

Aus dem Institut für klinische Diabetologie,
Deutsches Diabetes-Zentrum,
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. univ. Michael Roden

Energiestoffwechsel des humanen Myokards bei Herzinsuffizienz und Diabetes Mellitus Typ 2

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elric Zweck

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. univ. Julia Szendrödi, Ph.D.

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

Drittgutachter: Prof. Dr. med. Johannes Backs

Für Heide und Axel.

Teile der Daten dieser Arbeit wurden, bzw. werden veröffentlicht:

- Scheiber D, Jelenik T, **Zweck E**, Horn P, Schultheiss HP, Lassner D, Boeken U, Saeed D, Kelm M, Roden M, Szendroedi J, Westenfeld R:

High-Resolution Respirometry in Human Endomyocardial Biopsies shows reduced Ventricular Oxidative Capacity related to Heart Failure.

Experimental and Molecular Medicine. Februar 2019 14;51(2):16. doi: 10.1038/s12276-019-0214-6. Impact Faktor (2019): 5,418.

- **Zweck E**, Scheiber D, Jelenik T, Bonner F, Horn P, Pesta D, Schultheiss HP, Boeken U, Akhyari P, Lichtenberg A, Kelm M, Roden M, Westenfeld R, Szendroedi J:

Exposure to Type 2 Diabetes Provokes Mitochondrial Impairment in Apparently Healthy Human Hearts.

Diabetes Care. Mai 2021;44(5):e82-e84. doi: 10.2337/dc20-2255. Impact Faktor (2021): 19,112.

Zusammenfassung

Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) kann unabhängig von anderen Risikofaktoren zu einer Herzinsuffizienz führen. Jüngere Studien geben Hinweise darauf, dass bei Menschen mit koronarer Herzkrankheit bei Vorliegen eines T2DM eine reduzierte myokardiale mitochondriale Funktion vorliegt. Es bleibt jedoch unklar, welchen Einfluss T2DM auf Mitochondrien im humanen Myokard unabhängig von vaskulären Erkrankungen hat.

Es wurden die Hypothesen überprüft, dass (1) die myokardiale Mitochondrienfunktion des linken Ventrikels von jener in den Vorhöfen abweicht, (2) eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz mit einer eingeschränkten mitochondrialen oxidativen Kapazität im humanen Ventrikelmyokard assoziiert ist und (3) T2DM zu metabolischen Veränderungen des ventrikulären Myokards führt. Konkret wurde postuliert, dass (i) T2DM, Hyperglykämie und Insulinresistenz eine reduzierte ventrikuläre myokardiale oxidative Kapazität induzieren, (ii) zugleich eine subklinische Einschränkung kardialer Funktion *in vivo* besteht und (iii) die T2DM-induzierten Veränderungen mit erhöhtem systemischen oxidativen Stress und myokardialer Inflammation assoziiert sind.

Hierzu wurde in myokardialen Gewebeproben verschiedener Kohorten die mitochondriale oxidative Kapazität mittels hochauflösender Respirometrie untersucht. Bei 11 Probanden wurden Mitochondrienfunktion und Citrat-Synthase-Aktivität von Myokard aus rechtem und linkem Atrium, rechtem Ventrikel und interventrikulärem Septum mit linksventrikulärem Myokard verglichen. Weiterhin wurde ventrikuläres Myokard von 85 herzinsuffizienten Probanden mit jenem von 60 kardial asymptomatischen Herztransplantierten verglichen. Schließlich wurde der Einfluss des T2DM entsprechend Hypothesen 1 und 2 an ventrikulärem nicht-insuffizientem Myokard untersucht. Hierzu wurden 17 Herztransplantierte mit T2DM und 32 Herztransplantierte ohne Diabetes (Non-DM) verglichen. Alle Probanden beider Gruppen hatten Herzen von Spendern ohne Diabetes erhalten, welches in der Folge dem Empfänger-Stoffwechsel ausgesetzt war. Es wurden Mitochondrienfunktion, Glukosetoleranz und Insulinresistenz (über orale Glukosetoleranztests), ventrikuläre Pumpfunktion, T2-Relaxationszeiten, die myokardiale Expression von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells Subunit 1* (Nf- κ B1) als zellulärer Stress-Marker und zirkulierender oxidativer Stress erfasst.

Die myokardiale mitochondriale oxidative Kapazität, Kopplungseffizienz und Citrat-Synthase-Aktivität waren in linken und rechtem Atrium niedriger als im linken Ventrikel. Innerhalb des ventrikulären Myokards bestand hinsichtlich dieser Parameter kein Unterschied. Bei Herzinsuffizienten war die ventrikuläre myokardiale oxidative Kapazität niedriger als in Menschen nach Transplantation. Zudem korrelierte die myokardiale mitochondriale oxidative Kapazität mit dem Herzindex als Parameter der kardialen Funktion. Bei Herztransplantierten mit T2DM war die mitochondriale oxidative Kapazität des ventrikulären Myokards gegenüber Non-DM für alle Substrate reduziert. T2DM wies zudem eine eingeschränkte diastolische Funktion (Strainrate) bei erhaltener systolischer Funktion und eine höhere myokardiale T2-Relaxationszeit als Hinweis myokardialer Inflammation auf. Die myokardiale Nf- κ B1-Expression und der systemische oxidative Stress waren in T2DM ebenfalls höher. Über beide Gruppen korrelierte nüchtern-Plasmaglukose invers mit der mitochondrialen Respiration ($R^2=0.12$; $p<0,05$) und der diastolischen Funktion ($R^2=0.33$; $p<0.001$), jedoch positiv mit der Expression von Nf- κ B1 ($R^2=0.09$; $p<0,05$). Die Orale Glukose-Insulinsensitivität korrelierte positiv mit der myokardialen oxidativen Kapazität ($R^2=0.24$; $p<0,05$), jedoch invers mit myokardialen T2-Relaxationszeiten ($R^2=0.25$; $p<0,05$).

Dies zeigt, dass T2DM die respiratorische Funktion des humanen Ventrikelmyokards unabhängig von strukturellen oder vaskulären Erkrankungen beeinträchtigt. Diese Veränderungen werden von myokardialen Stress und Inflammation begleitet und sind mit Hyperglykämie und Insulinresistenz assoziiert. Somit könnte der myokardiale Energiestoffwechsel zukünftig einen diagnostischen und therapeutischen Ansatzpunkt bei diabetes-assoziiierter Herzinsuffizienz darstellen.

Abstract

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) can lead to heart failure independent of other risk factors. Recent studies suggest that in humans with coronary artery disease, myocardial mitochondrial function is reduced in presence of T2DM. However, the direct impact of T2DM on mitochondria in the human myocardium independent of vascular disease remains unclear.

It was hypothesized that (1) human left ventricular and atrial myocardium differ in mitochondrial function, (2) advanced heart failure is associated with an impairment of ventricular myocardial oxidative capacity, and (3) T2DM directly induces specific metabolic alterations in the ventricular myocardium. Concretely, it was postulated that (i) T2DM, hyperglycemia and insulin resistance lead to a reduction of ventricular myocardial oxidative capacity, (ii) concurrently, there is a subclinical cardiac functional impairment *in vivo*, and (iii) these T2DM-related alterations are accompanied by increased systemic oxidative stress and myocardial inflammation.

For this purpose, myocardial mitochondrial oxidative capacity was assessed in myocardial tissue specimens of participants from different cohorts using high-resolution respirometry. In 11 of these patients, myocardium was examined for regional differences. Mitochondrial function and citrate synthase activity in the right atrium, left atrium, right ventricle, and interventricular septum was compared to the respective values in the left ventricular free wall. Furthermore, ventricular myocardium from 85 patients undergoing cardiac surgery was compared to ventricular myocardium from 60 heart transplant recipients without apparent heart failure which was collected percutaneously. Finally, in accordance with hypotheses 1 and 2, the impact of T2DM on human ventricular myocardium was then scrutinized in apparently non-failing ventricular myocardium. We compared 32 heart transplant recipients without diabetes (Non-DM group) with 17 heart transplant recipients with T2DM (T2DM group). All participants in both groups had received hearts of donors without diabetes, which were exposed to the recipient's metabolism after transplantation. Beyond mitochondrial function, we assessed glucose tolerance and insulin resistance using oral glucose tolerance tests (OGTT), ventricular function and T2 relaxation times using cardiac magnetic resonance imaging (cMRI), myocardial expression of nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells Subunit 1 (Nf- κ B1) as a stress marker, as well as circulating markers of oxidative stress.

Myocardial mitochondrial oxidative capacity, coupling efficiency and citrate synthase activity were lower in the left and right atrium compared to the left ventricle. Within ventricular myocardium, there were no differences regarding these parameters. Heart failure patients exhibited lower myocardial oxidative capacity, albeit similar mitochondrial coupling efficiency, compared to patients after heart transplantation. Across both groups, cardiac index as a marker of cardiac function related positively to myocardial oxidative capacity. The T2DM group exhibited lower ventricular myocardial mitochondrial oxidative capacity and higher proton leak for all substrates used compared to Non-DM. Moreover, cMRI revealed preserved systolic but impaired diastolic function (diastolic strain rate) in T2DM, accompanied by increased T2 relaxation times, indicating myocardial inflammation. Myocardial expression of Nf- κ B1 and systemic oxidative stress were higher in T2DM. Across both groups, fasting plasma glucose correlated inversely with mitochondrial oxidative capacity ($R^2=0.12$; $p<0,05$) and diastolic function ($R^2=0.33$; $p<0.001$), but positively with Nf- κ B1 expression ($R^2=0.09$; $p<0,05$). Oral glucose insulin sensitivity related to myocardial mitochondrial oxidative capacity ($R^2= 0.24$; $p<0,05$), but inversely to myocardial T2 relaxation times ($R^2=0.25$; $p<0,05$).

The reported data reveal that T2DM impairs mitochondrial respiratory function in human ventricular myocardium independent of structural or vascular disease. These alterations are accompanied by myocardial stress and inflammation and are related to both, hyperglycemia, and insulin resistance. These findings point towards myocardial energy metabolism as a promising diagnostic and therapeutic target in diabetes-related heart failure.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-Diphosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EMB	Endomyokardbiopsie
ETS	Elektronen-transferierendes System
FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxy-phenylhydrazon
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide-1</i>
GMOct	OXPHOS Kapazität mit den Substraten Glutamat, Malat und Octanoyl-Carnitin
GMSOct	OXPHOS Kapazität mit den Substraten Glutamat, Malat, Succinat und Octanoyl-Carnitin
HbA_{1c}	Hämoglobin A _{1c}
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mittelgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HI	Herzinsuffizienz-Kohorte
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance</i>
HTX	Herztransplantationskohorte
LVAD	<i>Left ventricular assist device</i>
MOct	OXPHOS Kapazität mit den Substraten Malat und Octanoyl-Carnitin
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
MT-CO1	<i>mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-κB(1)	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (p105 subunit)</i>

OGIS	Orale Glukose-Insulin-Sensitivität, beziehungsweise <i>Oral Glucose Insulin Sensitivity</i>
OGTT	Oraler Glukose-Toleranztest
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PREDIM	<i>Predicted M-value</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
T1DM	Typ 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Klassifikation	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Ätiopathogenese	3
1.2	Energiestoffwechsel des ventrikulären Myokards	5
1.2.1	Substratversorgung und Leistung des menschlichen Herzes	5
1.2.2	Die oxidative Phosphorylierung	6
1.2.3	Respiratorische Stadien	8
1.3	Diabetes Mellitus	11
1.3.1	Diagnose und Klassifikation	11
1.3.2	Epidemiologie	12
1.3.3	Pathogenetische Grundlagen des Diabetes Mellitus Typ 2	13
1.4	Die diabetische Kardiomyopathie	15
1.4.1	Pathophysiologische Konzepte	15
1.4.2	Die Rolle myokardialer Mitochondrien	16
2	Hypothesen und Ziele der Arbeit	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Chemikalien und Arzneimittel	19
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3	Geräte	22
3.1.4	Software	23
3.2	Methoden	23
3.2.1	Studiendesign	23
3.2.2	Rekrutierung und Probandenkollektiv	24
3.2.3	Studienablauf	24
3.2.4	Hochauflösende <i>ex vivo</i> -Respirometrie an humanem Myokard	28

3.2.5	Messung der Citrat-Synthase-Aktivität	31
3.2.6	Messung von oxidativem Stress aus gefrorenem Serum	32
3.2.7	Messung der myokardialen Expression von mRNA	33
3.2.8	Statistische Auswertung	33
4	Ergebnisse	38
4.1	Höhere Respiration von linksventrikulärem gegenüber Vorhof-Myokard	38
4.2	Assoziation der Herzinsuffizienz mit reduzierter mitochondrialer Respiration	40
4.3	T2DM induziert mitochondriale Veränderungen im ventrikulären Myokard	45
5	Diskussion	54
5.1	Metabolische Charakteristika verschiedener Myokardregionen	54
5.1.1	Eigenschaften atrialen und ventrikulären Myokards	54
5.1.2	Ventrikuläre regionale metabolische Unterschiede	55
5.1.3	Akquise von Humanmyokard für klinische Studien	56
5.1.4	Limitationen	57
5.2	Reduzierter myokardialer Sauerstoffverbrauch bei Herzinsuffizienz	57
5.2.1	Charakteristika der Kohorten	57
5.2.2	Mitochondriale Funktion bei Herzinsuffizienz	58
5.2.3	Limitationen	59
5.3	Metabolische Charakteristika des humanen Myokards bei T2DM	60
5.3.1	Vergleichbarkeit der Probanden mit und ohne T2DM	60
5.3.2	Funktionelle Veränderungen des diabetischen Myokards	60
5.3.3	Reduktion myokardialer oxidativer Kapazität in T2DM	61
5.3.4	Hyperglykämie und Insulinresistenz	63
5.3.5	Myokardiale Inflammation und oxidativer Stress	65
5.3.6	Die Herztransplantation als mechanistisches Modell	67
5.3.7	Limitationen	68
6	Schlussfolgerungen	70
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	71

1 Einleitung

1.1 Die Herzinsuffizienz

1.1.1 Klassifikation

Die Herzinsuffizienz wird von der *European Society of Cardiology* in der Leitlinie von 2016 als ein aufgrund einer strukturellen oder funktionellen kardialen Ursache in Ruhe oder bei Belastung bestehendes klinisches Syndrom mit typischen Symptomen (z. B. Dyspnoe, Orthopnoe, paroxysmale nächtliche Dyspnoe, Unterschenkelödeme, Leistungsminderung und Fatigue) definiert, im Rahmen dessen es zu reduziertem Herzzeitvolumen oder erhöhten intrakardialen Drücken kommt [1]. Die Herzinsuffizienz bildet das finale Stadium zahlreicher kardialer Erkrankungen (siehe 1.1.3) [2].

Es existieren verschiedene Klassifikationen der Herzinsuffizienz, besonders gebräuchlich sind die Einteilung nach linksventrikulärer Ejektionsfraktion (siehe Tabelle 1) und die Stadieneinteilung nach Schwere der Dyspnoe-Symptomatik nach der *New York Heart Association* (siehe Tabelle 2) [1, 3]. Zudem kann zwischen akuter und chronischer Herzinsuffizienz unterschieden werden, wobei die akute Herzinsuffizienz typischerweise als Dekompensation einer chronischen Herzinsuffizienz auftritt [1, 4].

Typ der Herzinsuffizienz	Kriterien
Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF)	<ul style="list-style-type: none"> – Symptome ± klinische Zeichen – LVEF \geq 50% – Erhöhung natriuretischer Peptide – Ein weiteres Kriterium: Strukturelle Herzerkrankung oder diastolische Dysfunktion
Herzinsuffizienz mit mittelgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion (HFmrEF)	<ul style="list-style-type: none"> – Symptome ± klinische Zeichen – LVEF 40-49% – Erhöhung natriuretischer Peptide – Ein weiteres Kriterium: Strukturelle Herzerkrankung oder diastolische Dysfunktion
Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF)	<ul style="list-style-type: none"> – Symptome ± klinische Zeichen – LVEF \leq 40%

Tabelle 1: Einteilung der Herzinsuffizienz nach linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) nach *European Society of Cardiology* [1]. Die Strukturelle Herzerkrankung wird als linksventrikuläre

Hypertrophie oder Vergrößerung des rechten Vorhofs definiert. HFmrEF: heart failure with mid-range ejection fraction; HFpEF: heart failure with preserved ejection fraction; HFrEF: heart failure with reduced ejection fraction.

Stadium der Herzinsuffizienz	Kriterien
I	Kardiale Erkrankung ohne Einschränkung physischer Aktivität und ohne durch alltägliche physische Aktivität ausgelöste unverhältnismäßige Fatigue, Palpitationen, Dyspnoe oder Angina Pectoris.
II	Kardiale Erkrankung, die zu leichter Einschränkung der physischen Aktivität führt. Die alltägliche physische Aktivität löst unverhältnismäßige Fatigue, Palpitationen, Dyspnoe oder Angina Pectoris aus. Es bestehen keine Symptome in Ruhe.
III	Kardiale Erkrankung, die zu ausgeprägter Einschränkung der physischen Aktivität führt. Schon weniger als die alltägliche physische Aktivität löst unverhältnismäßige Fatigue, Palpitationen, Dyspnoe oder Angina Pectoris aus. Es bestehen keine Symptome in Ruhe.
IV	Kardiale Erkrankung, die bei jeder etwaigen physischen Aktivität oder auch in Ruhe in einschränkenden Beschwerden resultiert.

Tabelle 2: Einteilung der Herzinsuffizienz nach Schweregrad der Dyspnoe (Atemnot) nach *New York Heart Association* (NYHA) [3, 5].

Über die Symptome hinausgehende klinische Zeichen können fakultativ in jedem Stadium der Herzinsuffizienz auftreten, die zur Diagnose erhoben werden sollten. Spezifisch sind hier insbesondere die Jugularvenenstauung und ein positiver hepatojugulärer Reflux, ein dritter Herzton und ein nach lateral verlagertes Herzspitzenstoß [1].

1.1.2 Epidemiologie

Die Herzinsuffizienz ist eine häufige Erkrankung, die insbesondere im höheren Alter und entsprechend in entwickelten Staaten mit hoher Lebenserwartung gehäuft auftritt [1, 6, 7]. Im Rahmen des demografischen Wandels wird global eine Zunahme der Krankheitslast durch Herzinsuffizienz erwartet, wenngleich die alters-adjustierte Inzidenz der Herzinsuffizienz zu stagnieren scheint [6, 8]. Das Risiko, im Lauf des Lebens eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, liegt bei Menschen über 40 Jahren bei schätzungsweise 20-30% [9–11]. Insgesamt leben global nach Schätzungen zwischen 23 und 64 Millionen Menschen mit einer Herzinsuffizienz [4, 8, 12]. In Deutschland liegt die Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung etwa bei 2-4% [7, 13] und

deutschlandweit werden jährlich schätzungsweise über 500.000 Fälle einer Herzinsuffizienz diagnostiziert [7]. Hierbei machen HFpEF und HFrEF jeweils etwa die Hälfte der Patienten aus, wobei dieses Verhältnis je nach Studie, Definition und Erhebungszeitraum stark variiert [1, 6, 14].

Die Risiko für Mortalität ist bei Patienten mit Herzinsuffizienz drastisch erhöht mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 50% und einer 10-Jahres-Überlebensrate von etwa 10% [4]. In den USA hat jeder Achte bis Neunte zum Zeitpunkt des Todes die Diagnose einer Herzinsuffizienz und bei 20% dieser Menschen ist es die Haupt-Todesursache [1, 8, 15]. Die Herzinsuffizienz verschlechtert darüber hinaus signifikant die Lebensqualität betroffener Patienten [6] und weist eine 2-Jahres-Hospitalisierungsrate von über 50% auf [7], womit sie 2017 die vierthäufigste Ursache für eine Hospitalisation in den USA darstellte [16]. Entsprechend ist die Erkrankung auch von erheblicher sozioökonomischer Relevanz [2]. Die gesamten durch Herzinsuffizienz entstehenden Kosten betragen in den USA 39 Billionen US-Dollar pro Jahr [8].

1.1.3 Ätiopathogenese

Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus, das metabolische Syndrom und Atherosklerose, inklusive koronarer Herzerkrankung [6]. Zusätzlich sind genetische Erkrankungen (z. B. bei der dilatativen Kardiomyopathie), sowie modifizierbare Lifestyle-Faktoren wie Nikotin-, Drogen- und Alkoholabusus, Ernährung und Bewegungsarmut als potenzielle Risikofaktoren zu nennen [1].

Die Ursachen für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind jedoch vielfältig. Die *European Society of Cardiology* teilt sie in drei Übergruppen ein: Erkrankungen des Myokards (ischämische Kardiomyopathie, toxische Myokardschädigung, immunologisch vermittelte Erkrankungen, Infiltrationen oder Einlagerungen im Myokard, sowie metabolische und genetische Anomalien), veränderte Füllungsbedingungen (z.B. durch arterielle und pulmonale Hypertonie, valvuläre Erkrankungen, mechanische Belastung des Herzens und Volumenüberschuss) und Arrhythmien (atriale oder ventrikuläre Brady- oder Tachykardie) [1]. Eine gemeinsame Folge vieler der genannten Ursachen ist ein pathologisches myokardiales *Remodeling* als Kompensationsmechanismus, der in eine ventrikulären Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion und im Verlauf in eine ventrikulären Dilatation mit kombinierter systolischer und diastolischer Insuffizienz mündet [2].

Auf molekularer Ebene ist die Herzinsuffizienz durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener pathologischer Veränderungen gekennzeichnet, die sich je nach Ursache und Typ der Herzinsuffizienz unterscheiden können [2]. Beispielsweise wird die kardiale Hypertrophie maßgeblich durch eine Aktivierung des Signalwegs des *Insulin-like Growth Factor* (IGF) über Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase alpha (PI3K α) und Proteinkinase B (AKT) begünstigt [17]. Zudem

bewirkt ein Zusammenspiel verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR), zum Beispiel für Katecholamine oder Zytokine die Aktivierung anderer Kinase-Kaskaden, welche schließlich zur Aktivierung von *Remodeling*-induzierenden Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) oder *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) führen [17].

Zudem konnte eine zentrale Rolle des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) im kardialen *Remodeling* nachgewiesen werden [18, 19]. NF- κ B ist die Bezeichnung für eine Familie von Protein-Komplexen, die durch verschiedene, intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden und als Transkriptionsfaktor, sowie als Regulator für Apoptose und Zytokine wirken [18]. Bisher sind fünf humane für NF- κ B kodierende Gene bekannt (NFKB1, NFKB2, RELA, c-REL und RELB). Diese ermöglichen die Erstellung von insgesamt 7 Proteinen (p105, p100, p50, p52, RELA, c-REL und RELB) [20]. Ansätze zur therapeutischen Regulation von NF- κ B bei Herzinsuffizienz durch spezifische Inhibitoren existieren [21] – dass NF- κ B im Myokard jedoch sowohl eine Rolle bei kardialer hypertropher *Remodeling* spielt, als auch komplexe zytoprotektive, wie auch zytotoxische und pro-apoptotische Effekte hat, verkompliziert diese therapeutische Strategie [18]. Zahlreiche Stimuli führen zur vermehrten oder verminderten Expression von NF- κ B. Die Aktivierungsmechanismen werden in kanonische und nicht-kanonische unterschieden, was zu verschiedenen Zusammensetzungen der NF- κ B-Untereinheiten und somit zu individuellen Funktionen führen kann [18, 22, 23]. Zu einer Aktivierung von NF- κ B führen unter anderem inflammatorische Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Katecholamine, sowie Schädigungen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) [22]. NF- κ B kann außerdem über *Toll-like* Rezeptoren (TLR) wie TLR9 aktiviert werden [24]. TLR9 ist ein auf Immunzellen exprimierter Rezeptor, der seinerseits wiederum durch Infektionen, Zellschäden oder geschädigte Mitochondrien aktiviert werden kann [25, 26]. Die Relevanz dieser Entdeckung für die Herzinsuffizienz ist potenziell hoch, da bei dieser ebenfalls eine mitochondriale Schädigung vorliegt, was dem Konzept der Herzinsuffizienz als metabolische Erkrankung entspricht [27]. Dieses Konzept der Herzinsuffizienz als metabolische Erkrankung wurde erstmalig 1939 von George Herrmann und George M. Decherd Junior etabliert [28] und seitdem in zahlreichen Studien untersucht [27]. So konnte gezeigt werden, dass das insuffiziente Myokard Ätiologie-spezifische Störungen des Energiestoffwechsels aufweist, die sämtliche Schritte der Substratverwertung betreffen können (siehe 1.2.1).

1.2 Energiestoffwechsel des ventrikulären Myokards

1.2.1 Substratversorgung und Leistung des menschlichen Herzes

Das Herz hat den höchsten Energiebedarf aller Organe des Menschen mit einem täglichen Umsatz von 6 kg ATP in Ruhe bis zu 30 kg ATP bei Belastung, was dem 20 bis 150-fachen seines eigenen Gewichts entspricht [27, 29]. Täglich schlägt es etwa 100.000 mal und pumpt circa 10 Tonnen Blut durch den Körper [27]. Diese Leistung ist nur durch eine effektive und effiziente Substratverwertung des Myokards erreichbar, die in drei Schritte unterteilbar ist [27, 30]:

- I. Die Aufnahme von Substraten in den Kardiomyozyten.
- II. Die Umwandlung jener Substrate zu Energieträgern, insbesondere ATP, z. B. durch oxidative Phosphorylierung (siehe 1.2.2).
- III. Die Nutzung von ATP zur Kontraktion myokardialer Myofibrillen.

Während das Herz in der Lage ist, sämtliche im menschlichen Körper verwertbaren Energieträger zu verstoffwechseln, deckt es in Ruhe physiologisch etwa 60% seines Energiebedarfs durch langkettige Fettsäuren und etwa 30% mit Glukose, während die restlichen 10% durch andere Substrate wie Laktat und Ketonkörper abgedeckt werden [31]. Dieses Gleichgewicht kann bei gesteigertem Bedarf, beispielsweise bei körperlicher Belastung, zugunsten des Kohlenhydrat-Anteils verschoben werden, was den Vorteil eines besseren Verhältnis* von Sauerstoffbedarf zu ATP-Gewinnung aufweist [32]. Die Verstoffwechselung freier Fettsäuren im Gegensatz zu Kohlenhydraten erfordert theoretisch etwa 13% mehr Energie, in humanen Studien konnten sogar ein um 27-54% erhöhter Sauerstoffbedarf feststellen [33, 34].

Neben diesen physiologischen Adaptationen liegt auch bei Pathologien eine Verschiebung des Substratgleichgewichts vor (Abb. 1). Während sich bei Herzinsuffizienz die myokardiale Glukosenutzung erhöht, wird bei Insulinresistenz aufgrund reduzierter Aufnahmekapazität des Myokards für Glukose durch verminderten Einbau des Glukosetransporters Typ 4 in die Zellmembran der Kardiomyozyten das Verhältnis zugunsten von Fettsäuren verschoben.

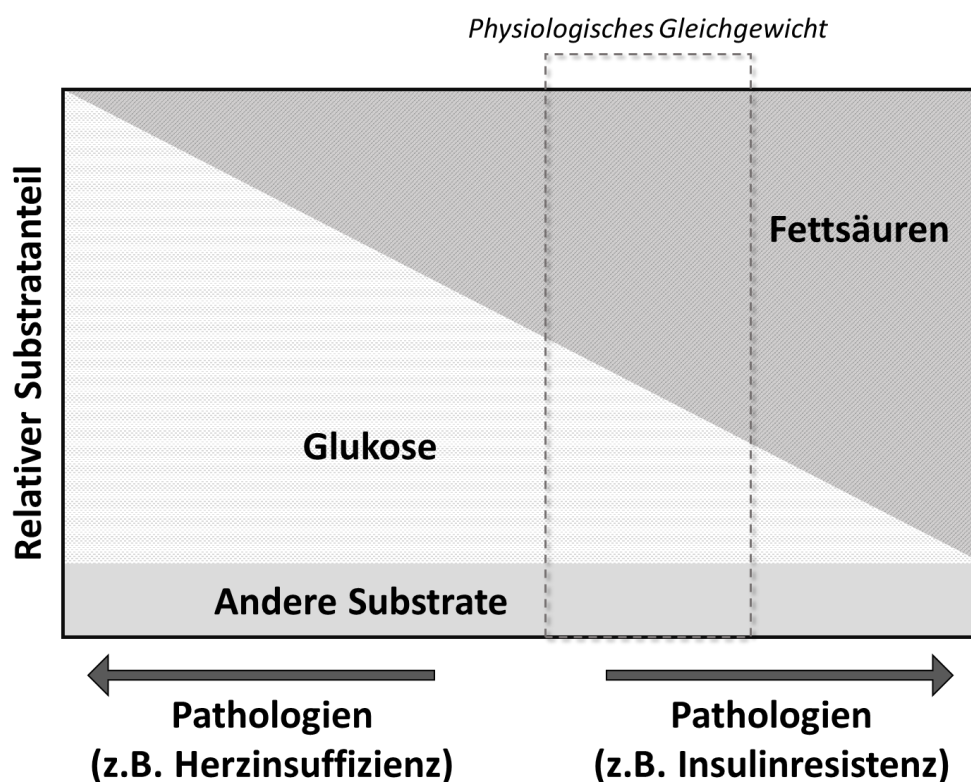


Abb. 1: Kardiale Substratnutzung im physiologischen und pathologischen Zustand. Darstellung nach Glatz et al [31].

Während bei verschiedenen Erkrankungen eine Verschiebung des Gleichgewichts zunächst als Adaptation dienen kann, um den myokardialen Substratbedarf zu decken, kann als gemeinsame Endstrecke eine unzureichende Versorgung des Myokards mit Substraten resultieren (1.4.2) [27, 34, 35].

1.2.2 Die oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung der mitochondrialen Atmungskette liefert den größten Teil der verwertbaren Energie in Form von ATP für den menschlichen Körper. Hauptkomponenten der Atmungskette sind die Komplexe I-V: Die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (NADH-Dehydrogenase; Komplex I), die Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Succinat-Dehydrogenase; Komplex II), die Ubihydrochinon (Ubichinol):Cytochrom c-Oxidoreduktase (Cytochrom-c-Reduktase; Komplex III), die Cytochrom c:O₂-Oxidoreduktase (Cytochrom-c-Oxidase; Komplex IV) und die F₀F₁-ATPase (ATP-Synthase; Komplex V). Die Komplexe I bis IV sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und bewirken einen Transport von Protonen entgegen dem Konzentrationsgefälle aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum. Hierfür notwendig sind die Reduktionsäquivalente Nicotinamidadenindinukleotid (NADH+H⁺) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂), die in anderen biochemischen Reaktionen erzeugt werden (z. B. Glykolyse, Citratzyklus, Beta-Oxidation). Den entstehenden Protonengradienten baut die ebenfalls die innere

Mitochondrienmembran durchziehende ATP-Synthase (Komplex V) ab, indem sie Protonen zurück in die Mitochondrienmatrix gelangen lässt und dabei Adenosin-Diphosphat (ADP) und Phosphat in Adenosin-Triphosphat (ATP) umwandelt. Die Vorgänge in der Atmungskette sind in Abb. 2 schematisch dargestellt.

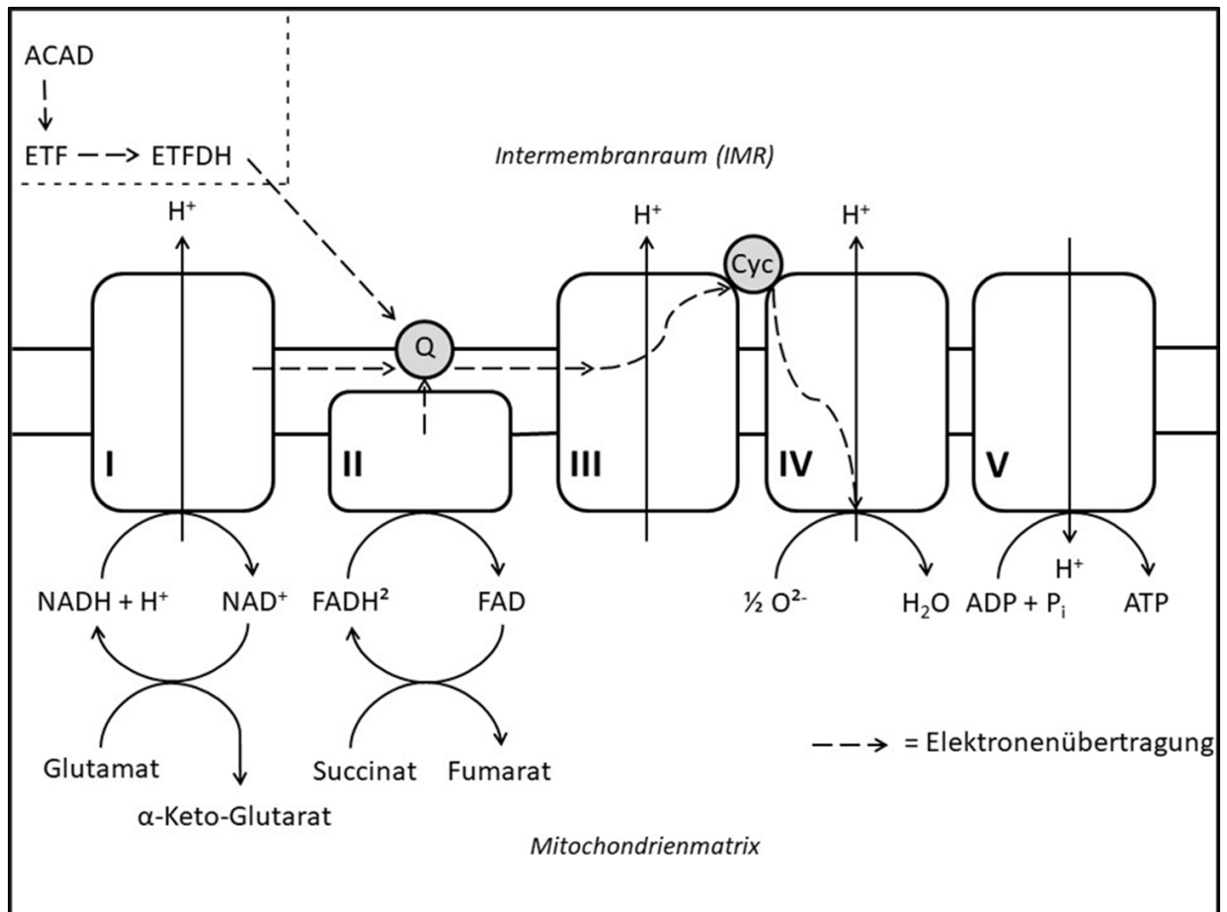


Abb. 2: Die Atmungskette: Vorgänge an der inneren Mitochondrienmembran. Verschiedene Reaktionen führen über Übertragung von Reduktionsäquivalenten zu einer Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol (Q-Junction) [36]. Hierbei können beispielsweise Glutamat (Komplex I), Succinat (Komplex II) oder Fettsäuren (über ETF) als Substrate zur Übertragung von Reduktionsäquivalenten fungieren. Ubichinol reduziert infolge an Komplex III zwei Cytochrom-c-Moleküle. Über mehrere Zwischenschritte übertragen zwei Cytochrom c²⁺ zwei Wasserstoffatome auf Sauerstoff unter Entstehung von Wasser und zwei Cytochrom c³⁺. Ein in den Komplexen I, III und IV aufgebauter Protonengradient wird durch Komplex V abgebaut, die entstehende Energie wird zur Synthese von ATP genutzt [37]. ACAD: Acyl-CoA-Dehydrogenase; ADP: Adenosin-Diphosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat; Cyc: Cytochrom c; ETF: *electron transfer flavoprotein complex*; ETFDH: Mitochondrial electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase; FADH: Flavin-Adenin-Dinukleotid; NADH: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; Q: Ubichinon (*Q-Junction*).

