Aus der
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

MITOCHONDRIALER ENERGIESTOFFWECHSEL UND INFLAMMATION IM MYOKARD BEI HERZINSUFFIZIENZ UNTERSCHIEDLICHER ÄTIOLOGIE

DISSERTATION

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

vorgelegt von

JULIUS BORGER

2024

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

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. med. Amin Polzin
Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Buchbender

„Der Geist der Medizin ist leicht zu fassen;

Ihr durchstudiert die groß‘ und kleine Welt

Um es am Ende gehn zu lassen,

Wie‘s Gott gefällt.“

- *Johann Wolfgang Goethe. Faust: Der Tragödie erster Teil (1808)*

Zusammenfassung

Herzinsuffizienz (HF) ist der häufigste Grund für Krankenhauseinweisungen in Deutschland und kann verschiedene zugrundeliegende Ätiologien haben. Obwohl mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, myokardiale Inflammation und Fibrose zentrale Merkmale der HF sind, ist unklar, inwiefern sich verschiedene Ätiologien diesbezüglich unterscheiden. Bei Patienten mit nicht-ischämischer HF und myokardialer Inflammation hat immunsuppressive Therapie zu verbesserter linksventrikulärer Pumpfunktion und Überleben beigetragen. Zur Wirksamkeit von Immunsuppression bei ischämisch bedingter HF liegen kaum Erkenntnisse vor.

Ziel der vorliegenden Studie war, den mitochondrialen Energiestoffwechsel bei Patienten mit ischämischer bzw. dilatativer Kardiomyopathie (ICM bzw. DCM) genauer zu beschreiben und das Ausmaß myokardialer Inflammation bei diesen verschiedenen Ätiologien zu erfassen. Hierfür stellten wir die Hypothesen auf: Patienten mit ICM bzw. DCM unterscheiden sich hinsichtlich [1] der mitochondrialen oxidativen Kapazität und [2] des Ausmaßes myokardialer Inflammation und Fibrose. [3] Außerdem korrelieren Fibrose und Inflammation mit myokardialer oxidativer Kapazität und oxidativem Stress.

Hierzu wurden 81 Patienten (n=44 ICM, n=37 DCM) eingeschlossen, welche aufgrund terminaler HF ein Linksherzunterstützungssystem (n=59) bzw. eine Herztransplantation (n=22) erhielten. Die mitochondriale Respiration im intraoperativ entfernten linksventrikulären Myokard wurde mittels hochauflösender Respirometrie bestimmt, Citratsynthase-Aktivität (CSA) als Marker mitochondrialer Dichte spektrophotometrisch gemessen und mittels Immunhistochemie die lymphozytäre Infiltration des Myokards und Fibrosierung quantifiziert. Lymphozytäre Infiltration mit mehr als 14 Zellen pro mm^2 wurde als Schwelle zu relevanter Inflammation betrachtet.

Die Patienten unterschieden sich nicht hinsichtlich des Alters (61,5±5,7 vs. 56,5±12,7 Jahre, p=0,164), des Geschlechts (86% vs. 84% männlich, p=0,725), des Auftretens von Typ 2 Diabetes mellitus (34% vs. 18%, p=0,126) oder chronischer Niereninsuffizienz (8% vs. 11%, p=0,994). Die mitochondriale oxidative Kapazität war bei Patienten mit ICM um 23% geringer als bei DCM (108,6±41,4 vs. 141,9±59,9 pmol/(s*mg), p=0,006). CSA war in ICM gegenüber DCM reduziert (359,6±164,1 vs. 503,0±198,5 nmol/min/mg Protein, p=0,002). Patienten mit ICM wiesen größere fibrosierte Areale auf (20,9±21,2 vs. 7,2±5,6% des Querschnitts, p=0,002); dies hing nicht mit oxidativer Kapazität zusammen (r=-0,13, p=0,327). Patienten mit ICM zeigten häufiger relevante myokardiale Inflammation verglichen zu DCM-Patienten (27% vs. 6%, p=0,024). Höhere myokardiale Inflammation war mit geringerer oxidativer Kapazität assoziiert (r=-0,296, p=0,019).

Bei Patienten mit ICM zeigte sich eine gesteigerte myokardiale Infiltration mit inflammatorischen Zellen, welche mit reduzierter mitochondrialer oxidativer Kapazität einherging. Zukünftige Studien sollten auf den Einfluss höherer myokardialer Inflammation auf den klinischen Verlauf von ICM-Patienten eingehen, um die Wirksamkeit immunsuppressiver Therapie zu untersuchen. Hierdurch könnte eine bereits etablierte Therapiestrategie einer neuen Patientengruppe zugänglich gemacht werden.

Abstract

Heart Failure (HF) is the most frequent reason for hospital admissions in Germany. The underlying etiologies are variable. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, myocardial inflammation, and fibrosis are hallmarks of HF pathophysiology, yet it is unclear whether patients with different HF-etiologies differ in these aspects. In non-ischemic HF with marked myocardial inflammation, immunosuppression has yielded benefits in left ventricular ejection fraction, and survival. However, little is known about possible benefits of immunosuppression in ischemic HF.

We aimed at characterizing mitochondrial metabolism in patients with ischemic or dilated cardiomyopathy (ICM or DCM), respectively, and at evaluating the extent of myocardial inflammation in these different etiologies. We hypothesized that patients with ICM or DCM would exhibit [1] different mitochondrial oxidative capacity, and [2] different myocardial inflammation and fibrosis, and that [3] oxidative capacity and oxidative stress correlate with myocardial inflammation and fibrosis.

We included 81 patients with advanced HF (n=44 ICM, n=37 DCM) undergoing implantation of a left ventricular assist device (n=59) or heart transplantation (n=22). Left ventricular myocardium was excised intraoperatively. We assessed mitochondrial respiration via high resolution respirometry, and citrate synthase activity (CSA), as a marker of mitochondrial content, spectrophotometrically. Myocardial inflammation and fibrosis were quantified using immunohistochemistry staining. Lymphocytic infiltration of more than 14 cells per mm^2 was considered relevant inflammation.

Patient with ICM or DCM did not differ regarding age (61.5±5.7 vs. 56.5±12.7 years, p=0.164), sex (86% vs. 84% male, p=0.725), Type 2 Diabetes mellitus (34% vs. 18%, p=0.126), or chronic kidney disease (8% vs. 11%, p=0.994). Mitochondrial oxidative capacity was 23% lower in patients with ICM than DCM (108.6±41.4 vs. 141.9±59.9 pmol/(s*mg), p=0.006), and CSA was reduced in ICM compared with DCM (359.6±164.1 vs. 503.0±198.5 nmol/min/mg protein, p=0.002). Despite greater fibrotic area in ICM than DCM (20.9±21.2 vs. 7.2±5.6% of area, p=0.002), no association of fibrosis with oxidative capacity was found (r=-0.13, p=0.327). Patients with ICM had relevant myocardial inflammation more often than patients with DCM (27% vs. 6%, p=0.024). Higher inflammation was associated with lower oxidative capacity (r=-0.296, p=0.019).

