysfunktion ist.

Die Funktion der ZSF-1 Kardiomyozyten bleibt, gemessen an der Kontraktion, im Vergleich zum Wildtyp auch unter chronotroper Belastung verbessert. Jedoch nehmen die Unterschiede zwischen ZSF-1 und Wildtyp Kardiomyozyten in der Geschwindigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ Abfalls unter höheren Frequenzen ab. Das lässt auf eine eingeschränkte

Belastungskapazität der isolierten Kardiomyozyten schließen, da die $[Ca^{2+}]_i$ Abfallkinetik nicht mehr im selben Ausmaß wie beim Wildtyp beschleunigt werden kann. Die abnehmende peak $[Ca^{2+}]_i$ bei höherer Stimulationsfrequenz ist ein Zeichen dafür, dass es durch die vermehrte Ca^{2+} -Freisetzung zu einer Entladung des SR kommt und die Belastungskapazität der zellulären Ionenhomöostase reduziert ist. Dies kann ein Zeichen einer diabetischen Schädigung der Kardiomyozyten sein, welche sich auch durch einen verminderten Ca^{2+} -Gehalt des SR manifestieren kann (siehe 6.4.1).

Die gewonnenen Erkenntnisse stehen im Widerspruch zum supprimierten Ca^{2+} - und Kontraktionszyklus der Kardiomyozyten, welcher typisch für HF_rEF ist. Insgesamt lassen sich trotz der metabolischen Komponente in diesem Modell deutliche Parallelen zu dem Hypertrophie-assoziierten Modell von HF_pEF (HHR), welches von Curl et al. beschrieben wurde, ziehen [45]. Hier kommt es auf kardiomyozytärer Ebene ebenfalls zu einer Akzeleration des Ca^{2+} - Zyklus und zu einer gesteigerten Kontraktilität [45]. Eine Erhöhung der diast. $[Ca^{2+}]_i$ mit nachstehender zellulärer Relaxationsstörung, wie sie sich in der Studie von Curl et al. [45] darstellte und auch beim Menschen mit hypertensiver Herzkrankheit und HF_pEF gefunden wurde [106], zeigte sich in unserem Versuch jedoch nicht. Es ist anzunehmen, dass es sich bei der Akzeleration des Ca^{2+} - Zyklus und der gesteigerten Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten um einen Kompensationsmechanismus gegen die erhöhte Steifigkeit der EZM (kardiales Remodeling und Fibrose) und eine erhöhte aktive und passive Steifigkeit der Myofilamente handelt [45]. Curl et al. konnten eine direkte Beziehung von Hypertrophie der Kardiomyozyten und erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ feststellen [45]. Dieser Zustand ist von der Ätiologie und vermutlich auch vom Alter abhängig. In Vorstudien unserer Arbeitsgruppe konnten in von 28 Wochen alten ZSF-1 obese Ratten isolierten Kardiomyozyten sowohl eine verminderte Ca^{2+} -Amplitude, als auch ein verlangsamter $[Ca^{2+}]_i$ Abfall bewiesen werden [93]. Miranda-Silva et al. haben im selben Modell ebenfalls nach 28 Wochen einen verlangsamten $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg und Abfall, zusammen mit einer erhöhten diast. $[Ca^{2+}]_i$ bei gleichbleibender $[Ca^{2+}]_i$ Amplitude festgestellt [105]. Zusätzlich wurde in diesem Versuch eine konsekutive Verlangsamung der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der isolierten Kardiomyozyten gezeigt [105].

Im Nephrektomie-induzierten HF_pEF-Modell ist, ähnlich zu diesem Versuch, keine erhöhte diast. $[Ca^{2+}]_i$ festzustellen [53]. In der Studie von Primessnig et al. konnten, wie

in diesem Versuch, keine für die Kardiomyozytenfunktion relevanten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in vitro festgestellt werden. Primessnig et al. haben jedoch einen verlangsamten $[Ca^{2+}]_i$ Abfall und daraus resultierender zellulärer Relaxationsstörung nachgewiesen [54], was sich in unserer Studie nicht darstellte. In diesem als auch in unserem Versuch verlangsamte sich die $[Ca^{2+}]_i$ Abfall Kinetik mit zunehmender Stimulationsfrequenz im Vergleich zur Kontrolle [53], was wie die abfallende peak $[Ca^{2+}]_i$ in unserem Versuch ein Zeichen einer eingeschränkten Belastungskapazität der Kardiomyozyten ist. Ein Grund für die eingeschränkte Belastungskapazität in unserer Studie könnte ein vermindertes β -Adrenorezeptor-Signaling sein, was Hamdani et al. bereits in einem hypertensiven HFpEF-Modell nachweisen konnten [49]. Dadurch dass die PKA weniger aktiv ist, kann die Leistungsfähigkeit der am Ca^{2+} -Handling beteiligten Proteine, Transporter und Kanäle (v.a. PLB, SERCA, LTCC, RyR und NKA) durch Phosphorylierung nicht weiter gesteigert werden. Unter physiologischen Bedingungen würde die β -adrenerg induzierte Steigerung der cAMP-Konzentration die PKA aktivieren [26]. Die PKA-abhängige Phosphorylierung der Ca^{2+} -Kanäle (u.a. LTCC) würde den transsarcolemmalen Ca^{2+} -Einstrom erhöhen [18, 26]. Das wiederum würde die Offenwahrscheinlichkeit des RyR erhöhen und zu einem gesteigertem CICR aus dem eng benachbarten SR führen [26]. Der RyR wird ebenfalls von der PKA phosphoryliert, was dessen Offenwahrscheinlichkeit zusätzlich erhöhen würde [18, 26, 27, 107]. Gleichzeitig würde auch die Ca^{2+} -Wiederaufnahme gesteigert werden, was zusammen mit der erhöhten Ca^{2+} -Freisetzung auch zu einer stärkeren Ca^{2+} -Beladung des SR führen würde (erhöht ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit des RyR) [18, 26, 29]. Ohne diesen Mechanismus ist die physiologisch positive Bowditch-Treppe aufgehoben. Bei Diabetes mellitus ist das β -Adrenorezeptor-Signaling gestört, sodass dieser Aspekt im ZSF-1 Modell wahrscheinlich eine besondere Bedeutung hat [76].

Sowohl in der Studie von Curl et al., als auch in der Studie von Primessnig et al. zeigte sich eine erhöhte Proarrhythmogenität, die durch spontane und dyssynchrone Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR gekennzeichnet waren [45, 53]. Das AP-unabhängige Ca^{2+} -Leck in die Mikrodomäne von SR, LTCC und NCX (fuzzy space) kann DADs, Arrhythmien und plötzlichen Herztod zur Folge haben [39]. Als Ursachen zeigten sich in beiden Studien Veränderungen im Expressions- und Phosphorylierungsmuster der Schlüsselproteine des SR Ca^{2+} -Handlings [45, 53]. Curl et al. [45] konnten eine verminderte Expression der SERCA2a, PLB und des RyR nachweisen. Zusätzlich wiesen die Proteine einen hohen Phosphorylierungsstatus auf, sodass sich die erhöhte

Proarrhythmogenität damit begründen lässt. Dies macht eine pathologische Aktivierung bzw. Deaktivierung von second-messenger-Systemen wie CaMKII, PKA, PKC und PKG wahrscheinlich. In einer Studie von Runte et al. [106] konnten bei hypertensiven Patienten mit HFpEF keine Veränderungen in der Expression der Na⁺- und Ca²⁺-Transporter nachgewiesen werden.

9.2.1 Gesteigerte Aktivität des Na⁺-Ca²⁺-Austauschers

Die abnehmende maximale [Ca²⁺]_i unter schnellerer Stimulation und die reduzierte [Ca²⁺]_i Amplitude der Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten könnten Zeichen dafür sein, dass es durch die vermehrte Ca²⁺-Freisetzung zu einer Entladung des SR kommt. Möglicherweise ist die SERCA-Aktivität eingeschränkt und befindet sich bereits bei 1 Hz (unter in vitro Bedingungen) nahe ihrer Leistungsgrenze. Alternativ könnte es auch zu einer diffusen Ca²⁺-Freisetzung aus „leaky“ Ryanodin-Rezeptoren kommen, die den SR-Ca²⁺-Speicher leeren (vgl. HFrEF [26, 34, 35, 39]). In beiden Fällen ist die NCX-Aktivität im Vorwärtsmodus gesteigert, wodurch ein Anstieg der diast. [Ca²⁺]_i verhindert wird. Möglicherweise wird durch den Anstieg der NCX-Aktivität ein neuer steady state erreicht, der durch die „überkompensatorische“ Senkung der diast. [Ca²⁺]_i die ausreichende zytosolische [Ca²⁺]_i Amplitude wiederherstellt, um die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten zu sichern.

Die beschleunigte Zeitkonstante des [Ca²⁺]_i Abfall tau der Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten zeigte eine um 40% erhöhte Aktivität des sarkolemmalen NCX im Vorwärtsmodus bei ZSF-1 Kardiomyozyten. Ebenso waren die Zeiten bis 50% und 90% [Ca²⁺]_i Abfall um 31% bzw. 22% verkürzt, wenn auch all diese Unterschiede nicht statistisch signifikant waren. Dies könnte vor allem durch die kleine n-Zahl und die verhältnismäßig große Streuung in der WT+Vehiculum Gruppe bedingt sein, weshalb wir von einem Fehler 2. Art bei der statistischen Analyse der Koffein-induzierten Ca²⁺-Transienten ausgehen. Daher lehnen wir in der Zusammenschau mit den Ergebnissen der Ca²⁺-Transientenanalyse (verminderte peak [Ca²⁺]_i) und den Mangel an gegenteiligen Beweisen die Nullhypothese trotzdem ab.