An Komplex IV der Atmungskette wird im Rahmen der folgenden Reaktion Wasser unter Verbrauch von Protonen und Sauerstoff produziert:



Diesen Sauerstoffverbrauch macht man sich experimentell im Rahmen der Respirometrie zunutze, um die mitochondriale Aktivität zu quantifizieren [38]. In einem geschlossenen System ist der Sauerstoffverbrauch proportional zur Aktivität des Atmungskettenkomplex‘ IV und damit ein Indikator für die gemeinsame Endstrecke der oxidativen Phosphorylierung. Dieser kann über einen polarographischen Sensor in isolierten Mitochondrien, Homogenaten und intakten oder permeabilisierten (aufgelöste Zellmembran bei intakter Mitochondrienmembran; siehe 3.2.4) Zellen gemessen werden [38, 39]. Der Verbrauch von Sauerstoff in Abhängigkeit von der Zeit, also die negative erste Ableitung der Sauerstoffkonzentration über der Zeit wird als Sauerstofffluss (O_2 -Fluss) oder Respiration bezeichnet [40].

Der O_2 -Fluss kann gewichtsspezifisch und volumenspezifisch berechnet werden. Im Falle permeabilisierten Gewebes ist eine gewichtsspezifische Messung sinnvoll, denn in einer geschlossenen Kammer mit festem Volumen verbraucht eine schwerere Probe aufgrund erhöhter Anzahl aktiver Mitochondrien (theoretisch) mehr Sauerstoff als eine leichte.

Gewichtsspezifisch lässt sich der O_2 -Fluss wie folgt beschreiben:

$$\text{Sauerstofffluss} = \frac{\Delta \text{Sauerstoffkonzentration [pmol]}}{\Delta \text{Zeit [s]} * \text{Feuchtwicht des Gewebes [mg]}}$$

1.2.3 Respiratorische Stadien

Bei der respiratorischen Messung der oxidativen Phosphorylierung werden verschiedene respiratorische Stadien (Englisch: *States*) unterschieden, deren Einteilung abhängig von den in ausreichender Menge vorliegenden und den fehlenden und damit die Geschwindigkeit begrenzenden Faktoren abhängig ist (siehe Tabelle 3).

	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	Stadium 4	Stadium 5
Ausreichend vorhanden	O_2	O_2 , ADP	O_2 , ADP, Substrat	O_2 , Substrat	Substrat, ADP
Begrenzender Faktor	Phosphat-Akzeptor	Substrat	-	Phosphat-Akzeptor	O_2
Geschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung	Langsam	Langsam	Maximal	Langsam	Null

Tabelle 3: Die ursprünglichen metabolischen Stadien der Mitochondrien nach Chance und Williams [41].

Die klassischen Respirometriestadien nach Chance und Williams können in isolierten Mitochondrien erreicht werden [41]. In intakten oder permeabilisierten Zellen ist dies nicht

zwangsläufig der Fall [38]. Stadium 1 und 2 können theoretisch durchlaufen werden, jedoch enthalten intakte und permeabilisierte Zellen höhere Konzentrationen endogen gespeicherter Substrate, sodass diese Stadien schwieriger von Stadium 3 abzugrenzen sind [38]. Zudem kann in intakten und permeabilisierten Zellen Stadium 4 praktisch nicht erreicht werden, da endogenes ADP nicht komplett aufgebraucht werden kann. Stattdessen kann durch hier Applikation eines Inhibitors der ATP-Synthase (z.B. Oligomycin; Tabelle 5) in Stadium 3 ein dem Stadium 4 in Respiration quantitativ ähnelnder State 4_o („O“ für Oligomycin) erzeugt werden. Stadium 3 und 5 sind auch in permeabilisierten Fasern erreichbar.

Die ursprünglichen Stadien nach Chance und Williams entstanden aus Überlegungen zur Addition verschiedener Substrate zu Mitochondrien in einem mit Sauerstoff gesättigten isotonischen Medium mit anorganischem Phosphat [38]. Im ursprünglichen Protokoll wurde zuerst ADP appliziert, um endogene Substrate abzubauen und erst bei Erreichen eines *steady state* Substrat. Chance und Williams führten jedoch auch weitere Protokolle ein, in denen vor Zugabe von ADP andere Substrate eingesetzt wurden. Infolgedessen kann die klassische Bezeichnung der Stadien 2 und 4 Verwirrung stiften [38].

Anstatt eines numerischen Systems der Respirationsstadien schlugen Gnaiger et al. folgende Definition der Stadien der Respirometrie vor [36, 38]: LEAK (englisch: Leck) Respiration, die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS Kapazität) und die Kapazität des Elektronen-transferierenden Systems (ETS Kapazität) (Tabelle 4).

Respirationsstadium	Erläuterung	Entsprechung der klassischen Respirationsstadien
LEAK Respiration	Nicht-phosphorylierende, partiell gekoppelte Respiration	Stadium 4, näherungsweise auch Stadium 2
OXPHOS Kapazität	Maximale phosphorylierende, partiell gekoppelte Respiration	Stadium 3
ETS Kapazität	Maximale nicht-phosphorylierende, entkoppelte Respiration	Keine (Entkoppeltes Stadium 3)

Tabelle 4: An kontemporäre Respirometrieprotokolle angepasste Respirationsstadien nach Gnaiger et al [38].

In permeabilisierten und intakten Zellen entspricht die LEAK Respiration dem durch Oligomycin induzierten Stadium 4_o. Zwar sind sowohl ADP als auch ATP noch vorhanden, jedoch dient die vorliegende Respiration im 4_o LEAK Stadium nicht mehr der Phosphorylierung von ADP, sondern der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials dient. Der entstehende Sauerstoffverbrauch

resultiert, da auch ohne phosphorylierende Aktivität der ATP-Synthase durch Protonen-Leckströme, sowie durch *proton slipping* und *cation cycling* Protonen aus dem Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix wandern können, die durch die Komplexe I-IV der Atmungskette zurückgeführt werden [38, 39]. Aufgrund der ubiquitär vorhandenen Protonen-Leckströme, die verhindern, dass sämtliche Ionen zur Generierung von ATP genutzt werden können, kann in der Respirometrie nie ein vollständig gekoppeltes Stadium erreicht werden – man spricht deswegen von partieller Kopplung [38]. Beim ursprünglichen Stadium 3 muss nach Gnaiger et al. bezüglich eines partiell gekoppelten (OXPHOS Kapazität) und eines entkoppelten (ETS Kapazität) Stadiums unterschieden werden [42]: Während Ersteres im Grunde dem Stadium 3 nach Chance und Williams entspricht, kann Letzteres *ex vivo* durch Applikation eines Entkopplers (z.B. Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxy-phenylhydrazon (FCCP)) erreicht werden. Als Entkoppler der Atmungskette werden ionophore Moleküle bezeichnet, die Protonen durch die Lipiddoppelschicht der Mitochondrien transportieren können. Durch Applikation eines Entkopplers in der Respirometrie wird somit eine von der Phosphorylierung losgelöste Respiration generiert, in der die maximale Respiration der Atmungskettenkomplexe I-IV unabhängig von der ATP-Synthase und Konzentrationen von Phosphatakzeptoren quantifiziert werden kann.

Alle Komplexe der Atmungskette können durch spezifische Inhibitoren gehemmt werden (Tabelle 5) [43]. Dies kann experimentell von Nutzen sein, um Komplex-spezifische Resultate zu erhalten (siehe 3.2.4). So kann beispielsweise durch Applikation von Antimycin A die Atmungskette blockiert werden, sodass ein residualer Sauerstofffluss messbar ist.

Atmungskettenkomplex	Inhibitor
I: NADH-Dehydrogenase	Rotenon
II: Succinat-Dehydrogenase	Malonat
III: Cytochrom-c-Reduktase	Antimycin A, Myxothiazol
IV: Cytochrom-c-Oxidase	(Natrium-)Azid, (Kalium-)Cyanid, Kohlenstoffmonoxid
V: ATP-Synthase	Oligomycin A

Tabelle 5: Beispiele für Inhibitoren für die einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette [38].

1.3 Diabetes Mellitus

1.3.1 Diagnose und Klassifikation

Unter dem Begriff Diabetes Mellitus werden Erkrankungen zusammengefasst, deren klinische Präsentation von symptomatischer Hyperglykämie geprägt ist. Nach der aktuellen Leitlinie der *American Diabetes Association* von 2018 liegt ein Diabetes Mellitus vor, wenn eine der folgenden Bedingungen erfüllt ist:

- Hämoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) $\geq 6,5$ %
- Nüchtern-Plasmaglukose ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l). Nüchtern ist definiert als mindestens 8 h ohne Nahrungsaufnahme.
- Zwei-Stunden-Plasmaglukose ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) während eines oralen Glukosetoleranztests (OGTT) mit 75 g Glukoseäquivalent.
- Bei einem Patienten mit klassischen Symptomen einer Hyperglykämie oder hyperglykämischen Krise: Einmalige Plasmaglukose ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l).

Die ADA schlägt darüber hinaus folgende Klassifikation des Diabetes Mellitus vor [44]:

- I. Typ 1 Diabetes Mellitus (T1DM): Beta-Zellzerstörung, die gewöhnlich zu absolutem Insulinmangel führt
 - Ia: Immunologisch vermittelt
 - Ib: Idiopathisch
- II. Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM): Von Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz
- III. Andere spezifische Typen
 - a. Genetische Defekte der Beta-Zell-Funktion
 - b. Genetische Defekte der Insulinwirkung
 - c. Erkrankungen des exokrinen Pankreas
 - d. Endokrinopathie-bedingter Diabetes
 - e. Medikamenten- oder Chemikalien-induzierter Diabetes
 - f. Infektionsbedingter Diabetes
 - g. Seltene Formen immunologisch bedingten Diabetes‘
 - h. Andere genetische Erkrankungen, die mit Diabetes assoziiert sein können
- IV. Gestationsdiabetes (hier gelten abweichende Diagnosekriterien)

1.3.2 Epidemiologie

Diabetes Mellitus ist eine häufige Erkrankung mit einer globalen Prävalenz von schätzungsweise 9,3% (463 Millionen Menschen), bei einer ungleich höheren Prävalenz in Industrienationen (10,4%) und im höheren Lebensalter (zwischen 70 und 79 Jahren etwa 20%) [45]. In den kommenden Jahrzehnten wird von einem deutlichen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz ausgegangen, die insbesondere Länder niedrigen und mittleren Einkommens betreffen wird [46]. So sehen Schätzungen die globale Prävalenz des Diabetes Mellitus 2045 bei 10,9% (700 Millionen) [45]. In Deutschland liegt die geschätzte Prävalenz zwischen 7,2 und 9,9% [47]. Den mit Abstand größten Anteil macht mit über 95% T2DM aus, während T1DM nur etwa 0,3% ausmacht [48].

Während die die Prädisposition für T2DM genetisch festgelegt ist, wird die Manifestation und die Ausprägung auch durch Umwelt- und behaviorale Faktoren bestimmt [49–51]. Beispiele für anerkannte Risikofaktoren sind Bewegungsarmut, energiereiche Ernährung mit hohem Anteil an Mono-, Di-, Oligosacchariden und Fetten, Umweltverschmutzung, niedriger sozioökonomischer Status, Nikotinabusus und Schlafmangel [51, 52].

Weltweit ist Diabetes ein wichtiger Risikofaktor für Mortalität, der in den letzten Jahrzehnten an Bedeutung weiter zugenommen hat [53]. Von den häufigen chronischen Komplikationen des

Diabetes Mellitus – kardiovaskulären Erkrankungen, diabetischer Nephropathie, diabetischer Retinopathie, diabetischer Neuropathie und diabetischem Fußsyndrom – sind die kardiovaskulären Erkrankungen jene, die mit dem höchsten Mortalitätsrisiko assoziiert sind [54]. Menschen mit T2DM weisen eine bis zu vierfach so hohe Mortalität wie Menschen ohne T2DM auf [55]. So starben 2015 weltweit 1,5 Millionen Menschen an Diabetes Mellitus und seinen Folgen [56], die insgesamt auf erhöhten Blutzucker zurückzuführenden Tode könnten jedoch bis zu 3,5 Millionen betragen [53]. In Deutschland waren 2010 schätzungsweise 21% aller Todesfälle auf Diabetes Mellitus zurückzuführen [57].

1.3.3 Pathogenetische Grundlagen des Diabetes Mellitus Typ 2

Der T2DM ist eine heterogene Erkrankung, die durch einen relativen Insulinmangel gekennzeichnet ist [51, 52]. Dieser fußt primär auf einem Zusammenspiel vierer pathomechanistischer Faktoren (nach Herold et al. 2015): Einer reduzierten Insulinsensitivität (Insulinresistenz), einem sekretorischen Defekt sowohl der beta- als auch der alpha-Zellen des Pankreas, einer fortschreitenden Apoptose der beta-Zellen und einer eingeschränkten Inkretinsekretion [58]. Während es bei T2DM in den alpha-Zellen des Pankreas zu einer verstärkten und fehlregulierten Glukagon-Ausschüttung und -Speicherung kommt, führen in den beta-Zellen unter anderem Amyloid-Ablagerungen und endoplasmatischer Retikulum-Stress zur Induktion von Apoptose [59]. Eine zu Beginn der Erkrankung auftretende periphere Insulinresistenz, die insbesondere in der Skelettmuskulatur und dem Fettgewebe in einer verminderten Glukoseaufnahme resultiert, kann zunächst noch durch gesteigerte Insulinsekretion kompensiert werden. Wenn die Insulinresistenz im Verlauf jedoch weiter zunimmt und die Insulinsekretionskapazität des Pankreas nachlässt, manifestiert sich der klinisch apparente T2DM mit postprandialen und später auch nüchtern-Hyperglykämien [52]. Bei Diagnose besteht häufig bereits ein beta-Zellverlust von 50% [51, 59], was dadurch bedingt ist, dass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines T2DM meist bereits eine mehrjährige Phase der Insulinresistenz und Glukoseintoleranz vorlag [60].

Wie die Wirkungen von Insulin an sich, sind auch die Folgen der Insulinresistenz bei T2DM organspezifisch [51, 61]. Auch eine gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Organe über spezifische Metabolite wird angenommen [62]. So kommt es in der Leber zu einer gesteigerten Gluconeogenese, Lipogenese und Glykogenolyse [52]; in den Nieren wird durch einen vermehrten Einbau von Natrium-Glukose-Co-Transporter 2 (SGLT2) die Glukoseresorption induziert [51]; im Skelettmuskel und im Herz werden vermehrt Fettsäuren anstatt Glukose verstoffwechselt, was den Sauerstoffbedarf erhöht (siehe 1.2.1) und zu ektopter Lipidspeicherung führt [31, 63–65]; im Gehirn kommt es zu verstärktem Appetit und vermindertem Sättigungsgefühl durch Disinhibition der Neuropeptid Y-Achse aufgrund verminderter Insulin- und Leptinwirkung [51, 66, 67]; die

Zusammensetzung des enteralen Mikrobioms verändert sich [68, 69]; und systemisch kommt es zu einer erhöhtem Inflammation und oxidativem Stress [70–74].

Oxidativer Stress bezeichnet das vermehrte Auftreten von ROS durch eine Verschiebung des Verhältnisses von Pro- gegenüber enzymatischen und nicht-enzymatischen Anti-Oxidantien zugunsten des Ersteren [75]. Der chronischen Belastung durch systemischen oxidativen Stress [19, 73] und systemische Inflammation [71, 72, 76, 77] bei T2DM und Insulinresistenz wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Komplikationen zugeschrieben. Eine durch Hyperglykämie induzierte vermehrte mitochondriale Emission von Superoxid gilt als primäre Ursache des oxidativen Stresses bei T2DM [74]. Als Superoxide werden chemische Verbindungen bezeichnet, die das Dioxid(1-)-Anion (O_2^-) enthalten. Sie werden in Mitochondrien vor allem an Komplex III, zu einem geringeren Teil auch an Komplex I der Atmungskette (siehe 1.2.2) erzeugt [78]. Bei T2DM kann es aufgrund eines veränderten Membranspannungspotenzials zu einer Blockade des Elektronentransfers an Komplex III kommen, wodurch die entsprechend an Ubichinon zurücktransferierten Elektronen an molekulares Sauerstoff abgegeben werden, was in der Bildung von Dioxid(1-) resultiert [74, 79]. Während Dioxid(1-) selbst nur eine begrenzte schädigende Wirkung hat, erklärt sich seine Pathogenität durch die Bildung von anderen reaktiven ROS wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikalen (OH^\cdot). Auch außerhalb von Mitochondrien können ROS gebildet werden, wie zum Beispiel bei der beta-Oxidation in Peroxisomen, durch die NAD(P)H-Oxidase, oder mikrosomale P-450-Enzyme [78]. ROS aktivieren über Strangbrüche der nukleären DNS Poly(ADP-ribose)-Polymerasen. Die pathogene Wirkung der ROS bei T2DM entfaltet sich in der Folge über die Induktion von fünf schädigenden Mechanismen [74]: Im Rahmen der Fructose-Synthese (Polyol-Weg), durch die Formation von Reaktionsprodukten der Glykation, sogenannten *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs), durch vermehrte Expression des Rezeptors für AGEs und aktivierende Liganden, durch Aktivierung von Isoformen der Protein-Kinase C und im Rahmen der verstärkten Biosynthese von Hexosaminen.

Zusammenfassend bestehen aufgrund des relativen Insulinmangels bei T2DM eine Hyperglykämie, eine Hypertriglyceridämie und eine Hyperinsulinämie – letzteres zumindest, solange die Sekretionskapazität der beta-Zellen noch nicht erschöpft ist [51, 80]. Die erhöhten Plasmakonzentrationen induzieren zahlreiche zum Teil organspezifische pathologische Prozesse, die direkt oder indirekt die Grundlage für die chronischen Komplikationen des T2DM bilden(siehe auch 1.4.1) [80, 81].

1.4 Die diabetische Kardiomyopathie

1.4.1 Pathophysiologische Konzepte

Auch unabhängig von vaskulären Erkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung, Hypertonie und anderen Risikofaktoren erhöht T2DM das Risiko für die Entstehung einer Herzinsuffizienz [1, 80, 82–84]. Auch umgekehrt kann eine Herzinsuffizienz über neurohumorale Aktivierung das Risiko eines T2DM erhöhen [85]. Außerdem verschlechtert das Vorliegen von T2DM zusätzlich zur Herzinsuffizienz die Prognose erheblich [6, 54, 85]. Die kardiale Mortalität ist bei Menschen mit T2DM auch unabhängig von der Koronarperfusion erhöht [86]. Als Ausdruck der primär epidemiologischen Feststellung, dass eine Herzinsuffizienz bei T2DM auch unabhängig von anderen Risikofaktoren entstehen kann, wurde der Begriff der diabetischen Kardiomyopathie eingeführt [87, 88].

Trotz umfassender Forschung in diesem Areal sind die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden. Insbesondere fehlt eine klinische Möglichkeit zur spezifischen Diagnostik und Therapie der diabetischen Kardiomyopathie [80]. Heutige pathophysiologische Modelle der diabetischen Kardiomyopathie basieren primär auf Tiermodellen, die in den letzten Jahren durch humane Daten zum Teil ergänzt und bestätigt wurden [88–90]. Nach diesen Modellen bewirkt ein Zusammenspiel der Hyperglykämie, der Hyperinsulinämie und der peripheren Insulinresistenz, sowie der Hyperlipidämie über verschiedene Mechanismen eine Schädigung des Myokards, die zu Apoptose, Fibrose und einer reduzierten Kontraktilität führen kann (Abb. 3) [80, 88]. Hierbei scheinen die eingeschränkte Leistung myokardialer Mitochondrien, sowie eine chronische Belastung durch Inflammation und oxidativen Stress eine zentrale Rolle zu spielen [80, 89, 91, 92].

Während sich die T2DM-assoziierte Herzinsuffizienz klinisch zunächst asymptomatisch präsentieren kann, kann bei Patienten mit T2DM häufig schon Jahre vor der Entwicklung einer klinisch apparenten, symptomatischen Herzinsuffizienz eine diastolische Dysfunktion nachgewiesen werden [35, 80, 85].

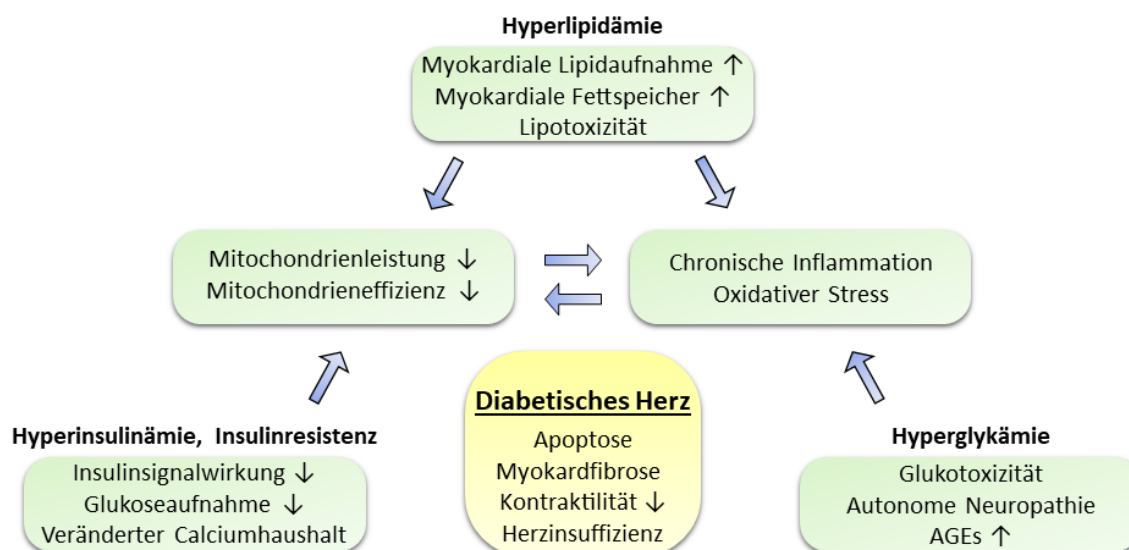


Abb. 3: Postulierte Pathomechanismen der diabetischen Kardiomyopathie. Das Herz ist bei T2DM chronisch den schädigenden Einflüssen Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie ausgesetzt, die ihrerseits eine Kaskade pathophysiologischer Vorgänge initiieren, an deren Ende eine irreversible fibrotische Schädigung des Myokards steht, wodurch es zu klinisch apparenter Herzinsuffizienz kommen kann [80, 89]. Darstellung nach Zweck et al [80]. AGE: *Advanced Glycation Endproduct*.

1.4.2 Die Rolle myokardialer Mitochondrien

Es gibt inzwischen weitgehend wissenschaftlichen Konsens, dass eine Schädigung myokardialer Mitochondrien ein zentrales Element der pathophysiologischen Kaskade bei diabetes-assoziiierter Herzinsuffizienz spielt. Daten aus zahlreichen Studien an Tiermodellen konnten in den vergangenen Jahrzehnten Postulate über die Mechanismen erstellen, die dieser Schädigung zugrunde liegen, wozu regelmäßig Übersichtsartikel publiziert wurden [87, 90, 91, 93–95].

Während Studien zum Einfluss von T2DM auf humane kardiale Mitochondrien lange nicht verfügbar waren, konnte dafür im humanen Skelettmuskel mehrfach die Einschränkung der Mitochondrienfunktion bei T2DM gezeigt werden [96–98]. Nach einer Studie von Boushel et al. könnte die Erklärung hierfür ein niedrigerer Mitochondriengehalt im Skelettmuskel von Patienten mit T2DM sein [99], andere Studien zeigten jedoch auch eine reduzierte oxidative Kapazität pro Mitochondrium, was auf einen intrinsischen Defekt hinweist [97, 98]. Auch ungeklärt ist, ob die Einschränkung der muskulären Mitochondrienfunktion ubiquitär vorliegt, da Rabol et al. bei T2DM diese nicht in Armmuskulatur nachweisen konnten [96].

Der erste Nachweis einer reduzierten myokardialen oxidativen Kapazität im Menschen wurde 2009 von Anderson et al erbracht [100], und konnte in der Folge von anderen Gruppen repliziert werden [101–104]. Die gemeinsamen Limitationen, die bei allen bis zum Beginn dieser Arbeit verfügbaren Humanstudien bestanden, lagen (i) in der Nutzung von Gewebe des Atriums und (ii)

in der Akquise von Gewebeproben von Patienten mit fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung, welches während koronarer Bypass-Operationen gewonnen wurde.

Vorhofgewebe unterscheidet sich von ventrikulärem Gewebe durch verschiedene metabolische, funktionelle und molekulare Faktoren [94, 105, 106]. Insbesondere existieren Daten, die zeigen, dass die mitochondriale Kapazität des Myokards des Vorhofs gegenüber den Ventrikeln reduziert ist [40, 106]. Die diabetes-assoziierte Herzinsuffizienz, ihre Symptomatik und klinische Relevanz gehen primär aus der Komponente der ventrikulären Dysfunktion hervor. Entsprechend ergibt sich die Rationale, zur Untersuchung der pathophysiologischen Einflüsse auf das Herz bei T2DM ventrikuläres Gewebe zu untersuchen. Bisher liegt nur eine Studie vor, die auch im Ventrikel von Patienten mit T2DM eine reduzierte mitochondriale Kapazität nachweisen konnte [103]. Diese teilt jedoch mit den anderen Studien die Eigenschaft des Probandenkollektivs von fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung. Die koronare Herzerkrankung reduziert die potenziell mögliche Versorgung des Myokards mit Sauerstoff und Substraten und in Patienten mit koronarer Herzerkrankung liegt eine reduzierte myokardiale mitochondriale oxidative Kapazität vor [102, 107–109]. Dadurch ist eine suffiziente Trennung der Folgen der koronaren Herzerkrankung gegenüber jenen des T2DM erschwert.

Darüber hinaus nutzten die genannten Studien die vorbekannte Diagnose, nüchtern-Glukose oder HbA_{1c} als Determinanten des T2DM zur Einteilung der Studiengruppen [100–103]. In entsprechender Ermangelung der Daten eines OGTT ergibt sich auf der einen Seite eine reduzierte Trennschärfe von Patienten mit und ohne T2DM, insbesondere, da bei einigen Studienpatienten ein Prädiabetes vorlag wie beispielsweise bei Anderson et al. [100]. Auf der anderen Seite fehlt es so an Möglichkeiten zur präzisen Quantifizierung der Insulinsensitivität der Patienten. Die etwa von Mouton et al. genutzte Methode des *Homeostasis Model Assessment* (HOMA) ist bezüglich der Korrelationen mit der Gold-Standard-Methode, dem euglykämischen *Clamp*, anderen aus dem OGTT abgeleiteten Indices wie *Oral Glucose Insulin Sensitivity* (OGIS) oder *Predicted M-value* (PREDIM) unterlegen [101, 110–113].

Somit ist zu konstatieren, dass es insbesondere aus Tiermodellen stammende Evidenz für das Vorliegen einer durch T2DM induzierten mitochondrialen Dysfunktion des ventrikulären Myokards gibt, diese jedoch nur von wenigen bislang vorliegenden Humandaten unterstützt wird. Darüber hinaus bleibt weiterhin unklar, ob die nachgewiesenen Veränderungen myokardialer Mitochondrien bei Menschen mit T2DM direkt durch T2DM (Hyperglykämie und Insulinresistenz) induziert werden, oder ob sie sekundär im Verlauf der Erkrankung etwa aufgrund mikro- oder makrovaskulärer Begleiterkrankungen entstehen.

2 Hypothesen und Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung des Einflusses von T2DM auf ventrikuläre myokardiale Mitochondrien im Menschen.

Folgende Hypothesen sollten zu diesem Zweck im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden:

- I. Die mitochondriale oxidative Kapazität des humanen Ventrikels weicht von jener des humanen Vorhofs ab.
- II. Eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz ist mit einer eingeschränkten oxidativen Kapazität der Mitochondrien des humanen Ventrikels assoziiert ist.

Aus der Bestätigung dieser beiden Hypothesen ergäbe sich die Rationale, zur Untersuchung des Einflusses von T2DM auf das humane ventrikuläre Myokard ventrikuläre Proben von Patienten ohne Herzinsuffizienz zu verwenden.

- III.
 - A) T2DM, Hyperglykämie und Insulinresistenz führen zu einer reduzierten ventrikulären myokardialen oxidativen Kapazität.
 - B) Die T2DM-assoziierte Einschränkung der mitochondrialen Funktion *ex vivo* korreliert mit einer Einschränkung funktioneller Parametern *in vivo*.
 - C) Diese Veränderungen werden von in T2DM erhöhtem zirkulierendem oxidativen Stress und myokardialer intrazellulärer Inflammation begleitet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Arzneimittel

- 300ml Glukoselösung entsprechend einer Menge von 75g wasserfreier Glukose (ACCU-CHEK® Dextrose O.G-T., Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- Isotonische Natriumchloridlösung 0,9 % (Isotonische Kochsalzlösung Fresenius, 10 ml, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)
- Saponin aus der Rinde des Quillaja (S7900 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Orlistat (Xenical®, 120mg, Roche, Basel, Schweiz)
- CelLytic MT Cell Lysis Reagent (C3228Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Protease Inhibitor Cocktail (P8340 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Assay Buffer for Citrate Synthase (B6935 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB (D8130 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Acetyl-Coenzym A (A2181Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Oxalessigsäure (O4126 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Citrat-Synthase (C4741 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Protein-Reagenzien A und B (Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A/B, 23228/23224, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Bovines Serum-Albumin (Pierce™ BCA Solid, 23230, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Kaliumchlorid (104938, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Sulfosalicylsäure (S7422 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Tetramethoxypropane (108383 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Butanol (B7906 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Pyridin (B57506 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Thiobarbitursäure (T5500 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Ethansäure (695092 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

- Natriumhydroxid (S8045 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- *BIOPS* Aufbewahrungspuffer mit den folgenden Bestandteilen:
 - CaK_2 Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) (2,8 mmol/l)
 - K_2 EGTA (7,2mmol/l)
 - Na_2 ATP (5,8mmol/l)
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (6,6mmol/l)
 - Taurin (20mmol/l)
 - Na_2 Phosphokreatin (15mmol/l)
 - Imidazol (20mmol/l)
 - 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (50mmol/l)
 - Dithiothreitol (0,5mmol/l)
- *MiRO5* Oxygraph-Puffer mit den folgenden Bestandteilen:
 - EGTA (0,5mmol/l)
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3mmol/l)
 - Kalium-Lactobionat (60mmol/l)
 - Taurin (20mmol/l)
 - KH_2PO_4 (10mmol/l)
 - 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (20mmol/l)
 - Saccharose (110mmol/l)
 - Bovines Serum-Albumin (1g/l)
- *RNAlater*[®] (AM7021, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Serum-Röhrchen 5ml (BD Vacutainer[®] SST[™] II Advance Plus Collection Blood Tubes, REF 367955, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Serum-Röhrchen 3,5ml (BD Vacutainer[®] SST[™] II Advance Plus Collection Blood Tubes, REF 367957, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- EDTA Blutbild-Röhrchen (BD Vacutainer[®] K2E 5,4 mg, Plus Blood Collection Tubes, REF 368499, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Citrat-Röhrchen (BD Vacutainer[®] 9NC 0.129M, REF 363079, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Blutentnahmeset mit Halter (BD Vacutainer[®] Safety-Lok[™] 21G (0,8 x 19 mm), 305 mm Schlauch, Luer Adapter, REF 367286, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)

- Einmalhalter aus Kunststoff (BD Vacutainer® Einmalhalter, REF 364815, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Probengefäß 1,3ml mit Schraubverschluss, Fluorid-Heparin/Glukose (Sarstedt® Probengefäß 1,3ml FH, Bestellnummer 41.1394.005)
- Probengefäß 2ml mit grünem Cap-Insert (BiozymCryovials® Außengewinde und Silikon-Dichtungsring, Art. Nr. 710533; Biozym Cap-Inserts für Cryovials®, Art. Nr. 710533; Biozym Scientific GmbH, Wien, Österreich)
- Einmalspritze 2ml (B. BRAUN Injekt® Luer Solo 2ml, REF 4606027V B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Einmalspritze 5ml (B. BRAUN Injekt® Luer Solo 5ml, REF 4606051V B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Einmalspritze 10ml (B. BRAUN Injekt® Luer Solo 10ml, REF 4606108V B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Einmalspritze 20ml (B. BRAUN Injekt® Luer Solo 20ml, REF 4606205V B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Sicherheitsvenenverweilkanülen (Vasofix® Safety, 18G, REF 4268130S-01, B. Braun AG Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Transparenter i.v. Filmverband (3M™ Tegaderm™ I.V., REF 1633, 3M Deutschland GmbH Neuss, Deutschland)
- Dreiwegehahn (B. Braun Discifix® C-3, blau, arzneimittelbeständig, REF 16494C, B. Braun AG Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Combistopper Verschlussknoten (B. Braun Combi-Stopper Verschlussknoten, blau, REF 4495152, B. Braun AG Melsungen, Melsungen, Deutschland)
- Pflasterrolle (3M™ Transpore™, REF 1527-1; 2,5cm x 9,1m, 3M Deutschland GmbH Health Care Business, Neuss, Deutschland)
- Venenstauer (Roeser Standard Venenstauer, Art.-Nr.: 40.718160, Roeser Medical GmbH, Essen, Deutschland)
- Hautantiseptikum (kodan® Tinktur forte farblos, Art.-Nr.: 204012, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Hände-Desinfektionsmittel (Sterillium® classic pure, REF 975512, Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Medizinische Untersuchungshandschuhe (Abena® Classic Nitrile | Powder-Free, REF 290420, Abena GmbH, Zörbig, Deutschland)
- Zellstofftupfer (L&R Zelletten®, 5 x 4 cm, REF 13356, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland)
- Nierenschale aus Pappe (Abena® Nierenschale aus Pappe, REF 431009, Abena GmbH, Zörbig, Deutschland)

- Glukose-Teststreifen (StatStrip® GLU Test Strips, REF 42214, Nova Biomedical UK, Runcorn, UK)
- Glas (Arcoroc® Campus, 29cl Wasser-, Saftbecher, Art. Nr.: GAR.04085, Gastro-Inn GmbH, Erfstadt, Deutschland)
- Pipettenspitzen (epT.I.P.S.® Reloads 2-200µl, LOT: F168959O; epT.I.P.S.® Reloads 50-1000µl, LOT: F168847O; epT.I.P.S.® Standard/Bulk 100-5000µl, LOT: F168993O, Eppendorf AH, Hamburg, Deutschland)
- 6-Well-Zellkulturplatten (VWR® Tissue Culture Plates: 6 wells, sterile, REF: 7342323, VWR International, LLC, Radnor, USA)
- Mikroreaktionsgefäß 1,5ml (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1.5 mL, LOT F169519P, Eppendorf AG, 22331, Hamburg, Deutschland)
- Konisches Röhrchen 15ml (Falcon® 15 mL High-Clarity Polypropylene Conical Tube, REF: 352096, Corning Science México, Reynosa, Tarnaulipas, Mexiko)
- Konisches Röhrchen 50ml (Falcon® 50 mL Polypropylene Conical Tube, REF 352098, Corning Science México, Reynosa, Tarnaulipas, Mexiko)
- Substratspritzen (Hamilton® Mycrosyringe 10/25/50mm³, Hamilton Central Europe S.R.L, Ghiroda, Rumänien)
- Filterpapier (VWR® Qualitative filterpaper, 410, REF: 516-0804, VWR International, Leuven, Belgien)
- Vernichtungsbeutel (oehmen® Vernichtungsbeutel 300x200x0,05mm, Art.Nr.: VB20, Oehmen Labortechnik, Essen, Deutschland)
- Sterile Skalpellklinge (BAYHA® Klinge Nr. 11, Art. Nr.: 311, Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- 96 Well Platte (Greiner CELLSTAR® 96 well plate, Nr. 655180, M0812 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

3.1.3 Geräte

- Point-Of-Care Glukose Monitoring System (StatStrip® GLU Meter-Remanufactured, REF 51707, Nova Biomedical UK, Runcorn, UK)
- Zeitmesser (LGG® Short PeriodTimerwithalarm, Kat. Nr. 38.2022.02, Wertheim, Deutschland)
- Oxygraph (Oroboros® O2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich)
- Schüttelmaschine/Schüttler (VWR® Standard Analog Shaker, STD 3500, SN: 100831001, Model-Nummer: 980302EU, VWR International, Leuven, Belgien)
- Pipetten 2,5/10/100/1000/5000µl (Eppendorf Research® plus, Einkanal, Katalog-Nr. 3120000011/3120000020/3120000046/3121000120/3120000070, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

- Zentrifuge (Heraeus™ Fresco™ 17 Microcentrifuge, 75002420, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Waage (ME-T Analysenwaage XP205, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA)
- Reagenzglasschüttler (Reax™ top, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Inkubator (Incubator Classic-Line, BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Multi-Detektionsplattenleser (Biotek Synergy 2®, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)
- Fluoreszenzplattenleser (Biotek Flx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)
- Thermoschüttler (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- pH-Meter (PHM 220, MeterLab, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- RedoxSYS® System inklusive Redoxpotenzial-Sensoren (Aytu Bioscience, Englewood, USA)

3.1.4 Software

- DatLab® Version 6.1.0.7 (Oroboros Instruments Corp, Innsbruck, Österreich)
- GraphPadPrism® Version 7.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA)
- IBM® SPSS® Version 24.0.0.2 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA)
- Microsoft Office® 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- Gen 5® (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)
- Python 3.7.4 (Python Software Foundation, Wilmington, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigte diese Studie am 21.12.2015 (Referenznummer 5263R). Sie ist registriert bei ClinicalTrials.gov mit der Identifikationsnummer NCT03386864. In dieser klinischen, analytischen Beobachtungsstudie wurden prospektiv Daten verschiedener Patientenkollektive erhoben, um unter anderem Auswirkungen von Herzinsuffizienz und metabolischen Pathologien auf die kardiale mitochondriale Funktion zu untersuchen. Alle studienbezogenen Untersuchungen stehen in Einklang mit den Statuten der Deklaration von Helsinki der *World Medical Association*. Alle Patienten gaben durch Unterschriften ihre informierte Einwilligung nach Aufklärung durch einen Studienarzt.