We found enhanced myocardial infiltration with inflammatory cells in patients with ICM compared with DCM that was associated with impaired mitochondrial oxidative capacity. Future studies should address possible influences of myocardial inflammation on the clinical course in patients with ischemic HF to evaluate a potential efficacy of immunosuppression in ICM. This could make an already established therapy available to a new group of patients.

Abkürzungsverzeichnis

ACE	*Angiotensin converting enzyme*
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Varianzanalyse (*Analysis of variance*)
ATP	Adenosintriphosphat
C (I-V)	Komplex I-V der mitochondrialen Atmungskette
CANTOS	*Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study*
CD	*Cluster of differentiation*
CETF	Kapazität des Elektronen-transferierenden Flavoproteins
CRP	C-reaktives Protein
CSA	Citratsynthase-Aktivität
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
ETF	Elektronen-transferierendes Flavoprotein
ETS	Elektronen-transferierendes System
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Hb	Hämoglobin
HbA_{1c}	Glykiertes Hämoglobin A_{1c}
HF	Herzinsuffizienz *(Heart Failure)*
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HTX	Herztransplantation
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
LCR	*Leak control ratio*
LVAD	*Left ventricular assist device*
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

mtDNA	*Mitochondrial deoxyribonucleic acid*
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PGC-1α	*Peroxisome-proliferator-activated receptor γ coactivator 1α*
RCR	*Respiratory control ratio*
ROS	*Reactive oxygen species*
ROX	*Residual oxygen consumption*
SGLT2	*Sodium-glucose cotransporter* 2
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus

Einheiten

g	Gramm
G	Mittlere Erdbeschleunigung
L	Liter
mol	Mol
m	Meter
s	Sekunde
U	*Unit*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Herzinsuffizienz ... 1
1.1.1 Einführung und Definition ... 1
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie der Herzinsuffizienz ... 2
1.1.3 Therapie der Herzinsuffizienz ... 3
1.2 Energiemetabolismus des Herzens ... 4
1.2.1 Mitochondrien im Herzen ... 4
1.2.2 Substratgebrauch im Herzen ... 5
1.2.3 Atmungskette und oxidative Phosphorylierung ... 6
1.2.4 Respiratorische Stadien ... 8
1.3 Störungen des Energiemetabolismus bei Herzinsuffizienz ... 9
1.4 Unterschiede der mitochondrialen Funktion bei verschiedener Ätiologie und Komorbiditäten der Herzinsuffizienz ... 12
1.5 Mitochondrien als mögliches Therapieziel bei Herzinsuffizienz ... 13
1.6 Myokardiale Inflammation bei Herzinsuffizienz ... 14
1.6.1 Inflammation und Fibrose im versagenden Herzen ... 14
1.6.2 Immunsuppressive Therapie bei Herzinsuffizienz ... 16
1.7 Ziele der Arbeit ... 17
2 Material und Methoden ... 18
2.1 Material ... 18
2.1.1 Verbrauchsmaterialien ... 18
2.1.2 Chemikalien ... 19
2.1.3 Geräte ... 22
2.1.4 Software ... 22
2.2 Methoden ... 23
2.2.1 Studiendesign ... 23
2.2.2 Patientenkohorte ... 23
2.2.3 Studienablauf ... 24
2.2.3.1 Blutabnahme ... 24
2.2.3.2 Gewebeakquisition ... 25
2.2.4 Hochauflösende Respirometrie ... 26
2.2.5 Messung reaktiver Sauerstoffspezies ... 29
2.2.6 Citratsynthase-Aktivität und Gesamtproteingehalt ... 30
2.2.7 Statistische Auswertung ... 31
3 Ergebnisse ... 33
3.1 Gute Vergleichbarkeit von Patienten mit ICM und DCM ... 33

3.2 Höhere mitochondriale Respiration im Myokard von Patienten mit DCM im Vergleich zu ICM bei vergleichbarer Effizienz der Mitochondrien 34
3.3 Vergleichbare Emission reaktiver Sauerstoffspezies in ICM und DCM 38
3.4 Keine Assoziation von Parametern der Glykämie und mitochondrialer Respiration 40
3.5 Assoziation von Inflammation mit reduzierter mitochondrialer Respiration und ICM 41
4 Diskussion 45
4.1 Gute Vergleichbarkeit der Ätiologie-Gruppen 45
4.2 Eingeschränkte Datenlage zur mitochondrialen Respiration im versagenden Herzen nach verschiedener Ätiologie 47
4.3 Geringere myokardiale mitochondriale Respiration bei Patienten mit ischämischer als nicht-ischämischer Herzinsuffizienz 49
4.4 Keine Assoziation verschiedener Glykämieparameter mit mitochondrialer Respiration 52
4.5 Vermehrte Inflammation im Myokard bei ischämischer Herzinsuffizienz 54
4.6 Limitationen 56
5 Schlussfolgerungen 57
6 Literatur- und Quellenverzeichnis 59

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Einführung und Definition

Herzinsuffizienz (englisch *Heart Failure*, HF) wird definiert als klinisches Syndrom, bei dem durch einen strukturellen oder funktionellen Fehler des Herzens ein adäquater Kreislauf zur Versorgung des Körpers bei normalen intrakardialen Drücken nicht mehr gewährleistet werden kann und das von bestimmten Symptomen (z.B. Dyspnoe, Erschöpfung) und klinischen Zeichen (z.B. erhöhter zentralvenöser Druck und jugularvenöse Stauung, periphere Ödeme) begleitet wird [1].

Beschreibungen von Patienten, die sehr wahrscheinlich an HF litten, finden sich bereits in der Antike. Vor fast 2500 Jahren beobachtete Hippokrates mehrere Patienten, die sich mit Ödemen und Dyspnoe präsentierten [2]. Der Zusammenhang zu einer Erkrankung des Herzens konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht festgestellt werden. Im Laufe des 17. und 18. Jahrhunderts wuchs das Wissen über Anatomie und Physiologie des Herz-Kreislaufsystems stark an, wobei Beschreibungen von Störungen wie Dilatation und Vergrößerung der Masse des Herzens, Füllungsschwäche (etwa bei Perikarderguss) oder Veränderungen an den Herzklappen, die zu HF führen können, den entsprechenden klinischen Bildern genauer zugeordnet werden konnten [3]. Im vergangenen Jahrhundert und insbesondere in den jüngsten Jahrzehnten ist durch moderne biomedizinische Forschung ein profunderes Bild vor allem metabolischer und molekularbiologischer Charakteristika des (versagenden) Herzens entstanden, was den klinischen Blick auf die Herzinsuffizienz verändert hat [4, 5].

Die kardiale Pumpfunktion von Patienten mit Herzinsuffizienz kann auf dem gesamten Spektrum der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) liegen (Tabelle 1). Gemäß der aktuellen Leitlinie der *European Society of Cardiology* lässt sich HF nach der LVEF grob einteilen in HF mit reduzierter LVEF (HFrEF), HF mit erhaltener LVEF, und HF mit mittelgradig reduzierter LVEF [1, 6]. HF kann akut (z.B. bei Myokardinfarkt) oder subakut (z.B. bei Kardiomyopathien) auftreten bzw. chronisch bestehen. Patienten mit chronischer HF, deren Symptomatik sich einen Monat lang nicht verschlechtert, können als „stabil“ bezeichnet werden, wohingegen eine Verschlechterung der Symptomatik als Dekompen-

sation beschrieben werden kann, die wiederum akut und subakut auftreten kann [1, 7]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden fortgeschritten herzinsuffiziente Patienten mit reduzierter LVEF untersucht.