Die gesteigerte NCX-Aktivität könnte die beginnende Dekompensation der Ca²⁺-Homöostase unter chronotroper Belastung erklären. Gesteigerte NCX-Aktivität wird

klassischer Weise mit HFrEF in Verbindung gebracht [26, 39]. Durch eine reduzierte SERCA-Aktivität akkumuliert Ca^{2+} bei hoher Frequenz stärker im Zytosol. Miranda-Silva et al. haben in Kardiomyozyten von 28 Wochen alten ZSF-1 Ratten eine erhöhte Expression von PLB im Vergleich zu ZSF-1 lean Kardiomyozyten festgestellt [105]. Durch den geringeren SERCA/PLB-Quotienten und die zusätzlich verminderte Phosphorylierung von PLB kommt es zu einer verminderten Ca^{2+} -Aufnahme des SR [105]. Hier scheint es eine Überschneidung zu HFrEF zu geben, bei der der SERCA/PLB-Quotient und die SERCA-Aktivität ebenfalls vermindert ist [35, 39]. Dadurch wird eine kompensatorisch höhere NCX-Aktivität im Vorwärtsmodus nötig, um einen Anstieg der diast. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu verhindern. Das ist insofern schlüssig, da bei ZSF-1 Kardiomyozyten nach 23 Wochen die diast. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht erhöht ist im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch führt die erhöhte NCX-Aktivität im Vorwärtsmodus auch zu einer Entladung des SR, da das Ca^{2+} die Zelle verlässt. Zum einen sinkt dadurch die absolute Menge an Ca^{2+} , die durch das SR freigesetzt werden kann, zum anderen sinkt die Offenwahrscheinlichkeit des RyR, was beides zu verminderter Ca^{2+} -Freisetzung führt. Durch unsere Studie lässt sich nicht ausschließen, dass es zu einer Entladung des SR gekommen ist. Obwohl sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Amplituden der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten von ZSF-1 Kardiomyozyten nicht signifikant vom Wildtyp unterscheiden, kann man in vitro eine Tendenz zu einer verminderten Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR erkennen. So lehnen wir auch hier aufgrund der niedrigen Power unseres statistischen Tests (kleiner Stichprobenumfang, sowie hohes Streuungsmaß) die Nullhypothese ab, da wahrscheinlich ein Fehler 2. Art vorliegt (siehe auch Zeit bis 50% und 90% $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Abfall, sowie Zeitkonstante des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Abfall tau). Bereits in Vorversuchen zu dieser Studie konnte eine signifikante Verminderung der sarkoplasmatischen $[\text{Ca}^{2+}]$ nach 28 Wochen gefunden werden [93]. Beim Menschen mit hypertensiver Herzkrankheit und HFpEF ist eine Zunahme der diast. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kardiomyozyten bei steigender Frequenz nachweisbar, was ebenfalls ein Zeichen verminderter SERCA-Aktivität und nicht ausreichender NCX-Aktivität im Vorwärtsmodus ist [105, 106].

Die gesteigerte NCX-Aktivität könnte also der Grund sein, warum es in isolierten Kardiomyozyten von 23 Wochen alten ZSF-1 Ratten noch nicht zu einer diast. Dysfunktion mit erhöhter diast. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei höheren Frequenzen gekommen ist. Die Bedeutung des NCX in der Pathophysiologie von HFpEF bleibt jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Im Hypertrophie-assoziierten HFpEF Rattenmodell und bei Menschen

mit hypertensiver Herzkrankheit und HFpEF ist die Expression des NCX in den Kardiomyozyten nicht verändert [45, 106]. Ebenfalls zeigte sich in Patch-Clamp-Versuchen keine Änderung der Leitfähigkeit des NCX, die auf eine posttranslationale Modifikation hinweisen würde [45, 53]. Jedoch bleiben Veränderungen der NCX-Aktivität aufgrund von dynamischen Änderungen des elektrochemischen Gradienten, z.B. durch eine Erhöhung des intrazellulären $[Na^+]_i$, unberücksichtigt. Im kardioresalen HFpEF-Modell ist die Expression des NCX erhöht und die Aktivität im Vorwärtsmodus eingeschränkt [53]. In der Studie von Primessnig et al. konnte eine reduzierte Expression der NCX-kolokalisierten NKA-Untereinheit $\alpha 2$ festgestellt werden, die zu einer verminderten Na^+ -Extrusion und der verminderten Vorwärtsmodus-Aktivität des NCX geführt haben könnte [53]. In fast allen HFpEF-Modellen kann ein SR- Ca^{2+} -Leck festgestellt werden [45, 53, 93], was Ursache einer erhöhten NCX-Aktivität im Vorwärtsmodus sein kann [53]. Eine hohe SR-Beladung kann ebenfalls zu einem SR- Ca^{2+} -Leck führen [26], jedoch sind die sarkoplasmatischen $[Ca^{2+}]_i$ in den verschiedenen Modellen teils erhöht und teils erniedrigt [45, 53]. Obwohl bei HFpEF eine erhöhte $[Na^+]_i$ in den Kardiomyozyten vermutet wird (Na^+ -Hypothese bei SGLT-2-Inhibitoren [41]), konnte keine erhöhte $[Na^+]_i$ in Biopsien von Menschen mit hypertensiver Herzkrankheit und HFpEF nachgewiesen werden [106].

Dementsprechend sollte die Bedeutung des NCX für die Pathogenese von HFpEF immer abhängig von der Ätiologie und untersuchten Spezies (physiologisch höhere $[Na^+]_i$ in Nagern und kleinerer Anteil des NCX am $[Ca^{2+}]_i$ -Abfall) beurteilt werden. Nichtsdestotrotz ist die Regulation der NCX-Aktivität ein interessanter Angriffspunkt für eine pharmakologische Intervention. Eine Reduktion der $[Na^+]_i$ im Subkompartiment des NCX (Na^+ fuzzy space) durch das Blocken der leistungsfähigen Na^+ -Importer könnte bei den jeweiligen Phänotypen zu einer verbesserten NCX-Aktivität im Vorwärtsmodus führen. Dadurch könnte die diastolische Ca^{2+} -Extraktion gefördert und die aktive Relaxation der Kardiomyozyten verbessert werden. Deshalb könnten auch SGLT-Inhibitoren durch die Reduktion des Na^+ -Influx durch SGLT-1 und NHE (Empagliflozin) in den jeweiligen HFpEF-Phänotypen mit erhöhter $[Na^+]_i$ und/oder gestörter NCX-Aktivität der Kardiomyozyten zu einer Normalisierung der NCX-Aktivität beitragen. In der Folge würde es zu einer Regulierung der Ionenhomöostase und Verbesserung der diastolischen Funktion kommen.

9.2.2 Erhöhte Myofilamentsensitivität

Wir konnten unsere Hypothese bestätigen, dass die Myofilamentsensitivität in diesem HFpEF-Modell erhöht ist. Der Zustand von hochaffinen Myofilamenten ist typischerweise mit der genetisch bedingten hypertrophen Kardiomyopathie vergesellschaftet [58, 62]. Jedoch haben Hamdani et al. auch in einem Hypertonie-assoziiertem HFpEF-Modell eine Hypophosphorylierung der Myofilamente – und damit Steigerung – der Myofilamentsensitivität nachgewiesen [49]. Hingegen ist noch ungeklärt, ob die Dysfunktion der Myofilamente Ursache oder Folge einer kardiomyozytären Hypertrophie durch Hypertonie ist. Dem gegenüberstehend scheint eine Langzeitschädigung der Myofilamente (bspw. AGEs an Aktin, Myosin und TnI, wie in 6.4.1 beschrieben) durch den T2DM eher weniger relevant für die Pathologie in diesem Versuch zu sein. Eine diabetische Schädigung der Kardiomyozyten, wie bei einer diabetischen Kardiomyopathie, würde eher mit einer verminderten Myofilamentsensitivität einher gehen (siehe 6.4.1). Trotz alledem ist eine akute Beeinflussung der Funktion der Myofilamente durch das pathologische Milieu (neurohumoraler und parakriner Stress, verändertes metabolisches Angebot von Fettsäuren, Glukose und Ketonkörpern, freie Radikale etc.) in vivo nicht auszuschließen. Anhand dieses Versuches ist aber eher davon auszugehen, dass im ZSF-1 Modell zu diesem Zeitpunkt die Beeinflussung der Myofilamente vorrangig durch den art. Hypertonus bedingt ist.