3.2.2 Rekrutierung und Probandenkollektiv

Für die Untersuchung des mitochondrialen Stoffwechsels wurden im Rahmen der DICARDI-Studie unterschiedliche Patientenkollektive eingeschlossen:

- Patienten, die aufgrund einer terminalen Herzinsuffizienz der Implantation eines linksventrikulären Unterstützungssystems (*Left Ventricular Assist Device*; LVAD) bedurften (LVAD Kohorte).
- Patienten mit einer terminalen Herzinsuffizienz, die eine orthotope Herztransplantation erhielten (HTX Kohorte).
- Herztransplantierte Patienten, die im Rahmen der routinemäßigen Kontrolluntersuchungen nach der Transplantation eine Endomyokardbiopsie (EMB) erhielten (post-HTX Kohorte).

Eingeschlossen wurden Menschen im Alter zwischen 20 und 85 Jahren, auf die Ausschlusskriterien nicht zutrafen:

- Akute Infektionserkrankungen innerhalb der letzten 2 Wochen vor der Untersuchung
- Schwangerschaft
- Einnahme von Alkohol- oder Drogen (Suchterkrankung), psychiatrische Erkrankungen
- Risiko für oder manifeste Infektion mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis B oder C
- Aktive Krebserkrankung

3.2.3 Studienablauf

Die Dauer des stationären Aufenthalts der Patienten, die für eine routinemäßige EMB aufgenommen wurden, betrug gewöhnlich drei Tage. Vereinzelt Variationen der Dauer waren stets studienunabhängigen klinischen oder organisatorischen Aspekten geschuldet. Die Studienuntersuchungen fanden über den Aufenthaltszeitraum verteilt statt, die Reihenfolge wurde von der Verfügbarkeit der Untersuchungsgeräte und –Räumlichkeiten bestimmt. Am dritten Tag wurden die Patienten zumeist entlassen. Eine verlängerte stationäre Aufenthaltsdauer aus Studiengründen wurde vermieden.

Patienten, die einen LVAD oder eine HTX erhielten, wiesen aus klinischen Gründen deutlich längere Krankenhausaufenthalte auf. Bei Ihnen wurden ausschließlich eine Blutabnahme (in möglichst kurzem Abstand zur Operation) und die Untersuchung des in der Operation anfallenden Gewebes durchgeführt.

Demgegenüber durchliefen Patienten, die im Rahmen ihres stationären klinischen Aufenthalts eine EMB erhielten, folgende zusätzliche studienbezogene Untersuchungen (sofern keine Kontraindikationen bestanden):

- Venöse Blutentnahme zur Serum- und Plasmaanalyse
- Oraler Glukose-Toleranztest (OGTT)
- Kardiale Magnetresonanztomographie (MRT)

3.2.3.1 Venöse Blutentnahme zur Serum- und Plasmaanalyse

Entweder aus einem neu gelegten venösen Zugang oder mittels eines Blutentnahmesets oder aus einer Schleuse in der Vena femoralis im Rahmen der EMB wurde den Patienten im nüchternen Zustand im Rahmen der Studie Blut abgenommen. Von diesen Blutabnahmen wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Röhren entnommen, analysiert und Überschüsse asserviert.

Gefäß	Bestimmte Parameter
13,5ml Serum	Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Magnesium, Creatinin, Cystatin C, Harnstoff, Harnsäure, Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), γ -Glutamyltransferase, alkalische Phosphatase, Bilirubin, Cholinesterase, Amylase, Pankreas-Amylase, Lipase, Triglyceride, Gesamt-Cholesterin, Low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), Laktat-Dehydrogenase, Creatin-Kinase, Gesamt-Eiweiß, Albumin, Ferritin, Eisen, hochsensitives C-reaktives Protein, freies Thyroxin, Thyreotropin (TSH) basal
3,0ml EDTA-Plasma	Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, Mittlere/s korpuskuläre/s Volumen (MCV), Hämoglobingehalt (MCH) und Hämoglobinkonzentration (MCHC) Thrombozyten, Hämoglobin A1c (HbA_{1c}) nach International Federation of Clinical Chemistry und National Glycohemoglobin Standardization Program
2,7ml Citrat-Plasma	Quick, International Normalized Ratio (INR), Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

Tabelle 6: Blutentnahme zur allgemeinen Serum- und Plasmaanalyse.

Bei allen Patienten wurden überschüssige Serumproben bei -80°C eingefroren zur späteren Messung von Markern des oxidativen Stresses (siehe 3.2.6).

3.2.3.2 Orale Glukose-Toleranztest

Alle Patienten mit einem HbA_{1c} unter 9,0%, einem nüchtern-Blutglukose von höchstens 170mg/dl und ohne Therapie mit Insulin oder Glitazonen erhielten im Rahmen der DICARDI-Studie einen OGTT, wenn sie diesem zustimmten. Zur Durchführung des OGTT wurde den Patienten im nüchternen Zustand, sowie nach der Ingestion von 300ml Glukoselösung entsprechend einer Menge von 75g wasserfreier Glukose zu Minute 30, 60, 90, 120, 150, 180 Blut aus einer venösen peripheren Verweilkanüle entnommen. Der periphere Venenkatheter (PVK) wurde jeweils nach den Blutabnahmen mit 5ml 0,9%iger Natriumchloridlösung gespült. Vor jeder Blutentnahme wurden 1,5ml Blut aus dem PVK verworfen, um einer Verdünnung der Proben vorzubeugen. Bei verminderter Durchgängigkeit wurde ein neuer PVK gelegt. Zusätzlich zur Bestimmung des Blutglukosespiegels zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten wurde auch jeweils zusätzlich der Insulin- und C-Peptid-Spiegel, sowie die Konzentration der nicht-veresterten freien Fettsäuren (FFS) im Blut bestimmt (Tabelle 7).

Gefäß	Blutmenge	Gemessene Parameter
3,5ml Serum	2 ml	Insulin, C-Peptid
1,3ml Fluorid-Heparin	1 ml	Blut-Glukose-Konzentration
2ml Probengefäß, präpariert mit 20µl EDTA und 1µg Orlistat	1 ml	Nicht-veresterte freie Fettsäuren

Tabelle 7: Abgenommene Blutproben und während des OGTTs repetitiv gemessene Parameter.

3.2.3.3 Kardiale Magnetresonanz-Tomographie

Bei EMB Patienten wurde im Laufe des stationären Aufenthalts eine kardiale Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT) durchgeführt. Alle Messungen wurden in einem 1,5-Tesla-System (Philips Achieva 1.5T XR MRI System) durchgeführt. Anhand verschiedener Sequenzen wurden u.a. linksventrikuläre Ejektionsfraktion, T1 Maps, T2 Maps, globaler longitudinaler Strain (GLS) und diastolische Strainrate (*strain*: englisch Verformung) analysiert.

T1 Maps wurden mit der *Modified Look-Locker Inversion recovery* (MOLLI) Pulssequenz erstellt [114]. T2 Maps wurden nach der *gradient-spin-echo* (GraSE) Methode erstellt [115, 116]. Strain-Analysen wurde in Bildserien der langen Achse (longitudinaler Strain) oder der kurzen Achse (diastolische Strainrate) mittels des von der Firma TOMTEC (TOMTEC IMAGING SYSTEMS GMBH, München, Deutschland) konzipierten Algorithmus zum sogenannten *Feature Tracking* (englisch.: Merkmalsverfolgung) bestimmt [117]. In dieser Methode werden die Grenzen des Ventrikels manuell identifiziert und dann automatisch durch alle Phasen des kardialen Zyklus verfolgt (25ms pro Bild). Die diastolische Strainrate wurde als frühe diastolische

zirkumferentielle Strainrate (E_{cc}/s) in vier mittventrikulären Segmenten ermittelt als $\Delta Strain / \text{temporale Auflösung}$. E_{cc}/s wurde hierbei definiert als Steigung von der End-Systole zur Mitt-Diastole [118, 119].

Patienten erhielten keine MRT bei Vorliegen eines der folgenden Gründe:

- Kontraindikationen (z.B. Metall im Körper)
- Zu großer Bauchumfang
- Starke Platzangst
- Weigerung, eine MRT zu durchlaufen

3.2.3.4 *Akquisition von Gewebeproben aus dem Endomyokard*

3.2.3.4.1 Im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung

Patienten nach Herztransplantation durchlaufen im Universitätsklinikum Düsseldorf eine organisierte Transplantatnachsorge, die eine repetitive Suche nach Zeichen von Transplantatabstoßung mittels Katheter-gesteuerter EMB beinhaltet. Im ersten Jahr nach Transplantation werden mindestens 5 Biopsien geplant, in den Folgejahren wird eine jährliche Kontrolle angestrebt. Jährlich werden Transplantierte zudem mittels einer Koronarangiografie auf koronare Stenosen untersucht.

Von einem im Verfahren der Myokardbiopsie erfahrenen kardiologischen Oberarzt des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden über einen venösen Zugang durch die rechte oder linke Leiste der Patienten Myokardbiopsien ausschließlich aus dem interventrikulären Septum entnommen. Mit einer nicht formbaren Kardiobiopsiezange (H. + H. Maslanka GmbH, REF EH1518.02-120, Tuttlingen, Deutschland) wurden über den rechten Ventrikel aus dem interventrikulären Septum 5-7 Gewebeproben der Masse 0,2-2mg entnommen und jeweils mithilfe einer Skalpellklinge in ein präpariertes Mikroreaktionsgefäß überführt. Größere Stücke wurden in vierprozentiger wässriger Formaldehyd-Lösung zur histologischen Analyse konserviert, kleinere Stücke wurden zur immunhistochemischen, virologischen und zur Expressionsanalyse in RNAlater® konserviert. Die genannten Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert und zur Analyse per Kurierdienst in das Institut für kardiale Diagnostik und Therapie (IKDT) in Berlin überführt, sodass eine Analyse in einem adäquaten Zeitrahmen von 3 Tagen möglich war.

Zusätzlich wurden zwei Gewebeproben in ein auf Eis gelagertes Mikroreaktionsgefäß, gefüllt mit flüssigem BIOPS-Medium, überführt. Kontinuierlich eisgekühlt wurden diese Proben innerhalb einer Stunde der Messung zugeführt (siehe 3.2.4).

3.2.3.4.2 Im Rahmen einer chirurgischer Implantation eines Linksherzunterstützungssystems

Im Rahmen der LVAD-Operation wird ein Metallring an der Herzspitze (Apex cordis) mit Einzelknopfnähten befestigt. Anschließend wird mithilfe einer speziellen Stanze die linksventrikulär gelegene Herzspitze entfernt, um das Einbringen des eigentlichen Unterstützungssystems (ThoratecHeartMate II® LVAD oder ThoratecHeartMate III® LVAD, Thoratec® Corporation, Pleasanton, California) zu ermöglichen.

Im Rahmen der Studie wurde ein muskelreiches Stück der herausgestanzten Herzspitze mit einem chirurgischen Messer separiert und unmittelbar in ein auf Eis gelagertes und mit BIOPS-Medium gefülltes konisches Röhrchen (15ml) überführt. Kontinuierlich eisgekühlt wurde die Gewebeprobe innerhalb einer Stunde der Messung zugeführt (siehe 3.2.4).

3.2.3.4.3 Im Rahmen einer orthotopen Herztransplantation

Im Rahmen einer orthotopen Herztransplantation wird, nachdem ein geeignetes Spenderherz im Operationssaal eingetroffen ist, das Herz des Empfängers auf Höhe beider Venae cavae, des linken Vorhofes, der Pulmonalarterie und der Aorta exzidiert, während der Transplantatempfänger an eine Herzlungenmaschine angeschlossen ist.

Im Rahmen der Studie wurde aus beiden Vorhöfen, beiden Ventrikeln und beiden Seiten des interventrikulären Septums des explantierten Herzen des Empfängers muskelreiche Proben von etwa einem Kubikzentimeter Größe mit einem chirurgischen Messer herausgeschnitten und in auf Eis gelagerte und mit BIOPS-Medium gefüllte konische Röhrchen (15ml) überführt. Kontinuierlich eisgekühlt wurde die Gewebeprobe innerhalb einer Stunde der Messung zugeführt (siehe 3.2.4).

3.2.4 Hoचाuflösende ex vivo-Respirometrie an humanem Myokard

Die Myokard-Gewebeproben wurden im Labor wiederum in eisgekühltes BIOPS-Medium überführt und sodann nach der *skinned-fiber*-Methode (englisch: isolierte-Faser-Methode) [120, 121] zunächst mechanisch mit präzisen Pinzetten (sofern die Größe und Form der Biopsate dies zuließ) in einzelne Fasern separiert und anschließend mit Saponin in der Konzentration 50µg/ml permeabilisiert. In dieser Lösung wurden die Fasern 30 Minuten auf einem Schüttler (VWR® International, Leuven, Belgien) mit etwa 80 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Auf diese Weise wurden die Cholesterol-reichen Plasmamembranen der Myokardzellen permeabilisiert, da Saponin diese aufgrund seiner hohen Affinität zu Cholesterol angreift, während die Cholesterol-armen Mitochondrienmembranen funktionell unversehrt bleiben [122]. Anschließend fanden zwei Waschungsschritte statt, in denen die Fasern jeweils 10 Minuten in MiRO5-Puffer auf genanntem Schüttler mit etwa 80 Umdrehungen pro Minute inkubiert wurden. Sodann wurden die Biopsate,

bzw. einzelne Fasern auf Filterpapier durch Abtupfen getrocknet und abgewogen (getrocknetes Gewicht etwa 1 mg), bevor sie schließlich in je eine der zwei Kammern des hochauflösenden Zweikammer-Respirometers (Oxygraph® 2k, OROBOROS® INSTRUMENTS, Innsbruck, Österreich) in 2ml MiRO5-Puffer bei 37° Celsius überführt wurden. Es folgte eine Hyperoxigenierung, sodass in beiden Kammern schließlich eine Sauerstoff-Konzentration von 400-450nmol/l vorlag. Die Messung der Sauerstoff-Konzentration und des O₂-Flusses (siehe 1.2.3 und Abb. 4) erfolgte über eine Clark-Elektrode des Oxygraphen und die Aufzeichnung der Daten über DatLab-Software (OROBOROS® INSTRUMENTS, Innsbruck, Österreich) [39].

Bei allen Gewebeproben wurde anschließend dasselbe Protokoll für die Substratzugabe durchgeführt:

Substrat	Finale Konzentration in Oxygraph
Malat	2mM
Octanoyl-Carnitin	1mM
Adenosindiphosphat	2,5mM
Glutamat	10mM
Succinat	10mM
Cytochrom C	10µM
Oligomycin	5µM
Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon	Titration in 0,2µM Schritten
Antimycin A	5µM

Tabelle 8: Verwendete Substrate und jeweilige Konzentrationen.

Gesättigte Konzentrationen von Malat, Octanoyl-Carnitin und ADP als Phosphatakzeptor ergaben in Kombination die Fettsäure-abhängige Respiration (MOct) [123]. Durch Titration von Glutamat wurde zusätzlich die maximale durch Komplex I unterstützte Respiration erreicht (GMOct). Succinat ist ein Substrat des Komplex II und in Kombination mit den vorher hinzugegebenen Substraten war die nun erreichte Respiration nach Applikation von Succinat die maximale partiell gekoppelte erreichbare OXPHOS Kapazität (GMSOct). Hinzugabe von Cytochrom C dient der Überprüfung der Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran. Bei einem Anstieg des Sauerstoffflusses nach Zugabe von Cytochrom C um mehr als 20% wurde von einer relevanten Schädigung der Mitochondrienmembran ausgegangen und die Messung verworfen. Oligomycin ist

ein Hemmstoff der ATP-Synthase und ermöglicht das Eintreten in den *LEAK State* 4_o (siehe 1.2.3). Infolgedessen fand eine schrittweise Titration von FCCP statt, um die maximale entkoppelte ETS Kapazität darzustellen (1.2.3). Abschließend wurde Antimycin A als Hemmstoff des Komplex III hinzugegeben, worauf eine Näherung des O_2 -Flux an 0 erwartet wurde.

Um die Kopplung der Atmungskette und die gewebebewichtsunabhängige mitochondriale Funktion zu beurteilen, wurden *Flux Control Ratios* gebildet [36, 39]. Die *Respiratory Control Ratio* (gebildet aus OXPHOS / LEAK Respiration, also *State 3* / *State 4_o*) kann als Maß für die Kopplungseffizienz gesehen werden: Eine höhere *Respiratory Control Ratio* bedeutet, dass verhältnismäßig mehr Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung anstatt nur für die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials eingesetzt werden kann [124]. Die *Respiratory Control Ratio* ist nach Definition immer ≥ 1 . Die *LEAK Control Ratio* (gebildet aus LEAK Respiration / ETS Kapazität, also *State 4_o* / *State 3* entkoppelt) auf der anderen Seite ist ein Maß für den Entkopplungsgrad oder die „Undichtigkeit“ der Atmungskette und nimmt Werte zwischen 0 und 1 an [38]. Schließlich kann noch das P/E Verhältnis (*P/E Ratio*, gebildet aus OXPHOS Kapazität / ETS Kapazität) genutzt werden, um zu beurteilen, zu welchem Grad die Aktivität der Atmungskettenkomplexe durch die Kapazität der ATP-Synthase limitiert wird.

Die Substrate wurden jeweils hinzugegeben, nachdem sich ein relativ konstanter Sauerstofffluss (Plateau) nach dem vorherigen Substrat einstellte (siehe Abb. 4).

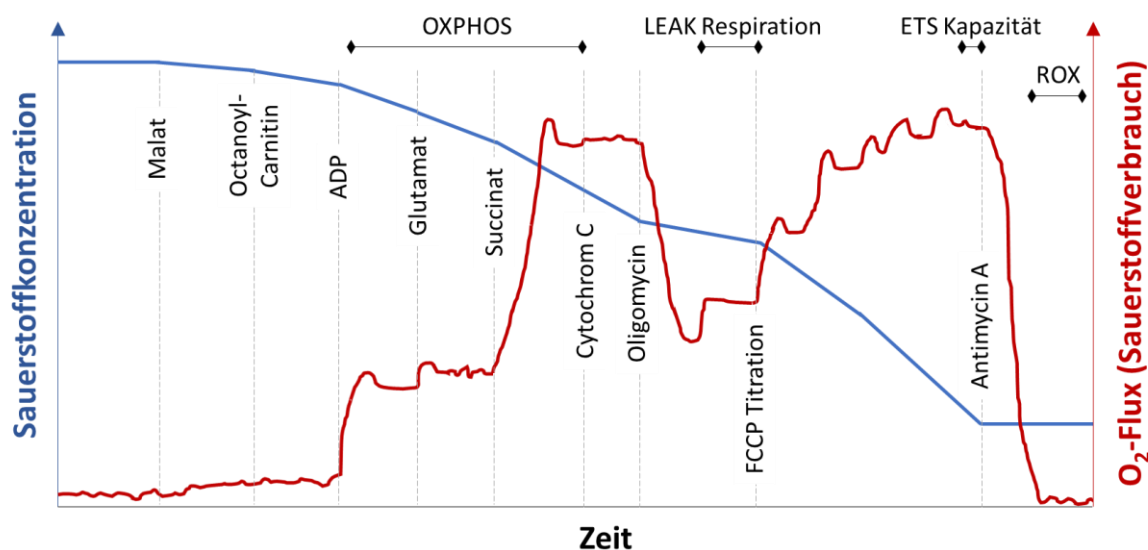


Abb. 4: Schematische Darstellung einer respirometrischen Messung. In Blau ist die Sauerstoffkonzentration (linke y-Achse) über der Zeit dargestellt, in Rot der O_2 -Flux (rechte y-Achse) über der Zeit. Durch sukzessive Zugabe der verschiedenen Substrate können verschiedene Respirationsstadien generiert werden. Die OXPHOS Kapazität wurde nach Zugabe von ADP, Malat, Octanoyl-Carnitin, Glutamate und Succinat erhoben. Zur Überprüfung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran wurde Cytochrom C hinzugegeben. Nach Hemmung der ATP-Synthase durch Oligomycin stellte sich Respirationsstadium 4_o ein. Durch Titration von Carbonyl-Cyanid-4-(Trifluoromethoxy)-Phenylhydrazon (FCCP) wurde die Kapazität des Elektronen-

transferierenden Systems (ETS Kapazität) quantifiziert. Der residuale Sauerstofffluss stellt sich nach Zugabe von Antimycin A.

Bei den größeren Gewebeproben (LVAD, HTX) wurden bei der respirometrischen Messung nicht genutzte, permeabilisierte und in MiRO5 gewaschene Fasern mit Filterpapier abgetupft, abgewogen und in flüssigem Stickstoff gekühlt. Für die Langzeit-Aufbewahrung wurden sie wieder aus diesem geborgen und bei -80°C eingefroren.

3.2.5 Messung der Citrat-Synthase-Aktivität

Die Citrat-Synthase-Aktivität (CSA) wurde, wie von anderen Gruppen zuvor beschrieben [125, 126], im Verhältnis zum Proteingehalt des Gewebes bestimmt. Eine Messung der Citrat-Synthase-Aktivität konnte nur bei größeren Gewebestücken (HTX Gruppe und LVAD Gruppe) erfolgen, da der Proteingehalt und Mitochondriengehalt hier ausreichend war, um ein valides Ergebnis zu erhalten. Mehrere Tests zur Überprüfung, ob sich bei der Citrat-Synthase-Aktivitäts- und Proteinbestimmung einer größeren Probe (mind. 10mg) und einer Biopsie (0,6 bis 1,8mg), die aus demselben Myokardstück extrahiert wurden, identische Resultate zeigten, ergaben eine Diskrepanz zwischen beiden Probenotypen. Mögliche Ursache ist, dass die Biopsien einer höheren Verdünnung ausgesetzt wurden, da sonst eine mechanische Homogenisierung nicht möglich war. Entsprechend wurde in der post-HTX-Gruppe keine Messung der Citrat-Synthase-Aktivität durchgeführt.

Aus der Langzeit-Aufbewahrung bei -80°C wurde das Gewebe in 1,5ml Mikroreaktionsgefäßen auf Eis gelagert und sodann mit Homogenisierungspuffer (*CellLytic MT* und *Protease Inhibitor Cocktail* im Verhältnis 100:1) im Verhältnis 6:1 (μl Puffer : mg Gewebe) versetzt. Anschließend wurden die Proben (weiterhin auf Eis) homogenisiert. Sodann wurden die Proben bei 12000G 15 Minuten lang zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde abpipettiert und im Verhältnis 1:10 mit *Assay Buffer for CSA* verdünnt.

3.2.5.1 Messung des Proteingehalts (BCA)

Eine doppelte Standard-Verdünnungsreihe von bovinem Serum-Albumin wurde auf einer 96-Well-Platte vorbereitet. Die verdünnten Proben wurden in je zwei Wells der Platte pipettiert und wiederum mit Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt. Jedes Well wurde mit $100\mu\text{l}$ *Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A* und *B* (gemischt im Verhältnis 50:1) versetzt und die ganze Platte 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben wieder auf Raumtemperatur gekühlt. Der Proteingehalt wurde kolorimetrisch mit einem Mikroplatten-Reader (Biotek Synergy 2®, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) in einer 96-Well-Platte bei 560nm Wellenlänge gemessen.

3.2.5.2 *Messung der Citrat-Synthase-Aktivität (CSA)*

Für die Messung der CSA wurde ein Assay Kit (CS0720 Citrate Synthase Assay Kit, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt. Es wurden Dreifach-Messungen aller Proben und eine dreifache Positiv-Kontrolle mit Citrat-Synthase durchgeführt. Die Messungen erfolgten photospektrometrisch mit einem Mikroplatten-Reader (Biotek Synergy 2[®], BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) in einer 96-Well-Platte bei 412nm Wellenlänge. Endogene Aktivität nach Zugabe von 2µl Acetyl-CoA (30mM) und 2µl 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (10mM) wurde von der totalen Aktivität nach Zugabe von 10 µl Oxalessigsäure (10mM) subtrahiert. CSA wurde als Absorption pro Minute gemessen und angepasst an Reaktionsvolumen in den Wells der 96-Well-Platte (0,2ml), die Verdünnung der Originalprobe (1:10), die hinzugegebene Menge von gelöster Probe (2µl) und die optische Weglänge der 96-Well-Platte. CSA wurde pro mg Protein (siehe 3.2.5.1) angegeben.

3.2.6 **Messung von oxidativem Stress aus gefrorenem Serum**

Bei -80°C aufbewahrte Serumproben der Patienten wurden in Eis aufgetaut. Anschließend wurden zur Abschätzung von ROS im Serum zwei Methoden angewandt:

3.2.6.1 *Bestimmung des gesamten Oxidations-Reduktions-Potenzials*

Zur Bestimmung des statischen Gesamt-Redoxpotenzials wurden 30µl auf Eis gelagert aufgetautes und durch einen Rüttler kurzzeitig homogenisiertes Serum auf einen speziellen, aus drei Elektroden aufgebauten Sensorstreifen pipettiert. Dieser wurde mit einem RedoxSYS[®] System (AytuBioscience, Englewood, USA) verbunden, welches das entsprechende Redoxpotenzial über eine, wie ein Galvanostat konfigurierte Leseinheit bestimmte. Sobald die Probe die Referenzelektrode füllte und damit den elektrochemischen Kreis vervollständigte, begann der Testvorgang.

3.2.6.2 *Messung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS)*

Je 50µl der Serumproben wurden mit 50µl 1,15% Kaliumchlorid-Lösung in einem 2ml Mikroreaktionsgefäß verdünnt. Eine Standardreihe von 1,1,3,3-Tetramethoxypropan, verdünnt mit 1,15% Kaliumchlorid-Lösung, wurde in identischen Gefäßen zu 100µl angesetzt. 50µl 8,1% Sulfosalicylsäure und 600µl 0,8% Thiobarbitursäure wurden zur jeder Probe hinzugegeben und alle Proben durchmischt. Anschließend fand eine einstündige Inkubation bei 95°C und 1400 Umdrehungen pro Minute auf einem Thermoschüttler statt. Nachdem die Proben wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden 400µl Butanol-Pyridin-Gemisch (dieses im Verhältnis 15:1) hinzugegeben, gerüttelt und bei 20°C 10 Minuten auf 3000g zentrifugiert. 300µl der obersten Phase wurden in neue Mikroreaktionsgefäße abpipettiert, danach wurde die letzten Schritte ab Zugabe von 400µl Butanol-Pyridin wiederholt. Die entstehenden 600µl Flüssigkeit

wurden mit einer Pipette gemischt und anschließend eine Minute ruhen gelassen, um etwaige Feststoffe ausfallen zu lassen. Aus jedem Mikroreaktionsgefäß wurden sodann 100µl in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert und Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 544nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm gemessen.

Aus Wells, die nur Kaliumchlorid-Lösung enthielten wurde eine Grundemission bestimmt, die von einzelnen Messwerten der Standardreihen-Wells subtrahiert wurde. Anhand der entstehenden Werte der Standard-Verdünnungsreihe wurde eine Funktionsgleichung erstellt, aus der sich die TBARS-Konzentration der Serumproben errechnet wurde.

3.2.7 Messung der myokardialen Expression von mRNA

Die Quantifizierung der myokardialen mRNA von NFκB1 (kodiert für das Protein NF-κB p105 *subunit*, NF-κB1) und MT-CO1 (codiert für das Protein Cytochrome c Oxidase *subunit* I) wurde für ausgewählte Proben im Institut für kardiale Diagnostik und Therapie Berlin mittels *Real-Time Polymerase Chain Reaction* anhand eines vorbeschriebenen Protokolls durchgeführt [127, 128]. Aufgrund der geringen Menge myokardialer DNS entsprechend der geringen Probengröße wurde eine Präamplifikationstechnik genutzt [129]. Die gemessene Expression wurde zur Expression eines *Housekeeping* Gens, der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 normalisiert.

3.2.8 Statistische Auswertung

3.2.8.1 Einteilung und Ausschluss der Patienten in der retrospektiven Analyse

Die Patienten der Studie wurden in unterschiedliche Kollektive aufgeteilt, jeweils angepasst an die zugrundeliegende Fragestellung. Im Rahmen der 5263R Studie wurden später noch mehr Probanden eingeschlossen und untersucht, als in dieser Arbeit analysiert wurden. Zwischen September 2016 und Dezember 2018 (Ende des Analysezeitraums für diesen Studienteil) wurden 332 myokardiale Gewebeproben von insgesamt 80 post-HTX-Probanden, 67 LVAD-Probanden und 40 HTX-Probanden gewonnen.

In den verschiedenen Gruppen wurden einige Patienten mehrfach untersucht. Beispielsweise konnte ein Studienteilnehmer bei Implantation des LVADs eingeschlossen werden, dann in der Folge eine Transplantation erhalten und wiederum anschließend Kontrollbiopsien post-HTX erhalten. Bei einigen post-HTX Probanden wurden im Rahmen der Transplantatnachsorge mehrere EMB im Studienzeitraum entnommen. Für die statistische Auswertung wurde eine Selektion vorgenommen, sodass von jedem Patienten immer nur ein Messzeitpunkt in die Analyse einging.

Nach welchen Kriterien dieser gewählt wurde, ist für die beiden in dieser Arbeit untersuchten Hauptkollektive im Folgenden separat dargelegt.

3.2.8.1.1 Einschluss der Patienten in die Herzinsuffizienz-Analyse

Zur Untersuchung der Assoziation fortgeschrittener Herzinsuffizienz mit mitochondrialer Respiration wurden alle zum Zeitpunkt der Auswertung untersuchten Patienten (n=177) der Studienkohorten LVAD, HTX und post-HTX eingeschlossen. Hierbei wurden die Gruppen LVAD und HTX zu einer „Fortgeschrittene Herzinsuffizienz“-Gruppe (HI) zusammengefasst und mit den nicht herzinsuffizienten Probanden aus post-HTX verglichen. Bei der retrospektiven Analyse der Daten wurden Messzeitpunkte mit fehlerhaften respirometrischen Messungen und innerhalb der post-HTX-Gruppe Messzeitpunkte mit histologischem Nachweis einer Transplantatabstoßung (jegliche Abstoßung, die über „0R“ nach den Kriterien der *International Society for Heart & Lung Transplantation* hinausgeht) ausgeschlossen (Abb. 5). Sodann wurde von jedem Probanden der erste Zeitpunkt eingeschlossen. Bei Probanden, die sowohl in der HI-, als auch in der post-HTX-Gruppe waren, wurde jeweils der erste Studienzeitpunkt eingeschlossen, da die Mitochondrienfunktion in post-HTX jene des Herzens des Spenders repräsentiert.

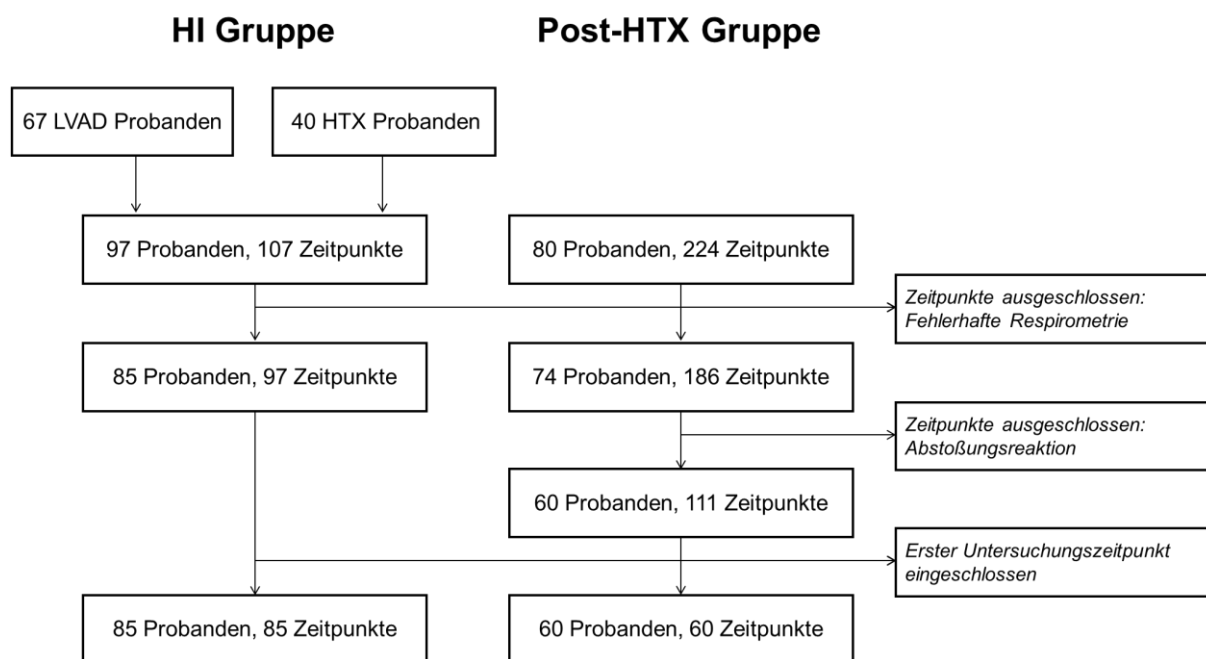


Abb. 5: Systematik der Patientenselektion in der retrospektiven Evaluation der Assoziation von Herzinsuffizienz und myokardialer mitochondrialer Funktion. HI: Herzinsuffizienz; HTX: Herztransplantation; LVAD: *Left Ventricular Assist Device*.