Kriterien	HFrEF	HFmrEF	HFpEF
1	Symptome/klinische Zeichen	Symptome/klinische Zeichen	Symptome/klinische Zeichen
2	LVEF ≤40%	LVEF 41-49%	LVEF ≥50%
3			• Strukturelle und/oder funktionelle Auffälligkeiten • Diastolische Dysfunktion und erhöhte intrakardiale Drücke • Erhöhung der natriuretischen Peptide

Tabelle 1: Definition der Herzinsuffizienz mit reduzierter, mittelgradig reduzierter und erhaltener Ejektionsfraktion gemäß der aktuell gültigen Leitlinie der *European Society of Cardiology*. Modifiziert nach [1]. HFmrEF: Herzinsuffizienz mit mittelgradig reduzierter Ejektionsfraktion; HFpEF: Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion; HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion.

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie der Herzinsuffizienz

Die globale Gesundheitslast durch kardiovaskuläre Erkrankungen, die weltweit unter den häufigsten Todesursachen zu finden sind, stellt ein wachsendes Problem dar [8, 9]. Die globale Gesamtprävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen hat sich zwischen 1990 und 2019 von rund 271 Millionen auf ca. 523 Millionen etwa verdoppelt. Auch die relative Prävalenz ist deutlich angestiegen, wobei es bedeutende Unterschiede etwa nach Region, Alter und Geschlecht gibt [9]. Die entsprechenden Zahlen der Herzinsuffizienz, der verschiedene kardiovaskuläre Ursachen zugrunde liegen können, entwickeln sich ähnlich: Zwischen 1990 und 2017 hat es insgesamt etwa eine Verdoppelung der globalen Gesamtprävalenz der HF gegeben, wobei sich die altersstandardisierte Rate allerdings verringert hat [10]. In Europa liegt die HF-Prävalenz unter Erwachsenen bei etwa 1-2%, steigt aber mit dem Alter stark an und überschreitet 10% in der Bevölkerung über 70 Jahren [1, 11]. Die Hospitalisierungsrate über zwei Jahre aufgrund von HF ist mit 55% hoch [11]. Zudem ist HF in Deutschland die zu den meisten Krankenhauseinweisungen sowie den meisten Todesfällen im Krankenhaus führende Erkrankung, wobei es starke regionale Unterschiede sowie einen Zuwachs über die

Zeit zu beobachten gibt [12]. Auch die ökonomische Last ist bedeutend: 2014 wurden die jährlichen weltweiten direkten und indirekten Gesamtkosten durch HF auf 108 Milliarden US-Dollar geschätzt, wobei die direkten Ausgaben für HF im globalen Durchschnitt 1,4% des Gesundheitsbudgets ausmachen, Tendenz steigend [13]. 86% der Kosten entstehen hierbei in Ländern mit höherem Wohlstand, die etwa 18% der Weltbevölkerung ausmachen, insb. in Europa und Nordamerika. Deutschland rangierte in dieser Studie bezogen auf die durch HF verursachten Gesamtkosten weltweit auf dem dritten Platz, in Europa an der Spitze [13].

Die Entstehung der Herzinsuffizienz ist variabel und kann verschiedene Ursachen haben [1]. Häufig spielen mehrere Faktoren und Komorbiditäten eine Rolle, die sich gegenseitig beeinflussen und verstärken können. Obwohl HF ein globales Problem darstellt, variieren die Ursachen regional, insb. zwischen Industrie- und Entwicklungsländern, teils deutlich [10, 13, 14]. Die häufigste Ursache für HF in Europa ist die Ischämische Kardiomyopathie (ICM), an zweiter und dritter Stelle folgen arterielle Hypertonie und andere Kardiomyopathien als Ursachen [10]. Eine 2002 veröffentlichte Studie mit 5517 HF-Patienten in Italien identifizierte in 45,6% aller Fälle ICM, in 36,0% der Fälle Dilatative Kardiomyopathie (DCM) als die beiden häufigsten Ursachen der HF [15].

1.1.3 Therapie der Herzinsuffizienz

Eine Therapie oder Beeinflussung von Risikofaktoren der Herzinsuffizienz wie der arteriellen Hypertonie oder Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) bereits vor dem Auftreten von Symptomen ist sinnvoll und kann die Prognose verbessern [1]. Bei Auftreten von Symptomen gelten die Senkung der Mortalität und Morbidität, die Verringerung von Hospitalisierungen, die Verbesserung des klinischen Status und der Erhalt der Lebensqualität als Ziele der Therapie. Die medikamentöse Therapie wird hierbei zunächst ausgereizt. Bei chronisch therapierefraktärer und weit fortgeschrittener HF kommen schließlich für selektierte Patientengruppen chirurgische Therapieoptionen der dauerhaften mechanischen Kreislaufunterstützung, etwa durch *Left ventricular assist devices* (LVAD), oder die Herztransplantation (HTX) in Frage [1, 16, 17]. Die aktuellen Therapiemöglichkeiten sind in der Lage, die Prognose für Patienten mit HF ischämischer sowie nicht-ischämischer Genese deutlich zu verbessern und deren Symptome zu lindern. Da das Ausreizen der konventionellen HF-Therapie allerdings, etwa durch die Gefahr von Hypotonie und Bradykardie, limitiert ist, liegt die Suche nach neuen Therapieansätzen nahe, die möglichst keine weitere hämodynamische Beeinträchtigung mit sich bringen und die außerdem direkt den

veränderten Stoffwechsel der Kardiomyozyten als Ziel haben sollen [18, 19]. Hierbei präsentieren sich Mitochondrien, die eine zentrale Rolle im Energiemetabolismus des Herzens einnehmen, als vielversprechender Ansatzpunkt (siehe Abschnitt 1.5) [18-20]. Da außerdem Unterschiede im mitochondrialen Stoffwechsel zwischen Patienten mit ICM und DCM festgestellt wurden, die insbesondere die mitochondriale Biogenese betrafen, ist eine Ätiologie-spezifische Therapie der HF als mögliches zukünftiges Ziel bereits in den Blick gefasst worden [21].