Die gesteigerte Myofilamentsensitivität könnte ein zellulärer Kompensationsmechanismus gegen die Herzinsuffizienz nach 23 Wochen sein. Die erhöhte Myofilamentsensitivität passt in das Bild des hyperkontraktilen Status (Vgl. Studie von Curl et al. im Hypertonie-assoziiertem HFpEF-Modell [45]), da sie die Kontraktionsleistung pro Ca^{2+} -Einheit auf Kosten der Lusitropie steigert. In unserem Versuch wurde die dadurch verschlechterte Relaxation der einzelnen Myofilamente durch eine schnellere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Abfallkinetik und eine niedrigere diast. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kompensiert, sodass sich keine kardiomyozytäre Relaxationsstörung ausbildete. Die erhöhte Myofilamentsensitivität erklärt, warum die Kontraktionsleistung der ZSF-1 Kardiomyozyten in vitro trotz verminderter peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei 2 und 4 Hz aufrechterhalten werden kann. Die erhöhte Ca^{2+} -Affinität sorgt dafür, dass die verminderte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht zum Tragen kommt und der hyperkontraktile Status der Kardiomyozyten – wenn auch in geringerer Ausprägung – bei höheren Frequenzen bestehen bleibt. Hamdani et al.

interpretierten die Hypophosphorylierung des kontraktiven Apparates und Steigerung der Myofilamentsensitivität, als Folge eines verminderten β -Adrenorezeptor-Signaling [49]. Die Phosphorylierung von TnI durch die PKA an Serin 23 und 24 führt normalerweise zu einer Abnahme der Myofilamentsensitivität und damit zu einer verbesserten Lusitropie bei β -adrenerger Stimulation [29, 55, 57, 64]. Die Aktivierung von PKC hat grundsätzlich einen gegenteiligen Effekt [58]. PKC phosphoryliert TnI ebenfalls an Serin 23 und 24, aber auch an Serin 43, 45 und Threonin 143, was die Myofilamentsensitivität erhöht [58, 59]. Hierbei gibt es zusätzlich spezifische Gewichtungen bei den unterschiedlichen Isoformen der PKC [58, 59]. Bei HFpEF findet sich eine Erhöhung der PKC α -Aktivität bei wohl unveränderter PKA-Aktivität, was zu dem Ungleichgewicht in der Phosphorylierung der Myofilamente zugunsten einer erhöhten Myofilamentsensitivität beiträgt [49]. Ein PKC abhängiger Effekt auf TnT zugunsten einer erhöhten Myofilamentsensitivität ist nicht auszuschließen. Weiterführend ist bekannt, dass bei HFpEF das NO-Signaling über cGMP und PKG gestört ist [4, 47, 108]. Folglich könnte die verminderte PKG-abhängige Phosphorylierung von Serin 23 und 24 am TnI zu einer weiteren Erhöhung der Myofilamentsensitivität und einer gestörten zellulären Relaxation beitragen.

Hamdani et al. haben im ZSF-1 Modell eine Titin-Hypophosphorylierung festgestellt, die wesentlich zur erhöhten Steifigkeit des Herzens beitrug [50]. In einem weiteren hypertensiven Modell von HFpEF (Hund), konnte ebenfalls von Hamdani et al. eine Titin-Hypophosphorylierung an denselben Phosphorylierungsstellen ermittelt werden [49]. Der Tn-Komplex und MyBP-C waren in dieser Studie hypophosphoryliert, was zusätzlich eine Steigerung der Myofilamentsensitivität bedingte [49]. Diese pathologischen Befunde konnten durch die Administration von PKA- und PKG-aktivierenden Substanzen rückgängig gemacht werden [49]. Daher vermuten wir auch in unserem Versuch eine PKA- und/oder PKG-abhängige Hypophosphorylierung des kontraktiven Apparates.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass der kompensatorische Anstieg der Myofilamentsensitivität bei weiterer Kompromittierung des Ca²⁺-Zyklus im Fortschritt der Erkrankung pathologischen Charakter bekommt. Insbesondere bei einem Anstieg der diast. [Ca²⁺], wie bereits von Curl et al. und Miranda-Silva et al. beschrieben [45, 105], würde es zu einer Relaxationsstörung der Kardiomyozyten kommen. Dieser Zustand wurde in diesem Modell nach 23 Wochen jedoch nicht erreicht.

9.3 Effekte von Sotagliflozin auf die Kardiomyozytenfunktion

SGLT-Inhibitoren greifen sowohl in den kardiomyozytären Metabolismus, als auch in die Na^+ -Homöostase durch NHE-Inhibition ein [56]. Der kardiomyozytäre Metabolismus und die $[\text{Na}^+]_i$ beeinflussen sich hierbei gegenseitig und beeinflussen die elektromechanische Kopplung (siehe 6.2.2 und 6.3.3). Eine erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ führt über den mitochondrialen NCX zu einem Abfallen der $[\text{Ca}^{2+}]_m$ [35, 41]. Es kommt zu einer verminderten Aktivierung der Enzyme des Krebs-Zyklus und der F_1F_0 -ATP-Synthetase, was zu einem Mismatch von Energiebedarf und Energieangebot führt [35, 41]. Kompensatorisch wird vor allem über die SGLT-1, welche Glukose im Symport mit Na^+ über die Zellmembran transportieren, die Aufnahme von Glukose in die Zelle gesteigert [37, 71]. Das erhöhte Glukoseangebot wird vermehrt über anaerobe Glykolyse verstoffwechselt, was eine Akkumulation von Pyruvat und Laktat im Zytosol und damit eine intrazelluläre Azidose verursacht [43]. Die Protonen werden hauptsächlich durch eine gesteigerte NHE-Aktivität aus der Zelle befördert [36, 37, 41], wodurch der Circulus vitiosus verstärkt wird. Aufgrund der Unterfunktion der Dehydrogenasen der Atmungskette ist der Pool an Reduktionsäquivalenten (v.a. NADH und FADH_2) reduziert [41]. Gleichzeitig sind die Enzyme des mitochondrialen oxidativen Schutzsystems alle von den Metaboliten des Citratzyklus (v.a. Malat und Isocitrat) abhängig. Zusammen führt dies zu einer verminderten Elimination von ROS [35].

ROS wiederum haben weitreichende Effekte auf die elektromotorische Kraft der Ionenkanäle und -Transporter, da die meisten von ihnen redox-sensibel sind [35]. Beispielsweise oxidieren ROS die SERCA und den RyR, was zu den oben beschriebenen pathologischen Phänomenen führen kann [35]. Letztlich können ROS auch das kardiale Remodeling fördern, da sie eine Reihe von Signalwegen aktivieren, die Hypertrophie, Fibrose und Apoptose induzieren [35, 42, 47].

9.3.1 Effekte von Sotagliflozin auf die Myofilamentsensitivität

Mit einer Dosis von 1 mg /kg KG wird vorwiegend der SGLT-2 gehemmt, da der SGLT-1 in der Ratte im Vergleich zum Menschen weniger affin für Sotagliflozin ist. Zusätzlich ist die Affinität von Sotagliflozin für den SGLT-1 20-fach niedriger, als für den SGLT-2 [74].

Daher ist erst bei einer Dosis von 30 mg/kg KG die signifikante Inhibition des SGLT-1 gesichert.

Sotagliflozin hatte in einer Dosis von 1 mg/kg KG keinen messbaren Effekt auf die Ca^{2+} -Homöostase von isolierten ZSF-1 Kardiomyozyten in vitro. Es ließen sich keine Zeichen einer verminderten $[\text{Na}^+]_i$, wie eine geringere diast. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch reduzierte NCX-Aktivität im Rückwärtsmodus nachweisen. Daher ist bei dieser Dosierung ein relevanter Effekt von Sotagliflozin auf den SGLT-1 und NHE der Kardiomyozyten (vgl. Empagliflozin) unwahrscheinlich.

Jedoch konnte mit der Dosierung von 1 mg/kg KG die Myofilamentsensitivität in ZSF-1 Kardiomyozyten deutlich gesenkt werden. So scheinen die systemischen Effekte von Sotagliflozin in die subzellulären Regulationsmechanismen der Myofilamentsensitivität einzugreifen. Vermutlich ist dies auf eine Verbesserung des NO-cGMP-PKG-Signaling im Koronarendothel zurückzuführen, das zu einer vermehrten Phosphorylierung der Myofilamente führt. Die PKG-Aktivität ist bei HFpEF (Inflammations-Hypothese, endotheliale Dysfunktion [47]) pathologisch erniedrigt [49, 50].

Die beschriebenen Effekte von Sotagliflozin 1 mg/kg KG auf die Myofilamentsensitivität konnte in den ZSF-1 Kardiomyozyten durch die Steigerung der Dosis auf 30 mg/kg KG ebenfalls erreicht, aber nicht weiter gesteigert werden.

Interessanterweise ist in Kardiomyozyten vom Wildtyp nach der Therapie mit Sotagliflozin eine signifikante Erhöhung der Myofilamentsensitivität bei 1 Hz Stimulationsfrequenz zu sehen. Es ist zu berücksichtigen, dass nur eine Dosierung von 30 mg/kg KG im Wildtyp getestet wurde. Möglicherweise führte die SGLT-1 Hemmung auch im Wildtyp zu einer Reduktion der globalen Glukoseaufnahme in die Kardiomyozyten und damit zu einem Mangel. Es wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass durch die Substratrestriction die AMP-aktivierte Proteinkinase induziert wird [109–111]. Diese ist in der Lage, Tnl an Serin 150 zu phosphorylieren und ähnlich wie die PKC die Myofilamentsensitivität zu steigern [109, 111]. Unter physiologischen Bedingungen wird auf diese Weise die Effizienz der Kontraktion in Hungerzuständen gesteigert [109]. Folglich könnte in der Kontrollgruppe durch die kombinierte SGLT-1- und SGLT-2-Hemmung ein Energiesubstratmangel in den Kardiomyozyten induziert worden sein, der

zu dieser Beobachtung geführt haben könnte. Dieser Effekt wird vom Bowditch-Effekt bei höheren Frequenzen antagonisiert. Der Bowditch-Effekt geht auch mit einer Beschleunigung der Relaxation einher. Dies wird als frequency-dependent acceleration of relaxation (FDAR) bezeichnet und beschreibt eine PKA-Aktivierung bei höherer Stimulationsfrequenz [57]. Diese führt zur Phosphorylierung der Proteine des Ca^{2+} -Handlings (vgl. β -adrenerge Stimulation), aber auch zu einer Phosphorylierung von TnI und damit zur Desensitivierung der Myofilamente [57]. Bei 2 Hz hat sich die Sotagliflozin-bedingte Erhöhung der Myofilamentsensitivität halbiert. Bei 4 Hz ist dieser Effekt aufgehoben. Dieses Phänomen ist in Kardiomyozyten von Sotagliflozin-behandelten ZSF-1 Ratten nicht zu beobachten, was die Vermutung eines reduzierten β -Adrenorezeptor-Signaling stützt.