3.2.8.1.2 Einschluss der Patienten in die Typ 2 Diabetes Mellitus-Analyse

In der retrospektiven Analyse des Einflusses von T2DM auf den myokardialen Metabolismus wurden zusätzlich zu den vorab festgelegten Ausschlusskriterien noch weitere festgelegt (siehe Abb. 6): (i) Patienten deren Herz von einem Spender stammte, der T1DM oder T2DM hatte. In diesen Patienten würde die Zeit seit der Transplantation nicht direkt den Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage widerspiegeln. (ii) Patienten mit fehlgeschlagener respirometrischer Messung. Oxygraphische Messungen wurden als fehlgeschlagen gewertet, wenn ein Anstieg des O₂-Fluss

von über 20% nach Hinzugabe von Cytochrom c zu verzeichnen war oder fundamentale Fehler bei der Versuchsdurchführung erfolgt waren (zum Beispiel Messung in fehlerhafter Pufferlösung). (iii) Alle Patienten mit histologischen Zeichen einer Transplantatabstoßung (jegliche Abstoßung, die über „0R“ nach den Kriterien der *International Society for Heart & Lung Transplantation* hinausgeht), denn bei diesen Patienten liegt vermutlich eine unabhängige Reduktion der Mitochondrienfunktion vor [130]. (iv) Wenn ein Patient die Biopsie als Kontrollbiopsie bei Zustand nach Diagnose einer Abstoßungsreaktion mit darauffolgender hochdosierter Kortison-Stoßtherapie erhalten hatte, wurde dieser Zeitpunkt wegen der potenziellen Verfälschung der glykämischen Parameter durch die hochdosierten Glukokortikoide nicht genutzt. (v) Wenn bei einem Probanden nicht klar war, ob er Non-DM oder T2DM zuzuordnen war. Dies war bei Patienten der Fall, die aus organisatorischen oder persönlichen Gründen keinen OGTT durchführen konnten oder wollten, jedoch grenzwertige nüchtern-Plasmaglukose (zwischen 100 und 125mg/dl) und HbA_{1c} (zwischen 5.7% und 6.4%) aufwiesen. Patienten mit T1DM wurden ebenfalls ausgeschlossen.

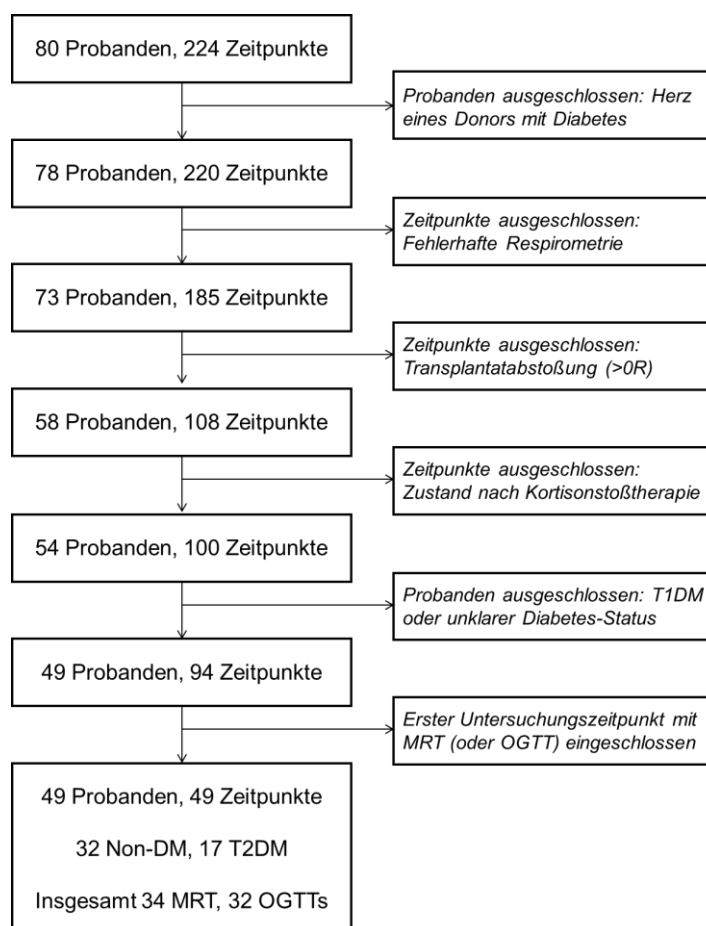


Abb. 6: Selektionsstrategie und -kriterien für die retrospektive Analyse des Einflusses von T2DM auf myokardiale metabolische Parameter. DM: Diabetes Mellitus; OGTT: Orale Glukose-Toleranz-Test; MRT: Magnetresonanztomografie; T1: Typ 1; T2: Typ 2.

Von den restlichen Messzeitpunkten jedes Patienten wurde jeweils der erste gewählt, an dem Ergebnisse zusätzlich zu erfolgreicher respirometrischer Messung auch eine kardiale MRT durchgeführt wurde. Die verbleibenden Patienten wurden nach den in Abschnitt 1.3.1 beschriebenen Diagnosekriterien des T2DM, bzw. abhängig von vorbestehender Diabetes-Therapie in Patienten mit T2DM (T2DM, n=32) und Patienten ohne T2DM (Non-DM, n=17) eingeteilt.

Über die Norm erhöhte nüchtern- ($\geq 100\text{mg/dl}$) oder 2-Stunden-OGTT-Plasmaglukosewerte ($\geq 140\text{mg/dl}$), werden als gestörte nüchtern-Glukose und gestörte Glukosetoleranz bezeichnet (englisch: *impaired fasting glucose* und *impaired glucose tolerance*: IFG/IGT) [131]. Diese Patienten wurden in dieser Arbeit Non-DM zugeordnet, da nach der Definition der *American Diabetes Association* kein T2DM vorlag [44]. Um Störungen der Glukosetoleranz und die Insulinsensitivität zu quantifizieren wurde bei allen Patienten, bei denen ein 3-stündiger OGTT durchgeführt wurde, die OGIS berechnet [112]. Der PREDIM wurde zusätzlich berechnet, da er bereits in einem lokalen Kollektiv validiert wurde und eine noch bessere Abschätzung des M-Werts aus dem *Clamp* als die OGIS liefern könnte [110]. Aus nüchtern-Glukose und nüchtern-Insulin wurde zusätzlich nach HOMA Index der Grad der Insulin-Resistenz bestimmt mittels der Formel [113]:

$$\text{Nüchterninsulinspiegel (mU/l)} * \text{Nüchternglukosespiegel (mmol/l)} / 22,5$$

3.2.8.2 Statistische Tests

Zur statistischen Analyse der Daten wurde die Software GraphPad Prism® Version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, USA), und IBM® SPSS® Statistics Version 24.0.0.2 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA) verwendet. Abbildungen und Tabellen wurden mit GraphPad Prism® Version 7.03 und mit Python 3.7.4 (Python Software Foundation, Wilmington, USA) unter Nutzung frei verfügbarer Softwarepakete für Python (Pandas, Seaborn, TableOne) erstellt. Werte in Tabellen werden als „Anzahl (%)“ oder „Median [Interquartilsabstand]“ angegeben. Werte in Abbildungen sind, wenn nicht anders angegeben als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wie zur Beurteilung des Unterschieds zwischen HI und post-HTX wurden bezüglich der Patientencharakteristika der Chi-Quadrat-Test für dichotome und Variablen und der Kruskal-Wallis-Test für kontinuierliche Variablen genutzt. Nicht-dichotome, kategoriale Variablen wurden in dieser Arbeit nicht erhoben.

Mitochondrien- und sämtliche anderen ergebnisbezogenen Daten wurden nach D'Agostino-Pearson-Test und Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung im Sinne einer Gaußschen Verteilung bei einem Alpha von 0,05 überprüft. Zeigte das Ergebnis eines der Tests, dass die Annahme einer

Normalverteilung nicht verworfen werden sollte und die Daten in einem Histogramm eine adäquate Verteilung, wurde von einer Normalverteilung der Datenreihe ausgegangen. Bei entsprechender Annahme einer Gauß-Verteilung wurden parametrische, andernfalls nicht-parametrische Tests genutzt. Zur Beurteilung der Respiration verschiedener Herzkammern wurde der linke Ventrikel als Referenzgröße gewählt und die Respiration der anderen Myokardlokalisationen mit diesem in einer *repeated measurement Mixed-Effects*-Analyse mittels des Dunnett Tests verglichen. Bei einem Vergleich von lediglich zwei Gruppen wurden zweiseitige t-Test angewandt, andernfalls der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test. Bei Berechnung des t-Tests wurde mit dem F-Test auf Varianzgleichheit geprüft und gegebenenfalls eine Korrektur nach Welch vorgenommen. In Gruppenvergleichen wurden die Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt, oder als Boxplot, wenn das Vorliegen von signifikanten Ausreißern bei nicht-parametrischer Verteilung dies rechtfertigte. Boxplots wurden nach der Tukey Methode dargestellt, wonach die Länge der Antennen auf den 1,5-fachen Interquartilsabstand begrenzt wird [132]. Über diese Grenzen hinausgehende Datenpunkte werden hierbei einzeln dargestellt.

Bei Korrelationen wurden bei Annahme einer Normalverteilung Korrelationskoeffizienten nach Pearson errechnet, gegebenenfalls wurde eine partielle Korrelation mit angegebenen Kontrollvariablen durchgeführt. Andernfalls wurde nach Spearman ein Rangkorrelationskoeffizient gebildet. In graphischen Darstellungen von Pearson-Korrelationen wurde bei parametrischer Datenverteilung zusätzlich eine einfache lineare Regression unter Einschluss der beiden korrelierenden Variablen durchgeführt und eine entsprechende Ausgleichsgerade eingefügt. In Sensitivitätsanalysen wurden zudem mittels linearer Regression für potenzielle Confounder adjustiert.

Bei allen Tests wird ein Ergebnis von $p < 0,05$ als signifikant betrachtet, Ergebnisse von $p < 0,1$ wurden als Tendenzen gewertet. p- und r-Werte wurden in allen Abbildungen und im Text auf zwei Nachkommastellen gerundet oder als „ $<0,01$ “ angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Höhere Respiration von linksventrikulärem gegenüber Vorhofmyokard

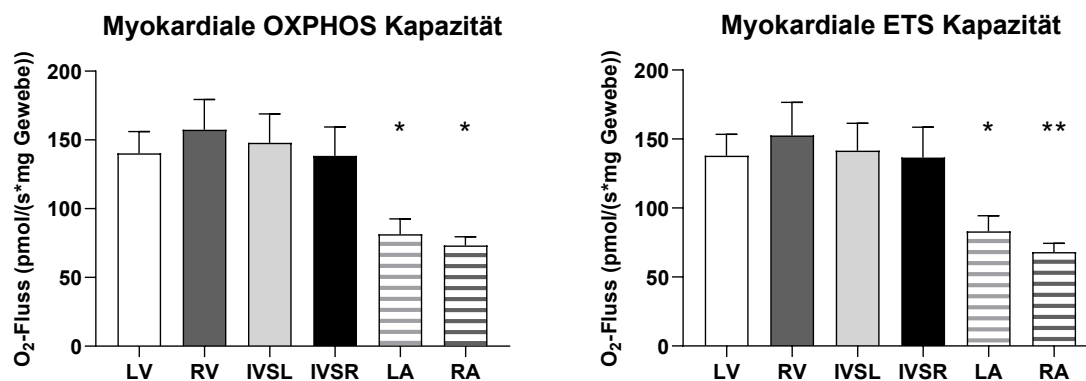


Abb. 7: Vergleich der maximalen State 3 Respiration des Gewebes verschiedener kardialer Regionen. Dargestellt sind der gekoppelte (links) und der entkoppelte (rechts) Sauerstofffluss. Mittelwerte mit Standardfehler. n=9-11. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum LV (Dunnett-Test). ETS: Elektronen-transferierendes System; IVSL: linksseitiges interventrikuläres Septum; IVSR: rechtsseitiges interventrikuläres Septum; LA: Linkes Atrium; LV: Linker Ventrikel; OXPHOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; RA: Rechtes Atrium; RV: Rechter Ventrikel.

Im Vergleich zum Myokard des klinisch am Meisten relevanten linken Ventrikels war die oxidative Kapazität im Myokard der beiden Vorhöfe geringer (Abb. 7). Hierbei war der Unterschied vom linkem Ventrikel zum rechten Atrium größer als zum linken Atrium. Der Unterschied zwischen linkem Ventrikel und den Vorhöfen zeigte sich auch in der Respiration mit MOct, bzw. GMOct. Es zeigte sich hinsichtlich des Sauerstoffflusses in keinem Schritt des Protokolls ein Unterschied vom Myokard des rechten Ventrikels oder des interventrikulären Septums zu jenem des linken Ventrikels.

Die mittels *Flux Control Ratios* abgeschätzte Kopplung der myokardialen Mitochondrien war in den Ventrikeln höher als in den Vorhöfen. Es zeigte sich in beiden Atria, insbesondere im rechten Atrium, eine niedrigere *Respiratory Control Ratio* und eine höhere *LEAK Control Ratio* im Vergleich zu linksventrikulärem Myokard Abb. 8, was Hinweise auf einen erniedrigten Kopplungsgrad des atrialen Myokards gibt. Bezüglich der *P/E Ratio* wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Regionen ersichtlich, sodass nicht davon auszugehen ist, dass die Limitation der oxidativen Kapazität des atrialen Myokards primär auf die Aktivität der ATP-Synthase zurückzuführen ist, sondern eher auf die vorangeschalteten Komplexe I-IV.

Aus gefrorenem permeabilisiertem Gewebe wurde die Citrat-Synthase-Aktivität aller untersuchten Myokardregionen gemessen, um daraus Rückschlüsse über den lokalen Mitochondriengehalt zu ziehen. Im Gewebe des rechten Vorhofs war die Citrat-Synthase gegenüber dem linken Ventrikel eingeschränkt, im linken Vorhof zeigte sich eine dahingehende Tendenz (Abb. 9). Bei auf die Citrat-Synthase-Aktivität normalisierter myokardialer Respiration zeigten sich keine Unterschiede mehr unterschiedlicher Myokardregionen. Wurden mittels dieser auf die Mitochondriendichte normierten Respiration die *Flux Control Ratios* gebildet, zeigte sich ein zur auf das Gewebegewicht normierten Respiration identisches Bild.

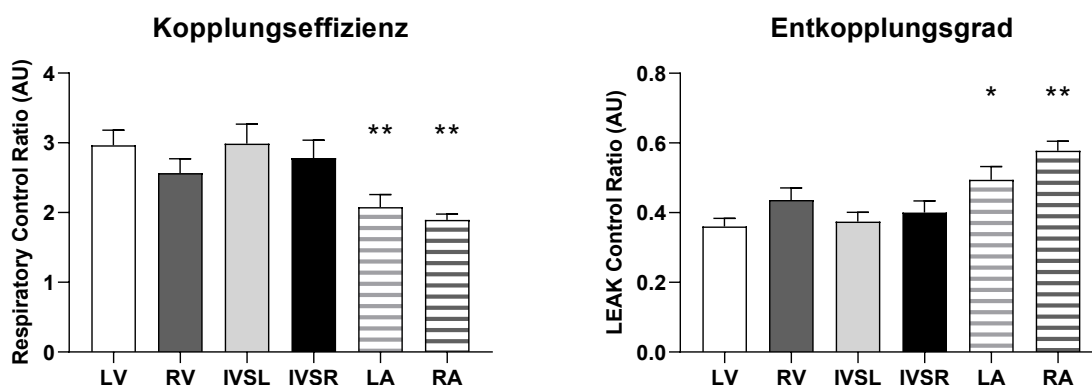


Abb. 8: Unterschiede der Kopplungseffizienz und des Entkopplungsgrades myokardialer Mitochondrien der Vorhöfe und der Ventrikel. n=9-11. *p<0,05, **p<0,01 im Vergleich zum LV (Dunnnett-Test). AU: *Arbitrary Unit*; IVSL: linksseitiges interventrikuläres Septum; IVSR: rechtsseitiges interventrikuläres Septum; LA: Linkes Atrium; LV: Linker Ventrikel; RA: Rechtes Atrium; RV: Rechter Ventrikel.

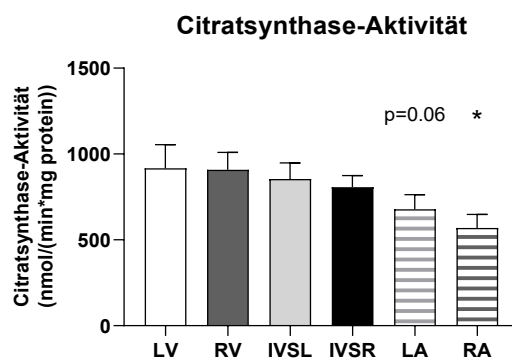


Abb. 9: Citrat-Synthase-Aktivität verschiedener Myokardregionen. n=9-11. *p<0,05 im Vergleich zum LV (Dunnnett-Test). IVSL: linksseitiges interventrikuläres Septum; IVSR: rechtsseitiges interventrikuläres Septum; LA: Linkes Atrium; LV: Linker Ventrikel; RA: Rechtes Atrium; RV: Rechter Ventrikel.

Da EMB aus dem rechtsseitigen interventrikulären Septum entnommen werden und hieraus Rückschlüsse auf die mitochondriale Funktion des linken Ventrikels gezogen werden sollen, wurde überprüft, inwieweit diese beiden Regionen korrespondieren. Wie in Abb. 10 dargestellt,

zeigte sich eine sehr starke Korrelation zwischen den Mittelwerten des rechtsseitigen interventrikulären Septums und des linken Ventrikels.

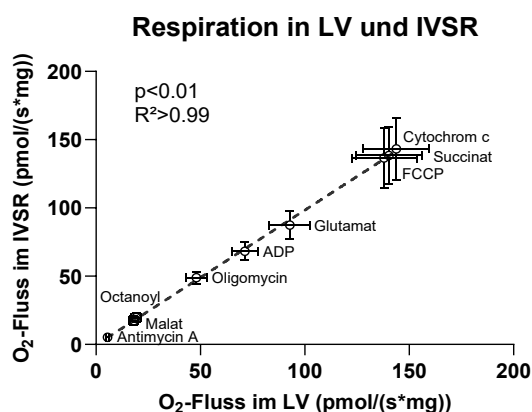


Abb. 10: Mittelwerte und Standardfehler der Respiration pro mg Gewebe des linken Ventrikels (LV) und des rechtsseitigen interventrikulären Septums (IVSR) nach verschiedenen applizierten Substrate. Substrate wurde in der in 3.2.4 beschriebenen Reihenfolge eingesetzt. Es zeigte sich ein starker linear Zusammenhang zwischen den Werten der Regionen. Regressionsgleichung: $y = 0,9873 \cdot x - 0,3680$. Mittelwerte mit Standardfehler. $n=11$. Pearson-Korrelation mit linearer Regressionsgerade. ADP: Adenosin-Diphosphat; FCCP: Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon; IVSR: Interventrikuläres Septum, rechtsventrikuläre Seite; LV: Linker Ventrikel; Octanoyl: Octanoyl-Carnitin.

4.2 Assoziation der Herzinsuffizienz mit reduzierter mitochondrialer Respiration

Beim Vergleich der Patienten in der HI-Gruppe und der post-HTX-Gruppe wurden hinsichtlich klinischer Charakteristika erhebliche Unterschiede festgestellt (siehe Tabelle 9). Neben für die fortgeschrittene Herzinsuffizienz typischen Unterschiede des Laborbilds und der Medikation wies die HI-Gruppe eine massive Einschränkung des Herzindex und der linksventrikulären Ejektionsfraktion gegenüber post-HTX auf. Zudem wiesen innerhalb der HI-Gruppe mehr Patienten eine pulmonale Hypertonie, eine koronare Herzerkrankung und ein Vorhofflimmern auf.

Parameter	Einheit	HI	Post-HTX	p
n		85	60	
Demografie				
Alter	Jahre	58,0 [49,0; 65,0]	59,0 [48,8; 66,0]	0,901
Geschlecht	Männlich	70 (82,4)	52 (86,7)	0,639
BMI	kg/m ²	27,0 [23,8; 31,1]	25,0 [22,5; 27,7]	0,063
Kardiale Funktion				
Herzzeitvolumen	l/min	3,5 [3,0; 4,8]	5,3 [4,8; 6,6]	<0,001
Herzindex	l/min/m ²	1,7 [1,5; 2,0]	2,9 [2,4; 3,2]	<0,001
LVEF	%	20 [15; 20]	67 [63; 70]	<0,001
Medizinische Daten				
(Z.n.) Nikotinabusus		19 (32,8)	26 (44,1)	0,286
(Z.n.) Alkoholabusus		4 (6,3)	2 (3,3)	0,680

Parameter	Einheit	HI	Post-HTX	p
COPD		11 (13,8)	5 (8,3)	0,466
Arterielle Hypertonie		36 (50,7)	27 (48,2)	0,920
Pulmonale Hypertonie		21 (27,3)	1 (1,8)	<0,001
(Z.n.) KHK		33 (42,3)	7 (11,7)	<0,001
(Z.n.) ICM		37 (44,6)	27 (45,0)	0,904
(Z.n.) DCM		43 (51,8)	31 (51,7)	0,878
T1DM		2 (2,5)	1 (1,7)	1,000
T2DM		21 (25,3)	19 (31,7)	0,517
Vorhofflimmern		25 (32,1)	4 (6,9)	0,001
Medikation				
Insulin		13 (16,7)	11 (18,3)	0,976
Metformin		1 (1,3)	3 (5,0)	0,315
GLP1-Analagon		1 (1,3)	0	1,000
DPP4-Inhibitor		3 (3,8)	1 (1,7)	0,634
SGLT2-Inhibitor		1 (1,2)	0	1,000
Protonenpumpenhemmer		69 (87,3)	45 (75,0)	0,098
Diuretika		67 (84,8)	34 (56,7)	<0,001
ACE-Hemmer		31 (39,2)	15 (25,0)	0,113
Calciumkanalblocker		8 (10,1)	25 (41,7)	<0,001
ARB		4 (5,1)	5 (8,3)	0,500
ARNI		1 (1,3)	0	1,000
Betablocker		55 (69,6)	17 (28,3)	<0,001
Aldosteronantagonist		40 (50,6)	15 (25,0)	0,004
Ivabradin		9 (11,4)	18 (30,0)	0,011
Herzglykosid		5 (6,3)	0	0,070
Statine		57 (72,2)	54 (90,0)	0,017
Acetylsalicylsäure		60 (75,9)	54 (90,0)	0,056
Amiodaron		25 (32,1)	0	<0,001
PDE-5-Hemmer		53 (67,9)	9 (15,0)	<0,001
Laborwerte				
Natrium	mmol/l	138 [135,5; 141,5]	141 [138,5; 143]	0,015
Kalium	mmol/l	4,6 [4,3; 5]	4,4 [4,1; 4,7]	0,050
Calcium	mmol/l	2,2 [2,1; 2,4]	2,3 [2,2; 2,3]	0,831
Chlorid	mmol/l	99 [97,5; 104,5]	103 [100; 106,5]	0,025
GFR (CKD-EPI)	ml/min	57,4 [36,7; 73,0]	52,7 [42,5; 75,5]	0,847
Cystatin C	mg/l	1,7 [1,3; 2,7]	1,6 [1,3; 2,3]	0,520
Harnstoff	mg/dl	55,4 [32,4; 88,5]	53,7 [38,8; 74,1]	0,995
Harnsäure	mg/dl	7,3 [4,8; 9,8]	6,5 [5,5; 7,8]	0,329
AST	U/l	32,5 [19,8; 37]	20 [15,5; 24]	<0,001
ALT	U/l	28 [17,8; 53,5]	16 [12; 22]	<0,001
γ-gT	U/l	123,5 [74,5; 190,2]	39 [22,5; 74]	<0,001
Alkalische Phosphatase	U/l	114,5 [73; 169]	59 [47; 78,5]	<0,001
Bilirubin	mg/dl	0,8 [0,6; 1,4]	0,4 [0,3; 0,6]	<0,001
Cholinesterase	U/l	4359 [3332; 5562]	6574 [4855; 8166]	<0,001
Amylase	U/l	59,5 [38,8; 90,5]	63 [40; 87]	0,942
Lipase	U/l	32,5 [20,8; 49,5]	29 [18; 42]	0,133
Triglyceride	mg/dl	128 [81,5; 151]	136 [113; 214]	0,042

Parameter	Einheit	HI	Post-HTX	p
Gesamtcholesterin	mg/dl	140 [105,5; 165,5]	171 [143,5; 198]	0,001
LDL	mg/dl	78 [48,5; 98]	97 [76; 115,5]	0,001
HDL	mg/dl	39 [28,5; 48]	51 [42; 60,5]	<0,001
LDH	U/l	252 [212,2; 335]	217 [177; 265]	0,003
Creatin-Kinase	U/l	46,5 [31,8; 89]	58 [29,5; 94]	0,706
Albumin	mg/dl	3356 [2846; 3681]	3813 [3412; 4180]	0,001
Ferritin	ng/ml	236 [106,5; 386]	153 [90,5; 377,5]	0,297
Eisen (2 ⁺)	µg/dl	50 [34; 85]	76 [56; 98]	0,016
CRP	mg/dl	2,6 [0,7; 6,5]	0,3 [0,1; 0,7]	<0,001
TSH	mU/l	2,6 [1,2; 3,9]	1,1 [0,6; 1,9]	0,002
Leukozyten	1/µl	7850 [5775; 10850]	7250 [5475; 9050]	0,157
Erythrozyten	Mio./µl	3,6 [3,4; 4,2]	4,1 [3,5; 4,7]	0,044
Hämoglobin	g/dl	10,7 [10,1; 12,3]	12,1 [10,4; 13,5]	0,038
Hämatokrit	%	32,4 [30,1; 36,9]	35,7 [31,4; 40,1]	0,043
Thrombozyten	Tsd./µl	217,5 [145,8; 295,8]	218,5 [163,2; 280,5]	0,777
Plasmaglukose	mg/dl	88 [80; 114]	88 [73; 110]	0,649
HbA _{1c}	mmol	40 [34; 43,5]	42,5 [36,2; 49]	0,048
HbA _{1c}	%	5,8 [5,3; 6,2]	6 [5,5; 6,7]	0,058

Tabelle 9: Klinische Charakteristika der Patienten in der Herzinsuffizienz-Gruppe (HI) und der Gruppe der Herztransplantierten (post-HTX). Daten angegeben als Anzahl (%) oder Median [Interquartilsabstand]. p-Werte sind für kontinuierliche Variablen nach Kruskal-Wallis-Test berechnet, für kategorische Variablen mittels Chi-Square-Test oder nach Fisher, wenn die Zahl der Ereignisse innerhalb einer Gruppe < 5 war. ACE: *Angiotensin converting enzyme*; ALT: Alanin-Aminotransferase; ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker; ARNI: Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitoren; AST: Aspartat-Aminotransferase; BMI: *Body mass index*; COPD: Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung; CRP: C-reaktives Protein; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; DM: Diabetes Mellitus; DPP4: Dipeptidylpeptidase 4; GFR (CKD-EPI): Glomeruläre Filtrationsrate nach Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; γ -gT: Gamma-Glutamyl-Transferase; GLP1: *Glukagon-like peptide 1*; HDL: *High-density lipoprotein*; HI: Herzinsuffizienz; HTX: Herztransplantation; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; IMPDH: Inosinmonophosphat-Dehydrogenase; KHK: Koronare Herzerkrankung; LDH: Laktatdehydrogenase; LDL: *Low-density lipoprotein*; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; PDE-5: Phosphodiesterase-5; SGLT2: *Sodium dependent glucose co-transporter 2*; TSH: Thyreoidea-stimulierendes Hormon; T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus; Z.n.: Zustand nach.

Beim Vergleich der mitochondrialen Respiration zwischen den beiden Gruppen wurde eine eingeschränkte OXPHOS und ETS Kapazität in der HI-Gruppe bei vergleichbarer Kopplungseffizienz in den beiden Gruppen nachgewiesen (Abb. 11). Die Einschränkung der OXPHOS Kapazität bestand für alle Substrat-Kombinationen, am schwächsten war sie nach Titration von Succinat (GMSOct) ausgeprägt. Hinsichtlich Kopplungseffizienz zeigte sich lediglich eine Tendenz zu einer höheren Kopplungseffizienz in der HI-Gruppe ($p=0,07$).

Zur Weiteren Charakterisierung der Assoziation der Herzleistung und der Myokardialen Mitochondrienfunktion wurden über und innerhalb beider Gruppen die Assoziation der OXPHOS und ETS Kapazität mit Parametern kardialer Leistung (Herzindex) bestimmt (Abb. 12). Höhere Herzleistung stand in einem schwachen Zusammenhang mit höherer MOct- und GMOct-Respiration, sowie mit höherer ETS Kapazität. Dieser Zusammenhang bestand über beide

Gruppen, jedoch nicht innerhalb der einzelnen Gruppen. Die GMSOct OXPHOS Kapazität und die *Flux Control Ratios* zeigten dagegen keinen Zusammenhang mit der Herzleistung. Eine Untersuchung des Zusammenhangs der linksventrikulären Ejektionsfraktion mit mitochondrialer Funktion des Myokards wurde aufgrund des eklatanten Gruppenunterschieds dieses Parameters mit fehlender Überlappung (Abb. 13) nicht durchgeführt.

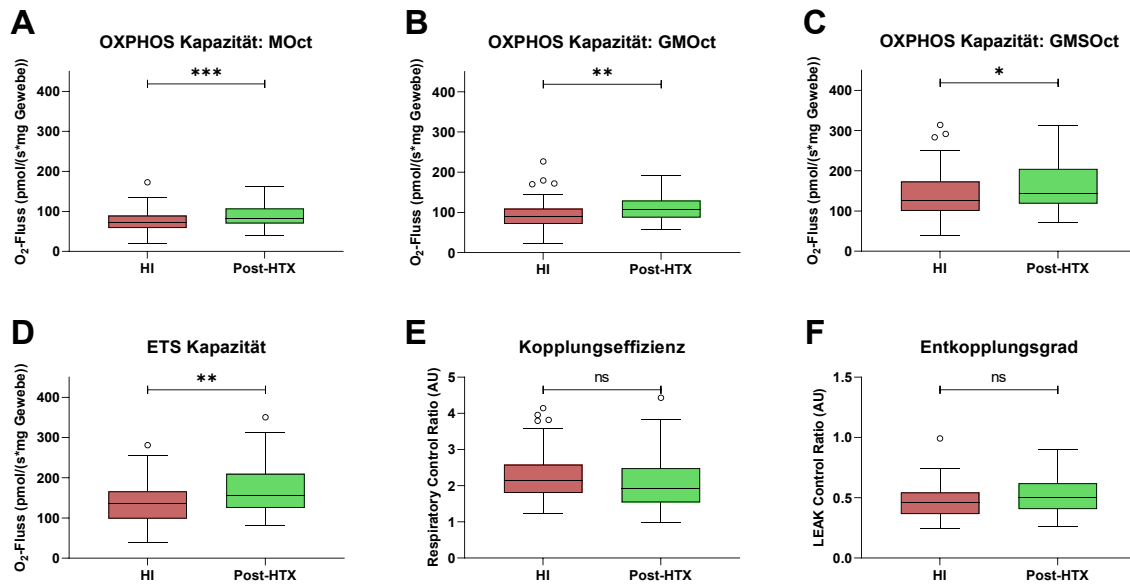


Abb. 11: Eingeschränkte Funktion myokardialer Mitochondrien bei Herzinsuffizienz. Dargestellt ist die OXPHOS Kapazität für verschiedene Substrate (A-C), die entkoppelte Respiration (D), sowie Kopplungseffizienz (E) und Entkopplungsgrad (F). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ mit Mann-Whitney-Test. Daten dargestellt als Boxplots nach Tukey. $n = 84-85$ vs. $59-60$. AU: *Arbitrary Unit*; ETS: Elektronen-transferierendes System; G: Glutamat; HI: Herzinsuffizienz; HTX: Herztransplantation; M: Malat; ns: nicht signifikant; Oct: Octanoyl-Carnitin; OXPHOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; S: Succinat.

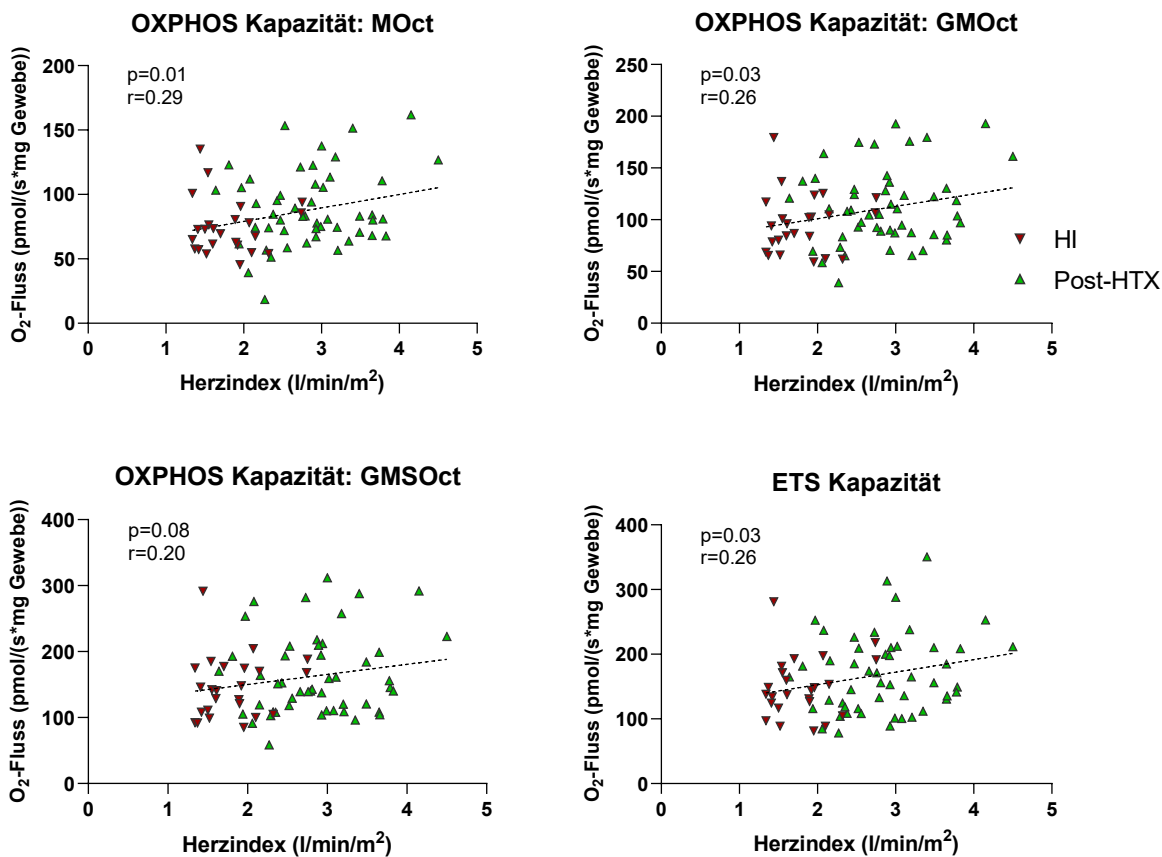


Abb. 12: Korrelation des Herzindex mit myokardialer mitochondrialer oxidativer Kapazität. $n=74$. Pearson-Korrelations-Koeffizient mit linearer Regressionsgerade. ETS: Elektronen-transferierendes System; OXPHOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; ETS: Elektronen-transferierendes System; G: Glutamat; HI: Herzinsuffizienz; HTX: Herztransplantation; M: Malat; Oct: Octanoyl-Carnitin; OXPHOS: oxidative Phosphorylierung (*state 3*); S: Succinat.