1.2 Energiemetabolismus des Herzens

1.2.1 Mitochondrien im Herzen

Das Herz ist das Organ mit dem höchsten Energieverbrauch im menschlichen Körper: Täglich werden ca. 6 kg Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt [22], während das Herz über 7000 Liter Blut durch den Körper pumpt. Im Myokard nehmen Mitochondrien etwa 35% des Zellvolumens ein [23] und produzieren über 95% des benötigten ATPs, wovon 60-70% für Kontraktionen und die restlichen 30-40% hauptsächlich für die Funktion von Ionenpumpen eingesetzt werden [24]. Mitochondrien (von altgriechisch μίτος (*mitos*), Faden, und χονδρος (*chondros*), Korn) sind von einer doppelten Membran umschlossene Zellorganellen, die ihr eigenes Erbgut besitzen und neben anderen Funktionen insbesondere für den Energiemetabolismus der Zelle verantwortlich sind. Menschliche mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (mtDNA) ist zirkulär aufgebaut und codiert unter anderem für 13 Proteine, darunter Teile der Komplexe I, III, IV und V der Atmungskette [23]. Weitere mitochondriale Proteine werden von der nukleären DNA codiert und durch Transporter in der inneren und äußeren Membran aktiv ins Mitochondrium eingebracht [25]. Die innere Membran, die die mitochondriale Matrix umhüllt, enthält die Komplexe der Atmungskette, ist stark gefaltet und hat an manchen Stellen Kontakt zur äußeren Membran, was zum Stoffaustausch und als Ausgangspunkt mitochondrialer Fusion und Teilung genutzt wird, da Mitochondrien nicht *de novo* generiert werden können [23, 26]. In der mitochondrialen Matrix sind die Enzyme des Citratzyklus sowie der β-Oxidation der Fettsäuren lokalisiert, über die Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid ($FADH_2$) als Reduktionsäquivalente für die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) bereitgestellt werden, wodurch Mitochondrien zum wichtigsten Ort der Bereitstellung von Energie für die Zelle werden [27, 28]. Darüber hinaus spielen Mitochondrien zahlreiche relevante

Rollen unter anderem bei der Apoptose, der Häm-Synthese sowie bei der Zellkommunikation über *second messenger*, etwa durch Signalgebung mittels reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zur Steuerung der Zellproliferation und Hypoxieantwort oder durch Beeinflussung der Calciumhomöostase [28-30]. Gleichzeitig ist die mtDNA deutlich anfälliger für Mutationen und aufgrund der Nähe zur Produktionsstelle von ROS einer besonderen Belastung ausgesetzt [27]. Mitochondrien sind keine starren Gebilde, sondern unterliegen einer ständigen Dynamik aus Fusion und Spaltung, wodurch sie in verschiedenen Formen auftreten können, einzeln oder als verzweigte Netzwerke, was im Ausmaß je nach betrachteter Zellart variieren kann [23, 26].

1.2.2 Substratgebrauch im Herzen

Der Substratgebrauch ist, neben der OXPHOS sowie dem Transport und der Verwertung des ATPs, eine Säule der kardialen Bioenergetik [22]. Das Herz gilt als „metabolischer Allesfresser“ [31], da es nicht nur in der Lage ist, mit verschiedenen Substraten zu arbeiten, sondern gerade die metabolische Flexibilität in der Substratauswahl und damit die Fähigkeit, das unter gegeben Bedingungen ertragreichste Substrat zu bevorzugen, einen Kernpunkt des gesunden kardialen Energiemetabolismus darstellt [29, 31]. Hierdurch sind etwa Reaktionen auf Ernährungszustände wie Überangebot von Nährstoffen oder Fasten möglich [32]. Unter normalen Umständen nutzt das Herz zu ca. 60-90% Fettsäuren zur Energiegewinnung, zu 10-40% Glucose bzw. Lactat und zu geringerem Anteil andere Substrate, insbesondere Ketonkörper [24, 33]. Theoretisch erzeugt die Verbrennung von Glucose pro verbrauchtem Sauerstoff mehr ATP als die Verbrennung von Fettsäuren, beziehungsweise muss bei gegebenem Energiebedarf mehr Sauerstoff zugeführt werden, wenn Fettsäuren anstatt von Glucose verbrannt werden, wodurch die Glucoseverbrennung als effizienter gilt [24]. Welche Substrate in welchem Verhältnis genutzt werden, hängt jedoch neben dem Vorhandensein der notwendigen Enzyme im Gewebe besonders auch von der Plasmakonzentration der Substrate ab [24, 34]. Beispielsweise wird bei Erhöhung der Konzentration freier Fettsäuren im Rahmen andauernder moderater Belastung auch die β-Oxidation gesteigert [35]. Störungen dieser Flexibilität treten als Kernpunkte der metabolischen Schäden im Rahmen der Herzinsuffizienz auf (siehe Abschnitt 1.3).

Der metabolische Phänotyp des Herzens, also die Substratpräferenz bei gegebenem Substratangebot, Durchblutung und Energiebedarf, muss je nach Situation flexibel gesteuert werden und unterliegt einer komplexen Interregulation. Dies ist möglich über eine Beeinflussung der Substrataufnahme oder des Substratumsatzes durch Steuerung der katalytischen

Aktivität von Schlüsselenzymen dieser Prozesse [24]. Während diese kurzfristig reguliert werden kann, läuft die langfristige Regulation des Energiemetabolismus über eine Beeinflussung der Expression dieser Enzyme. Diese wird an prominenter Stelle durch *peroxisome-proliferator-activated receptor α* gesteuert, einen nukleären Transkriptionsfaktor mit zentraler Rolle im Fettstoffwechsel, welcher maßgeblich durch die Co-Aktivierung durch *Peroxisome-proliferator-activated receptor γ coactivator-1α* (PGC-1α) beeinflusst wird [24, 35, 36]. PGC-1α ist für ganze Stoffwechselwege der ATP-Produktion [37] und viele weitere mitochondriale Prozesse relevant, darunter mitochondriale Biogenese, Expression der Komplexe der Atmungskette sowie ROS-Homöostase [38-40]. Aufgrund der zentralen Rolle von PGC-1α im mitochondrialen Stoffwechsel und weil sich gezeigt hat, dass die PGC-1α-Aktivität bei HF deutlich reduziert ist, wird der Dysregulation von PGC-1α eine relevante Bedeutung bei der Pathogenese der HF zugeschrieben [29, 41].

1.2.3 Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

Die OXPHOS läuft über fünf Proteinkomplexe, die Komplex I-V (CI-CV) genannt werden. Sie sind für die Phosphorylierung von ADP zu ATP unter Sauerstoffverbrauch zuständig und bilden damit die gemeinsame Endstrecke der Prozesse der Zelle, die Energie bereitstellen. Abb. 1 liefert eine schematische Darstellung der wichtigsten beteiligten Prozesse.