9.3.2 Effekte von Sotagliflozin auf die Ca^{2+} -Homöostase

Bei einer Dosis von 30 mg/kg KG und signifikanter SGLT-1 Hemmung traten Veränderungen der kardiomyozytären Ionenhomöostase auf. Durch die Langzeitbehandlung der ZSF-1 Ratten mit Sotagliflozin 30 mg/kg KG stieg die diast. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kardiomyozyten um durchschnittlich 18%. Ebenfalls stieg die peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in vergleichbarem Ausmaß, sodass die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Amplitude unverändert blieb. Die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hatte keinen nachteiligen Einfluss auf die zelluläre Kontraktion und Relaxation, was sich durch die gleichzeitig verminderte Myofilamentsensitivität und dem damit neu etablierten steady state begründen lässt. Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Sotagliflozin hatte in diesem Versuch keine funktionelle Relevanz.

Es ist möglich, dass die Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase der ZSF-1 Kardiomyozyten durch die pharmakologische Beeinflussung ihrer vermutlich ungünstigen Stoffwechsellage verursacht wurde. Denn in Kardiomyozyten der Kontrollgruppe konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden. Es ist wahrscheinlich, dass durch die kardiale Hypertrophie und den Diabetes mellitus in diesem Modell der kardiale Metabolismus gestört ist [73, 101]. Durch die Insulinresistenz kommt es zu einer reduzierten Aufnahme von Glukose in die Zelle [73]. Der kardiale Glukosemetabolismus wird auch insulinunabhängig durch die Kontraktion, das heißt nach dem Energiebedarf, reguliert [61, 73]. Da die ZSF-1 Ratte in einem Alter von 23 Wochen eine Hyperkontraktilität der Kardiomyozyten zeigt, die zusammen mit der kardialen

Hypertrophie normalerweise zu einer gesteigerten Metabolisierung von Glukose führen würde [73], besteht hier möglicherweise eine gestörte Substrat-Balance. Die stärkere Hemmung des SGLT-1 durch die höhere Dosis von Sotagliflozin könnte in diesem Versuch zu einer Anpassung des kardialen Metabolismus und konsekutiven Änderung der Aktivität der Ionenpumpen (z.B. SERCA2a) geführt haben.

Der SGLT-1 ist unter pathologischen Bedingungen eine sensible Struktur, da der kardiale Metabolismus bei Hypertrophie, aber beispielsweise auch bei Ischämie, von Glukose abhängt [42, 112–114]. Unter diesen pathologischen Konstellationen ist SGLT-1 hochreguliert, sodass dieser an Bedeutung für den Metabolismus gewinnt [74, 112, 114]. Unter ischämischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass der SGLT-1 bei Insulinresistenz, Diabetes und Übergewicht eine kompensatorisch-protective Rolle für den kardiomyozytären Metabolismus spielt und dessen Hemmung einen negativen Effekt auf die diastolische Funktion hat [112]. In pathologischen Konstellationen mit hohem Substratbedarf/Energiemangel, wie bei Ischämie oder Hypertrophie, ist der kardiale Metabolismus vom SGLT-1 abhängig [62, 113, 114]. Daher muss eine Veränderung der Anteile von FFAs, Ketonkörpern und Glukose am Substratangebot der Kardiomyozyten durch SGLT-Inhibition nicht zwangsläufig zu der vermuteten Verbesserung des kardiomyozytären Metabolismus (siehe 6.5.1 und 6.5.2) führen.

Da durch die Therapie mit Sotagliflozin 30 mg/kg KG im Vergleich zur niedrigeren Dosierung kein vorteilhafter Effekt auf die intrinsische Kardiomyozytenfunktion erreicht werden konnte, sollte aus Sicht dieses Versuchs der Hemmung des SGLT-1 eher mit Zurückhaltung begegnet werden.

Zusammenfassend ist Sotagliflozin in der Lage eine erhöhte Myofilamentsensitivität zu senken. Dafür ist eine SGLT-2 Hemmung mit einer Dosis von 1 mg/kg KG ausreichend. Es konnte keine Effektsteigerung mit einer Dosis von 30mg/kg KG erreicht werden, sodass die Effekte auf die Myofilamentsensitivität wahrscheinlich durch die systemischen Effekte von Sotagliflozin bedingt und sekundär durch die Aktivierung des NO-cGMP-PKG-Wegs vermittelt werden. Ob die zelluläre Relaxation bei pathologisch erhöhter Myofilamentsensitivität reell verbessert werden kann, ist durch diese Studie nicht beurteilbar, da in vitro keine Relaxationsstörung der ZSF-1 Kardiomyozyten vorbestand.

9.3.3 Verbesserung der diastolischen Funktion in vivo

Die Untersuchung der einzelnen Kardiomyozyten konnte die Milderung der diastolischen Dysfunktion durch Sotagliflozin in diesem HFpEF-Modell nicht erklären. Die Senkung des LVEDP und die Reduktion der Dilatation des linken Atriums der ZSF-1 Ratte sind relevante Effekte für die Therapie von HFpEF. Diese Studie bestärkt, dass SGLT-Inhibitoren eine wichtige Säule in der zukünftigen Therapie von Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion sein könnten.

Wir nahmen in diesem Versuch an, die kontraktile Funktion durch die pharmakologische Intervention am SGLT-1 durch die Verbesserung der zellulären Ionenhomöostase (Senkung der $[Na^+]_i$) und Regulation des Zellstoffwechsels der Kardiomyozyten, verbessern zu können. Jedoch fanden wir heraus, dass sich trotz Senkung der Myofilamentsensitivität die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten durch die SGLT Inhibition nicht beeinflussen ließ. Trotzdem kam es unter der Therapie zu einer Verbesserung der diastolischen Funktion in vivo. Basierend auf dieser Studie, können wir nicht beantworten, ob eine Verbesserung der Ionenhomöostase und der elektromechanischen Kopplung per se nicht möglich ist, da keine Störung der Kardiomyozyten in unserem Versuch vorlag. Jedoch gibt die Diskrepanz zwischen positivem Effekt von Sotagliflozin in vivo und Nulleffekt auf die Kardiomyozyten in vitro, Anlass die Pathologie des Herzens in diesem Stadium von HFpEF hauptsächlich in dessen Zellgerüst und Struktur (Remodeling, Hypertrophie), sowie extrakardial (Gefäßsystem, Niere, etc.) zu verorten, wo diese auch erfolgreich mit Sotagliflozin behandelt werden kann. Durch die Reduktion der Blutglukosekonzentration könnte es zu weniger Apoptose von Kardiomyozyten und kardialer Fibrose und Lipomatose gekommen sein. Gleichzeitig werden durch die BZ-Kontrolle Schäden am Gefäßsystem des Herzens (Inflammationshypothese), aber auch an der Niere, minimiert. Darüber hinaus ist es naheliegend, dass durch die Volumenkontraktion (Glukosurie und Natriurese) und Senkung der Vorlast das Herz hämodynamisch entlastet wird.

Daher sollte mit der Erkenntnis aus dieser Studie, dass in frühen Krankheitsstadien eine funktionell relevante Schädigung der Kardiomyozyten vermutlich vorerst ausbleibt, im Sinne der weiteren Translation evaluiert werden, ob die zusätzliche SGLT-1 Inhibition von dualen SGLT Inhibitoren durch die Effekte in anderen Geweben (siehe 6.5.1 und 6.5.2)

klinisch vorteilhaft ist. Außerdem sollte geprüft werden, ob in einem späteren Stadium der Erkrankung mit funktionell relevanter Schädigung der Kardiomyozyten die SGLT-1 Hemmung positive Effekte auf die Kardiomyozytenfunktion hat.

9.4 Limitationen

Nach 23 Wochen ist es wahrscheinlich noch nicht zur vollständigen Ausprägung eines pathologischen Phänotyps der Kardiomyozyten gekommen. Das lässt unsere Vorstudie mit ZSF-1 Ratten im Alter von 28 Wochen [93], sowie die Studie von Miranda-Silva et al. [105] vermuten, da hier eine Störung von Ca^{2+} -Homöostase und Kontraktion der Kardiomyozyten nachgewiesen wurde. Das fortgeschrittene Alter ist ein wesentlicher Risikofaktor bei HFpEF. Durch die verschiedenen Komorbiditäten ist der zeitliche Aspekt in diesem Modell besonders interessant. Es ist nachvollziehbar, dass die verschiedenen Komorbiditäten unterschiedlich lange auf das Herz einwirken müssen, um ihre typischen Veränderungen hervorzurufen. Daher ist es in diesem Modell wahrscheinlich, dass sich die Erscheinung der Erkrankung in einem laufenden Wandel während der Progression von HFpEF befindet. Beispielsweise könnte es zu einem späteren Zeitpunkt zur Veränderung der Gewichtung von hypertropher und diabetischer Komponente, beziehungsweise kardiomyozytärer und fibrotischer Komponente kommen (siehe auch Vorstudie unserer Arbeitsgruppe und Studie Miranda-Silva et al. [93, 105]). Viele der bislang durchgeführten Phänotypisierungs- und Medikamentenstudien für HFpEF beschränken sich ausschließlich auf fortgeschrittene Stadien von HFpEF („worsening heart failure“). Hingegen ist über den pathophysiologischen Verlauf und die Krankheitsprogression noch wenig bekannt, obwohl die frühen teilkompensierten Stadien der Erkrankung wohl von dem Großteil der Patienten in der Klinik präsentiert werden. Diese Diskrepanz könnte ein wesentlicher Grund dafür sein, dass die bisherigen Therapieversuche möglicherweise nicht stadiengerecht sind und daher oft frustriert verlaufen. Die eingeschränkte Probenverfügbarkeit von Patienten mit geringgradig ausgeprägter HFpEF stellt eine bedeutende Hürde für die Entwicklung neuer Therapien dar [45].