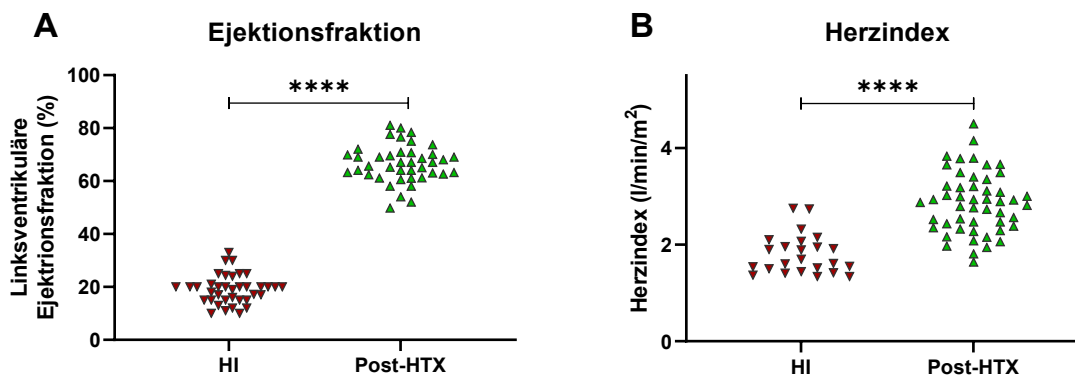


Abb. 13: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion der Herzinsuffizienz (HI)-Gruppe und der Gruppe der Herztransplantierten (Post-HTX). **** $p<0.0001$. Ungepaarter zweiseitiger t-Test. A: $n=37$ vs. 41. B: $n=24$ vs. 50. HI: Herzinsuffizienz; HTX: Herztransplantation.

4.3 T2DM induziert mitochondriale Veränderungen im ventrikulären Myokard

Aus den 49 für die finale Analyse eingeschlossenen, herztransplantierten Probanden wurden zwei Gruppen nach Status des T2DM gebildet, wobei 32 Probanden keinen Diabetes (Non-DM) und 17 einen T2DM aufwiesen. Die klinischen Charakteristika dieser beiden Gruppen waren ähnlich (Tabelle 10). An Unterschieden ist ein höherer *Body Mass Index* der T2DM Gruppe zu nennen, der auch die Spender der jeweiligen Herzen betraf. Außerdem erhielt ein größerer Anteil Patienten der T2DM-Gruppe eine dauerhafte Therapie mit Betarezeptorenblockern. Entsprechend der Gruppeneinteilung waren Glykämie, freie Fettsäuren und Parameter der Insulinresistenz in T2DM höher und in Non-DM erhielt im Gegensatz zu T2DM kein Proband antihyperglykämische Therapie. Bezüglich der Laborwerte lag bei T2DM ein höherer Harnstoff, eine erhöhte Creatin-Kinase und niedrigere Thrombozyten vor (Tabelle 10). Andere demografische, klinische und labormedizinische Parameter waren zwischen den beiden Gruppen vergleichbar – insbesondere waren Parameter der linksventrikulären systolischen Funktion (Ejektionsfraktion und Herzindex) nicht unterschiedlich.

Parameter	Einheit	Non-DM	T2DM	p
n		32	17	
Demografie				
Alter	Jahre	60 [42,8; 66]	58 [52; 68]	0,488
Geschlecht	Männlich	26 (81,2)	16 (94,1)	0,397
BMI	kg/m ²	24,6 [21,8; 26,1]	27,3 [24,5; 30,2]	0,006
Spenderalter	Jahre	41 [29; 47,5]	41 [36; 55]	0,142
Spendergeschlecht	Männlich	20 (62,5)	8 (47,1)	0,461
Spender-BMI	kg/m ²	24 [23; 25,9]	27,3 [26,2; 28,3]	0,003
Kardiale Funktion				
Herzindex	l/min/m ²	2,7 [2,4; 3,1]	2,5 [2,3; 3]	0,323
LVEF	%	68,5 [63; 70]	65 [61; 67]	0,347
Herzzeitvolumen	l/min	4,9 [4,5; 5,7]	4,8 [4,5; 5,4]	0,772
Herzfrequenz	1/min	85,0 [77,0; 90,0]	86,0 [79,0; 88,8]	0,714
Medizinische Daten				
(Z.n.) Nikotinabusus		14 (45,2)	5 (31,2)	0,544
(Z.n.) Alkoholabusus		1 (3,1)	0	1
COPD		2 (6,2)	1 (5,9)	1
Arterielle Hypertonie		11 (40,7)	10 (58,8)	0,39
Pulmonale Hypertonie		0	1 (5,9)	0,378
(Z.n.) KHK		4 (12,5)	3 (17,6)	0,681
(Z.n.) ICM		10 (31,2)	9 (52,9)	0,24
(Z.n.) DCM		19 (59,4)	8 (47,1)	0,601
Vorhofflimmern		1 (3,1)	2 (12,5)	0,254
Medikation				
Insulin		0	7 (41,2)	<0,001
Metformin		0	2 (11,8)	0,116
GLP1-Analogon		0	0	1

Parameter	Einheit	Non-DM	T2DM	p
DPP4-Inhibitor		0	1 (5,9)	0,347
SGLT2-Inhibitor		0	0	1
Protonenpumpenhemmer		22 (68,8)	13 (76,5)	0,743
Diuretika		17 (53,1)	11 (64,7)	0,634
ACE-Hemmer		6 (18,8)	5 (29,4)	0,48
Calciumkanalblocker		13 (40,6)	8 (47,1)	0,897
ARB		4 (12,5)	2 (11,8)	1
ARNI		0	0	1
Betablocker		8 (25)	10 (58,8)	0,043
Aldosteronantagonist		7 (21,9)	3 (17,6)	1
Ivabradin		9 (28,1)	6 (35,3)	0,847
Herzglykosid		0	0	1
Statin		29 (90,6)	16 (94,1)	1
Acetylsalicylsäure		30 (93,8)	13 (76,5)	0,164
Amiodaron		0	0	1
PDE-5-Hemmer		2 (6,2)	2 (11,8)	0,602
Cyclosporin A		1 (3,1)	0	1
Tacrolimus		30 (93,8)	16 (94,1)	1
Everolimus		7 (21,9)	7 (41,2)	0,193
IMPDH-Hemmer		25 (78,1)	10 (58,8)	0,193
Prednisolon		29 (90,6)	17 (100)	0,542
Laborwerte				
Natrium	mmol/l	142 [139,8; 143]	141 [138; 142]	0,197
Kalium	mmol/l	4,4 [4,2; 4,6]	4,4 [4,1; 4,8]	0,776
Calcium	mmol/l	2,3 [2,2; 2,3]	2,3 [2,1; 2,4]	0,729
Chlorid	mmol/l	105 [101; 106]	104 [101; 107]	0,8
GFR (CKD-EPI)	ml/min	52,4 [43,7; 76,2]	43 [34,2; 57,5]	0,065
Cystatin C	mg/l	1,5 [1,2; 2]	1,6 [1,6; 2,5]	0,106
Harnstoff	mg/dl	45,8 [34,2; 65,6]	62,4 [53,1; 90,2]	0,013
Harnsäure	mg/dl	6,9 [5,5; 8,3]	7,3 [6; 9,7]	0,248
AST	U/l	19,5 [16; 23,5]	22 [15; 25]	0,563
ALT	U/l	16 [12; 22]	16 [12; 26]	0,721
γ-gT	U/l	27 [18; 52,2]	42 [27; 81]	0,067
Alkalische Phosphatase	U/l	56 [41; 70]	71 [52; 87]	0,133
Bilirubin	mg/dl	0,4 [0,3; 0,5]	0,5 [0,4; 0,6]	0,204
Cholinesterase	U/l	6525 [5323; 8091]	8100 [5806; 8766]	0,159
Amylase	U/l	72,5 [52,2; 93]	65 [57; 74]	0,308
Lipase	U/l	29 [18,8; 42]	35 [26; 48]	0,407
Triglyceride	mg/dl	127,5 [96,5; 149,8]	207 [131; 335]	0,002
Gesamtcholesterin	mg/dl	169,5 [141,8; 197,5]	183 [146; 253]	0,294
LDL	mg/dl	96 [80,2; 112]	117 [77; 164]	0,35
HDL	mg/dl	51,5 [47,8; 61,2]	50 [33; 55]	0,192
LDH	U/l	214,5 [173,5; 251,2]	209 [179; 231]	0,908
Creatin-Kinase	U/l	64,5 [32,8; 84,8]	93 [77; 179]	0,023
Albumin	mg/dl	3967 [3590; 4236]	3884 [3448; 4172]	0,366
Ferritin	ng/ml	118 [70,2; 222,2]	199 [105; 352]	0,182
Eisen (2 ⁺)	μg/dl	72,5 [54,5; 93,5]	82 [75; 97]	0,141

Parameter	Einheit	Non-DM	T2DM	p
CRP	mg/dl	0,3 [0,1; 0,6]	0,4 [0,2; 0,5]	0,437
TSH	mU/l	1 [0,6; 1,8]	1,1 [0,8; 1,3]	0,592
Leukozyten	1/ μ l	6700 [4900; 7700]	6300 [5100; 8900]	0,682
Erythrozyten	Mio./ μ l	4 [3,6; 4,6]	4,3 [3,9; 5,1]	0,174
Hämoglobin	g/dl	11,8 [10,8; 12,9]	12,5 [11,2; 14,1]	0,188
Hämatokrit	%	35 [32,9; 38,2]	38,6 [33,9; 43,1]	0,2
Thrombozyten	Tsd./ μ l	237 [171; 294]	163 [151; 210]	0,005
Nüchtern-Glukose	mg/dl	77 [71,8; 89,2]	117 [100; 144]	<0,001
Hämoglobin A1c	mmol	37 [35; 42]	55 [48; 61]	<0,001
Hämoglobin A1c	%	5,5 [5,4; 6]	7,2 [6,5; 7,8]	<0,001
Nüchtern-Insulin	mU/l	7,6 [5,8; 10,3]	12,8 [8,3; 16,5]	0,018
Freie Fettsäuren	μ mol/l	405,8 [312,9; 581,6]	696,5 [650; 954]	<0,001
OGIS: Insulinsensitivität	ml/min/m ²	463,6 [410,1; 503,1]	288,4 [267,6; 315,9]	0,039
PREDIM: Insulinsensitivität		1,8 [1,6; 1,9]	0,8 [0,7; 1,3]	0,001
HOMA Insulinresistenz		1,4 [1,1; 2]	3,4 [2,4; 4,6]	<0,001

Tabelle 10: Klinische Charakteristika der Probanden ohne Diabetes Mellitus (Non-DM) und jener mit T2DM (T2DM). Daten angegeben als Anzahl (%) oder Median [Interquartilsabstand]. p-Werte sind für kontinuierliche Variablen nach Kruskal-Wallis-Test berechnet, für kategorische Variablen mittels Chi-Square-Test oder nach Fisher, wenn die Zahl der Ereignisse innerhalb einer Gruppe < 5 war. ACE: *Angiotensin converting enzyme*; ALT: Alanin-Aminotransferase; ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker; ARNI: Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitoren; AST: Aspartat-Aminotransferase; BMI: *Body mass index*; COPD: Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung; CRP: C-reaktives Protein; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; DM: Diabetes Mellitus; DPP4: Dipeptidylpeptidase 4; GFR (CKD-EPI): Glomeruläre Filtrationsrate nach Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; γ -GT: Gamma-Glutamyl-Transferase; GLP1: *Glukagon-like peptide 1*; HDL: *High-density lipoprotein*; HOMA: *Homeostasis Model Assessment*; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; IMPDH: Inosinmonophosphat-Dehydrogenase; KHK: Koronare Herzerkrankung; LDH: Laktatdehydrogenase; LDL: *Low-density lipoprotein*; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; OGIS: Orale Glukose-Insulin-Sensitivität; PDE-5: Phosphodiesterase 5; PREDIM: *Predicted M-value*; SGLT2: *Sodium dependent glucose co-transporter 2*; TSH: Thyreoidea-stimulierendes Hormon; T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus; Z.n.: Zustand nach.

Die Untersuchung der allgemeinen systolischen kardialen Funktion in der kardialen MRT ergab zwischen Non-DM und T2DM keine Unterschiede (Abb. 14 A, B). Demgegenüber gab es bei der diastolischen Funktion eine signifikante Einschränkung in T2DM (Abb. 14 C). Auch erhöhte T2-Relaxationszeiten als Hinweis auf ein myokardiales Ödem und Inflammation waren in T2DM nachweisbar (Abb. 14D).

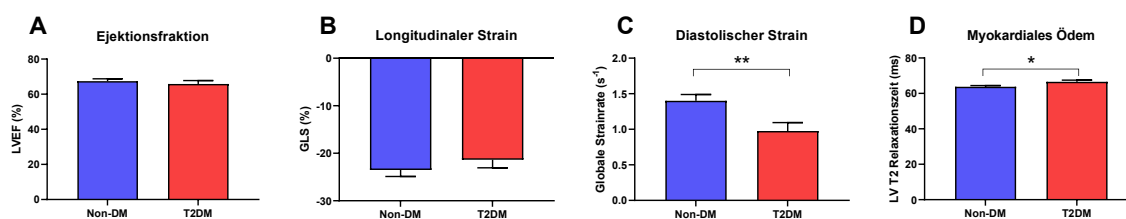


Abb. 14: Parameter kardialer systolischer (A, B) und diastolischer Funktion (C), sowie myokardialen Ödems (D). Mittelwerte mit Standardfehler. n=19-21 vs. 11-12. *p<0,05; **p<0,01. Ungepaarte

zweiseitige t-Tests. DM: Diabetes Mellitus; GLS: Globaler longitudinaler Strain; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus.

Diese T2DM-assoziierten funktionellen Veränderungen wurden auf mitochondrialer Ebene durch eine für alle Substratkombinationen auftretende Einschränkung der mitochondrialen oxidativen Kapazität und einen höheren Entkopplungsgrad begleitet (Abb. 15 A-E). Die *Respiratory Control Ratio* war in T2DM tendenziell reduziert ($2,18 \pm 0,14$ vs. $1,81 \pm 0,12$); $p=0,052$). Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich *P/E Ratio* ($p=0,54$). In T2DM war außerdem die myokardiale mRNA-Expression von NF- κ B1 erhöht (Abb. 15 F) und es lag ein erhöhter systemischer oxidativer Stress vor (Abb. 15 G, H). Die myokardiale Expression von MT-CO1 unterschied sich nicht zwischen den Gruppen ($p=0,86$ und $p=0,97$). In rückwärtsgerichteten linearen Regressionen für jeden der beschriebenen Parameter über beide Gruppen zeigte sich der *Body Mass Index* nicht als signifikanter Prädiktor, T2DM jedoch schon.

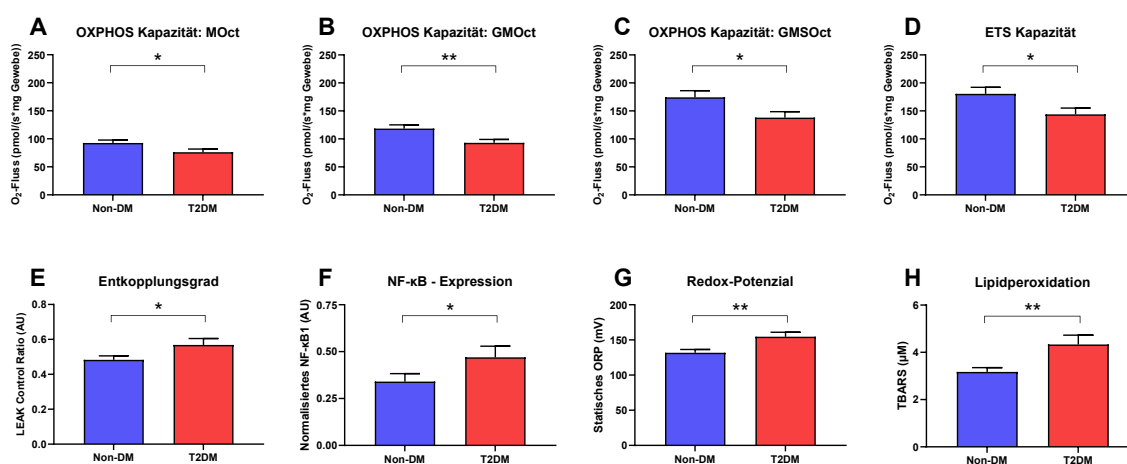


Abb. 15: Einschränkung der myokardialen mitochondrialen Funktion und Effizienz (A-E), sowie erhöhter myokardialer und (oxidativer) systemischer Stress in T2DM. Mittelwerte mit Standardfehler. $n=29-32$ vs. $16-19$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Ungepaarte zweiseitige t-Tests. AU: *Arbitrary Unit*; DM: Diabetes Mellitus; ETS: Elektronen-transferierendes System; G: Glutamat; M: Malat; NF- κ B: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*; Oct: Octanoyl-Carnitin; ORP: Oxidations-Reduktions-Potenzial; OXPHOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; S: Succinat; T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus; TBARS: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.

Über die Gruppenunterschiede hinaus lag über beide Gruppen eine Assoziation des nüchtern-Plasmaglukosespiegels mit der myokardialen mitochondrialen Respiration (Abb. 16 A-D), wie auch der kardialen diastolischen Funktion (Abb. 16 E) vor. Während das glykierte Hämoglobin keinen Zusammenhang mit mitochondrialen Parametern aufwies, waren höhere Spiegel mit einer Einschränkung der kardialen diastolischen Funktion verbunden (Abb. 16 F). Adjustierung für den *Body Mass Index* oder Betarezeptorenblocker-Therapie veränderten die Signifikanz der Korrelationen nicht. Nüchtern-Plasmaglukose korrelierte über beide Gruppen zudem mit der Expression von NF- κ B1 und den globalen linksventrikulären T2-Relaxationszeiten als Zeichen des myokardialen Stresses und Ödems (Abb. 17). Innerhalb der Non-DM-Gruppe blieb nur die

inverse Korrelation mit diastolischer Strainrate signifikant, innerhalb der T2DM nur die Korrelationen mit der OXPHOS Kapazität (Abb. 17).

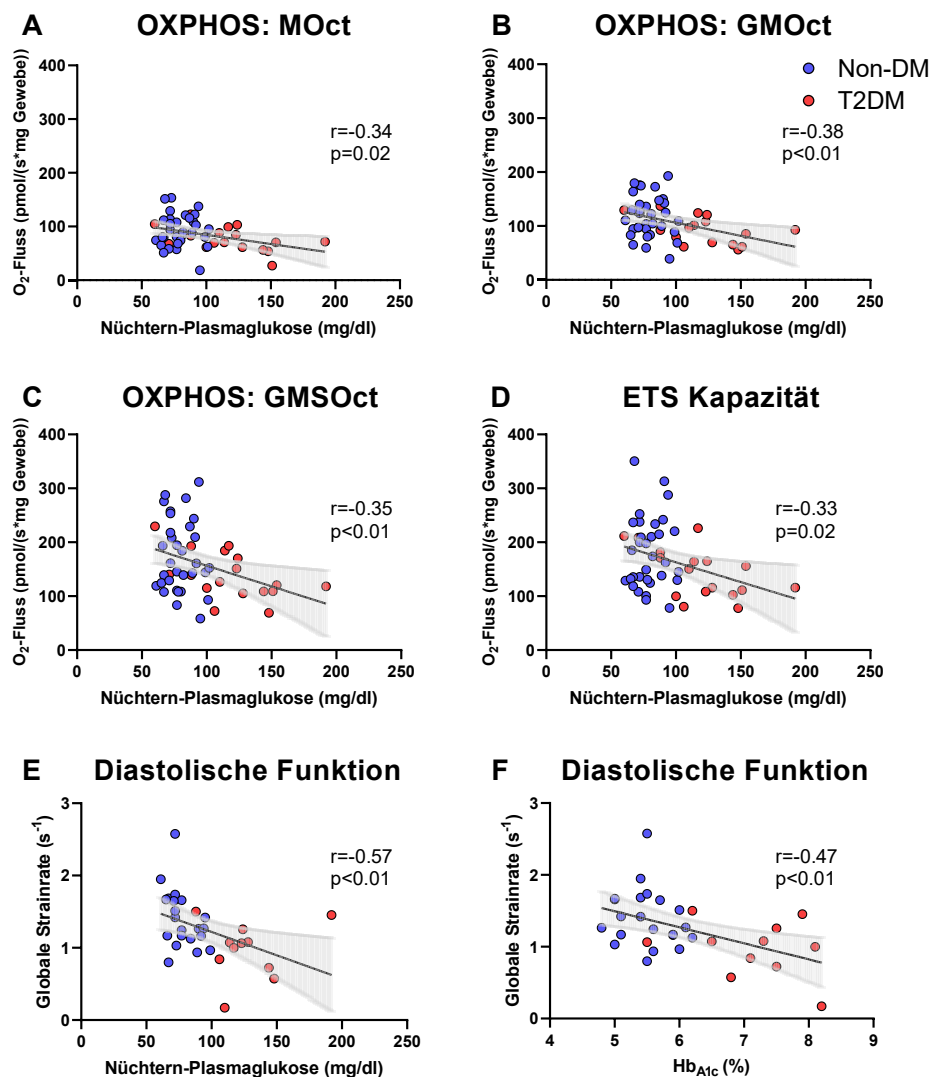


Abb. 16: Assoziation der Glykämie (nüchtern-Plasmaglukose und HbA_{1c}) mit Parametern myokardialer mitochondrialer Funktion (A-D) und kardialer diastolischer Funktion (E-F). DM: Diabetes Mellitus; ETS: Elektronen-transferierendes System; G: Glutamat; HbA_{1c} : Hämoglobin A_{1c} ; M: Malat; Oct: Octanoyl-Carnitin; OXPHOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; S: Succinat; T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus.

Die myokardiale OXPHOS und ETS Kapazität korrelierten nicht nur invers mit der Plasmaglukose, sondern auch positiv mit der systemischen Insulinsensitivität (Abb. 18). Die Assoziationen bestanden für die OGIS und den PREDIM, waren jedoch bei der OGIS ausgeprägter. Neben diesen Parametern der Insulinsensitivität wies der HOMA-Insulinresistenz-Index eine entsprechende inverse Korrelation mit der Mitochondrienfunktion auf. Außerdem korrelierte HOMA-IR invers mit der diastolischen Strainrate (Abb. 17). Die Signifikanz dieser Beobachtungen blieb auch nach Adjustierung für *Body Mass Index* und Betarezeptorenblocker-Therapie erhalten. In T2DM korrelierten OGIS und HOMA-IR weiterhin signifikant mit der

OXPHOS und ETS Kapazität (Abb. 17). Innerhalb Non-DM zeigte HOMA-IR eine positive Korrelation mit dem Entkopplungsgrad der myokardialen Mitochondrien (Abb. 17).

Niedrigere Insulinsensitivität ging darüber hinaus mit erhöhten globalen linksventrikulären T2-Relaxationszeiten einher (Abb. 19). Gleichzeitig bestand eine inverse Korrelation von T2-Relaxationszeiten mit der OXPHOS Kapazität für GMOct und GMSOct (Abb. 19), jedoch nicht signifikant mit der OXPHOS Kapazität für MOct und der ETS Kapazität ($p=0,08$, $p=0,08$). Außerdem korrelierte die myokardiale NF- κ B1-Expression mit der OXPHOS Kapazität mit der Komplex-I-fokussierten Substratkombination GMOct, jedoch nicht mit OXPHOS Kapazität oder ETS Kapazität mit anderen Substratkombinationen ($r=-0,33$; $p=0,03$). Ein höherer nüchtern-Insulinspiegel als weiteres Korrelat einer Insulinresistenz stand im Zusammenhang mit der eingeschränkten myokardialen systolischen Deformationsfähigkeit, die über globalen longitudinalen Strain quantifiziert wurde (Abb. 17).

Da Probanden aus T2DM einen höheren Anteil an Patienten mit Betarezeptorenblocker-Therapie und einen höheren *Body Mass Index* aufwiesen, wurden entsprechende Sensitivitätsanalysen durchgeführt, um einen möglichen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit durch diese Variablen zu untersuchen. Über beide Gruppen wurden hinweg Patienten mit und ohne Betarezeptorenblocker-Therapie hinsichtlich der primär untersuchten metabolischen Zielparameter verglichen (Abb. 20). Die *LEAK Control Ratio* als Zeichen der Entkopplung der Atmungskette war in T2DM erhöht. Bei OXPHOS Kapazität, ETS Kapazität, *Respiratory Control Ratio*, Expression von NF- κ B1, TBARS und Redoxpotenzial zeigten sich keine Unterschiede.

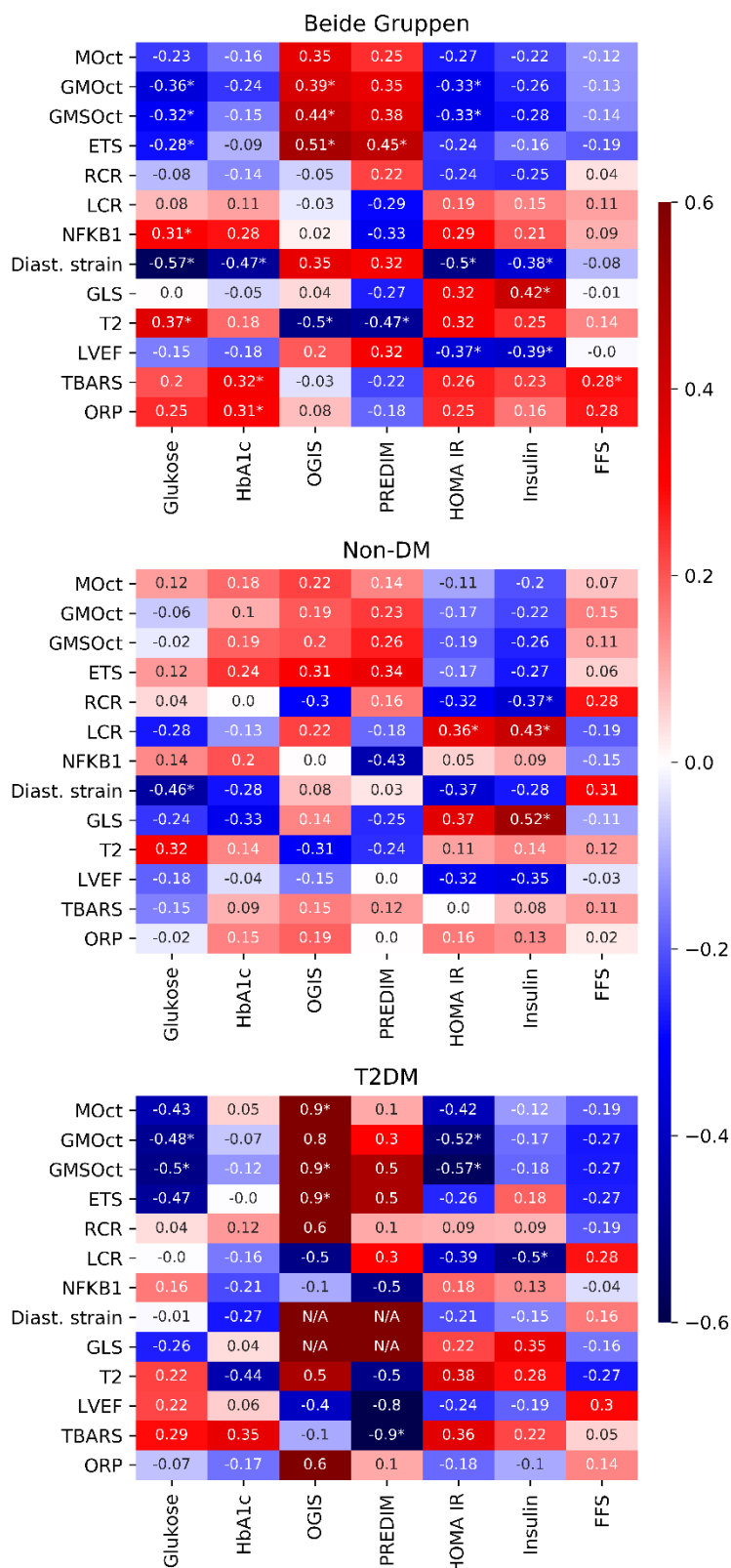


Abb. 17: Korrelationsmatrizen für Assoziationen von Determinanten diabetischer Stoffwechsellage und metabolischen und funktionellen kardialen Zielparametern, über beide und innerhalb der einzelnen untersuchten Gruppen. In den einzelnen Zellen sind die jeweiligen Spearman rho Koeffizienten der Korrelationen angegeben. Die Anzahl der Beobachtungen variiert zwischen und innerhalb der Subgruppen, insbesondere, weil in der T2DM-Gruppe nur 5 orale Glukosetoleranztests durchgeführt wurden: Beide Gruppen: n=18-49; Non-DM: n=16-32; T2DM: n=3-17. *p<0,05.

N/A: *not applicable* (Anzahl Messungen ist nicht ausreichend für Test). Diast.: Diastolisch; DM: Diabetes Mellitus; ETS: Elektronen-transferierendes System; FFS: Freie Fettsäuren; G: Glutamat; GLS: Globaler longitudinaler Strain; HbA_{1c}: Hämoglobin A_{1c}; HOMA-IR: *Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance*; LCR: *LEAK Control Ratio*; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; M: Malat; NFKB1: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells subunit 1*; Oct: Octanoyl-Carnitin; OGIS: Orale Glukose-Insulin-Sensitivität; ORP: Oxidations-Reduktions-Potenzial; OXPHOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; PREDIM: *Predicted M-value*; RCR: *Respiratory Control Ratio*; S: Succinat; T2: Globale linksventrikuläre T2-Relaxationszeiten; T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus; TBARS: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.

Auch die Herzfrequenz war bei Patienten mit und ohne Betablocker-Therapie nicht unterschiedlich ($87,1 \pm 2,5$ vs. $83,2 \pm 2,2$; $p=0,26$). Der *Body Mass Index* korrelierte univariat invers mit der OXPHOS Kapazität von GMOct und GMSOct ($r=-0,29$; $p=0,04$ und $r=0,31$; $p=0,03$). In bivariaten linearen Regressionsanalysen mit anderen identifizierten Prädiktoren für die OXPHOS Kapazität von GMOct und GMSOct wie nüchtern-Plasmaglukose oder OGIS war der *Body Mass Index* für die OXPHOS Kapazität jedoch kein signifikanter Prädiktor mehr (Für GMOct: Glukose: $p=0,03$; *Body Mass Index*: $p=0,25$. OGIS: $p=0,02$; *Body Mass Index*: $p=0,61$. Für GMSOct: Glukose: $p=0,04$; *Body Mass Index*: $p=0,24$. OGIS: $p=0,01$; *Body Mass Index*: $p=0,55$). Der *Body Mass Index* zeigte weiterhin keine Assoziation zu den Zielgrößen ETS Kapazität, *LEAK Control Ratio*, *Respiratory Control Ratio*, Expression von NF- κ B1, TBARS und Redoxpotenzial.

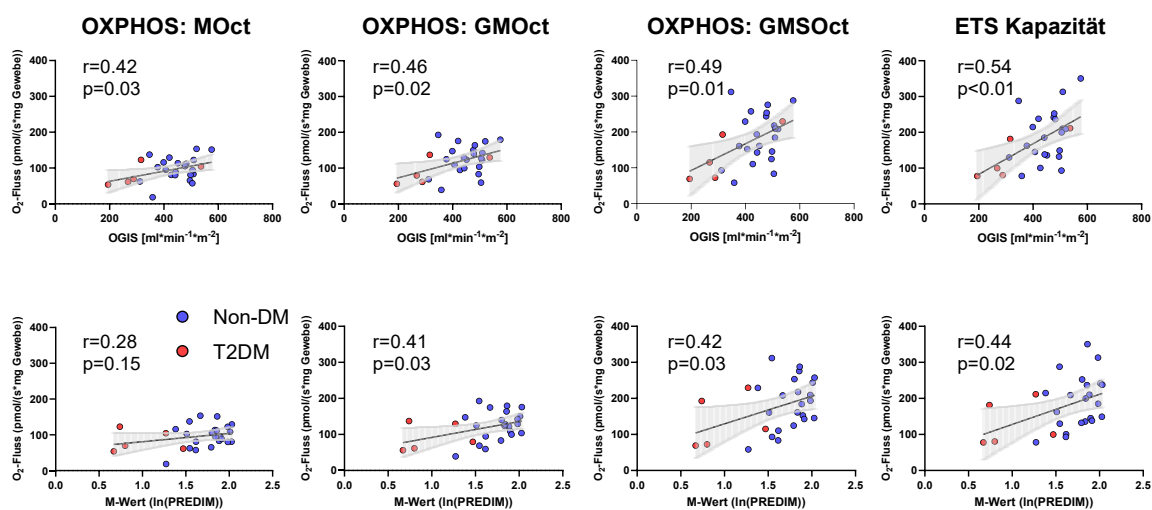


Abb. 18: Assoziation der systemischen Insulinsensitivität mit myokardialer mitochondrialer oxidativer Kapazität. Pearson-Korrelationen mit linearer Regressionsgerade. $n=22$ vs. 5 . DM: Diabetes Mellitus; ETS: Elektronen-transferierendes System; G: Glutamat; M: Malat; Oct: Octanoyl-Carnitin; OGIS: Orale Glukose-Insulin-Sensitivität; OXPHOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; PREDIM: *Predicted M-value*; S: Succinat; T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus.