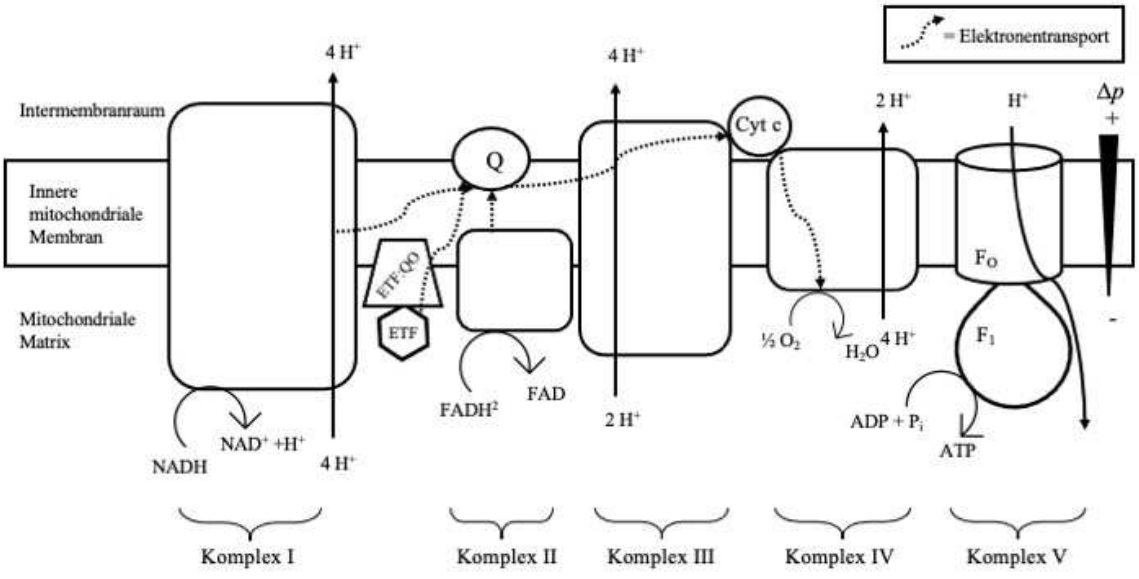

Abb. 1: Schematische Darstellung der Funktion der Atmungskette, modifiziert nach [42-44]. Komplex I, III und IV bauen einen Protonengradienten auf, der durch Komplex V abgebaut und zur ATP-Synthese genutzt wird. Komplex I, II und das ETF-System tragen indirekt durch Reduktion des Ubichinons bei. Somit dienen Glutamat (über CI), Succinat (über CII) und Fettsäuren (über ETF) als Substrate für die Elektronenübertragung [45]. ADP: Adenosin-Diphosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat; Cyt c: Cytochrom c; ETF: *Electron transfer flavoprotein*; ETF:QO: *Electron transfer*

flavoprotein:Ubichinon-Oxidoreduktase; FADH: Flavin-Adenin-Dinukleotid; F_O/F_1: Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V); NADH: Nicotinamidadenindinukleotid; Q: Ubichinon (*Q-junction*); Δp: Protonengradient

Die Proteinkomplexe sind in der inneren mitochondrialen Membran integriert. Gemeinsam bauen CI (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), CIII (Ubichinol-Cytochrom *c*-Oxidoreduktase) und CIV (Cytochrom *c*-Oxidase) einen elektrochemischen Protonengradienten über die innere mitochondriale Membran auf, dessen Potential durch CV (ATP-Synthase) für die Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt wird. Diese Proteinkomplexe lagern sich zu festen Gruppen in definierter Stöchiometrie zusammen und werden dann als Superkomplexe bezeichnet [42]. CII (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase) trägt durch Reduktion des Ubichinons (Coenzym Q) zu Ubichinol indirekt zum Protonengradienten bei, transportiert aber im Gegensatz zu CI und CIII-IV selbst keine Protonen. Mehrere weitere Mechanismen, darunter CI und das Elektronen-transferierende Flavoprotein (ETF) im Zusammenspiel mit der ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase, tragen zur Reduktion von Ubichinon bei, was bei vollständiger Substratsättigung einen zusätzlichen Effekt für den Elektronentransport ausmacht (*Q-junction*) [46, 47]. CIII, CIV und CV bilden die gemeinsame Endstrecke des Elektronentransports. CIV übernimmt die Elektronen des Cytochrom *c* und überträgt sie auf Sauerstoff, wobei Wasser entsteht. CV, die F_1/F_O-ATP-Synthase, nutzt den Abbau des aus CI, CIII und CIV entstandenen Protonengradienten für die Katalyse der Reaktion von ADP und anorganischem Phosphat zu ATP. Hierbei fließen die Protonen durch den in der inneren mitochondrialen Membran befindlichen F_O-Teil, was eine Rotation bewirkt, die wiederum die für die ATP-Synthese nötigen Konformationsänderungen des F_1-Teils bewirkt [43].
In einem geschlossenen System (etwa der Kammer eines Oxygraphen) ist die Aktivität des CIV und damit der gemeinsamen Endstrecke der Atmungskette direkt proportional zum Sauerstoffverbrauch, wodurch über die Messung der Änderung der Sauerstoffkonzentration nach der Zeit eine Aussage über die Aktivität der Atmungskette möglich ist [45]. Es wird definiert (mit *t*=Zeit) [45]:

$$Respiration = -\frac{d[O_2](t)}{dt}$$

Da die Respiration neben der Effizienz der Mitochondrien auch abhängig von ihrer Menge ist, große Proben permeabilisierten Gewebes mit vielen Mitochondrien also mehr Sauerstoff

verbrauchen als kleine, sollte die Respiration auf das Probengewicht normiert werden [45]. Damit wird beschrieben (mit *m*=Masse, *t*=Zeit):

$$Respiration_{Probe} = -\frac{d[O_2](t)}{dt} \cdot \frac{1}{m_{Probe}}$$

1.2.4 Respiratorische Stadien

Nach B. Chance und G. R. Williams werden bei der respirometrischen Messung der oxidativen Phosphorylierung fünf klassische Fließgleichgewichtszustände oder Stadien (englisch *States*) definiert [43, 48]. Diese unterscheiden sich in der Verfügbarkeit für die oxidative Phosphorylierung benötigter Substrate bzw. von Sauerstoff, wodurch die mitochondriale Respiration durch unterschiedliche Schritte limitiert wird (siehe Tabelle 2). Diese klassischen Stadien können in isolierten Mitochondrien erreicht werden, sind als Modell in permeabilisiertem Gewebe aber problematischer, da in diesem teils noch endogene Substrate wie ADP vorhanden sind, die nicht völlig verbraucht werden können [45]. Gnaiger *et al*. unterscheiden daher nach respiratorischen Zuständen in einem neuen System, das auf hochauflösende Respirometrie auch in permeabilisiertem Gewebe ausgelegt ist (siehe Tabelle 3) [45].

Respirationsstadium	**Vorhanden**	**Limitiert durch**
***State* 1**	O_2	ADP, Substrat
***State* 2**	O_2, ADP	Substrat
***State* 3**	O_2, ADP, Substrat	Mitochondriales Membranpotential
***State* 4**	O_2, Substrat	ADP
***State* 5**	ADP, Substrat	O_2

Tabelle 2: **Die klassischen respiratorischen Stadien nach Chance und Williams (1955).** Modifiziert nach [43, 48].

Hierbei kann mit verschiedenen Hemmstoffen gearbeitet werden, die spezifisch Komplexe der Atmungskette inhibieren. So kann etwa, da in permeabilisiertem Gewebe endogenes ADP nicht vollständig verbraucht und damit ein klassischer *State* 4 nicht erreicht werden kann, durch Zugabe von Oligomycin während *State* 3 (bzw. OXPHOS) die ATP-Synthase gehemmt und dadurch ein dem *State* 4 quantitativ sehr naher State 4_O (bzw. LEAK, siehe

Tabelle 3) erreicht werden [45, 49]. In diesem Fall der aufgehobenen Phosphorylierung wird also nur der zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials benötigte Sauerstoffverbrauch gemessen. Der ständige Abbau des Protonengradienten, der das chemiosmotische Potential der mitochondrialen Membran ausmacht, sorgt außerdem dafür, dass ein vollständig gekoppeltes Stadium nicht erreicht werden kann, weshalb Gnaiger *et al*. zwischen partiell gekoppelter und vollständig entkoppelter Respiration unterscheiden. Partiell gekoppelte Respiration im Sinne der OXPHOS-Kapazität entspricht State 3 nach Chance und Williams; vollständige Entkopplung wird im experimentellen Rahmen durch Hinzufügen eines Entkopplers (z.B. Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)) erreicht [49].