Während die intrinsische Funktion der Kardiomyozyten in diesem Versuch die diastolische Dysfunktion in vivo nicht erklären kann, können wir nicht ausschließen, dass

das extrazelluläre Milieu (beispielsweise durch parakrine, neurohumorale, metabolische, und/oder Zell-Zell-Interaktionen) in vivo nachteilige Einflüsse auf die Kardiomyozytenfunktion hat. Es ist möglich, dass Veränderungen der Extrazellulärmatrix und der passiven Elemente des kontraktiven Apparates in diesem frühen Stadium der Erkrankung die Pathologie der diast. Dysfunktion in vivo bestimmen. Ein Indiz dafür ist die stärkere Verkürzung der Zeit bis 50% Relaxation im Vergleich zur Zeit bis 90% Relaxation der Kardiomyozyten in vitro (-65% vs. -45% im Vergleich zur Kontrolle bei 1 Hz). Der Unterschied in den Relaxationszeiten könnte ein Hinweis auf eine erhöhte passive Steifheit sein. Da der Grad der Stauchung der Kardiomyozyten mit der Relaxation abnimmt, verringert sich auch der Anteil der passiven Elemente an der Relaxationsgeschwindigkeit [50]. So könnte ein Isoform Shift im Titin, oder eine Änderung dessen Phosphorylierungsmusters in diesem Versuch zu einer gesteigerten Rückstellgeschwindigkeit in der frühen Relaxation geführt haben [50].

Ein bedeutendes Hindernis dieser Studie waren die hohen Ausfallraten (keine Zellen) bei der Isolation der funktionsfähigen Kardiomyozyten, während die erfolgreichen Isolationen eine hohe Qualität hatten. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen konnten die erhobenen Daten nicht sicher auf eine Normalverteilung getestet werden, da die Power dieser Tests bei kleinen Stichproben zu gering ist. Dennoch ist bei einem Stichprobenumfang in dieser Größenordnung auch ein Rangverfahren nicht zweifelsfrei anwendbar. Wir denken, dass auf Grund der Abwesenheit von extremen Ausreißern ein non-parametrisches Testmodell zu einer Unterschätzung der teilweise großen numerischen Unterschiede zwischen den Gruppen führen würde. Zusätzlich würde es durch die geringere Power von non-parametrischen Test mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einem Fehler 2. Art kommen. Daher glauben wir, dass ein parametrisches Testverfahren in unserem Versuch zu der bestmöglichen Annäherung, mit hinreichender Sensitivität für Gruppenunterschiede, führt. Gleichwohl ist auch das von uns gewählte lineare gemischte Modell nicht ideal für kleine Gruppengrößen, sodass die Gültigkeit der Ergebnisse der statistischen Auswertung nicht uneingeschränkt gewährleistet werden kann. Daher liegt der Fokus dieser Arbeit vor allem auf der Deskription der Daten und der kritischen Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung. Dieses Vorgehen unterstreicht den explorativen Charakter dieser Studie, dessen vordergründiges Ziel es war, charakteristische Veränderungen im Ca^{2+} - und Kontraktionszyklus von aus an HFpEF

erkrankten Ratten isolierten Kardiomyozyten und dessen pharmakologische Beeinflussbarkeit zu identifizieren.

Es sollte kritisch diskutiert werden, ob eine höhere Anzahl an Versuchstieren für die in vitro Untersuchungen zu einem relevanten zusätzlichen Erkenntnisgewinn geführt hätte und im Sinne von 3R („replace, reduce, refine“ von Tierversuchen) ethisch vertretbar gewesen wäre.

Letztlich sind die Ergebnisse aus diesem Tiermodell nur unter Vorbehalt auf den Menschen übertragbar. Wie bereits beschrieben gibt es zwischen Ratte und Mensch Unterschiede im Ca^{2+} -Handling der Kardiomyozyte, wie z.B. in der NCX-Aktivität, aber auch die $[\text{Na}^+]_i$ ist variabel zwischen verschiedenen Spezies [26, 32]. Nichtsdestotrotz sind Ratten ein etabliertes Modell zur Erforschung von Herz-Kreislauserkrankungen, sodass eine Translation durchaus möglich ist. Zudem entwickelt die ZSF-1 Ratte einem dem Menschen sehr nahekommenden Phänotyp des HFpEF Syndroms, der die menschliche Pathologie gut nachstellen kann.

9.5 Conclusio und Ausblick

Die medizinische Versorgung von Patienten mit Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion ist eine große Herausforderung im klinischen Alltag. Die heterogene Patientengruppe macht eine akribische Diagnostik und Identifizierung der klinischen Subtypen notwendig. Im Gegensatz zu HFrEF, einer endogenen Erkrankung des Herzens, scheint es keine universelle Therapie für HFpEF zu geben. Dadurch ist die Validierung mortalitätsverbessernder Medikamente in klinischen Studien erschwert (vgl. Ergebnisse der ALDO-DHF- [80] und TOPCAT-Studie [81]), was die Therapieoptionen für Patienten mit HFpEF bislang begrenzt. Es ist von einem Krankheitsbild auszugehen, welches in dessen Progress einem starken Wandel unterzogen ist und deshalb möglicherweise zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlicher Therapie bedarf. Daher stellt auch die Früherkennung bei Risikopatienten hohe Anforderungen an das medizinische Personal und setzt detailliertes Wissen über den Verlauf der Erkrankung voraus.

In diesem Modell von durch das metabolische Syndrom induzierter HFpEF, fanden wir eine diastolische Dysfunktion in vivo, die auf zellulärer Ebene in vitro kompensiert war. Die kardiomyozytäre Hyperkontraktilität charakterisiert die Progression zu HFpEF [45] und liefert einen Erklärungsansatz, warum die Herzmedikation für HFpEF bei HFpEF wirkungslos bleibt. In diesem frühen Stadium der Erkrankung ist die Pathologie vermutlich durch die kardiale Fibrose und Hypertrophie, sowie erhöhte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten getrieben. In unserem Versuch fand sich ein in vitro Phänotyp, der gemischte Anteile von hypertropher und diabetischer Kardiomyopathie hat. Die stark erhöhte Myofilamentsensitivität könnte zu den Diskrepanzen in den in vivo und in vitro Untersuchungen beitragen haben. Zusammen mit der verminderten kardiomyozytären Leistungsreserve deutet dies auf eine komplexe subzelluläre Adaptation hin, die weitere Erforschung verdient. Die gesteigerte Myofilamentsensitivität könnte zudem einen Ausblick auf die Progression der Erkrankung geben und im Verlauf zu einer zellulären Relaxationsstörung führen. Diese Studie bestätigt, dass die gestörte aktive Relaxation ein relevanter Faktor in der Genese von HFpEF sein könnte.

Die Langzeittherapie mit Sotagliflozin konnte in diesem Modell insgesamt keine Verbesserung der in vitro Kardiomyozytenfunktion herbeiführen. Zwar konnte Sotagliflozin bereits in geringer Dosierung die Myofilamentsensitivität reduzieren, jedoch blieb eine Verbesserung der Relaxation oder intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase der Kardiomyozyten aus. Die positiven Effekte der Therapie auf die diastolische Funktion von ZSF-1 Ratten (Primessnig DGK 2019 [101]) ist vermutlich auf die extrakardialen Effekte von Sotagliflozin (siehe 9.3.3) zurückzuführen. Da im untersuchten Krankheitsstadium keine zelluläre Relaxationsstörung in vitro vorbestand, kann die Wirkung von Sotagliflozin hinsichtlich dieses Aspektes nicht abschließend beurteilt werden. Dennoch gibt diese Beobachtung Anlass, die Erfordernis einer direkten pharmakologischen Intervention am Herzmuskel zu diesem Zeitpunkt zu hinterfragen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der Identifizierung des jeweiligen klinischen Subtyps und Krankheitsstadiums für die Auswahl einer geeigneten Therapie.

Die Effekte auf die Myofilamentsensitivität lassen eine signifikante Verbesserung der endothelialen Dysfunktion und des NO-cGMP-PKG-Signalwegs durch Sotagliflozin vermuten, was die Inflammationshypothese von Tschöpe et al. bestätigen würde [47]. Da die Beeinträchtigung von second-messenger-Systemen, wie dem NO-cGMP-PKG-

Signalweg, modellübergreifend von zentraler Bedeutung für die Pathophysiologie von HFpEF zu sein scheint, bedarf es hier weiterer Erforschung. Im Hinblick auf den gestörten Stoffwechsel und die im Verlauf gestörte Ionenhomöostase der Kardiomyozyten würde auch die Untersuchung Mitochondrienfunktion zu einem weiteren Verständnis der Pathophysiologie von HFpEF beitragen und möglicherweise Antwort darauf geben, ob die SGLT-1-Hemmung an den Kardiomyozyten längerfristig Schaden vom Herzmuskel abwenden kann.