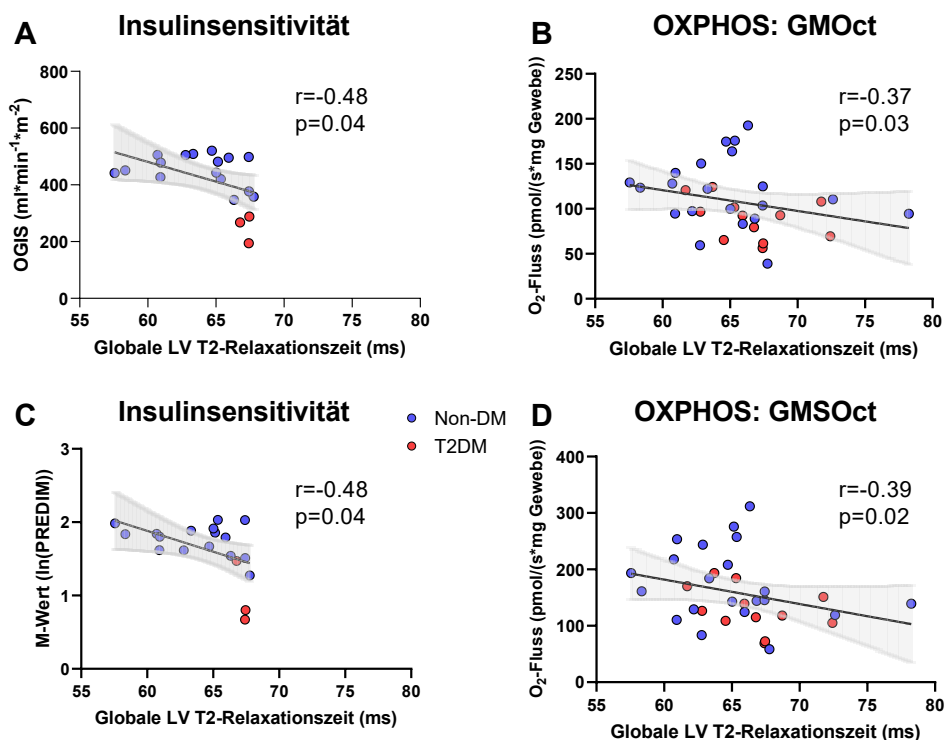


Abb. 19: Globale T2 Relaxationszeiten als Marker myokardialen Ödems zeigen inverse Assoziationen mit Insulinsensitivität (A, C) und myokardialer mitochondrialer Funktion (B, D). $n=16-21$ vs. $3-12$. Pearson Korrelations-Koeffizienten (A, C) oder Spearman rho (B, D). DM: Diabetes Mellitus; G: Glutamat; LV: Linksventrikulär; M: Malat; Oct: Octanoyl-Carnitin; OGIS: Orale Glukose-Insulin-Sensitivität; OXPPOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; PREDIM: *Predicted M-value*; T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus.

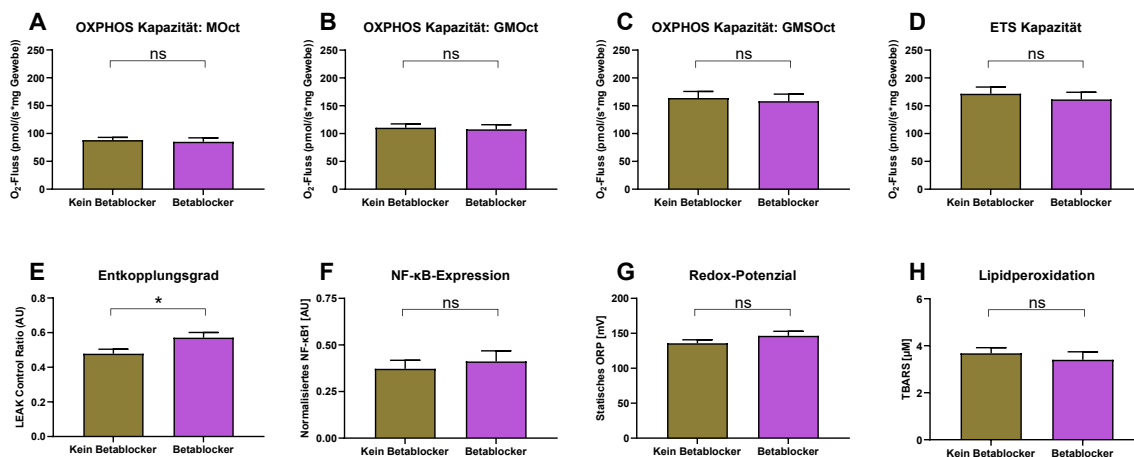


Abb. 20: Assoziation der primären metabolischen Zielp Parameter mit Betablocker-Therapie. $*p<0,05$. ns: nicht signifikant ($p>0,05$). Zweiseitige ungepaarte t-Tests. $n=29-31$ vs. $16-18$. AU: *Arbitrary Unit*; ETS: Elektronen-transferierendes System; G: Glutamat; M: Malat; NF- κ B: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*; Oct: Octanoyl-Carnitin; ORP: Oxidations-Reduktions-Potenzial; OXPPOS Kapazität: Oxidative Phosphorylierungs-Kapazität; S: Succinat; TBARS: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.

5 Diskussion

Entsprechend der Ausgangshypothesen können anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Daten folgende Aussagen getroffen werden:

1. Linksventrikuläres Myokard unterscheidet sich durch höhere OXPHOS Kapazität, ETS Kapazität, mitochondriale Kopplungseffizienz und CSA von Gewebe des linken und rechten Vorhofs, jedoch besteht hinsichtlich dieser Parameter kein Unterschied gegenüber dem rechten Ventrikel oder dem interventrikulären Septum.
2. In ventrikulärem Myokard ist die mitochondriale Respiration bei Herzinsuffizienz massiv reduziert. Es zeigt sich jedoch keine reduzierte Kopplungseffizienz der Atmungskette.
3. T2DM induziert auch unabhängig von vaskulären Vorerkrankungen in ventrikulärem Myokard eine Reduktion der mitochondrialen oxidativen Kapazität. Diese Veränderungen stehen in Zusammenhang mit Hyperglykämie und Insulinresistenz und werden von einer diastolischen Relaxationsstörung, myokardialer Inflammation und erhöhtem systemischen oxidativen Stress begleitet.

5.1 Metabolische Charakteristika verschiedener Myokardregionen

5.1.1 Eigenschaften atrialen und ventrikulären Myokards

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Myokard des linken Ventrikels gegenüber Myokard beider Vorhöfe eine reduzierte OXPHOS Kapazität, ETS Kapazität, mitochondriale Kopplungseffizienz und Citrat-Synthase-Aktivität aufweist. Metabolische Unterschiede zwischen ventrikulärem und atrialem Myokard wurden bereits in mehreren Studien nachgewiesen. Diese Differenzen wiesen jedoch je nach Studie unterschiedliche Charakteristika und Ausprägungen auf. Sowohl in murinen als auch humanen Herzen bestehen Unterschiede zwischen den Ventrikeln und dem Vorhofgewebe auf transkriptioneller Ebene [105, 133]. Entsprechend sind Enzymkonzentrationen und -aktivitäten Vorhof- und Ventrikel-spezifisch, was letztlich in physiologischen Unterschieden dieser Regionen (beispielsweise hinsichtlich des Aktionspotenzials) mündet [133, 134].

Speziell im Hinblick auf myokardiale Respiration existieren humane Daten, die unsere Ergebnisse unterstützen. Lemieux et al. zeigten in chronisch insuffizienten Herzen für verschiedene Substratkombinationen höheren Sauerstofffluss in rechtem und linkem Ventrikel gegenüber Vorhofgewebe [40]. Krajčová et al. konnten in von Organspendern gewonnenen Myokardhomogenaten eine erhöhte oxidative Kapazität im Ventrikel nachweisen [135].

Unklar bleibt, inwieweit die Unterschiede zwischen den Ventrikeln und Vorhöfen auf die Mitochondriendichte zurückzuführen sind. Die Citrat-Synthase-Aktivität ist ein etablierter Marker des Mitochondriengehalts im Skelettmuskel und wird auch in Myokard genutzt [101, 135–137]. In unseren Daten zeigte sich bei Normalisierung der oxidativen Kapazität auf Citrat-Synthase-Aktivität kein Unterschied der Myokardregionen. Ähnliche Ergebnisse berichteten Krajčová et al. bei der Untersuchung von Organspendern [135]. Unsere Ergebnisse sprechen aufgrund der *Flux Control Ratios* eher gegen eine ausschließlich auf erhöhter Mitochondriendichte basierende höhere Respiration der Ventrikel. Sie zeigten in unseren Daten eine höhere Kopplungseffizienz und einen niedrigeren Entkopplungsgrad der ventrikulären Mitochondrien. Krajčová et al. wiesen in Myokardhomogenaten aus Vorhöfen und Ventrikeln dagegen keine Unterschiede der *Flux Control Ratios* nach [135]. Diese Gruppe kombinierte für den Vergleich der Myokardregionen Myokard von insuffizienten explantierten Herzen mit Myokard von Organspendern. Möglicherweise liegen die Unterschiede der mitochondrialen Effizienz also auch erst bei Herzinsuffizienz auf. Lemieux et al. konnten in einem vergleichbaren experimentellen Aufbau keinen Unterschied hinsichtlich der *Flux Control Ratios* zwischen atrialem und ventrikulärem Gewebe feststellen, dies jedoch bei lediglich drei untersuchten Herzen, wodurch die Generalisierbarkeit dieser Ergebnisse unklar ist. Unsere respirometrische Analyse der myokardialen Regionen weist mit 11 Herzen eine deutlich größere Stichprobengröße auf.

5.1.2 Ventrikuläre regionale metabolische Unterschiede

Ob eine Differenz der mitochondrialen Respiration des rechten gegenüber jener des linken Ventrikels besteht, konnte durch bisherige Literatur nicht eindeutig beantwortet werden. Während die Ergebnisse unserer Kohorte keine Unterschiede der beiden Ventrikel aufzeigen, was sich mit einigen Studien deckt [138, 139], stellten Lemieux et al. einen eben solchen Unterschied fest [40]. Eine potenzielle Ursache könnte darin bestehen, dass die vorliegenden Studien die verschiedenen Myokardlokalisation nur anhand explantierter Herzen vergleichen konnten, die schwere Herzinsuffizienz unterschiedlichster Genese aufwiesen. So ist möglich, dass spezifische Pathologien dieser Herzen (zum Beispiel eine schwere pulmonale Hypertonie oder Vitien) einen eher univentrikulären Einfluss auf die oxidative Kapazität des Myokards ausüben. So konnten Nascimben et al. in gesunden Spenderherzen in beiden Vorhöfen und Kammern ähnliche Citrat-Synthase-Aktivität feststellen, in insuffizienten Herzen lag jedoch atrial eine niedrigere Citrat-Synthase-Aktivität vor als ventrikulär [140]. Alle genannten Studien stimmen jedoch insofern mit unseren Ergebnissen überein, dass rechts- und linksventrikuläres Gewebe eher miteinander vergleichbar sind als linksventrikuläres und atriales Gewebe.

Während die meisten Studien Myokard entweder aus der rechtsventrikulären und/oder der linksventrikulären lateralen Wand entnahmen, bezogen Sharov et al. auch das interventrikuläre

Septum in den Vergleich mit ein. Ihre Daten offenbarten keine Unterschiede bei Respiration oder *Respiratory Control Ratio* in permeabilisierten Fasern beider Ventrikel gegenüber dem interventrikulären Septum [138]. Unsere Ergebnisse unterstützen und ergänzen diese Daten, da wir erstmalig separat Myokard des rechtsseitigen und linksseitigen interventrikulären Septums respirometrisch untersuchten. Beide Seiten des Septums zeigten eine mit den linksventrikulären Daten vergleichbare OXPHOS Kapazität, ETS Kapazität, Kopplungseffizienz und Citrat-Synthase-Aktivität. Es bestand eine nahezu lineare Korrelation der mittleren Respiration zwischen linkem Ventrikel und rechtsseitigem interventrikulärem Septum.

5.1.3 Akquise von Humanmyokard für klinische Studien

Eine eklatante Erschwernis für die Analyse mitochondrialer Funktion des humanen Myokards über Respirometrie stellt die Gewebeakquisition dar [93]. Bisher griff die Forschung primär auf Gewebeproben aus explantierten insuffizienten Herzen [40, 138], post-mortem entnommene Gewebeproben [141] oder Gewebe zurück, welches während kardiochirurgischen Operationen entnommen wurde [40, 100–103, 137, 139]. Ein Nachteil dieser Probengewinnung ist die deutliche Einschränkung des Patientenkollektivs, welches meist aus multipel vorerkrankten Patienten besteht und so eine potenzielle Verzerrung der Ergebnisse durch Komorbiditäten möglich ist. Eine Alternative war die Probenentnahme an Herzen von Organspendern [40, 135, 142, 143], wobei hier wiederum der Nachteil darin besteht, dass Spender typischerweise nicht frühzeitig identifiziert und in Studien eingeschlossen werden können, sodass die Charakterisierung dieser Patienten erschwert ist.

In eigenen Vorarbeiten konnte die Katheter-gesteuerte EMB als Option zur Akquise humaner Myokardproben für die Respirometrie etabliert werden [106]. Entscheidende Vorteile hierbei sind, dass ventrikuläres Myokard untersucht und dadurch das potenziell untersuchbare Patientenkollektiv erheblich vergrößert werden kann. So können Populationen, die EMBs aus klinisch-diagnostischen Gründen erhalten, eine zusätzliche mitochondriale Diagnostik erhalten. Konkret umfassen diese Populationen beispielsweise Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie bei Ausschluss von koronarer Herzerkrankung, Klappenerkrankungen und hypertensiver Kardiomyopathie, Patienten mit Verdacht auf eine Myokarditis, Patienten mit Verdacht auf bestimmte Kardiomyopathien (zum Beispiel Anthrazyklin-Kardiomyopathie oder restriktive Kardiomyopathie) oder Patienten nach Herztransplantation, die EMBs zur Abklärung einer Transplantatabstoßung erhalten [144]. Die Entnahme aus dem interventrikulären Septum gegenüber einer Entnahme aus der lateralen Wand birgt hierbei ein geringeres Risiko der Entstehung einer Perikardtamponade, einer potenziell letalen Komplikation der EMB [144]. Unsere Daten weisen darauf hin, dass das Myokard des interventrikulären Septums hinsichtlich

der respirometrischen Funktion mit jener der linksventrikulären Wand vergleichbar ist (siehe 5.1.2).

5.1.4 Limitationen

Eine potenzielle Limitation dieser Daten besteht darin, dass ein möglicher Unterschied zwischen epikardialen und endokardialen Anteilen der lateralen Ventrikelwände nicht beleuchtet wurde. Durch Katheter-gesteuerte EMB ist nur eine endokardiale Probenentnahme möglich. Sharov et al. zeigten, dass das epikardiale Drittel der lateralen linksventrikulären Wand höhere OXPHOS Kapazität als das endokardiale Drittel aufwies [138]. Sie fanden jedoch keine Hinweise für Unterschiede zwischen Epi- und Endokard hinsichtlich der Kopplungseffizienz. Ob der genannte Unterschied physiologisch besteht oder eine Folge chronischer Herzinsuffizienz ist, kann nur durch weitere Studien geklärt werden.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit keine Mitochondrien isoliert, da im Prozess der Isolierung typischerweise ein eklatanter Anteil der Mitochondrien verloren geht [38, 145]. Möglicherweise findet im Isolationsvorgang auch eine künstliche Selektion von widerstandfähigeren Mitochondrien statt, was Ergebnisse potenziell beeinflussen kann [38]. Die Evaluation ausschließlich intrinsisch-mitochondrialer Funktion, die durch Isolierung ermöglicht wird, kann dafür in permeabilisierten Fasern nur mittels *Flux Control Ratios* abgeschätzt werden [36].

5.2 Reduzierter myokardialer Sauerstoffverbrauch bei Herzinsuffizienz

5.2.1 Charakteristika der Kohorten

In dieser Arbeit wurde die ventrikuläre mitochondriale Funktion von chronisch Herzinsuffizienten mit jener von kardial asymptomatischen Herztransplantierten, die als Kontrollgruppe dienten, verglichen. Die beiden Gruppen unterschieden sich insbesondere in Markern kardialer Funktion, jedoch auch in anderen typischerweise bei Herzinsuffizienz vorliegenden Begleitscheinungen wie koronarer Herzerkrankung, Vorhofflimmern und der Dauertherapie wie Diuretika, Phosphodiesterase-5-Hemmer oder Aldosteronantagonisten. Hinsichtlich der Laborparameter wies die Gruppe der chronisch Herzinsuffizienten gegenüber der Kontrollgruppe Zeichen der Leberschädigung (erhöhte Transaminasen) und eingeschränkter Lebersyntheseleistung (Albumin und Cholinesterase) auf. Dies könnten Hinweise auf das Vorliegen einer Rechtsherzinsuffizienz mit Stauungshepatitis sein [58]. Außerdem lagen bei Herzinsuffizienz eine Anämie und ein höherer Spiegel des C-reaktiven Proteins vor. Zusammengefasst entspricht diese Konstellation in der HI-Gruppe typischen bei Herzinsuffizienz vorliegenden Befunden [1, 6]. Der

Gruppenunterschied dieser Parameter spricht somit für die Eignung der post-HTX-Gruppe als Kontrolle.

Darüber hinaus wiesen Patienten in der Kontrollgruppe erhöhte Triglycerid-Konzentrationen, sowie eine Dyslipidämie auf. Dies könnte durch die immunsuppressive Therapie bedingt sein, die alle Herztransplantierten erhielten und die die dauerhafte Gabe von Prednisolon in Dosen bis 10mg pro Tag, beinhaltete. Eine Dyslipidämie ist eine typische Nebenwirkung einer Glukokortikoid-Dauertherapie [146, 147].

5.2.2 Mitochondriale Funktion bei Herzinsuffizienz

Die in ventrikulärem Gewebe gemessene OXPHOS und ETS Kapazität war bei Herzinsuffizienten gegenüber Herztransplantierten ohne zelluläre oder humorale Abstoßung substratabhängig um 15 bis 18% reduziert. Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen anderer Gruppen, die bei Menschen mit chronischer Herzinsuffizienz eine gestörte myokardiale Mitochondrienfunktion beschrieben [33, 40, 138, 141–143, 148]. Stride et al. beschrieben beispielsweise eine um 40% reduzierte mitochondriale Respiration in ventrikulärem Gewebe bei Herzinsuffizienz [148]. In der Arbeit von Stride et al. wurden Menschen, die eine LVAD-Operation oder eine Klappenoperation erhielten, untersucht. Die Kontrollgruppe wurde definiert als diejenigen Studienteilnehmer, die eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion über 45% aufwiesen. Da jedoch alle Kontrollprobanden operationsbedürftige Vitien aufwiesen, bleibt trotz erhaltener Ejektionsfraktion unklar, ob bei ihnen nicht auch eine Herzinsuffizienz vorlag [1].

Hier fällt eine generelle Schwierigkeit bei der Analyse des Zusammenhangs von Herzinsuffizienz und humaner Mitochondrienfunktion auf: Eine gesunde Kontrollgruppe zu finden, mit der herzinsuffiziente Probanden verglichen werden können. Dem wiederum liegt die für die Respirometrie zwingende Notwendigkeit zugrunde, Myokard aus dem vitalen Herzen zu extrahieren und möglichst unverzüglich der Messung zuzuführen [149], was allein für Studienzwecke für gesunde Probanden aus der Allgemeinbevölkerung ein unverhältnismäßig hohes und mit heutigen Methoden ethisch nicht vertretbares Risiko darstellen würde. Die Stärke dieser Arbeit liegt in der Gruppengröße sowohl der Herzinsuffizienz-, als auch der Kontrollgruppe und ihrer Zusammensetzung. Durch die Etablierung der Messung mitochondrialer Respiration an EMB in eigenen Vorarbeiten [106] wurden herztransplantierte Menschen als mögliches Kollektiv für respirometrische Messungen erschlossen (siehe 5.1.3). Wenngleich Herztransplantierte dauerhaft einige kardial wirksame Medikamente und eine kombinierte Immunsuppression erhalten, entsprechen Sie doch eher einer kardial gesunden Population als Patienten, welche einer kardiochirurgischen Operation bedürfen [150].

Über den Gruppenunterschied hinaus ergab sich in unserer Kohorte eine positive Korrelation des Herzindex mit der myokardialen oxidativen Kapazität. Diese war insbesondere präsent für Substrate des Elektronen-transferierenden Flavoprotein-Komplexes (Octanoyl-Carnitin) und des Komplex I (Glutamat), jedoch nicht für Succinat als Substrat des Komplex II. Dass GMSOct im Vergleich mit anderen Substraten auch beim direkten Gruppenvergleich eine geringeren Unterschied bei der OXPHOS Kapazität aufwies, lässt vermuten, dass die bei Herzinsuffizienz vorliegende Einschränkung der Mitochondrienfunktion primär Komplex I betrifft und durch Komplex II partiell kompensiert werden kann. Insbesondere die Einschränkung der Fettsäure-Oxidation entspricht der bei Herzinsuffizienz beschriebene Substrat-Verschiebung von Fettsäuren zu Glukose als bevorzugtes Substrat [31]. Allerdings erlaubt das kombinierte Protokoll, dass in dieser Arbeit angewandt wurde, keine abschließenden Komplex-spezifischen Aussagen.

Die über *Respiratory Control Ratio* und *LEAK Control Ratio* bestimmte Kopplungseffizienz der myokardialen Mitochondrien zeigte in unserer Kohorte keine Veränderung bei Herzinsuffizienz. Diese Daten widersprechen Ergebnissen von Sharov et al. und Lemieux et al. die über *Flux Control Ratios* eine Reduktion der myokardialen mitochondrialen Effizienz beschrieben [40, 138], entsprechen jedoch den Ergebnissen von Stride et al. [148]. Die hier gezeigten Daten und jene von Stride et al. beinhalten deutlich größere Kohorten, weshalb vorerst kein Hinweis auf einen intrinsischen Defekt der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung bei Herzinsuffizienz vorliegt, sondern eher auf einen quantitativen Mangel kardialer Mitochondrien.

5.2.3 Limitationen

Bei der Interpretation dieser respirometrischen Untersuchungsergebnisse stellt die Mitochondriendichte des Gewebes eine Schwierigkeit dar. Verschiedene Gruppen versuchten diese über die Citrat-Synthase-Aktivität zu ermitteln. Einige konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen herzinsuffizienten und gesunden Patienten ermitteln [140, 148], bei anderen war die Citrat-Synthase-Aktivität bei Herzinsuffizienz reduziert [141]. Die Citrat-Synthase-Aktivität ist allerdings als Marker der Mitochondriendichte im Herzen weniger gut etabliert als im Skelettmuskel [40, 136], sodass eine definitive Bestimmung der Mitochondriendichte über CSA nicht gewährleistet ist. Zudem ist die Messung der Citrat-Synthase-Aktivität an Myokardproben von nur 1mg Feuchtgewicht nicht etabliert. In eigenen Versuchen ist es uns nicht gelungen, bei Nutzung eines Standardkits (Citate Synthase Activity Assay Kit, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) reproduzierbare Citrat-Synthase-Aktivitäts-Werte aus Proben dieser Größe zu messen, sodass sie in dieser Arbeit nur in der Herzinsuffizienz-Gruppe hätten bestimmt werden können.

Eine von der Mitochondriendichte unabhängige Möglichkeit stellt die Bestimmung von *Flux Control Ratios* dar. Die *Flux Control Ratios* waren jedoch in beiden Gruppen nicht unterschiedlich, sodass hierdurch kein Indiz für eine qualitative Störung der

Mitochondrienfunktion erbracht wurde. Mit den hier vorgestellten Daten kann demnach nicht eindeutig bestimmt werden, ob und in welchem Ausmaß der reduzierte Sauerstoffverbrauch des Myokards bei Herzinsuffizienz durch eine Reduktion der myokardialen Mitochondriendichte bei Herzinsuffizienz erklärbar ist. Entsprechend sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Rolle der Mitochondriendichte hierbei zu klären.

5.3 Metabolische Charakteristika des humanen Myokards bei T2DM

5.3.1 Vergleichbarkeit der Probanden mit und ohne T2DM

In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse des myokardialen Stoffwechsels bei T2DM zeigten die Gruppen aus Patienten mit und ohne T2DM wenig Unterschiede hinsichtlich klinischer und demografischer Charakteristika. Der in der T2DM-Gruppe höhere *Body Mass Index* entsprach dem häufig bei T2DM vorliegenden Phänotyp, der letztendlich in der Pathophysiologie begründet ist [52, 151]. Ein weiterer Unterschied der Gruppen bestand darin, dass Patienten in T2DM häufiger eine Betarezeptorenblocker-Dauertherapie erhielten, weshalb mehrere Sensitivitätsanalysen in dieser Arbeit durchgeführt wurden, um die Wahrscheinlichkeit eines Einflusses dieses Gruppenunterschieds auf unsere Ergebnisse abzuschätzen (vergleiche 5.3.3). Die Patientengruppen waren hinsichtlich anderer demografischer, kardialer, klinischer Parameter und Medikation sonst gut vergleichbar. In Serum- und Plasmaanalysen zeigte sich in T2DM über die für T2DM typischen metabolischen Veränderungen (erhöhte Plasmaglukose, erhöhte freie Fettsäuren, niedrige Insulinsensitivität) ein erhöhter Harnstoff, eine höhere Kreatin-Kinase und niedrigere Thrombozytenzahl. Da die Veränderungen sich in einem physiologischen Rahmen bewegten, stuften wir die pathophysiologische Relevanz dieser Einzelbefunde als eher gering ein.

5.3.2 Funktionelle Veränderungen des diabetischen Myokards

Die beiden untersuchten Gruppen wiesen eine exzellente Vergleichbarkeit hinsichtlich klassischer kardialer Funktionsparameter auf – so waren mittlere linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Herzzeitvolumen und Herzindex in beiden Gruppen nahezu identisch. Darüber hinaus war der globale longitudinale Strain in beiden Gruppen nicht unterschiedlich, es zeigte sich jedoch eine Assoziation mit dem nüchtern-Insulinspiegel als Marker einer systemischen Insulinresistenz. Der globale longitudinale Strain ist ein immer etablierteres Werkzeug zur Quantifizierung primär der systolischen linksventrikulären Funktion und Deformierbarkeit über die Ejektionsfraktion hinaus [152]. Er ist über die Echokardiografie oder die kardiale MRT bestimmbar [117, 152]. Der Strain bietet zusätzlich wichtige prognostische Informationen hinsichtlich Mortalität und unerwünschten kardialen Ereignissen [153, 154]. Ob der globale longitudinale Strain bei Menschen mit und ohne Diabetes grundsätzlich unterschiedlich ist, kann aus der vorhandenen Studienlage nicht eindeutig

eruiert werden, da einige Studien einen solchen feststellten [155–159] und andere Studien nicht [160]. Ein möglicher Einflussfaktor ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung des T2DM, welchem typischerweise bereits eine mehrjährige Phase der Insulinresistenz und reduzierten Glukosetoleranz vorausgeht [60]. Diese Phase mag von Studie zu Studie variiert haben. Aus Tierstudien geht hervor, dass in der Frühphase einer diabetischen Kardiomyopathie bereits eine diastolische Funktionsstörung vor einer systolischen Funktionsstörung nachweisbar ist [161].

In unserer Kohorte war bei Menschen mit T2DM eine niedrigere diastolische Strainrate als früher Marker einer diastolischen Dysfunktion nachweisbar. Dies spricht dafür, dass die T2DM-Gruppe in dieser Arbeit den aus Tiermodellen und vorherigen Studien bekannten Phänotyp der diabetischen Kardiomyopathie repräsentiert – eine eher asymptomatische linksventrikuläre diastolische Funktionsstörung bei erhaltener linksventrikulärer systolischer Funktion. Eine bei T2DM reduzierte diastolische Strainrate konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden [156, 158, 162–165].

5.3.3 Reduktion myokardialer oxidativer Kapazität in T2DM

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmalig in ventrikulärem Myokard von Menschen mit T2DM, die zudem keine operationsbedürftigen kardialen Komorbiditäten aufwiesen, eine mitochondriale Respirationseinschränkung gegenüber Menschen ohne Diabetes gezeigt werden: Die OXPHOS Kapazität war in T2DM für alle Substratkombinationen um 22–27% reduziert, insbesondere zeigte sich ein signifikanter Gruppenunterschied bei Komplex-I-assoziiierter Respiration (GMOct).

Wenngleich einer kardialen Mitochondrien-Dysfunktion bei der Pathogenese T2DM-assoziiierter Herzinsuffizienz in den letzten Jahren eine immer zentralere Rolle zugesprochen wird [87, 166, 167], liegen nur wenige humane Studien vor, die die Mitochondrienfunktion des Myokards bei T2DM respirometrisch untersucht haben [100–104, 168]. Eine Gemeinsamkeit dieser Studien ist, dass sie Patienten untersuchten, die einer koronaren Bypass-Operation unterzogen wurden, in deren Verlauf Myokard für die respirometrische Untersuchung entnommen wurde. Wie bereits in 1.4.2 beschrieben, ist die koronare Herzerkrankung selbst mit einer deutlichen Einschränkung der myokardialen oxidativen Kapazität assoziiert [102, 107–109, 169]. Entsprechend ist die Trennschärfe der Folgen des T2DM, Hyperglykämie und Insulinresistenz gegenüber jenen der koronaren Herzerkrankung und vaskulären Schäden eingeschränkt. Zudem untersuchte bisher nur eine der genannten Studien ventrikuläres Myokard, während die anderen auf Vorhofmyokard zurückgriffen, dessen metabolische Eigenschaften nicht direkt auf das ventrikuläre Myokard übertragbar sind (siehe 1.4.2). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse dieser (siehe 5.2), wie auch anderer Studien [27, 142, 148, 170] eine Einschränkung der mitochondrialen Funktion bei Herzinsuffizienz. Die bisherigen Studien bemühten sich, um den Einfluss von T2DM auf den

myokardialen Metabolismus zu betrachten, keine Menschen mit Herzinsuffizienz einzuschließen, indem sie eine gewisse Grenze der Ejektionsfraktion festlegten (zum Beispiel 50% [101, 103]). Wie in Abschnitt 1.1.1 dargestellt, kann bei erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion dennoch eine Herzinsuffizienz vorliegen, die Ergebnisse also dennoch durch diese verzerrt sein. Entsprechend liegt das Novum unserer Arbeit in der Untersuchung von kardial nicht vorerkrankten Patienten, die die Auswirkungen der diabetischen Stoffwechsellaage auf das nicht-diabetische Herz nach der Transplantation widerspiegeln, sowie in der Nutzung von ventrikulärem Myokard für die Respirometrie, das direktere Rückschlüsse auf molekulare Mechanismen der diabetischen Kardiomyopathie ermöglicht als Vorhofmyokard.

Ungeachtet der Unterschiede im Studiendesign bestätigen unsere Daten die Ergebnisse der bisherigen Studien, welche eine reduzierte myokardiale oxidative Kapazität bei T2DM zeigten. In unserer Kohorte schien die mitochondriale Einschränkung insbesondere Komplex I-abhängige Respiration zu betreffen, aus bisherigen Studien gibt es jedoch kontroverse Ergebnisse bezüglich der Komplex-spezifischen Effekte von T2DM [100, 103, 104]. Möglicherweise ist dies durch die Interferenz von T2DM mit koronarer Herzerkrankung in diesen Studien bedingt, die keine Aussage über Komplex-Spezifität der T2DM-bedingten Schädigung ermöglicht. Allerdings erlaubt auch das in unserer Studie genutzte kombinierte Protokoll nur Vermutungen über die Komplex-Spezifität, sodass es zur Klärung dieser Fragestellung weiterer Studien bedarf.

Unsere Daten zeigen auch einen erhöhten Entkopplungsgrad der Atmungskette in T2DM, womit sie an Ergebnisse vorheriger Studien anknüpfen [101]. Die erhöhte Entkopplung der Atmungskette in T2DM lässt auf intrinsische mitochondriale Veränderungen schließen, die unabhängig von der Mitochondriendichte des Myokards sind. Die T2DM-assoziierten Veränderungen der *LEAK Control Ratio* waren in multivariaten Analysen nicht mehr signifikant und es bestand eine erhöhte *LEAK Control Ratio* bei Patienten mit Betarezeptorenblocker-Therapie. Die Größe der Studienpopulation schmälert die Aussagekraft der multivariaten Analyse, sodass weitere Studien in ähnlichen, aber größeren Kollektiven hier Aufschluss geben könnten. Der Einfluss der Betarezeptorenblocker-Therapie auf die mitochondriale Kopplung bleibt unklar. Betarezeptorenblocker haben auch in transplantierten Herzen einen Effekt auf die Herzfrequenz [171]. Potenziell kann eine Veränderung der Herzfrequenz einen Einfluss auf mitochondriale Aktivität haben [172]. Doch die Herzfrequenz war in beiden Gruppen vergleichbar, ebenso in Patienten mit und ohne Betarezeptorenblocker-Therapie und es bestand kein Zusammenhang der Herzfrequenz mit jeglichen Zielparametern unserer Analyse. Der geringe Effekt der Herzfrequenz auf die mitochondriale Funktion könnte durch die Denervierung transplantierten Herzen bedingt sein, die mit einer iatrogen verminderten Regulation der Herzfrequenz einhergeht [173, 174].

Während sich die Gruppen hinsichtlich des *Body Mass Index* unterschieden, zeigten die rückwärtsgerichteten linearen Regressionsanalysen, dass der *Body Mass Index* keinen oder wenigstens einen T2DM untergeordneten Einfluss auf die metabolischen Zielparameter dieser Arbeit hat. Dies entspricht der bisherigen Datenlage humaner Studien. Zwar beschrieben Niemann et al. mitochondriale Veränderungen bei Übergewicht, jedoch lagen diese in der veränderten Expression von mRNA; sie berücksichtigten außerdem nicht den Einfluss von Insulinresistenz und Diabetes, obwohl große Schwankungen im HbA_{1c} der Subgruppen vorlagen [175]. In permeabilisierten Fasern aus dem Vorhof konnte dieselbe Gruppe keinen Unterschied zwischen normalgewichtigen und übergewichtigen Patienten hinsichtlich der Respiration zeigen [176]. Montaigne et al. detektierten in einer relativ großen Population von 141 Menschen keinen Einfluss des *Body Mass Index* auf die mitochondriale Respiration, wohl jedoch einen Einfluss des T2DM [101]. Es ist also naheliegend, dass die mitochondrialen Veränderungen bei T2DM nicht primär auf Gruppenunterschiede im BMI zurückgeführt werden können, auch wenn ein Effekt auf kardialen Metabolismus durch Adipositas und damit korrelierender ungesunder Lebensweise nicht ausgeschlossen ist.

Unterschiede der oxidativen Kapazität können grundsätzlich auch durch die Mitochondriendichte des Myokards bedingt sein. Für eine davon unabhängige Veränderung sprechen jedoch die in T2DM und Non-DM vergleichbare Expression von MT-CO1 und die erhöhte *LEAK Control Ratio* in T2DM. Im Atrium konnten von anderen Gruppen keine Unterschiede bei der CSA zwischen Patienten mit und ohne T2DM gezeigt werden [100, 102, 103]. Verfahren zur Bestimmung der Mitochondriendichte, die wie CSA beim Skelettmuskel etabliert sind [136], sind jedoch im humanen Myokard noch von unklarer Signifikanz [148].

5.3.4 Hyperglykämie und Insulinresistenz

Da die Diagnose T2DM, wenngleich sie wissenschaftlich fundiert ist [44], letztlich eine arbiträre Grenze für kontinuierliche Variablen wie nüchtern-Plasmaglukose oder Insulinsensitivität erzeugt, wurde die Assoziation der myokardialen metabolischen und funktionellen Parameter mit Hyperglykämie und Insulinresistenz über beide Gruppen hinweg untersucht. In einer Sensitivitätsanalyse wurden die Unterschiede dann auch nochmal innerhalb der Gruppen analysiert.