Name des Respirationsstadiums	**Erläuterung**	**Entsprechendes klassisches Stadium**
LEAK	Intrinsische Entkopplung, keine Phosphorylierung	*State* 4
OXPHOS	Partiell gekoppelte maximale Phosphorylierung	*State* 3
ETS-Kapazität	Vollständig entkoppelte Respiration	-
ROX	Sauerstoffverbrauch durch oxidative Nebenreaktionen	*State* 2

Tabelle 3: **Von Gnaiger *et al*. vorgeschlagene Unterscheidung respiratorischer Stadien, die auch auf permeabilisiertes Gewebe angewendet werden können** [45]. ETS: Elektronen-transferierendes System; ROX: *Residual oxygen consumption*

1.3 Störungen des Energiemetabolismus bei Herzinsuffizienz

Der Energiestoffwechsel des Herzens ist bei Herzinsuffizienz auf mannigfaltige Weise gestört, insbesondere durch die Beeinträchtigung der Energieproduktion [22], fehlerhaften Substratgebrauch [24] und übermäßige ROS-Produktion [50], aber auch durch die aus dem fehlerhaftem Substratgebrauch resultierende Akkumulation schadhafter Intermediärmeta-bolite [29].

Die Beeinträchtigung der Energieproduktion spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der HF [22, 51], wobei kardiale Mitochondrien bereits in frühen Stadien von Dysfunktionen betroffen sind, die sich im Verlauf progressiv zeigen [52]. Mitochondrien zeigen im

versagenden Herzen eine verringerte Respiration bei unterschiedlichem Substratangebot und inhibierte OXPHOS-Kapazität [24, 53-57]. Durch verminderte OXPHOS wird weniger ATP als unter gesunden Bedingungen zur Verfügung gestellt, was die Kontraktilität der Sarkomere einschränken kann und durch verringerten Sauerstoffverbrauch widergespiegelt wird [22]. Gleichzeitig findet eine vermehrte Katecholaminausschüttung statt, wodurch die Herzarbeit stimuliert und vermehrt ATP umgesetzt wird, was zu erhöhten Konzentrationen von ADP im perimyofibrillären Mikrokompartiment und nahe der sarkolemmalen Ionenpumpen führt. Dies inhibiert die Kontraktilität und limitiert die inotrope Reserve noch weiter [22]. Die verringerte ATP-Bereitstellung erfolgt nicht zuletzt aufgrund einer Verringerung der Expression von Proteinen der Atmungskette sowie der ATP-Synthase [22, 58] und Defekten in diesen Enzymen [24]. Eine zentrale Bedeutung für das verminderte Vorkommen dieser Proteine wird der Verringerung der PGC-1α-Expression sowie der posttranslationalen Modifikation von PGC-1α im versagenden Herzen zugeschrieben [22, 29, 37, 41, 52].

Der Substratgebrauch ist im versagenden Herzen auf bedeutende Weise verändert, wobei insbesondere die charakteristische metabolische Flexibilität des gesunden Myokards (vgl. 1.2.2) eingeschränkt wird [31]. Obwohl nicht gänzlich geklärt ist, ob der Fettsäuren-Gebrauch in frühen Stadien der HF auf einem gleichen Niveau bleibt oder sogar leicht ansteigt, ist weitgehend einheitlich beobachtet worden, dass die Fettsäuren-Oxidation bei fortgeschrittener HF deutlich abnimmt [22, 24, 29, 35, 37, 59, 60]. Hierbei fehlt allerdings eine entsprechende Verringerung der Aufnahme von Fettsäuren in die Myozyten. Da gleichzeitig in fortgeschrittenen HF-Stadien das Angebot durch freie Fettsäuren im Serum erhöht ist [61], führt dies letztlich zu einer Akkumulation von Fettsäuren im Cytosol im Herzen [29, 62]. Hierbei entstehen vermehrt metabolische Intermediate wie Ceramide und Diacylglycerol, die toxisch wirken können [24, 35, 63] und insbesondere den Insulin-Signalweg inhibieren [29, 64]. In frühen HF-Stadien steigt der Verbrauch von Glucose zunächst an, um bei fortschreitender Insulinresistenz im späteren Krankheitsverlauf ebenfalls deutlich abzunehmen [22, 52, 65]. Ein initial gestiegener Beitrag der Glucose-verbrennung ist aufgrund des höheren ATP-Ertrags bezogen auf verbrauchten Sauerstoff (vgl. 1.2.2) zwar günstig, kann aber den Ausfall aus der verringerten Fettsäuren-Oxidation nicht kompensieren [24, 29]. Auch Glucose wird in größerer Menge aufgenommen als oxidiert, wodurch es zur intrazellulären Akkumulation von Glucose und seinen Abbau-produkten kommt, was die Insulinresistenz verstärken kann [66]. Ein Überladen des Herzens mit Substraten für die Energieproduktion, die nicht adäquat weiter verwertet werden können, hat demnach toxische Folgen für die Zelle (Schema: siehe Abb. 2) [66]. Insulinresistenz

könnte daher bei erhöhtem Substrat- und Insulinangebot ein kardioprotektiver Faktor sein, der das Herz zum Teil vor den toxischen Folgen der Substratüberladung schützen kann [67].

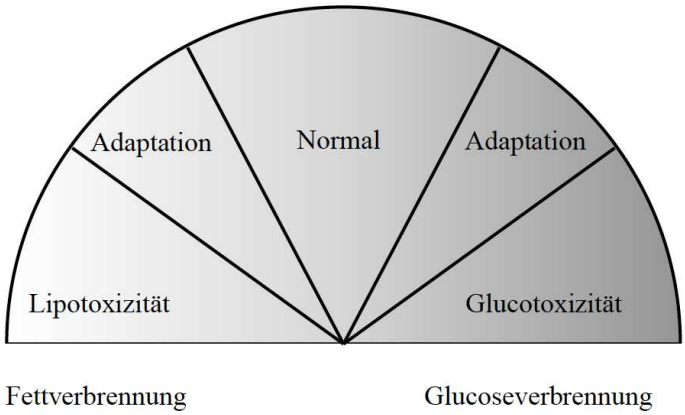

Abb. 2: Schema der Substratauswahl des Herzens nach Taegtmeyer und Ballal [68]. Das gesunde Herz hält demnach ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Glucose- und Fettsäureverbrauch und kann bei Belastung oder Überangebot eines Substrats in einem gewissen Rahmen adaptieren. Beide Extreme können aber toxische Wirkungen auf das Herz entfalten.