10. Literaturverzeichnis

1. Barandiarán Aizpurua A, Schroen B, van Bilsen M, van Empel V. Targeted HFpEF therapy based on matchmaking of human and animal models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315:H1670-H1683. doi:10.1152/ajpheart.00024.2018.
2. Herold G, editor. *Innere Medizin 2018*. Köln: Gerd Herold; 2018.
3. Buglioni A, Burnett JC. Pathophysiology and the cardiorenal connection in heart failure. Circulating hormones: biomarkers or mediators. *Clin Chim Acta*. 2015;443:3–8. doi:10.1016/j.cca.2014.10.027.
4. Gevaert AB, Boen JRA, Segers VF, van Craenenbroeck EM. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review of Cardiac and Noncardiac Pathophysiology. *Front Physiol* 2019. doi:10.3389/fphys.2019.00638.
5. Ziaeeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13:368–78. doi:10.1038/nrcardio.2016.25.
6. Holstiege J, Manas K, Akmatov, Steffen A, Bätzing J. Prävalenz der Herzinsuffizienz – bundesweite Trends, regionale Variationen und häufige Komorbiditäten. 2018. https://www.versorgungsatlas.de/fileadmin/ziva_docs/97/VA_18-09_BerichtHerzinsuffizienz_2018-12-20_V2.pdf. Zugriff am 05.12.2019.
7. Tschöpe C, Pieske B. Neue Therapiekonzepte zur Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion. *Herz*. 2015;40:194–205. doi:10.1007/s00059-015-4210-x.
8. Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R. Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106:269–75. doi:10.3238/arztebl.2009.0269.
9. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More ‘malignant’ than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2001;3:315–22. doi:10.1016/S1388-9842(00)00141-0.
10. Shah KS, Xu H, Matsouaka RA, Bhatt DL, Heidenreich PA, Hernandez AF, Devore AD, Yancy CW, Fonarow GC. Heart Failure With Preserved, Borderline, and Reduced Ejection Fraction: 5-Year Outcomes. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:2476–86. doi:10.1016/j.jacc.2017.08.074.
11. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C,

- Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P. 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*. 2016;37:2129–200. doi:10.1093/eurheartj/ehw128.
12. Oeing CU, Tschöpe C, Pieske B. Neuerungen der ESC-Leitlinien zur akuten und chronischen Herzinsuffizienz 2016. *Herz*. 2016;41:655–63. doi:10.1007/s00059-016-4496-3.
 13. Borlaug BA, Redfield MM. Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation*. 2011;123:2006-13; discussion 2014. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.954388.
 14. Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, Keulenaer G de, Leite-Moreira AF, Borbély A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL. 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*. 2007;28:2539–50. doi:10.1093/eurheartj/ehm037.
 15. Bell DSH, Goncalves E. Heart failure in the patient with diabetes: Epidemiology, aetiology, prognosis, therapy and the effect of glucose-lowering medications. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21:1277–90. doi:10.1111/dom.13652.
 16. Petutschnigg J, Edelmann F. Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion. *Internist (Berl)*. 2019;60:925–42. doi:10.1007/s00108-019-0653-0.
 17. Campbell KS, Sorrell VL. Cell- and molecular-level mechanisms contributing to diastolic dysfunction in HFpEF. *J Appl Physiol (1985)*. 2015;119:1228–32. doi:10.1152/jappphysiol.01168.2014.
 18. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie : mit Online-Repetitorium*. 31st ed. Berlin: Springer; 2017.
 19. Oktay AA, Rich JD, Shah SJ. The Emerging Epidemic of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Curr Heart Fail Rep* 2013. doi:10.1007/s11897-013-0155-7.

20. Nolan PB, Carrick-Ranson G, Stinear JW, Reading SA, Dalleck LC. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis. *Prev Med Rep.* 2017;7:211–5. doi:10.1016/j.pmedr.2017.07.004.
21. Moreira GC, Cipullo JP, Ciorlia LAS, Cesarino CB, Vilela-Martin JF. Prevalence of Metabolic Syndrome: Association with Risk Factors and Cardiovascular Complications in an Urban Population. *PLoS One* 2014. doi:10.1371/journal.pone.0105056.
22. Shah SJ, Kitzman DW, Borlaug BA, van Heerebeek L, Zile MR, Kass DA, Paulus WJ. Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. *Circulation.* 2016;134:73–90. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021884.
23. Heinzl FR, Hohendanner F, Jin G, Sedej S, Edelmann F. Myocardial hypertrophy and its role in heart failure with preserved ejection fraction. *J Appl Physiol.* 2015;119:1233–42. doi:10.1152/jappphysiol.00374.2015.
24. Lam CSP, Voors AA, Boer RA de, Solomon SD, van Veldhuisen DJ. Heart failure with preserved ejection fraction: from mechanisms to therapies. *Eur Heart J.* 2018;39:2780–92. doi:10.1093/eurheartj/ehy301.
25. Caruana L, Petrie MC, Davie AP, McMurray JJV. Do patients with suspected heart failure and preserved left ventricular systolic function suffer from “diastolic heart failure” or from misdiagnosis? A prospective descriptive study. *BMJ.* 2000;321:215–8. doi:10.1136/bmj.321.7255.215.
26. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415:198–205. doi:10.1038/415198a.
27. Aronsen JM, Swift F, Sejersted OM. Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;61:11–9. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.06.003.
28. Bers DM, Chen-Izu Y. Sodium and calcium regulation in cardiac myocytes: from molecules to heart failure and arrhythmia. *J Physiol (Lond).* 2015;593:1327–9. doi:10.1113/JP270133.
29. Biesiadecki BJ, Davis JP, Ziolo MT, Janssen PML. Tri-modal regulation of cardiac muscle relaxation; intracellular calcium decline, thin filament deactivation, and cross-bridge cycling kinetics. *Biophysical Reviews.* 2014;6:273–89. doi:10.1007/s12551-014-0143-5.

30. Kobirumaki-Shimozawa F, Inoue T, Shintani SA, Oyama K, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata S, Fukuda N. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *J Physiol Sci*. 2014;64:221–32. doi:10.1007/s12576-014-0314-y.
31. Horvath B, Bers DM. The late sodium current in heart failure: pathophysiology and clinical relevance. *ESC Heart Fail*. 2014;1:26–40. doi:10.1002/ehf2.12003.
32. Despa S, Bers DM. Na⁺ transport in the normal and failing heart - remember the balance. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;61:2–10. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.011.
33. Chen-Izu Y, Shaw RM, Pitt GS, Yarov-Yarovoy V, Sack JT, Abriel H, Aldrich RW, Belardinelli L, Cannell MB, Catterall WA, Chazin WJ, Chiamvimonvat N, Deschenes I, Grandi E, Hund TJ, Izu LT, Maier LS, Maltsev VA, Marionneau C, Mohler PJ, Rajamani S, Rasmusson RL, Sobie EA, Clancy CE, Bers DM. Na⁺ channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *J Physiol (Lond)*. 2015;593:1347–60. doi:10.1113/jphysiol.2014.281428.
34. Verdonck F, Mubagwa K, Sipido KR. Na(+) in the subsarcolemmal 'fuzzy' space and modulation of Ca(2+)(i) and contraction in cardiac myocytes. *Cell Calcium*. 2004;35:603–12. doi:10.1016/j.ceca.2004.01.014.
35. Bay J, Kohlhaas M, Maack C. Intracellular Na⁺ and cardiac metabolism. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;61:20–7. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.05.010.
36. Clancy CE, Chen-Izu Y, Bers DM, Belardinelli L, Boyden PA, Csernoch L, Despa S, Fermini B, Hool LC, Izu L, Kass RS, Lederer WJ, Louch WE, Maack C, Mattiazzi A, Qu Z, Rajamani S, Rippinger CM, Sejersted OM, O'Rourke B, Weiss JN, Varró A, Zaza A. Deranged sodium to sudden death. *J Physiol (Lond)*. 2015;593:1331–45. doi:10.1113/jphysiol.2014.281204.
37. Despa S. Myocyte Na⁺ Dysregulation in Heart Failure and Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol*. 2018;9:1303. doi:10.3389/fphys.2018.01303.
38. Balcazar D, Regge V, Santalla M, Meyer H, Paululat A, Mattiazzi A, Ferrero P. SERCA is critical to control the Bowditch effect in the heart. *Sci Rep*. 2018;8:12447. doi:10.1038/s41598-018-30638-9.
39. Bers DM, Despa S, Bossuyt J. Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1080:165–77. doi:10.1196/annals.1380.015.
40. Díaz ME, Graham HK, Trafford AW. Enhanced sarcolemmal Ca²⁺ efflux reduces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content and systolic Ca²⁺ in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004;62:538–47. doi:10.1016/j.cardiores.2004.01.038.

41. Bertero E, Prates Roma L, Ameri P, Maack C. Cardiac effects of SGLT2 inhibitors: the sodium hypothesis. *Cardiovasc Res*. 2018;114:12–8. doi:10.1093/cvr/cvx149.
42. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res*. 2013;113:709–24. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300376.
43. Maack C, Lehrke M, Backs J, Heinzel FR, Hulot J-S, Marx N, Paulus WJ, Rossignol P, Taegtmeyer H, Bauersachs J, Bayes-Genis A, Brutsaert D, Bugger H, Clarke K, Cosentino F, Keulenaer G de, Dei Cas A, González A, Huelsmann M, Iaccarino G, Lunde IG, Lyon AR, Pollesello P, Rena G, Riksen NP, Rosano G, Staels B, van Laake LW, Wanner C, Farmakis D, Filippatos G, Ruschitzka F, Seferovic P, Boer RA de, Heymans S. Heart failure and diabetes: metabolic alterations and therapeutic interventions: a state-of-the-art review from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association-European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2018;39:4243–54. doi:10.1093/eurheartj/ehy596.
44. Ljubojevic S, Bers DM. Nuclear calcium in cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;65:211–7. doi:10.1097/FJC.000000000000174.
45. Curl CL, Danes VR, Bell JR, Raaijmakers AJA, Ip WTK, Chandramouli C, Harding TW, Porrello ER, Erickson JR, Charchar FJ, Kompa AR, Edgley AJ, Crossman DJ, Soeller C, Mellor KM, Kalman JM, Harrap SB, Delbridge LMD. Cardiomyocyte Functional Etiology in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Is Distinctive-A New Preclinical Model. *J Am Heart Assoc* 2018. doi:10.1161/JAHA.117.007451.
46. Lam CSP, Chandramouli C, Ahooja V, Verma S. SGLT-2 Inhibitors in Heart Failure: Current Management, Unmet Needs, and Therapeutic Prospects. *J Am Heart Assoc*. 2019;8:e013389. doi:10.1161/JAHA.119.013389.
47. Tschöpe C, van Linthout S. New insights in (inter)cellular mechanisms by heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Heart Fail Rep*. 2014;11:436–44. doi:10.1007/s11897-014-0219-3.
48. Silverthorn DU, Johnson BR. *Human physiology: An integrated approach*. 5th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings; 2010.
49. Hamdani N, Bishu KG, Frieling-Salewsky M von, Redfield MM, Linke WA. Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res*. 2013;97:464–71. doi:10.1093/cvr/cvs353.