Unsere Daten offenbarten eine inverse Assoziation von nüchtern-Plasmaglukose und myokardialer mitochondrialer OXPHOS und ETS Kapazität. Darüber hinaus korrelierte die nüchtern-Plasmaglukose mit der myokardialen Expression von NF- κ B1 und mit der diastolischen Strainrate. Dies weist auf eine direkt mit akuter Glykämie in Zusammenhang stehende Beeinträchtigung sowohl des myokardialen Metabolismus als auch der kardialen Kontraktilität hin. Frühere Studien konnten bereits Korrelationen der Glykämie und myokardialen oxidativen

Kapazität feststellen, untersuchten hierfür allerdings den HbA_{1c} [100, 101, 103]. Anders als in diesen Studien zeigte sich keine Assoziation von HbA_{1c} und myokardialer Mitochondrienfunktion in unseren Daten. Das glykierte Hämoglobin ist ein verbreiteter und klinisch äußerst wichtiger Parameter für das Diabetes-Management, das die über 8-12 Wochen bestehende Glykämie abbildet. Es kann jedoch durch verschiedene (patho-)physiologische Zustände beeinflusst werden [177]. Hierzu zählen Eisenmangel, Anämie, Hämoglobin-Varianten, Hämolyse, Splenomegalie, Bluttransfusionen oder Medikamente [177]. Außerdem werden Hypoglykämien und kurzweilige Hyperglykämien im HbA_{1c} möglicherweise nicht abgebildet [177]. Die Plasmaglukose ermöglicht hingegen eine präzise Momentaufnahme der Glykämie [177]. Unsere Daten weisen also darauf hin, dass die Veränderungen des myokardialen Metabolismus bei T2DM akuter auftreten könnten als in bisherigen Studien angenommen.

In der vorliegenden Arbeit konnte Insulinsensitivität in direkten Bezug zur myokardialen oxidativen Kapazität gesetzt werden. Für alle Substrate korrelierte die OXPHOS Kapazität mit der OGIS und zum Teil auch mit dem vom OGIS abgeleiteten PREDIM. Auch über HOMA berechnete höhere Insulinresistenz ging mit niedrigerer Respiration, wie auch innerhalb der Non-DM-Gruppe mit höherer Entkopplung der Atmungskette einher. Insulinsensitivität ist also direkt assoziiert mit der mitochondrialen Funktion des humanen Ventrikelmyokards. In früheren Studien war in Vorhofgewebe der Zusammenhang von Insulinresistenz und Mitochondrienfunktion uneindeutig, jedoch wurde hier zur Quantifizierung der Insulinsensitivität ausschließlich HOMA genutzt [101]. In eigenen Vorarbeiten des Deutschen Diabetes-Zentrums war HOMA-IR in einem Kollektiv von Probanden ohne T2DM mit reduzierter Kopplungseffizienz, jedoch nicht mit Veränderungen des Sauerstoffflusses assoziiert [178]. HOMA wird hinsichtlich seiner Gültigkeit bei stark eingeschränkter Betazellfunktion und bei Insulintherapie diskutiert [113, 179]. OGIS und PREDIM werden in der Literatur als präziser in der Erfassung von Insulinsensitivität beschrieben [110, 111], und zeigen eine gute Annäherung an den Goldstandard zur Insulinsensitivitätsmessung, dem *Clamp* [112]. Auch in den in dieser Arbeit beschriebenen Daten zeigte OGIS eine bessere Varianzaufklärung für die Respiration als HOMA-IR. Zur Abschätzung der Mitochondrienfunktion anhand der Insulinsensitivität sind also vom 3-Stunden-OGTT abgeleitete Methoden, speziell OGIS und PREDIM das Mittel der Wahl, da sie noch präzisere Ergebnisse liefern können als HOMA-IR, dessen Vorteil in der leichten Erhebung liegt.

Die reduzierte Fähigkeit zur Respiration von Fettsäuren bei gleichzeitig erhöhter Fettsäureaufnahme in die Kardiomyozyten, wie sie bei Insulinresistenz vorliegt [31], legt eine intrazelluläre Akkumulation der Fettsäuren und eine damit assoziierte Lipotoxizität als einen potenziellen Pathomechanismus nahe [63]. Lipotoxizität kann Entzündung induzieren und die mitochondriale Kapazität reduzieren, sodass hier ein sich selbst verstärkender Kreislauf entsteht [88]. Ein vergleichbarer Pathomechanismus liegt im Skelettmuskel vor: Auch im Skelettmuskel

sind die mitochondriale oxidative Kapazität und ATP-Produktion bei Insulinresistenz beeinträchtigt und es besteht eine intramyozelluläre Lipidakkumulation [52, 63, 180, 181]. Unklar bleibt jedoch, ob diese mitochondrialen Einschränkungen im Skelettmuskel nicht primär durch eine reduzierte Mitochondriendichte erklärbar sind und ob eine Wiederherstellung der Insulinsensitivität durch Training oder Diät eine Regeneration der myozellulären mitochondrialen Funktion bewirken kann [182]. Darüber hinaus ist trotz genannter Parallelen ungewiss, ob und in welchem Ausmaß die bisherigen Erkenntnisse aus der Skelettmuskulatur auf das Myokard übertragen werden können.

5.3.5 Myokardiale Inflammation und oxidativer Stress

Myokardiale Inflammation und oxidativer Stress wurden in dieser Arbeit sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* und sowohl lokal myokardial als auch systemisch untersucht. In der T2DM-Gruppe zeigte sich *in vivo* eine Erhöhung der globalen linksventrikulären T2-Relaxationszeiten. Dies entspricht Beobachtungen von Jiang et al. in einer Population von 190 Patienten ohne Herzinsuffizienz [183]. Auch nach einem Myokardinfarkt sind T2-Relaxationszeiten in T2DM erhöht [184]. Über den Gruppenunterschied hinaus waren die T2-Relaxationszeiten mit Insulinresistenz und invers mit der myokardialen oxidativen Kapazität des Myokards assoziiert. Mechanistisch spricht dies für eine bei T2DM vorliegende myokardiale Inflammation, möglicherweise aufgrund erhöhter Lipidakkumulation, die zu einer Einschränkung der mitochondrialen Funktion führt [63, 116]. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass die T2-Relaxationszeiten ein nicht-invasiv bestimmbarer Prädiktor für die myokardiale Mitochondrienfunktion und damit für das Vorliegen einer diabetischen Kardiomyopathie dienen könnten. Die eingeschlossene Patientenzahl in dieser Arbeit reicht jedoch nicht aus, um mögliche *Confounder* wie Alter und Geschlecht auszuschließen, deren Einfluss auf T2-Relaxationszeiten bereits nachgewiesen wurde [118]. Würden unsere Ergebnisse in weiteren Studien bestätigt, wäre dies ein Schritt zu einer verbesserten Diagnostik der diabetischen Kardiomyopathie.

Darüber hinaus wies das Myokard der T2DM-Gruppe eine 38% höhere NF- κ B1-Expression auf. NF- κ B ist ein zentraler Knotenpunkt für diverse zelluläre Signalwege, inklusive der Anpassung an oxidativen und endoplasmatischen Retikulum-Stress, Zelldifferenzierung, DNS-Schädigung und Inflammation (siehe Abschnitt 1.1.3). Die Relevanz des NF- κ B-Signalwegs für die diabetische Kardiomyopathie wurde dagegen bisher primär in präklinischen Modellen beleuchtet [89, 95, 185]. Hieraus geht hervor, dass eine dauerhafte Aktivierung von NF- κ B, wie sie bei Diabetes Mellitus in Tierstudien gezeigt wurde, eine substanzielle Rolle in der Entstehung einer Herzinsuffizienz einnimmt [95, 186]. In T2DM könnte NF- κ B zum Beispiel durch oxidativen Stress, *Advanced Glycation Endproducts* über Methylglyoxal, über Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und durch beschädigte Mitochondrien und Fehler in der

Autophagie aktiviert werden [25, 52, 89, 161, 187]. Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs zeigt in Tiermodellen vielversprechende Ergebnisse bei der Prävention der Entstehung einer diabetischen Kardiomyopathie, beispielsweise über Aktivierung von *Glukagon-like peptide-1* (GLP-1) [24, 186]. Agonisten des GLP-1 konnten in klinischen Studien jedoch keine signifikante Verbesserung Herzinsuffizienz-bezogener Endpunkte bewirken [188–191].

Unseres Wissens erbringt diese Arbeit den ersten Nachweis einer diabetes-induzierten Erhöhung der Expression von NF- κ B1 in humanen Ventrikelmyokard. Darüber hinaus zeigte sich auch eine Korrelation der NF- κ B1-Expression mit der nüchtern-Plasmaglukose, sowie auch mit der Komplex-I-assoziierten OXPHOS Kapazität (GMOct). Im Zusammenspiel dieser Ergebnisse mit Daten aus Tiermodellen der diabetischen Kardiomyopathie und Humanstudien anderer Kardiomyopathien, ist eine mögliche Erklärung, dass es bei T2DM zu einer Daueraktivierung von NF- κ B1 im Myokard kommt [89, 186, 192]. Als ein Trigger der NF- κ B-Aktivierung könnten somit Defekte myokardiale Mitochondrien, die letztlich auf dem gestörten Insulinsignal fußen, auch ein initialer Trigger des pathologischen *Remodeling* bei T2DM sein. Die zentrale Rolle von NF- κ B, Inflammation und oxidativem Stress bei T2DM-induzierter Organschädigung ist auch im Skelettmuskel beschrieben worden [52, 91]. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich diese Prozesse zum Teil auf das Myokard übertragen lassen.

Mitochondriale Defekte können sowohl eine Folge als auch eine Ursache von erhöhtem oxidativen Stress bei T2DM und Insulinresistenz sein [80, 93, 193]. In dieser Arbeit konnten bei T2DM erhöhte zirkulierende Marker von oxidativem Stress nachgewiesen werden. Konkret zeigten sich Hinweise auf eine erhöhte systemische Lipidperoxidation und ein erhöhtes Oxidation-Reduktions-Potenzial bei T2DM. Ein kardialer Ursprung dieser ROS ist denkbar: Anderson et al. wiesen erhöhte mitochondriale Wasserstoffperoxid-Emission aus permeabilisierten Fasern nach [100]. Kanazawa et al. zeigten in isolierten Mitochondrien von Rattenherzen erhöhten oxidativer Stress bei Diabetes und eine korrespondierende Einschränkung der mitochondrialen Transkription [194]. Erhöhte ROS können zudem zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials führen, wodurch die Effizienz reduziert wird und schließlich über Aktivierung von Caspase 9 und Caspase 3 Apoptose induziert werden kann [195]. Die Apoptose des Myokards kann sich ebenfalls in der reduzierten oxidativen Kapazität widerspiegeln [196]. Die Reduktion des systemischen oxidativen Stresses in kardialen Mitochondrien könnte sich in Zukunft als Therapiestrategie in verschiedenen Kardiomyopathien erweisen, wozu es bereits einige Ansätze gibt [170, 197–199]. Allerdings zeigte sich in unseren Daten kein signifikanter Zusammenhang zwischen Markern des systemischen oxidativen Stresses und kardialer Mitochondrienfunktion oder NF- κ B-Expression. Dies könnte als Hinweis angesehen werden, dass zur Behandlung einer diabetischen Kardiomyopathie eine lokal fokussierte Therapie, die auf Mitochondrienfunktion und NF- κ B1-Aktivierung abzielt, vielversprechender ist als eine systemischen Therapie des oxidativen

Stresses. Interessanterweise waren TBARS und statisches Redoxpotenzial auch nicht mit der nüchtern-Plasmaglukose, sondern mit HbA_{1c} und freien Fettsäuren assoziiert. Möglicherweise spiegeln diese ROS Marker also eher die chronische diabetes-assoziierte Inflammation wieder, als den Effekt der akut auftretenden Hyperglykämie, der mit einer Reduktion der mitochondrialen oxidativen Kapazität und erhöhter myokardialer NF- κ B-Expression assoziiert ist (vergleiche Abschnitt 5.3.4).

5.3.6 Die Herztransplantation als mechanistisches Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig das Modell der Herztransplantation genutzt, um direkte Einflüsse des T2DM auf den mitochondrialen Metabolismus des humanen Myokards zu entschlüsseln. Die genauen Veränderungen eines vormals gesunden Herzen bei der Exposition gegenüber einer metabolisch veränderten, diabetischen Stoffwechsellage zu beobachten, bietet für Humanstudien eine einzigartige Möglichkeit, ein quasi-experimentelles Studiendesign zu schaffen. Dies gilt insbesondere für Analysen des mitochondrialen Metabolismus aufgrund der begrenzten Halbwertszeit der Mitochondrien [200]. Eine kürzlich erschienene Studie machte sich diese Strategie ebenfalls zunutze, in dem sie in einem entsprechenden Kollektiv die myokardiale Lipidakkumulation in Transplantierten mit und ohne T2DM verglich [150]. In dieser Studie von Marfella et al. wird auf das enorme Potenzial des Modells Herztransplantation für die Diabetes-Forschung hingewiesen, es wurden jedoch keine Daten der myokardialen Mitochondrienfunktion oder anderer in dieser Dissertation erfasster metabolischer Zielparameter erhoben.

Neben diesen Chancen weist eine Kohorte aus Herztransplantierten auch einige Besonderheiten auf, die in diesem Zusammenhang bedacht werden müssen. Allen voran steht hier die immunsuppressive Therapie mit typischerweise einem Glukokortikoid (zum Beispiel Prednisolon), einem Hemmer der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (zum Beispiel Mycophenolat-Mofetil) und einem Calcineurin-Inhibitor (zum Beispiel Cyclosporin A, Tacrolimus oder Everolimus). Die Einführung dieser Substanzen in die Therapie nach Organtransplantationen hat das Überleben massiv verbessert und sie sind heute essenziell in der Transplantatnachsorge, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern. Es bleibt unklar, ob die Einnahme dieser Substanzen einen Effekt auf dem myokardialen Metabolismus, speziell auf myokardiale Mitochondrienfunktion haben. Die in dieser Arbeit untersuchten Gruppen aus Probanden mit und ohne T2DM wiesen jedoch ein vergleichbares immunsuppressives Therapieregime auf. Es ergibt sich aus den Gruppencharakteristika also kein Anhalt für eine Verzerrung der Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von T2DM durch Immunsuppressiva. Um den kurzfristigen Einfluss von Glukokortikoiden auf die Ergebnisse dieser Arbeit zu minimieren, nahmen die Patienten am Tag der Untersuchungen (OGTT und EMB) die Prednisolon-Medikation

erst nach den Studienuntersuchungen ein und Studienzeitpunkte unmittelbar nach einer Glukokortikoid-Stoßtherapie wurden nicht in die Analysen einbezogen.

Eine weitere Besonderheit bei Herztransplantierten ist die hohe Prävalenz von T2DM. Ein Jahr nach Transplantation liegt die Prävalenz von Diabetes bei über 20%, nach 5 Jahren bereits über 35% [201]. Diese erklärt sich primär aus zwei Ursachen: Erstens aus der erhöhten kardiovaskulären Komplikationsrate und hohen Prävalenz von Herzinsuffizienz von über 40% bei Menschen mit Diabetes, die sie häufiger zu Transplantatempfängern macht [83]; und zweitens aus der immunsuppressiven Therapie, die eine Insulinresistenz fördert [58] – entsprechend auch die hohe Inzidenz in den Jahren nach Transplantation [201]. Wie auch in der Allgemeinbevölkerung ist Diabetes bei Herztransplantierten mit schlechterem Überleben assoziiert – allerdings gilt dies in erster Linie für Diabetes Mellitus mit Komplikationen, während das Überleben Herztransplantierte mit unkompliziertem Diabetes Mellitus nicht eingeschränkt zu sein scheint [202, 203]. Ein erhöhter *Body Mass Index* geht ebenfalls mit einem höheren Mortalitätsrisiko nach Herztransplantation einher, jedoch erst bei (insbesondere höhergradiger) Adipositas, zum Beispiel über 33kg/m² [204, 205].

Abschließend ist zu sagen, dass Herztransplantierte, wenngleich sie nach Transplantation kardial asymptomatisch sein können, typischerweise multiple Komorbiditäten aufweisen, die zum Teil noch aus der Zeit vor der Transplantation stammen und mit entsprechender umfassender Dauermedikation behandelt werden. In unserem Kollektiv waren Statine, Acetylsalicylsäure, Protonenpumpeninhibitoren und Calciumkanalblocker häufig als Dauermedikation vertreten. Diese Substanzen könnten potenziell intrinsische Effekt auf den kardialen mitochondrialen Metabolismus aufweisen – jedoch wurden sie in beiden untersuchten Gruppen in ähnlichem Maße genutzt, sodass eine hieraus entstehende Veränderung der Ergebnisse eher unwahrscheinlich ist.

5.3.7 Limitationen

Eine Limitation der Studie stellte die Probengröße der EMB (etwa 1-2mg) dar. Diese limitierte die Art und Anzahl der Messungen, die im Rahmen der Studie durchgeführt werden konnten, da bereits etwa 2 mg für die hochauflösende Respirometrie in Duplikaten benötigt werden. Die Erhebung interessanter weiterer Messwerte wie Citrat-Synthase-Aktivität, myokardiale Insulinsensitivität, weiterer Elemente des NF- κ B-Signalwegs und *Metabolomics* waren hierdurch nicht möglich.

Eine Stärke der Studie war, dass bei den Herztransplantierten letztlich der Metabolismus des Spenderherzen analysiert, die dem Milieu des Empfängers ausgesetzt waren, sodass die spezifischen Einflüsse des Empfängermetabolismus im gesunden Herzen widergespiegelt werden. Allerdings muss hierfür dafür ausgegangen werden, dass sich die Spenderherzen zum Zeitpunkt

der Transplantation nicht unterschieden. Hierzu verglichen wir demografische Parameter der Spender innerhalb beider Gruppen. Für eine optimale Phänotypisierung wären darüber hinaus respirometrische Daten aus Endomyokardproben der Spenderherzen zum Zeitpunkt der Transplantation von Interesse gewesen, um zu gewährleisten, dass sie sich zum Zeitpunkt der Transplantation zwischen den Gruppen nicht unterschieden, sondern erst im Verlauf divergierten. In einer Versuchsanordnung wie von Stoica et al. beschrieben könnte dies ein Ziel zukünftiger Studien sein [206].

Abschließend ist als Limitation zu nennen, dass die Anzahl an in der Studie eingeschlossener Probanden und deren Messzeitpunkte im Untersuchungszeitraum nicht ausreichten, um aussagekräftige longitudinale Analysen des Einflusses von T2DM auf myokardiale Mitochondrienfunktion durchzuführen. Die Anzahl der eingeschlossenen Patienten in dieser Arbeit erlaubte zudem keine umfassenden multivariate Analysen, um die Relevanz einzelner Prädiktoren der kardialen Mitochondrienfunktion abschließend einzuordnen. Weitere Studien mit größeren Probandenkollektiven könnten hier von Interesse sein. Da nach dem Ende des in dieser Arbeit spezifizierten Untersuchungszeitraums noch weitere Probanden in die Studie eingeschlossen wurden, ist zu hoffen, in naher Zukunft entsprechende Analysen vorweisen zu können.

6 Schlussfolgerungen

Es können mehrere zentrale Schlussfolgerungen entsprechend den dieser Arbeit zugrundeliegenden Subhypothesen gezogen werden. (i) Vorhofmyokard unterscheidet sich von ventrikulärem Myokard hinsichtlich diverser metabolischer Charakteristika, während Myokard unterschiedlicher ventrikulärer Lokalisationen vergleichbarer ist. (ii) Eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz ist mit einer Einschränkung der mitochondrialen oxidativen Kapazität bei erhaltener Kopplungseffizienz verbunden. (iii) T2DM, Insulinresistenz und Hyperglykämie induzieren eine Reduktion der oxidativen Kapazität des ventrikulären Myokards bereits vor der Entstehung symptomatischer Herzinsuffizienz. Die T2DM-induzierten metabolischen Veränderungen des Myokards werden von einer diastolischen Funktionsstörung, erhöhter myokardialer Inflammation und systemischem oxidativen Stress begleitet und involvieren die Aktivierung des Herzinsuffizienz-induzierenden NF- κ B-Signalwegs.

Aus diesen Daten lässt sich die Rationale ableiten, für zukünftige Analysen des metabolischen Einflusses von T2DM auf das Myokard auf ventrikuläre Proben von Menschen ohne Herzinsuffizienz zurückzugreifen. In einem entsprechenden Kollektiv wurden in dieser Arbeit spezifische myokardiale Adaptationen an das Milieu des T2DM nachgewiesen, die neue Hinweise auf den pathomechanistischen Charakter Diabetes-assoziiierter Herzinsuffizienz liefern. Diese Ergebnisse könnten einen Schritt zu einer präziseren Diagnostik, wie auch zu neuen therapeutischen Angriffspunkten für die diabetische Kardiomyopathie erbringen.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 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: 2129–2200. doi:10.1093/eurheartj/ehw128
- [2] Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003; 348: 2007–2018. doi:10.1056/NEJMra021498
- [3] New York Heart Association. Criteria Committee. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. Boston: Little, Brown and Company; 1994
- [4] Roger VL. Epidemiology of heart failure. *Circ Res* 2013; 113: 646–659. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300268
- [5] Raphael C, Briscoe C, Davies J, et al. Limitations of the New York Heart Association functional classification system and self-reported walking distances in chronic heart failure. *Heart* 2007; 93: 476–482. doi:10.1136/hrt.2006.089656
- [6] Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62: e147-239. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.019
- [7] Störk S, Handrock R, Jacob J, et al. Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study: A retrospective database study. *Clin Res Cardiol* 2017; 106: 913–922. doi:10.1007/s00392-017-1137-7
- [8] Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 30–41. doi:10.1038/nrcardio.2010.165
- [9] Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 2004; 292: 344–350. doi:10.1001/jama.292.3.344
- [10] Djoussé L, Driver JA, Gaziano JM. Relation between modifiable lifestyle factors and lifetime risk of heart failure. *JAMA* 2009; 302: 394–400. doi:10.1001/jama.2009.1062
- [11] Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MCJM, et al. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2004; 25: 1614–1619. doi:10.1016/j.ehj.2004.06.038

- [12] Lippi G, Sanchis-Gomar F. Global epidemiology and future trends of heart failure. *AME Med J* 2020; 5: 15. doi:10.21037/amj.2020.03.03
- [13] Ohlmeier C, Mikolajczyk R, Frick J, et al. Incidence, prevalence and 1-year all-cause mortality of heart failure in Germany: a study based on electronic healthcare data of more than six million persons. *Clin Res Cardiol* 2015; 104: 688–696. doi:10.1007/s00392-015-0841-4
- [14] Owan TE, Redfield MM. Epidemiology of diastolic heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 2005; 47: 320–332. doi:10.1016/j.pcad.2005.02.010
- [15] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010; 121: 948–954. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192666
- [16] Agency for Healthcare Research and Quality. HCUP Fast Stats. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP).
- [17] Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *The Lancet* 2011; 378: 704–712. doi:10.1016/S0140-6736(11)60894-5
- [18] Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B. *Circ Res* 2011; 108: 1122–1132. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226928
- [19] Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, et al. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 473–483. doi:10.1093/cvr/cvp305
- [20] Chen L-F, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 392–401. doi:10.1038/nrm1368
- [21] González A, Ravassa S, Beaumont J, et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 1833–1843. doi:10.1016/j.jacc.2011.06.058
- [22] Brasier AR. The NF- κ B Regulatory Network. *Cardiovasc Toxicol* 2006; 6: 111–130. doi:10.1385/CT:6:2:111
- [23] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 49–62. doi:10.1038/nrm2083
- [24] Fuentes-Antrás J, Ioan AM, Tuñón J, et al. Activation of toll-like receptors and inflammasome complexes in the diabetic cardiomyopathy-associated inflammation. *Int J Endocrinol* 2014; 2014: 847827. doi:10.1155/2014/847827

- [25] Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* 2012; 485: 251–255. doi:10.1038/nature10992
- [26] Nakayama H, Otsu K. Translation of hemodynamic stress to sterile inflammation in the heart. *Trends Endocrinol Metab* 2013; 24: 546–553. doi:10.1016/j.tem.2013.06.004
- [27] Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007; 356: 1140–1151. doi:10.1056/NEJMra063052
- [28] HERRMANN G, DECHERD GM JR. THE CHEMICAL NATURE OF HEART FAILURE. *Ann Intern Med* 1939; 12: 1233. doi:10.7326/0003-4819-12-8-1233
- [29] Ashrafian H, Neubauer S. Metabolomic profiling of cardiac substrate utilization: fanning the flames of systems biology? *Circulation* 2009; 119: 1700–1702. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.849919
- [30] Taegtmeier H. Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation* 2004; 110: 894–896. doi:10.1161/01.CIR.0000139340.88769.D5
- [31] Glatz JFC, Bonen A, Ouwens DM, et al. Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 471–476. doi:10.1007/s10557-006-0582-8
- [32] Goodwin GW, Taylor CS, Taegtmeier H. Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work. *J Biol Chem* 1998; 273: 29530–29539. doi:10.1074/jbc.273.45.29530
- [33] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85: 1093–1129. doi:10.1152/physrev.00006.2004
- [34] Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation* 2007; 116: 434–448. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.702795
- [35] Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res* 2018; 122: 624–638. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311586
- [36] Gnaiger E, Aasander Frostner E, Abdul Karim N, Abdel-Rahman EA, Abumrad NA, Acuna-Castroviejo D, Adiele RC, Ahn B, Alencar MB, Ali SS, Alton L, Alves MG, Amati F, Amoedo ND, Amorim R, Anderson EJ, Andreadou I, Antunes D, Arago M, Aral C, Arandarcikaite O, Arias-Reyes C, Armand A-S, Arnould T, Avram VF, Axelrod CL, Bairam A, Bailey DM, Bajpeyi S, Bajzikova M, Bakker BM, Barlow J, Bardal T, Banni A, Bastos Sant'Anna Silva, Ana Carolina, Batterson P, Battino M, Bazil J, Beard DA, Beleza J,

Bednarczyk P, Bello F, Ben-Shachar D, Bergdahl A, Berge RK, Bergmeister L, Bernardi P, Berridge MV, Bettinazzi S, Bishop D, Blier PU, Blindheim DF, Boardman NT, Boetker HE, Borchard S, Boros M, Borsheim E, Borrás C, Borutaite V, Botella J, Bouillaud F, Bouitbir J, Boushel RC, Bovard J, Bravo-Sagua R, Breton S, Brown DA, Brown GC, Brown RA, Brozinick JT, Buettner GR, Burtscher J, Bustos M, Calabria E, Calbet JA, Calzia E, Cannon DT, Cano Sanchez M, Canto Alvarez C, Cardinale D, Cardoso LHD, Carvalho E, Casado Pinna M, Cassar S, Castelo MP, Castilho RF, Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Cecatto C, Celen MC, Cervinkova Z, Chabi B, Chakrabarti L, Chakrabarti S, Chaurasia B, Chen Q, Chicco AJ, Chinopoulos C, Chowdhury SK, Cizmarova B, Clementi E, Coen PM, Cohen BH, Coker RH, Collin-Chenot A, Coughlan MT, Coxito P, Crisostomo L, Crispim M, Crossland H, Dahdah N, Dalgaard LT, Dambrova M, Danhelovska T, Darveau CA, Darwin PM, Das AM, Dash RK, Davidova E, Davis MS, Dayanidhi S, Bem AF de, Goede P de, Palma C de, Pinto V de, Dela F, Dembinska-Kiec A, Detraux D, Devaux Y, Di Marcello M, Di Paola FJ, Dias C, Dias TR, Distefano G, Djafarzadeh S, Doermann N, Doerrier C, Dong L-F, Donnelly C, Drahota Z, Duarte FV, Dubouchaud H, Duchon MR, Dumas J-F, Durham WJ, Dymkowska D, Dyrstad SE, Dyson A, Dzialowski EM, Eaton S, Ehinger J, Elmer E, Endlicher R, Engin AB, Escames G, Evinova A, Ezrova Z, Falk MJ, Fell DA, Ferdinandy P, Ferko M, Fernandez-Ortiz M, Fernandez-Vizarra E, Ferreira JCB, Ferreira R, Ferri A, Festuccia WT, Fessel JP, Filipovska A, Fisar Z, Fischer C, Fischer M, Fisher G, Fisher JJ, Fontanesi F, Forbes-Hernandez TY, Ford E, Fornaro M, Fuertes Agudo M, Fulton M, Galina A, Galkin A, Gallee L, Galli GL, Gama Perez P, Gan Z, Ganetzky R, Gao Y, Garcia GS, Garcia-Rivas G, Garcia-Roves PM, Garcia-Souza LF, Garlid KD, Garrabou G, Garten A, Gastaldelli A, Gayen J, Genders AJ, Genova ML, Giampieri F, Giovarelli M, Glatz JFC, Goikoetxea Usandizaga N, Goncalo Teixeira da Silva, Rui, Goncalves DF, Gonzalez-Armenta JL, Gonzalez-Francesca A, Gonzalez-Freire M, Gonzalo H, Goodpaster BH, Gorr TA, Gourlay CW, Grams B, Granata C, Grefte S, Grilo L, Guarch ME, Gueguen N, Gumeni S, Haas CB, Haavik J, Hachmo Y, Haendeler J, Haider M, Hajrulahovic A, Hamann A, Han J, Han WH, Hancock CR, Hand SC, Handl J, Hansikova H, Hardee JP, Hargreaves IP, Harper ME, Harrison DK, Hassan H, Hatokova Z, Hausenloy DJ, Heales S JR, Heiestad C, Hellgren KT, Henrique A, Hepple RT, Hernansanz-Agustin P, Hewakapuge S, Hickey AJ, Ho DH, Hoehn KL, Hoel F, Holland OJ, Holloway GP, Holzner L, Hoppel CL, Hoppeler H, Hoppel F, Houstek J, Huete-Ortega M, Hyrossova P, Iglesias-Gonzalez J, Indiveri C, Irving BA, Isola R, Iyer S, Jackson CB, Jadiya P, Jana PF, Jandeleit-Dahm K, Jang DH, Jang YC, Janowska J, Jansen K, Jansen-Duerr P, Jansone B, Jarmuszkiewicz W, Jaskiewicz A, Jaspers RT, Jedlicka J, Jerome E, Jespersen NR, Jha RK, Joseph V, Juhasz L, Jurczak MJ, Jurk D, Kaambre T, Kaczor JJ, Kainulainen H, Kampa RP, Kandel SM, Kane DA, Kapferer W, Kapnick S, Kappler L, Karabatsiakakis A, Karavaeva I, Karkucinska-Wieckowska A, Kaur S,

Keijer J, Keller MA, Keppner G, Khamoui AV, Kidere D, Kilbaugh T, Kim HK, Kim JKS, Kimoloi S, Klepinin A, Klepinina L, Klingenspor M, Klocker H, Komlódi T, Kolasa I, Koopman WJH, Kopitar-Jerala N, Kowaltowski AJ, Kozlov AV, Krajcova A, Krako Jakovljevic N, Kristal BS, Krycer JR, Kuang J, Kucera O, Kuka J, Kwak HB, Kwast K, Kwon OS, Laasmaa M, Labieniec-Watala M, Lai N, Lalic NM, Land JM, Lane N, Laner V, Lanza IR, Laouafa S, Larsen S, Larsen TS, Lavery GG, Lazou A, Ledo AM, Lee HK, Leeuwenburgh C, Lehti M, Lemieux H, Lenaz G, Lerfall J, Li PA, Liang L, Li Puma L, Liepins E, Lin C-T, Liu J, Lopez LC, Lucchinetti E, Ma T, Macedo MP, Machado IF, Maciej S, MacMillan-Crow LA, Magalhaes J, Magri A, Majtnerova P, Makarova E, Makrecka-Kuka M, Malik AN, Marcouiller F, Marechal A, Markova M, Markovic I, Martin DS, Martins AD, Martins JD, Maseko TE, Maull F, Mazat JP, McKenna HT, McKenzie M, McMillan DGG, McStay GP, Menze MA, Mercer JR, Menndham A, Merz T, Messina A, Meszaros AT, Methner A, Michalak S, Mila Guasch M, Minuzzi LM, Misirkic Marjanovic M, Moellering DR, Moiso N, Molina AJA, Montaigne D, Moore AL, Moore C, Moreau K, Moreira BP, Moreno-Sanchez R, Mracek T, Muccini AM, Muntane J, Muntean DM, Murray AJ, Musiol E, Nabben M, Nair KS, Nehlin JO, Nemecek M, Nesci S, Neuffer PD, Neuzil J, Nevriere R, Newsom SA, Norman J, Nozickova K, Nunes S, Nuoffer J-M, O'Brien K, O'Brien KA, O'Gorman D, Olgar Y, Oliveira B, Oliveira J, Oliveira MF, Oliveira MT, Oliveira PF, Oliveira PJ, Olsen RE, Orynbayeva Z, Osiewacz HD, Paez H, Pak YK, Pallotta ML, Palmeira CM, Parajuli N, Passos JF, Passrigger M, Patel HH, Pavlova N, Pavlovic K, Pecina P, Pedersen TM, Perales JC, Pereira da Silva Grilo da Silva, Filomena, Pereira R, Perez Valencia JA, Perks KL, Pesta D, Petit PX, Pettersen IKN, Pichaud N, Pichler I, Piel S, Pinho SA, Pietka TA, Pino MF, Pirkmajer S, Place N, Plangger M, Porter C, Porter RK, Pregoica I, Procaccio V, Prochownik EV, Prola A, Pulinilkunnit T, Puskarich MA, Puurand M, Radenkovic F, Ramzan R, Rattan SIS, Reano S, Reboredo-Rodriguez P, Rees BB, Renner-Sattler K, Rial E, Robinson MM, Roden M, Rodrigues AS, Rodriguez E, Rodriguez-Enriquez S, Roesland GV, Rohlena J, Rolo AP, Ropelle ER, Roshanravan B, Rossignol R, Rossiter HB, Rousar T, Rubelj I, Rybacka-Mossakowska J, Saada A, Safaei Z, Saharnaz S, Salin K, Salvadego D, Sandi C, Saner N, Sanz A, Sazanov LA, Scatena R, Schartner M, Scheibye-Knudsen M, Schilling JM, Schlattner U, Schoenfeld P, Schots PC, Schulz R, Schwarzer C, Scott GR, Selman C, Shabalina IG, Sharma P, Sharma V, Shevchuk I, Shirazi R, Shiroma JG, Siewiera K, Silber AM, Silva AM, Sims CA, Singer D, Singh BK, Skolik RA, Smenes BT, Smith J, Soares FAA, Sobotka O, Sokolova I, Solesio ME, Sonkar VK, Sowton AP, Sparagna GC, Sparks LM, Spinazzi M, Stankova P, Starr J, Stary C, Stelfa G, Stepto NK, Stiban J, Stier A, Stocker R, Storder J, Sumbalova Z, Suomalainen WA, Suravajhala P, Svalbe B, Swerdlow RH, Swiniuch D, Szabo I, Szewczyk A, Szibor M, Tanaka M, Tandler B, Tarnopolsky MA, Tausan D, Tavernarakis N, Tepp K, Teodoro J,