Eine geregelte Produktion von ROS dient im gesunden Herzen als wichtiges Signalsystem für viele homöostatische Mechanismen und die Adaptation bei Stress [69]. ROS entstehen bei verschiedenen Schritten des Elektronentransports in der Atmungskette im Mitochondrium, insbesondere an CI und CIII [42], sowie durch die Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidasen und andere Mechanismen [69]. Das häufigste Intermediärprodukt ist hierbei das Superoxidradikal O_2^-, das in der Regel schnell durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt und etwa durch Glutathionperoxidasen eliminiert wird. Auch nichtenzymatische Mechanismen über Antioxidantien existieren. Produktion und Abbau sind eng gekoppelt und sorgen unter gesunden Bedingungen für ein limitiertes Vorkommen und geregelte Signalwege von ROS [50].

Bei HF kommen ROS deutlich vermehrt vor. In den Mitochondrien des versagenden Herzens ist sowohl die Produktion von ROS in der Atmungskette erhöht als auch der Abbau gestört, was zu vermehrtem Anfallen von H_2O_2 und Hydroxylradikalen führt [50, 70]. Dieses Ungleichgewicht führt über verschiedene Wege zu Fehlern im Herzen, darunter Veränderungen des Calciummetabolismus, Begünstigung von Arrhythmien sowie struktureller Umbau durch maladaptive Signale für Hypertrophie, verstärkte Apoptose und Nekrose [50]. Dies führt zu linksventrikulärer Dysfunktion und begünstigt die HF weiter, weshalb ROS eine zentrale und kausale Rolle in der Pathogenese der HF einnehmen [50].

Relevant ist hierbei zusätzlich die Lokalisation des Auftretens von oxidativem Stress: Da in Mitochondrien besonders viele ROS entstehen, sind mitochondriale Prozesse besonders gestört und ist mtDNA, die außerdem durch das Fehlen protektiver Histone um ein vielfaches mutationsanfälliger ist als nukleäre DNA, unmittelbar gefährdet [18, 27, 50].

1.4 Unterschiede der mitochondrialen Funktion bei verschiedener Ätiologie und Komorbiditäten der Herzinsuffizienz

Der metabolische Phänotyp des versagenden Herzens kann je nach Pathogenese und Stadium der HF variieren [24, 52]. Da menschliches Herzmuskelgewebe limitiert zur Verfügung steht, stammen viele Ergebnisse zur mitochondrialen Funktion bei HF aus Tiermodellen [24]. Wenige Studien am menschlichen Herzen stellen mögliche Unterschiede zwischen HF-Patienten mit verschiedener Ätiologie als direkten Vergleich in den Vordergrund.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben verminderte mitochondriale Respiration oder Aktivität der Atmungskette bei HF im Vergleich zu Kontrollen ohne Herzerkrankungen nachgewiesen, was zunächst unabhängig von der Ätiologie der HF war [53-58]. Keine der Studien, die ihre Patienten nach ICM und DCM oder anderen Gesichtspunkten der Pathogenese der HF unterschieden haben, konnte signifikante Unterschiede in der mitochondrialen Funktion darstellen, wobei allen diesen Gruppen relativ geringe Gruppengrößen zur Verfügung standen (siehe auch Abschnitt 4.2). In einem Fall wurde allerdings im direkten Vergleich zwischen ICM und DCM ein nicht signifikanter Trend beschrieben, nach dem die Respiration (normiert auf Proteingehalt) ohne Fettsäuren-Zugabe in ICM-Herzen größer sei als bei DCM [53]. In einigen Fällen wurden Hinweise auf verringerten Mitochondriengehalt bei HF im Vergleich zu nicht-versagenden Herzen durch Messung verringerter CSA gefunden [56, 71], in anderen Fällen aber zeigte sich kein signifikanter Unterschied [54, 58]. Zudem konnten Stride und Kollegen nachweisen, dass die CSA in chronisch ischämischem Myokard im Vergleich zu nicht-ischämischem Muskel reduziert ist [72]. Eine Studie am Myokard herzinsuffizienter Patienten von Ahuja *et al.* aus dem Jahr 2013 verglich direkt Patienten mit ICM und DCM sowie einer Kontrollgruppe [21]. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Mitochondrien bei DCM zahlreicher waren als bei ICM, dabei allerdings abnormale Morphologie aufwiesen und signifikant mehr Mutationen in der mtDNA trugen [21].

Der mitochondriale Stoffwechsel spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Insulinresistenz und T2DM [64, 73], wobei Diabetes-assoziierte Stoffwechselveränderungen wesentlich zur Pathogenese der HF beitragen können [29, 62]. Andersherum beeinträchtigen Insulinresistenz und T2DM die mitochondriale Funktion im Herzen [74-79] und, möglicherweise dadurch [80], die Ischämietoleranz des Myokards [81]. Durch Insulinresistenz bei T2DM ist das Herz darüber hinaus in besonderer Weise auf Fettsäuren als Energieträger angewiesen [82] und verliert seine Flexibilität, auf Änderungen des Substratangebots zu reagieren [83]. Eine Zusammensetzung der Patientengruppen, die im Hinblick auf den T2DM-Status nicht vergleichbar sind, wäre demnach ein möglicher Störfaktor bei der Untersuchung der mitochondrialen Funktion und des Substratgebrauchs bei HF bzw. bei ICM und DCM.

Als niederschwellig zugängliche klinische Parameter für Diabetes und Glykämie werden häufig das glykierte Hämoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) und der momentane Glucosespiegel im Blut herangezogen. Der HbA_{1c}-Wert unterliegt gewissen Unsicherheiten und ist insbesondere abhängig von der Lebensdauer der Erythrozyten und damit von etwaigen Bluttransfusionen, welche perioperativ bei Patienten mit terminaler HF häufig vorkommen können [84]. In der Analyse eines anderen Arms der hier vorliegenden Studie zeigte der HbA_{1c} keinen Zusammenhang mit der myokardialen mitochondrialen Respiration, wohl aber die momentane Blutglucose [44]. Es gibt außerdem Anzeichen dafür, dass HbA_{1c} und Glucosespiegel bei Patienten mit oder ohne Diabetes unterschiedliche Zusammenhänge mit der Funktion der kardialen Mitochondrien haben kann [79].

1.5 Mitochondrien als mögliches Therapieziel bei Herzinsuffizienz

Der mitochondriale Stoffwechsel und die Energieproduktion ist bei HF in vielfacher Weise gestört und präsentiert sich damit als attraktives Feld für die Suche nach neuen Therapieansätzen. Die aktuellen Therapieregime konzentrieren sich darauf, den Energieverbrauch des Herzens zu senken und damit die Disbalance zur gestörten Energieproduktion zu beseitigen, wobei aber eine reduzierte Energiereserve und Belastungstoleranz bestehen bleiben [18]. Neue Ansätze könnten dazu beitragen, die Bereitstellung von Energie für das geschwächte Herz unmittelbar zu erhöhen und damit die potentielle Reversibilität der Kontraktionsschwäche zu nutzen, die in vielen Fällen besteht [18, 85]. Diese Ansatzpunkte bestehen unter anderem in der Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese und des Substratgebrauchs für die Energiegewinnung, von Schäden der Atmungskette sowie in der