50. Hamdani N, Franssen C, Lourenço A, Falcão-Pires I, Fontoura D, Leite S, Plettig L, López B, Ottenheijm CA, Becher PM, González A, Tschöpe C, Díez J, Linke WA, Leite-Moreira AF, Paulus WJ. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail.* 2013;6:1239–49. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000539.
51. Bode D, Semmler L, Wakula P, Hegemann N, Primessnig U, Beindorff N, Powell D, Dahmen R, Ruetten H, Oeing C, Alogna A, Messroghli D, Pieske BM, Heinzel FR, Hohendanner F. Dual SGLT-1 and SGLT-2 inhibition improves left atrial dysfunction in HFpEF. *Cardiovasc Diabetol.* 2021;20:7. doi:10.1186/s12933-020-01208-z.
52. Bianco CM, Farjo PD, Ghaffar YA, Sengupta PP. Myocardial Mechanics in Patients With Normal LVEF and Diastolic Dysfunction. *JACC Cardiovasc Imaging* 2019. doi:10.1016/j.jcmg.2018.12.035.
53. Primessnig U, Schönleitner P, Höll A, Pfeiffer S, Bracic T, Rau T, Kapl M, Stojakovic T, Glasnov T, Leineweber K, Wakula P, Antoons G, Pieske B, Heinzel FR. Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:987–97. doi:10.1002/ejhf.524.
54. LeWinter MM, Granzier HL. Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63:207–12. doi:10.1097/FJC.000000000000007.
55. Davis JP, Tikunova SB. Ca²⁺ exchange with troponin C and cardiac muscle dynamics. *Cardiovasc Res.* 2008;77:619–26. doi:10.1093/cvr/cvm098.
56. Baartscheer A, Schumacher CA, Wüst RCI, Fiolet JWT, Stienen GJM, Coronel R, Zuurbier CJ. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na⁺ through inhibition of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia.* 2017;60:568–73. doi:10.1007/s00125-016-4134-x.
57. Chung J-H, Biesiadecki BJ, Ziolo MT, Davis JP, Janssen PML. Myofilament Calcium Sensitivity: Role in Regulation of In vivo Cardiac Contraction and Relaxation. *Front Physiol.* 2016;7:562. doi:10.3389/fphys.2016.00562.
58. Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry Mosc.* 2013;78:1447–65. doi:10.1134/S0006297913130063.
59. Jideama NM, Noland TA, Raynor RL, Blobe GC, Fabbro D, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hannun YA, Kuo JF. Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins

- and regulation of myofilament properties. *J Biol Chem.* 1996;271:23277–83.
doi:10.1074/jbc.271.38.23277.
60. Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie.* 8th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007.
61. Chanda D, Luiken JJFP, Glatz JFC. Signaling pathways involved in cardiac energy metabolism. *FEBS Lett.* 2016;590:2364–74. doi:10.1002/1873-3468.12297.
62. Li MX, Hwang PM. Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs. *Gene.* 2015;571:153–66. doi:10.1016/j.gene.2015.07.074.
63. Hamdani N, Waard M de, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, dos Remedios C, Duncker DJ, Borbely A, Papp Z, Paulus W, Stienen GJM, Marston SB, van der Velden J. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 2008;29:189–201. doi:10.1007/s10974-008-9160-y.
64. Barbagallo F, Xu B, Reddy GR, West T, Wang Q, Fu Q, Li M, Shi Q, Ginsburg KS, Ferrier W, Isidori AM, Naro F, Patel HH, Bossuyt J, Bers D, Xiang YK. Genetically Encoded Biosensors Reveal PKA Hyperphosphorylation on the Myofilaments in Rabbit Heart Failure. *Circ Res.* 2016;119:931–43.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308964.
65. Guaricci AI, Bulzis G, Pontone G, Scicchitano P, Carbonara R, Rabbat M, Santis D de, Ciccone MM. Current interpretation of myocardial stunning. *Trends Cardiovasc Med.* 2018;28:263–71. doi:10.1016/j.tcm.2017.11.005.
66. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res.* 2004;94:1279–89.
doi:10.1161/01.RES.0000127175.21818.C2.
67. Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res.* 2000;86:51–8. doi:10.1161/01.res.86.1.51.
68. Nassif ME, Kosiborod M. Effects of sodium glucose cotransporter type 2 inhibitors on heart failure. *Diabetes Obes Metab.* 2019;21 Suppl 2:19–23.
doi:10.1111/dom.13678.
69. Malhotra A. Regulation of contractile proteins in diabetic heart. *Cardiovasc Res.* 1997;34:34–40. doi:10.1016/S0008-6363(97)00059-X.

70. Chilton RJ. Effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors on the cardiovascular and renal complications of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2019. doi:10.1111/dom.13854.
71. Varma U, Koutsifeli P, Benson VL, Mellor KM, Delbridge L. Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes – Experimental insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018;1864:1949–59. doi:10.1016/j.bbadis.2017.10.035.
72. Szablewski L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *Int J Cardiol*. 2017;230:70–5. doi:10.1016/j.ijcard.2016.12.083.
73. Schwenk RW, Luiken JJFP, Bonen A, Glatz JFC. Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 2008;79:249–58. doi:10.1093/cvr/cvn116.
74. Cefalo CMA, Cinti F, Moffa S, Impronta F, Sorice GP, Mezza T, Pontecorvi A, Giaccari A. Sotagliflozin, the first dual SGLT inhibitor: current outlook and perspectives. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18:20. doi:10.1186/s12933-019-0828-y.
75. Lambert R, Srodulski S, Peng X, Margulies KB, Despa F, Despa S. Intracellular Na⁺ Concentration (Na⁺_i) Is Elevated in Diabetic Hearts Due to Enhanced Na⁺-Glucose Cotransport. *J Am Heart Assoc*. 2015;4:e002183. doi:10.1161/JAHA.115.002183.
76. Fu Q, Xu B, Liu Y, Parikh D, Li J, Li Y, Zhang Y, Riehle C, Zhu Y, Rawlings T, Shi Q, Clark RB, Chen X, Abel ED, Xiang YK. Insulin Inhibits Cardiac Contractility by Inducing a Gi-Biased β 2-Adrenergic Signaling in Hearts. *Diabetes*. 2014;63:2676–89. doi:10.2337/db13-1763.
77. Jweied EE, McKinney RD, Walker LA, Brodsky I, Geha AS, Massad MG, Buttrick PM, Tombe PP de. Depressed cardiac myofilament function in human diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2478-83. doi:10.1152/ajpheart.00638.2005.
78. Papadaki M, Holewinski RJ, Previs SB, Martin TG, Stachowski MJ, Li A, Blair CA, Moravec CS, van Eyk JE, Campbell KS, Warshaw DM, Kirk JA. Diabetes with heart failure increases methylglyoxal modifications in the sarcomere, which inhibit function. *JCI Insight*. doi:10.1172/jci.insight.121264.
79. Kosmas CE, Silverio D, Sourlas A, Montan PD, Guzman E. Role of spironolactone in the treatment of heart failure with preserved ejection fraction. *Ann Transl Med*. 2018;6:461. doi:10.21037/atm.2018.11.16.

80. Edelmann F, Wachter R, Schmidt AG, Kraigher-Krainer E, Colantonio C, Kamke W, Duvinage A, Stahrenberg R, Durstewitz K, Löffler M, Düngen H-D, Tschöpe C, Herrmann-Lingen C, Halle M, Hasenfuss G, Gelbrich G, Pieske B. Effect of spironolactone on diastolic function and exercise capacity in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the Aldo-DHF randomized controlled trial. *JAMA*. 2013;309:781–91. doi:10.1001/jama.2013.905.
81. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, Harty B, Heitner JF, Kenwood CT, Lewis EF, O'Meara E, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SD, Sweitzer NK, Yang S, McKinlay SM. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2014;370:1383–92. doi:10.1056/NEJMoa1313731.
82. Kosmala W, Holland DJ, Rojek A, Wright L, Przewlocka-Kosmala M, Marwick TH. Effect of If-Channel Inhibition on Hemodynamic Status and Exercise Tolerance in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Randomized Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:1330–8. doi:10.1016/j.jacc.2013.06.043.
83. Maier LS, Layug B, Karwatowska-Prokopczuk E, Belardinelli L, Lee S, Sander J, Lang C, Wachter R, Edelmann F, Hasenfuss G, Jacobshagen C. RANoLazIne for the Treatment of Diastolic Heart Failure in Patients With Preserved Ejection Fraction: The RALI-DHF Proof-of-Concept Study. *JACC: Heart Failure*. 2013;1:115–22. doi:10.1016/j.jchf.2012.12.002.
84. Solomon SD, Zile M, Pieske B, Voors A, Shah A, Kraigher-Krainer E, Shi V, Bransford T, Takeuchi M, Gong J, Lefkowitz M, Packer M, McMurray JJV. The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. *The Lancet*. 2012;380:1387–95. doi:10.1016/S0140-6736(12)61227-6.
85. Solomon SD, McMurray JJV, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, Martinez F, Packer M, Pfeffer MA, Pieske B, Redfield MM, Rouleau JL, van Veldhuisen DJ, Zannad F, Zile MR, Desai AS, Claggett B, Jhund PS, Boytsov SA, Comin-Colet J, Cleland J, Düngen H-D, Goncalvesova E, Katova T, Kerr Saraiva JF, Lelonek M, Merkely B, Senni M, Shah SJ, Zhou J, Rizkala AR, Gong J, Shi VC, Lefkowitz MP. Angiotensin-Neprilysin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2019;381:1609–20. doi:10.1056/NEJMoa1908655.