Thakkar H, Thapa M, Thyfault JP, Tomar D, Ton R, Torp M-K, Towheed A, Tretter L, Trewin AJ, Trifunovic A, Trivigno C, Tronstad KJ, Trougakos IP, Truu L, Tuncay E, Turan B, Tyrrell DJ, Urban T, Urner S, Valentine JM, van Bergen NJ, Varricchio F, Vella J, Vendelin M, Verdaguer IB, Vernerova A, Vercesi AE, Victor VM, Vieira Ligo Teixeira C, Vidimce J, Viel C, Vieyra A, Vilks K, Villena JA, Vincent V, Vinogradov AD, Viscomi C, Vitorino RMP, Vogt S, Volani C, Volska K, Votion D-M, Vujacic-Mirski K, Wagner BA, Ward ML, Warnsmann V, Wasserman DH, Watala C, Wei Y-H, Whitfield J, Wickert A, Wieckowski MR, Wiesner RJ, Williams CM, Winwood-Smith H, Wohlgemuth SE, Wohlwend M, Wolff JN, Wrutniak-Cabello C, Wuest RCI, Yokota T, Zablocki K, Zanon A, Zanou N, Zaugg K, Zaugg M, Zdrzilova L, Zhang Y, Zhang YZ, Zikova A, Zischka H, Zorzano A, Zvejniece L, Lagarrigue S, Munro D, Pereira S, Laranjinha J, Almeida A, Diederich M, Hecker M, Jusic A, Prigione A, Sommer N, Weissig V, Guida, Bento, G, John G, Jones, JG. Mitochondrial physiology. *Bioenergetics Communications*; 2020. doi:10.26124/BEC:2020-0001.V1

- [37] Rassow J. *Biochemie. Duale Reihe. 3. Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2012
- [38] Gnaiger E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis.* Innsbruck: Mitochondr Physiol Network 17.18; 2012
- [39] Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol* 2012; 810: 25–58. doi:10.1007/978-1-61779-382-0_3
- [40] Lemieux H, Semsroth S, Antretter H, et al. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 1729–1738. doi:10.1016/j.biocel.2011.08.008
- [41] CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 1955; 217: 409–427
- [42] Gnaiger E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1837–1845. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.013
- [43] Gnaiger E. *Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis ; mitochondr physiol network 19.12.* 4. Aufl. Mitochondrial physiology network. Innsbruck: Oroboros Instruments; 2012
- [44] American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 2018; 41: S13-S27. doi:10.2337/dc18-S002

- [45] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* 2019; 157: 107843. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843
- [46] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103: 137–149. doi:10.1016/j.diabres.2013.11.002
- [47] Heidemann C, Scheidt-Nave C. Prevalence, incidence and mortality of diabetes mellitus in adults in Germany – A review in the framework of the Diabetes Surveillanc. In: *Journal of Health Monitoring*. Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung; 2017. doi:10.17886/RKI-GBE-2017-062
- [48] Tamayo T, Brinks R, Hoyer A, et al. The Prevalence and Incidence of Diabetes in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 177–182. doi:10.3238/arztebl.2016.0177
- [49] Mahajan A, Wessel J, Willems SM, et al. Refining the accuracy of validated target identification through coding variant fine-mapping in type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2018; 50: 559–571. doi:10.1038/s41588-018-0084-1
- [50] Saxena R, Elbers CC, Guo Y, et al. Large-scale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies type 2 diabetes loci. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 410–425. doi:10.1016/j.ajhg.2011.12.022
- [51] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet* 2017; 389: 2239–2251. doi:10.1016/S0140-6736(17)30058-2
- [52] Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature* 2019; 576: 51–60. doi:10.1038/s41586-019-1797-8
- [53] Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 2020; 396: 1223–1249. doi:10.1016/S0140-6736(20)30752-2
- [54] Rawshani A, Rawshani A, Franzén S, et al. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2017; 376: 1407–1418. doi:10.1056/NEJMoa1608664
- [55] Tönnies T, Hoyer A, Brinks R. Excess mortality for people diagnosed with type 2 diabetes in 2012 - Estimates based on claims data from 70 million Germans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2018; 28: 887–891. doi:10.1016/j.numecd.2018.05.008

- [56] Wang H, Naghavi M, Allen C, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 2016; 388: 1459–1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1
- [57] Jacobs E, Hoyer A, Brinks R, et al. Burden of Mortality Attributable to Diagnosed Diabetes: A Nationwide Analysis Based on Claims Data From 65 Million People in Germany. *Diabetes Care* 2017; 40: 1703–1709. doi:10.2337/dc17-0954
- [58] Herold G, Hrsg. *Innere Medizin* 2015. Köln: Selbstverl.; 2015
- [59] Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* 2020; 16: 349–362. doi:10.1038/s41574-020-0355-7
- [60] Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, et al. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *The Lancet* 2009; 373: 2215–2221. doi:10.1016/s0140-6736(09)60619-x
- [61] Moller DE, Flier JS. Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med* 1991; 325: 938–948. doi:10.1056/NEJM199109263251307
- [62] Gancheva S, Jelenik T, Álvarez-Hernández E, et al. Interorgan Metabolic Crosstalk in Human Insulin Resistance. *Physiol Rev* 2018; 98: 1371–1415. doi:10.1152/physrev.00015.2017
- [63] Szendroedi J, Roden M. Ectopic lipids and organ function. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 50–56. doi:10.1097/mol.0b013e328321b3a8
- [64] Preuss C, Jelenik T, Bódis K, et al. A New Targeted Lipidomics Approach Reveals Lipid Droplets in Liver, Muscle and Heart as a Repository for Diacylglycerol and Ceramide Species in Non-Alcoholic Fatty Liver. *Cells* 2019; 8. doi:10.3390/cells8030277
- [65] Szendroedi J, Frossard M, Klein N, et al. Lipid-induced insulin resistance is not mediated by impaired transcapillary transport of insulin and glucose in humans. *Diabetes* 2012; 61: 3176–3180. doi:10.2337/db12-0108
- [66] Roden M, Ludwig C, Nowotny P, et al. Relative hypoleptinemia in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 976–981. doi:10.1038/sj.ijo.0801266
- [67] Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Programming of appetite and type 2 diabetes. *Early Hum Dev* 2005; 81: 981–988. doi:10.1016/j.earlhumdev.2005.10.006

- [68] Sharma S, Tripathi P. Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go? *The Journal of nutritional biochemistry* 2019; 63: 101–108.
doi:10.1016/j.jnutbio.2018.10.003
- [69] Canfora EE, Meex RCR, Venema K, et al. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15: 261–273. doi:10.1038/s41574-019-0156-z
- [70] Furman D, Campisi J, Verdin E, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med* 2019; 25: 1822–1832. doi:10.1038/s41591-019-0675-0
- [71] Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2003; 52: 1799–1805. doi:10.2337/diabetes.52.7.1799
- [72] Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2007; 356: 1517–1526. doi:10.1056/NEJMoa065213
- [73] Folli F, Corradi D, Fanti P, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev* 2011; 7: 313–324.
doi:10.2174/157339911797415585
- [74] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107: 1058–1070. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
- [75] Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 1991; 91: S31-S38. doi:10.1016/0002-9343(91)90281-2
- [76] Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, et al. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol* 2019; 14: 50–59.
doi:10.15420/ecr.2018.33.1
- [77] Ziegler D, Strom A, Brüggemann J, et al. Overexpression of cutaneous mitochondrial superoxide dismutase in recent-onset type 2 diabetes. *Diabetologia* 2015; 58: 1621–1625.
doi:10.1007/s00125-015-3609-5
- [78] Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12: 537–577. doi:10.1089/ars.2009.2531
- [79] Trumpower BL. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* 1990; 265: 11409–11412

- [80] Zweck E, Szendrői J, Kelm M, et al. Das diabetische Herz und Herzinsuffizienz – Aktuelles zu Entstehung und Therapie. *Dtsch Med Wochenschr* 2019; 144: 175–179. doi:10.1055/a-0646-7871
- [81] Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341: 1127–1133. doi:10.1056/NEJM199910073411506
- [82] Seferović PM, Petrie MC, Filippatos GS, et al. Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 2018; 20: 853–872. doi:10.1002/ejhf.1170
- [83] Miller L. Heart transplantation in patients with diabetes. *Circulation* 2006; 114: 2206–2207. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660902
- [84] Aguilar D, Deswal A, Ramasubbu K, et al. Comparison of patients with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction among those with versus without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2010; 105: 373–377. doi:10.1016/j.amjcard.2009.09.041
- [85] Maack C, Lehrke M, Backs J, et al. 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: 4243–4254. doi:10.1093/eurheartj/ehy596
- [86] Giri S, Shaw LJ, Murthy DR, et al. Impact of diabetes on the risk stratification using stress single-photon emission computed tomography myocardial perfusion imaging in patients with symptoms suggestive of coronary artery disease. *Circulation* 2002; 105: 32–40. doi:10.1161/hc5001.100528
- [87] Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 2007; 115: 3213–3223. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679597
- [88] Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease: A hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia* 2018; 61: 21–28. doi:10.1007/s00125-017-4390-4
- [89] Kenny HC, Abel ED. Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ Res* 2019; 124: 121–141. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.311371
- [90] Bugger H, Abel ED. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech* 2009; 2: 454–466. doi:10.1242/dmm.001941
- [91] Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 8: 92–103. doi:10.1038/nrendo.2011.138

- [92] Boudina S, Sena S, Theobald H, et al. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 2007; 56: 2457–2466. doi:10.2337/db07-0481
- [93] Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11: 31–39. doi:10.1007/s11154-010-9131-7
- [94] Riehle C, Bauersachs J. Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2018; 114: 2. doi:10.1007/s00395-018-0711-0
- [95] Ritchie RH, Abel ED. Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease. *Circ Res* 2020; 126: 1501–1525. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.315913
- [96] Rabøl R, Larsen S, Højberg PMV, et al. Regional anatomic differences in skeletal muscle mitochondrial respiration in type 2 diabetes and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 857–863. doi:10.1210/jc.2009-1844
- [97] Phielix E, Schrauwen-Hinderling VB, Mensink M, et al. Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2008; 57: 2943–2949. doi:10.2337/db08-0391
- [98] Mogensen M, Sahlin K, Fernström M, et al. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 1592–1599. doi:10.2337/db06-0981
- [99] Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, et al. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 2007; 50: 790–796. doi:10.1007/s00125-007-0594-3
- [100] Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, et al. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 1891–1898. doi:10.1016/j.jacc.2009.07.031
- [101] Moutagne D, Marechal X, Coisne A, et al. Myocardial contractile dysfunction is associated with impaired mitochondrial function and dynamics in type 2 diabetic but not in obese patients. *Circulation* 2014; 130: 554–564. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008476
- [102] Duicu OM, Lighezan R, Sturza A, et al. Assessment of Mitochondrial Dysfunction and Monoamine Oxidase Contribution to Oxidative Stress in Human Diabetic Hearts. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 8470394. doi:10.1155/2016/8470394

- [103] Ljubkovic M, Gressette M, Bulat C, et al. Disturbed Fatty Acid Oxidation, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis in Left Ventricle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2019; 68: 1924–1933. doi:10.2337/db19-0423
- [104] Croston TL, Thapa D, Holden AA, et al. Functional deficiencies of subsarcolemmal mitochondria in the type 2 diabetic human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307: H54-65. doi:10.1152/ajpheart.00845.2013
- [105] Barth AS, Merk S, Arnoldi E, et al. Functional profiling of human atrial and ventricular gene expression. *Pflugers Arch* 2005; 450: 201–208. doi:10.1007/s00424-005-1404-8
- [106] Scheiber D, Jelenik T, Zweck E, et al. High-resolution respirometry in human endomyocardial biopsies shows reduced ventricular oxidative capacity related to heart failure. *Exp Mol Med* 2019; 51: 1–10. doi:10.1038/s12276-019-0214-6
- [107] Duicu O, Jușcă C, Falniță L, et al. Substrate-specific impairment of mitochondrial respiration in permeabilized fibers from patients with coronary heart disease versus valvular disease. *Mol Cell Biochem* 2013; 379: 229–234. doi:10.1007/s11010-013-1644-4
- [108] Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90: 207–258. doi:10.1152/physrev.00015.2009
- [109] Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, et al. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2008; 80: 30–39. doi:10.1093/cvr/cvn184
- [110] Tura A, Chemello G, Szendroedi J, et al. Prediction of clamp-derived insulin sensitivity from the oral glucose insulin sensitivity index. *Diabetologia* 2018; 61: 1135–1141. doi:10.1007/s00125-018-4568-4
- [111] Mari A, Pacini G, Brazzale AR, et al. Comparative evaluation of simple insulin sensitivity methods based on the oral glucose tolerance test. *Diabetologia* 2005; 48: 748–751. doi:10.1007/s00125-005-1683-9
- [112] Mari A, Pacini G, Murphy E, et al. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 2001; 24: 539–548. doi:10.2337/diacare.24.3.539
- [113] Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* 2004; 27: 1487–1495. doi:10.2337/diacare.27.6.1487

- [114] Messroghli DR, Radjenovic A, Kozerke S, et al. Modified Look-Locker inversion recovery (MOLLI) for high-resolution T1 mapping of the heart. *Magn Reson Med* 2004; 52: 141–146. doi:10.1002/mrm.20110
- [115] Fernández-Jiménez R, Sánchez-González J, Aguero J, et al. Fast T2 gradient-spin-echo (T2-GraSE) mapping for myocardial edema quantification: first in vivo validation in a porcine model of ischemia/reperfusion: First in vivo validation in a porcine model of ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Magn Reson* 2015; 17: 92. doi:10.1186/s12968-015-0199-9
- [116] Spieker M, Katsianos E, Gastl M, et al. T2 mapping cardiovascular magnetic resonance identifies the presence of myocardial inflammation in patients with dilated cardiomyopathy as compared to endomyocardial biopsy. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2018; 19: 574–582. doi:10.1093/ehjci/jex230
- [117] Thomas D, Luetkens J, Faron A, et al. Feature-tracking-based strain analysis - a comparison of tracking algorithms. *Pol J Radiol* 2020; 85: e97-e103. doi:10.5114/pjr.2020.93610
- [118] Bönner F, Janzarik N, Jacoby C, et al. Myocardial T2 mapping reveals age- and sex-related differences in volunteers. *J Cardiovasc Magn Reson* 2015; 17: 9. doi:10.1186/s12968-015-0118-0
- [119] Gastl M, Lachmann V, Christidi A, et al. Cardiac magnetic resonance T2 mapping and feature tracking in athlete's heart and HCM. *Eur Radiol* 2020. doi:10.1007/s00330-020-07289-4
- [120] Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, et al. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers: A novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 1987; 892: 191–196. doi:10.1016/0005-2728(87)90174-5
- [121] Kunz WS, Kuznetsov AV, Schulze W, et al. Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1144: 46–53. doi:10.1016/0005-2728(93)90029-f
- [122] Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, et al. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008; 3: 965–976. doi:10.1038/nprot.2008.61
- [123] Salabei JK, Gibb AA, Hill BG. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. *Nat Protoc* 2014; 9: 421–438. doi:10.1038/nprot.2014.018

- [124] Salin K, Villasevil EM, Anderson GJ, et al. The RCR and ATP/O Indices Can Give Contradictory Messages about Mitochondrial Efficiency. *Integr Comp Biol* 2018; 58: 486–494. doi:10.1093/icb/icy085
- [125] O'Brien LC, Chen Q, Savas J, et al. Skeletal muscle mitochondrial mass is linked to lipid and metabolic profile in individuals with spinal cord injury. *Eur J Appl Physiol* 2017; 117: 2137–2147. doi:10.1007/s00421-017-3687-9
- [126] Fleckenstein-Elsen M, Dinnies D, Jelenik T, et al. Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid differentially regulate adipogenesis, acquisition of a brite phenotype and mitochondrial function in primary human adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60: 2065–2075. doi:10.1002/mnfr.201500892
- [127] Lassner D, Kuhl U, Siegismund CS, et al. Improved diagnosis of idiopathic giant cell myocarditis and cardiac sarcoidosis by myocardial gene expression profiling. *European Heart Journal* 2014; 35: 2186–2195. doi:10.1093/eurheartj/ehu101
- [128] Schmidt-Lucke C, Zobel T, Escher F, et al. Human Parvovirus B19 (B19V) Up-regulates CXCR4 Surface Expression of Circulating Angiogenic Cells: Implications for Cardiac Ischemia in B19V Cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2018; 217: 456–465. doi:10.1093/infdis/jix309
- [129] Noutsias M, Rohde M, Block A, et al. Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 3. doi:10.1186/1471-2199-9-3
- [130] Zweck E, Scheiber D, Jelenik T, et al. P4220 Mild cellular heart transplant rejection is associated with decreased myocardial mitochondrial respiration and coupling efficiency. *European Heart Journal* 2018; 39: Supplement 1. doi:10.1093/eurheartj/ehy563.P4220
- [131] Kerner W, Brückel J. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2011; 6: 107–110. doi:10.1055/s-0031-1283764
- [132] McGill R, Tukey JW, Larsen WA. Variations of Box Plots. *The American Statistician* 1978; 32: 12. doi:10.2307/2683468
- [133] Bloomekatz J, Galvez-Santisteban M, Chi NC. Myocardial plasticity: cardiac development, regeneration and disease. *Curr Opin Genet Dev* 2016; 40: 120–130. doi:10.1016/j.gde.2016.05.029
- [134] Bass A, Stejskalová M, Ostádal B, et al. Differences between atrial and ventricular energy-supplying enzymes in five mammalian species. *Physiol Res* 1993; 42: 1–6

- [135]Krajčová A, Urban T, Megvinet D, et al. High resolution respirometry to assess function of mitochondria in native homogenates of human heart muscle. *PLoS One* 2020; 15: e0226142. doi:10.1371/journal.pone.0226142
- [136]Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol (Lond)* 2012; 590: 3349–3360. doi:10.1113/jphysiol.2012.230185
- [137]Scheiber D, Zweck E, Jelenik T, et al. Reduced Myocardial Mitochondrial ROS Production in Mechanically Unloaded Hearts. *J Cardiovasc Transl Res* 2019; 12: 107–115. doi:10.1007/s12265-018-9803-3
- [138]Sharov VG, Todor AV, Silverman N, et al. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2361–2367. doi:10.1006/jmcc.2000.1266
- [139]Lee SH, Doliba N, Osbakken M, et al. Improvement of myocardial mitochondrial function after hemodynamic support with left ventricular assist devices in patients with heart failure. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1998; 116: 344–349. doi:10.1016/S0022-5223(98)70136-9
- [140]Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, et al. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 1996; 94: 1894–1901. doi:10.1161/01.cir.94.8.1894
- [141]Quigley AF, Kapsa RM, Esmore D, et al. Mitochondrial respiratory chain activity in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure* 2000; 6: 47–55. doi:10.1016/S1071-9164(00)00011-7
- [142]Chatfield KC, Sparagna GC, Chau S, et al. Elamipretide Improves Mitochondrial Function in the Failing Human Heart. *JACC Basic Transl Sci* 2019; 4: 147–157. doi:10.1016/j.jacbts.2018.12.005
- [143]Jarreta D. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 860–865. doi:10.1016/S0008-6363(99)00388-0
- [144]Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007; 28: 3076–3093. doi:10.1093/eurheartj/ehm456

- [145] Hubbard WB, Harwood CL, Prajapati P, et al. Fractionated mitochondrial magnetic separation for isolation of synaptic mitochondria from brain tissue. *Sci Rep* 2019; 9: 9656. doi:10.1038/s41598-019-45568-3
- [146] Sholter DE, Armstrong PW. Adverse effects of corticosteroids on the cardiovascular system. *The Canadian journal of cardiology* 2000; 16: 505–511
- [147] Ng MKC, Celermajer DS. Glucocorticoid treatment and cardiovascular disease. *Heart* 2004; 90: 829–830. doi:10.1136/hrt.2003.031492
- [148] Stride N, Larsen S, Hey-Mogensen M, et al. Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2013; 15: 150–157. doi:10.1093/eurjhf/hfs172
- [149] Doerrier C, Garcia-Souza LF, Krumschnabel G, et al. High-Resolution Fluorescence Respirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. *Methods Mol Biol* 2018; 1782: 31–70. doi:10.1007/978-1-4939-7831-1_3
- [150] Marfella R, Amarelli C, Cacciatore F, et al. Lipid Accumulation in Hearts Transplanted From Nondiabetic Donors to Diabetic Recipients. *J Am Coll Cardiol* 2020; 75: 1249–1262. doi:10.1016/j.jacc.2020.01.018
- [151] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444: 840–846. doi:10.1038/nature05482
- [152] Potter E, Marwick TH. Assessment of Left Ventricular Function by Echocardiography: The Case for Routinely Adding Global Longitudinal Strain to Ejection Fraction. *JACC Cardiovasc Imaging* 2018; 11: 260–274. doi:10.1016/j.jcmg.2017.11.017
- [153] Romano S, Judd RM, Kim RJ, et al. Association of Feature-Tracking Cardiac Magnetic Resonance Imaging Left Ventricular Global Longitudinal Strain With All-Cause Mortality in Patients With Reduced Left Ventricular Ejection Fraction. *Circulation* 2017; 135: 2313–2315. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027740
- [154] Mangion K, McComb C, Auger DA, et al. Magnetic Resonance Imaging of Myocardial Strain After Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: A Systematic Review. *Circ Cardiovasc Imaging* 2017; 10. doi:10.1161/CIRCIMAGING.117.006498
- [155] Ernande L, Bergerot C, Girerd N, et al. Longitudinal myocardial strain alteration is associated with left ventricular remodeling in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Soc Echocardiogr* 2014; 27: 479–488. doi:10.1016/j.echo.2014.01.001

- [156]Ng ACT, Delgado V, Bertini M, et al. Findings from left ventricular strain and strain rate imaging in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2009; 104: 1398–1401. doi:10.1016/j.amjcard.2009.06.063
- [157]Fang ZY, Yuda S, Anderson V, et al. Echocardiographic detection of early diabetic myocardial disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 611–617. doi:10.1016/s0735-1097(02)02869-3
- [158]Ng ACT, Delgado V, Bertini M, et al. Myocardial steatosis and biventricular strain and strain rate imaging in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2010; 122: 2538–2544. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.955542
- [159]Liu X, Yang Z-G, Gao Y, et al. Left ventricular subclinical myocardial dysfunction in uncomplicated type 2 diabetes mellitus is associated with impaired myocardial perfusion: a contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance study. *Cardiovasc Diabetol* 2018; 17: 139. doi:10.1186/s12933-018-0782-0
- [160]Paiman EHM, van Eyk HJ, Bizino MB, et al. Phenotyping diabetic cardiomyopathy in Europeans and South Asians. *Cardiovasc Diabetol* 2019; 18: 133. doi:10.1186/s12933-019-0940-z
- [161]Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12: 144–153. doi:10.1038/nrendo.2015.216
- [162]Shang Y, Zhang X, Leng W, et al. Increased fractal dimension of left ventricular trabeculations is associated with subclinical diastolic dysfunction in patients with type-2 diabetes mellitus. *Int J Cardiovasc Imaging* 2019; 35: 665–673. doi:10.1007/s10554-018-1492-0
- [163]Korosoglou G, Humpert PM, Ahrens J, et al. Left ventricular diastolic function in type 2 diabetes mellitus is associated with myocardial triglyceride content but not with impaired myocardial perfusion reserve. *J Magn Reson Imaging* 2012; 35: 804–811. doi:10.1002/jmri.22879
- [164]Levelt E, Pavlides M, Banerjee R, et al. Ectopic and Visceral Fat Deposition in Lean and Obese Patients With Type 2 Diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2016; 68: 53–63. doi:10.1016/j.jacc.2016.03.597
- [165]Zabalgoitia M, Ismaeil MF, Anderson L, et al. Prevalence of diastolic dysfunction in normotensive, asymptomatic patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001; 87: 320–323. doi:10.1016/S0002-9149(00)01366-7

- [166]Bugger H, Abel ED. Mitochondria in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 2010; 88: 229–240.
doi:10.1093/cvr/cvq239
- [167]Verma SK, Garikipati VNS, Kishore R. Mitochondrial dysfunction and its impact on diabetic heart. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863: 1098–1105.
doi:10.1016/j.bbadis.2016.08.021
- [168]Anderson EJ, Rodriguez E, Anderson CA, et al. Increased propensity for cell death in diabetic human heart is mediated by mitochondrial-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300: H118-24. doi:10.1152/ajpheart.00932.2010
- [169]Borger J, Scheiber D, Horn P, et al. Aetiology-dependent impairment of mitochondrial function in the failing human heart. *European Heart Journal* 2020; 41.
doi:10.1093/ehjci/ehaa946.3606
- [170]Bayeva M, Gheorghide M, Ardehali H. Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61: 599–610. doi:10.1016/j.jacc.2012.08.1021
- [171]Doesch AO, Celik S, Ehlermann P, et al. Heart rate reduction after heart transplantation with beta-blocker versus the selective If channel antagonist ivabradine. *Transplantation* 2007; 84: 988–996. doi:10.1097/01.tp.0000285265.86954.80
- [172]Fragasso G, Cobelli F de, Spoladore R, et al. Resting cardiac energy metabolism is inversely associated with heart rate in healthy young adult men. *Am Heart J* 2011; 162: 136–141.
doi:10.1016/j.ahj.2011.04.012
- [173]Casadei B, Meyer TE, Coats AJ, et al. Baroreflex control of stroke volume in man: an effect mediated by the vagus. *J Physiol (Lond)* 1992; 448: 539–550.
doi:10.1113/jphysiol.1992.sp019056
- [174]Bernardi L, Radaelli A, Passino C, et al. Effects of physical training on cardiovascular control after heart transplantation. *Int J Cardiol* 2007; 118: 356–362.
doi:10.1016/j.ijcard.2006.07.032
- [175]Niemann B, Chen Y, Teschner M, et al. Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria: The role of mitochondria. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 577–585. doi:10.1016/j.jacc.2010.09.040
- [176]Niemann B, Pan R, Teschner M, et al. Age and obesity-associated changes in the expression and activation of components of the AMPK signaling pathway in human right atrial tissue. *Exp Gerontol* 2013; 48: 55–63. doi:10.1016/j.exger.2012.04.005

- [177]Wright LA-C, Hirsch IB. Metrics Beyond Hemoglobin A1C in Diabetes Management: Time in Range, Hypoglycemia, and Other Parameters. *Diabetes Technol Ther* 2017; 19: S16-S26. doi:10.1089/dia.2017.0029
- [178]Jelenik T, Flögel U, Álvarez-Hernández E, et al. Insulin Resistance and Vulnerability to Cardiac Ischemia. *Diabetes* 2018; 67: 2695–2702. doi:10.2337/db18-0449
- [179]Okita K, Iwahashi H, Kozawa J, et al. Homeostasis model assessment of insulin resistance for evaluating insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes on insulin therapy. *Endocr J* 2013; 60: 283–290. doi:10.1507/endocrj.ej12-0320
- [180]Petersen KF, Befroy D, Dufour S, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003; 300: 1140–1142. doi:10.1126/science.1082889
- [181]Szendroedi J, Schmid AI, Chmelik M, et al. Muscle mitochondrial ATP synthesis and glucose transport/phosphorylation in type 2 diabetes. *PLoS Med* 2007; 4: e154. doi:10.1371/journal.pmed.0040154
- [182]Dela F, Helge JW. Insulin resistance and mitochondrial function in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45: 11–15. doi:10.1016/j.biocel.2012.09.019
- [183]Jiang L, Wang J, Liu X, et al. The combined effects of cardiac geometry, microcirculation, and tissue characteristics on cardiac systolic and diastolic function in subclinical diabetes mellitus-related cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2020; 320: 112–118. doi:10.1016/j.ijcard.2020.07.013
- [184]Zia MI, Ghugre NR, Roifman I, et al. Comparison of the frequencies of myocardial edema determined by cardiac magnetic resonance in diabetic versus nondiabetic patients having percutaneous coronary intervention for ST elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2014; 113: 607–612. doi:10.1016/j.amjcard.2013.10.040
- [185]Madonna R, Wu H, Shelat H, et al. CD1d-associated expression of NF-κB and cardiac dysfunction in diabetic and obese mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013; 26: 59–73. doi:10.1177/039463201302600106
- [186]Thomas CM, Yong QC, Rosa RM, et al. Cardiac-specific suppression of NF-κB signaling prevents diabetic cardiomyopathy via inhibition of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307: H1036-45. doi:10.1152/ajpheart.00340.2014
- [187]Nigro C, Leone A, Longo M, et al. Methylglyoxal accumulation de-regulates HoxA5 expression, thereby impairing angiogenesis in glyoxalase 1 knock-down mouse aortic

endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019; 1865: 73–85.
doi:10.1016/j.bbadis.2018.10.014

- [188]Zweck E, Roden M. GLP-1 receptor agonists and cardiovascular disease: drug-specific or class effects? *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2019; 7: 89–90. doi:10.1016/s2213-8587(18)30351-6
- [189]Zweck E, Westenfeld R, Szendroedi J. Oral Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2019; 381: 2075–2076. doi:10.1056/NEJMc1913157
- [190]Herrera Comoglio R, Vidal Guitart X. Cardiovascular outcomes, heart failure and mortality in type 2 diabetic patients treated with glucagon-like peptide 1 receptor agonists (GLP-1 RAs): A systematic review and meta-analysis of observational cohort studies. *Int J Clin Pract* 2020; 74: e13553. doi:10.1111/ijcp.13553
- [191]Zheng SL, Roddick AJ, Aghar-Jaffar R, et al. Association Between Use of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors, Glucagon-like Peptide 1 Agonists, and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors With All-Cause Mortality in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 2018; 319: 1580–1591. doi:10.1001/jama.2018.3024
- [192]Pels K, Schwimmbeck PL, Rosenthal P, et al. Long-term clopidogrel administration following severe coronary injury reduces proliferation and inflammation via inhibition of nuclear factor-kappaB and activator protein 1 activation in pigs. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 174–182. doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02089.x
- [193]Anderson EJ, Katunga LA, Willis MS. Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39: 179–193. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05641.x
- [194]Kanazawa A, Nishio Y, Kashiwagi A, et al. Reduced activity of mtTFA decreases the transcription in mitochondria isolated from diabetic rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E778-85. doi:10.1152/ajpendo.00255.2001
- [195]Ghosh S, Pulinilkunnil T, Yuen G, et al. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H768-76. doi:10.1152/ajpheart.00038.2005
- [196]Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol* 2003; 3: 219–228. doi:10.1385/ct:3:3:219
- [197]Dal S, Sigrist S. The Protective Effect of Antioxidants Consumption on Diabetes and Vascular Complications. *Diseases* 2016; 4. doi:10.3390/diseases4030024

- [198]Cai L, Wang Y, Zhou G, et al. Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1688–1697. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.022
- [199]Mortensen SA, Rosenfeldt F, Kumar A, et al. The effect of coenzyme Q10 on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial: Results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial. *JACC Heart Fail* 2014; 2: 641–649. doi:10.1016/j.jchf.2014.06.008
- [200]Gottlieb RA, Stotland A. MitoTimer: a novel protein for monitoring mitochondrial turnover in the heart: A novel protein for monitoring mitochondrial turnover in the heart. *J Mol Med* 2015; 93: 271–278. doi:10.1007/s00109-014-1230-6
- [201]Lund LH, Khush KK, Cherikh WS, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant* 2017; 36: 1037–1046. doi:10.1016/j.healun.2017.07.019
- [202]Russo MJ, Chen JM, Hong KN, et al. Survival after heart transplantation is not diminished among recipients with uncomplicated diabetes mellitus: an analysis of the United Network of Organ Sharing database. *Circulation* 2006; 114: 2280–2287. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.615708
- [203]Saraiva J, Sola E, Prieto D, et al. Diabetes as an outcome predictor after heart transplantation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011; 13: 499-504; discussion 504. doi:10.1510/icvts.2010.256321
- [204]Kobashigawa JA, Starling RC, Mehra MR, et al. Multicenter retrospective analysis of cardiovascular risk factors affecting long-term outcome of de novo cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 1063–1069. doi:10.1016/j.healun.2006.05.001
- [205]Doumouras BS, Fan C-PS, Mueller B, et al. The effect of pre-heart transplant body mass index on posttransplant outcomes: An analysis of the ISHLT Registry Data. *Clin Transplant* 2019; 33: e13621. doi:10.1111/ctr.13621
- [206]Stoica SC, Satchithananda DK, Atkinson C, et al. The energy metabolism in the right and left ventricles of human donor hearts across transplantation. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2003; 23: 503–512. doi:10.1016/S1010-7940(03)00019-8

Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung von Freunden, Familie und Kollegen, die mir auf sehr individuelle Weise unter die Arme gegriffen haben und von denen ich hier einige hervorheben möchte.

Zuallererst möchte ich an dieser Stelle den Betreuern meiner Doktorarbeit danken, Julia Szendrödi und Ralf Westenfeld, für Ihre immerwährende Unterstützung, die enge Zusammenarbeit, ihr Engagement, ihre Motivation und die immensen Chancen, die sie mir in meiner vierjährigen Arbeit als Doktorand ermöglicht haben. Daniel Scheiber möchte ich für die Einführung in das Projekt und seine stete Hilfsbereitschaft danken. Darüber hinaus möchte ich mich bei Michael Roden und Malte Kelm bedanken für die Möglichkeit, die Infrastruktur ihrer Institute zu nutzen und dafür, dass sie mir ihre Erfahrung und wissenschaftliche Orientierung wann immer möglich angeboten haben. Mein Dank gilt auch den Doktoranden, die meine Arbeit in diesem Projekt weitergeführt haben: Sophie Albermann, Julius Borger, Martin Leung, Constanze Moos und Max Karschnia.

Im Deutschen Diabetes Zentrum bin darüber hinaus ich vielen (ehemaligen) Mitarbeitern zu Dank verpflichtet, derer ich hier nur einige nennen kann: Kálmán Bódis für seine stete Motivation und Hilfsbereitschaft. Tomas Jelenik für sein offenes Ohr und seine verständnisvolle Art. Dominik Pesta für spannende Diskussionen manchmal nicht ganz eindeutiger Ergebnisse. Volker Burkhart und Christian Herder. Daniel Markgraf und seinem gesamten Laborteam. Fariba Zivehe, Ilka Rokitta, Myrko Eßer und Michele Reina do Fundo für die Versüßung der langen Stunden im Labor und fürs Einspringen in der Not.

Weiterhin danke ich zahlreichen Kollegen vom Universitätsklinikum Düsseldorf für Ihre enorm wertvolle Unterstützung, derer ich hier auch nur einige nennen kann: Patrick Horn, Florian Bönner und Maximilian Spieker für die stete Hilfsbereitschaft. Dem gesamten Team des Herzkatheterlabors, der Stationen ME08, ME09 und ME06. Diyar Saeed, Payam Akhyari, Udo Boeken und Artur Lichtenberg für die Unterstützung beim Einschluss kardiochirurgischer Patienten.

Ich danke außerdem den Menschen, die mich auf meinem bisherigen wissenschaftlichen Werdegang begleitet, unterstützt und geprägt haben. I would like to thank Navin Kapur in Boston for welcoming me in his research group, for his understanding, his support and commitment. I would also like to thank his Lab team, particularly Katherine Thayer and Lija Swain for being the greatest lab mates and for incredibly productive discussions. Ich möchte mich des Weiteren bei Mirjam Christ-Crain, Matthias Hepprich und Jonathan Mudry aus dem Universitätsspital Basel bedanken und besonders Marc Donath, dessen unbedingte Hilfsbereitschaft mir ein Vorbild ist.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, für ihr Verständnis, ihr offenes Ohr, ihre immerwährende Unterstützung und dafür, dass sie mich auf meinem Weg begleitet haben: Bei meinen Großeltern Christine, Brigitte, Gernot und Robert, bei Stella und bei meinen Eltern Heide und Axel.