86. Kaplan A, Abidi E, El-Yazbi A, Eid A, Booz GW, Zouein FA. Direct cardiovascular impact of SGLT2 inhibitors: mechanisms and effects. *Heart Failure Reviews*. 2018;23:419–37. doi:10.1007/s10741-017-9665-9.
87. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. SGLT inhibitors in management of diabetes. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2013;1:140–51. doi:10.1016/S2213-8587(13)70050-0.
88. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Inzucchi SE. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373:2117–28. doi:10.1056/NEJMoa1504720.
89. Baartscheer A, Schumacher CA, Wüst RCI, Fiolet JWT, Stienen GJM, Coronel R, Zuurbier CJ. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na⁺ through inhibition of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in rats and rabbits *Supplements. Diabetologia*. 2017;60.
90. Conceição G, Heinonen I, Lourenço AP, Duncker DJ, Falcão-Pires I. Animal models of heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J*. 2016;24:275–86. doi:10.1007/s12471-016-0815-9.
91. Tofovic SP, Kusaka H, Kost CK, Bastacky S. Renal function and structure in diabetic, hypertensive, obese ZDFxSHHF-hybrid rats. *Ren Fail*. 2000;22:387–406. doi:10.1081/jdi-100100882.
92. Leite S, Oliveira-Pinto J, Tavares-Silva M, Abdellatif M, Fontoura D, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Lourenço AP. Echocardiography and invasive hemodynamics during stress testing for diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: an experimental study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;308:H1556-63. doi:10.1152/ajpheart.00076.2015.
93. Hohendanner F, Bode D, Primessnig U, Guthof T, Jeuthe S, Adams V, Rolim N, Wisloff U, Pieske B, Heinzel F. Atrial and ventricular in-vitro and in-vivo function in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *EP Europace*. 2017;19:iii1-iii2. doi:10.1093/ehjci/eux132.002.
94. Danne T, Biester T, Kordonouri O. Combined SGLT1 and SGLT2 Inhibitors and Their Role in Diabetes Care. *Diabetes Technol Ther*. 2018;20:S269-S277. doi:10.1089/dia.2018.0081.

95. Bode D, Guthof T, Pieske BM, Heinzl FR, Hohendanner F. Isolation of Atrial Cardiomyocytes from a Rat Model of Metabolic Syndrome-related Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *J Vis Exp* 2018. doi:10.3791/57953.
96. Freidl P. Diplomarbeit: Frühe Veränderungen der Calcium Homöostase und Remodelling der T-Tubuli in β 1-transgenen Mäusen. 2009.
97. Molecular Probes I. Product Information: Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01200.pdf>. Zugriff am 05.12.2019.
98. IonOptix LLC. Myocyte Calcium & Contractility Recording System (HyperSwitch Configuration). 2011. http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont_HSW_digital.pdf. Zugriff am 02.11.2019.
99. IonOptix LLC. Measuring Sarcomere Length. <http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Measuring-sarcomere-length.pdf>. Zugriff am 02.11.2019.
100. Powers FM, Solaro RJ. Caffeine alters cardiac myofilament activity and regulation independently of Ca^{2+} binding to troponin C. *Am J Physiol*. 1995;268:C1348-53. doi:10.1152/ajpcell.1995.268.6.C1348.
101. Primessnig U, Hegemann N, Clemens L, Beindorff N, Wakula P, Grune J, Kübler W, Hohendanner F, Pieske B, Messroghli D, Heinzl FR. Abstract 379 SGLT-1/2 inhibition with Sotagliflozin improved cardiac function in a metabolic-based HFpEF model. 2019. Zugriff am 27.04.2020.
102. American Council on Science and Health. Another Problem with BMI: The Obesity Paradox. 2016. <https://www.acsh.org/news/2016/03/07/another-problem-with-bmi-the-obesity-paradox>. Zugriff am 22.02.2021.
103. Nishimura RA, Ommen SR, Tajik AJ. Cardiology patient page. Hypertrophic cardiomyopathy: a patient perspective. *Circulation*. 2003;108:e133-5. doi:10.1161/01.CIR.0000097621.97566.96.
104. Talman V, Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*. 2016;365:563–81. doi:10.1007/s00441-016-2431-9.
105. Miranda-Silva D, Wüst RCI, Conceição G, Gonçalves-Rodrigues P, Gonçalves N, Gonçalves A, Kuster DWD, Leite-Moreira AF, van der Velden J, Sousa Beleza JM de, Magalhães J, Stienen GJM, Falcão-Pires I. Disturbed cardiac mitochondrial and cytosolic calcium handling in a metabolic risk-related rat model of heart failure with

- preserved ejection fraction. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020;228:e13378.
doi:10.1111/apha.13378.
106. Runte KE, Bell SP, Selby DE, Häußler TN, Ashikaga T, LeWinter MM, Palmer BM, Meyer M. Relaxation and the Role of Calcium in Isolated Contracting Myocardium From Patients With Hypertensive Heart Disease and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail* 2017.
doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004311.
107. Baddeley D, Jayasinghe ID, Lam L, Rossberger S, Cannell MB, Soeller C. Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:22275–80.
doi:10.1073/pnas.0908971106.
108. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MPV, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJM, Laarman GJ, Somsen A, Verheugt FWA, Niessen HWM, Paulus WJ. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 2012;126:830–9.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.076075.
109. Nixon BR, Thawornkaiwong A, Jin J, Brundage EA, Little SC, Davis JP, Solaro RJ, Biesiadecki BJ. AMP-activated protein kinase phosphorylates cardiac troponin I at Ser-150 to increase myofilament calcium sensitivity and blunt PKA-dependent function. *J Biol Chem*. 2012;287:19136–47. doi:10.1074/jbc.M111.323048.
110. Kim GE, Young LH. AMPK and the Atrial Response to Metabolic Inhibition. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:59–61. doi:10.1016/j.jacc.2015.04.054.
111. Oliveira SM, Zhang Y-H, Solis RS, Isackson H, Bellahcene M, Yavari A, Pinter K, Davies JK, Ge Y, Ashrafian H, Walker JW, Carling D, Watkins H, Casadei B, Redwood C. AMP-activated protein kinase phosphorylates cardiac troponin I and alters contractility of murine ventricular myocytes. *Circ Res*. 2012;110:1192–201.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259952.
112. Yoshii A, Nagoshi T, Kashiwagi Y, Kimura H, Tanaka Y, Oi Y, Ito K, Yoshino T, Tanaka TD, Yoshimura M. Cardiac ischemia-reperfusion injury under insulin-resistant conditions: SGLT1 but not SGLT2 plays a compensatory protective role in diet-induced obesity. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18:85. doi:10.1186/s12933-019-0889-y.
113. Connelly KA, Zhang Y, Desjardins J-F, Thai K, Gilbert RE. Dual inhibition of sodium-glucose linked cotransporters 1 and 2 exacerbates cardiac dysfunction

following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:99.
doi:10.1186/s12933-018-0741-9.

114. Di Franco A, Cantini G, Tani A, Coppini R, Zecchi-Orlandini S, Raimondi L, Luconi M, Mannucci E. Sodium-dependent glucose transporters (SGLT) in human ischemic heart: A new potential pharmacological target. *Int J Cardiol.* 2017;243:86–90. doi:10.1016/j.ijcard.2017.05.032.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Jan Börge Ritter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wirkung einer dualen SGLT-1/2 Inhibition mit Sotagliflozin auf die Kardiomyozytenfunktion in einem Rattenmodell der Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion“; „Effect of a dual SGLT-1/2 inhibition with Sotagliflozin on cardiomyocyte function in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

12. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13. Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Frank Heinzl und Co-Betreuer Dr. Felix Hohendanner für die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Ebenfalls danke ich Brian Danzer für die Hilfestellungen im Labor, sowie Linden Clemens für die gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Konietschke und Frau Schneider für die fachliche Unterstützung und den ermutigenden Zuspruch für meine Arbeit bedanken.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Rückhalt mir das Studium der Medizin und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

14. Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucherschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Ritter Jan Börge
Emailadresse: jan-boerge.ritter@charite.de
Matrikelnummer: 221995
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. med. Frank Heinzel
Promotionsinstitution/ Klinik: CC11 Medizinische Klinik m.S.
Kardiologie CVK

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Jan Börge Ritter innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 20.06.2019

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Überblick über die gemessenen Daten mittels deskriptiver Statistik; Angabe angemessener Lage- und Streuungsmaße
- Es ist die Abhängigkeit der Daten zu berücksichtigen (mehrere Zellen einer Maus und mehreren gemessenen Parametern)
- Empfohlen wird ein lineares gemischtes Modell

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 08.07.2019

Name des Beraters/ der Beraterin: Alice Schneider



CHARITÉ
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
Besucherschrift: Rahel-Hirsch-Weg 5

Unterschrift Beraterin, Institutsschemenschrift: Rahel-Hirsch-Weg 5