Modulation der ROS-Produktion der kardialen Mitochondrien [18, 19]. Die Ideen in diesen Bereichen sind vielfältig und in mehreren Übersichtsarbeiten ausführlich behandelt worden [18-20, 52, 85]. In der klinischen Testphase [86] befindet sich beispielsweise Elamipretid, ein Tetrapeptid, welches sich mit Cardiolipin verbindet, die Expression der Enzyme der Atmungskette erhöht und in sogenannten Superkomplexen (vergleiche Abschnitt 1.2.3) stabilisiert, womit es zu verbesserter Respiration, höherer maximaler ATP-Produktion und geringerer ROS-Produktion bei Herzinsuffizienz beitragen kann [20, 87]. Auf ätiologische Unterschiede wird teils bereits besonderes Augenmerk gelegt: Im speziellen Fall des Wirkstoffs Trimetazidin hat sich bereits gezeigt, dass dieses Medikament bei HF ischämischer [88] bzw. nicht-ischämischer Genese [89] unterschiedliche Effektivität zeigt. Auch eine klinische Studie zur Substitution von Coenzym Q zeigte einen nicht-signifikanten Trend, nach dem Coenzym Q-Substitution bei Herzinsuffizienzpatienten mit DCM eine bessere Wirksamkeit haben könnte als bei Patienten mit anderer HF-Genese [90].
Auch bestehende Therapien haben Effekte auf den Energiestoffwechsel bei fortgeschrittener HF gezeigt. Kardiales *unloading* mittels LVAD kann zur Erholung des Herzens beitragen, da hierbei unter anderem zelluläre Hypertrophie [91], mtDNA-Schäden [21] sowie die ROS-Belastung reduziert [92] und Lipotoxizität durch Ceramide und Diacylglycerol im Herzen sowie Insulinresistenz im gesamten Körper verringern werden können [93]. Interessanterweise trägt die LVAD-Therapie bei ICM-Herzen, nicht aber bei DCM-Herzen, durch Normalisierung des Gehalts und der Zusammensetzung des Cardiolipins zur Erholung der mitochondrialen Funktion bei [94].

1.6 Myokardiale Inflammation bei Herzinsuffizienz

1.6.1 Inflammation und Fibrose im versagenden Herzen

HF wird in vielen Fällen durch einen Zustand chronischer Inflammation begleitet, wobei sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem eine wichtige Rolle spielen [95, 96]. Das angeborene Immunsystem wird durch *pattern recognition receptors* aktiviert, welche unter anderem auf Kardiomyozyten exprimiert werden, wodurch proinflammatorische Signalkaskaden in Gang gesetzt werden [95]. Die Expressionsmuster hiermit verbundener Gene unterscheiden sich zwischen Patienten mit ICM oder DCM [97]. Fortgeschrittene HF wird durch erhöhte Spiegel zirkulierender proinflammatorischer Zytokine begleitet, was mit verschlechterten klinischen Resultaten vergesellschaftet ist [96,

98, 99]. Auch myokardiale Infiltration mit Makrophagen besteht bei HF, dies bei ICM und DCM in vergleichbarem Ausmaß [100]. Makrophagen sind eine heterogene Zellart und können pro- und antiinflammatorische Wirkungen haben. Bei myokardialem Schaden infiltrieren sie das Herz und tragen zu strukturellem Umbau und Fibrosierung bei [101].

Während das angeborene Immunsystem eine globale und unspezifische Antwort auf Stressoren liefert, reagiert das erworbene Immunsystem gezielter. T-Zellen machen den Hauptteil der zellulären Immunantwort aus und infiltrieren das Herz sowohl unter infektiösen (z.B. virale Myokarditis) als auch unter sterilen Bedingungen (z.B. Ischämie oder abnormale Druckbedingungen) [102]. Diese kardiale T-Zell-Rekrutierung tritt bei Patienten mit ischämischer sowie nicht-ischämischer HF auf [102-105]. T-Zellen exprimieren das Oberflächenprotein *cluster of differentiation* (CD) 3 und lassen sich grob in CD8-positive zytotoxische T-Zellen und CD4-positive T-Helferzellen einteilen. Sowohl unter ischämischen als auch nicht-ischämischen Bedingungen kann eine bei HF dysregulierte zelluläre Immunantwort zu myokardialem Schaden beitragen [95]. Gesteigerter oxidativer Stress durch ROS sowie verringerte OXPHOS bei HF begünstigen kardiale Inflammation [70, 106]. Kürzlich konnte außerdem beschrieben werden, dass bei höherer kardialer Inflammation bei Transplantatabstoßung auch die myokardiale OXPHOS eingeschränkt ist [107]. Kardiale Inflammation nimmt damit eine zentrale Position in der metabolischen Abwärtsspirale bei HF ein, die durch geschädigte Mitochondrien getragen wird [70].

Sowohl kardiale Inflammation als auch oxidativer Stress bei mitochondrialem Schaden begünstigen die Entwicklung myokardialer Fibrose [108, 109]. Fibrosierung ist zunächst ein adaptiver Mechanismus mit Reparaturfunktion und tritt sowohl bei ischämischer als auch nicht-ischämischer HF auf [109]. Bei andauernder Aktivierung von Fibroblasten – wie durch übermäßigen oxidativen Stress – wird übermäßige Fibrosierung jedoch zum maladaptiven Mechanismus und schädigt das Herz in Struktur und Funktion [109]. Das Ausmaß kardialer Fibrose bei HF ist ein unabhängiger Prädiktor für schlechte klinische Verläufe und höhere Mortalität [108], wobei unklar ist, ob Patienten mit ischämischer bzw. nicht-ischämischer HF-Genese höhere Grade von Fibrosierung aufweisen. Bisherige Elemente der Therapie von HF und koronarer Herzerkrankung, z.B. *Angiotensin converting enzyme* (ACE)-Hemmer, Mineralocorticoid-Rezeptorantagonisten und Statine, sind in der Lage, direkt oder indirekt myokardiale Fibrosierung günstig zu beeinflussen, während gleichzeitig an neuen Strategien der Reduktion maladaptiver Fibrosierung gearbeitet wird [110]. In Großtiermodellen haben sich zudem Hinweise auf eine günstige Beeinflussung der myokardialen Fibrosierung nach

Myokardischämie durch *sodium-glucose cotransporter* 2 (SGLT2) -Inhibitoren gezeigt [111, 112], hierüber fehlen jedoch zurzeit noch belastbare Daten von menschlichen Herzen.

1.6.2 Immunsuppressive Therapie bei Herzinsuffizienz

Bereits in den 1980er Jahren wurden Studien zu möglichem Nutzen von Immunsuppression mittels Prednison bei Patienten mit HF aufgrund von DCM entwickelt. Damals waren die klinischen Vorteile gering und eine immunsuppressive Therapie konnte nicht empfohlen werden [113]. Verbesserte Selektion der Patienten konnte in einer weiteren Studie bereits zu einem Nachweis erhöhter LVEF nach bis zu zwei Jahren bei Patienten mit HF aufgrund von DCM und Immunsuppression mittels Prednison und Azathioprin beitragen [114]. Eine retrospektive Analyse von Patienten mit Myokarditis ergab zudem eine bedeutend bessere Wirksamkeit immunsuppressiver Therapie nach dem Ausschluss kardiotroper Viren in der Myokardbiopsie [115]. Diese Entdeckung bildete die Grundlage mehrerer erfolgreicher klinischer Studien, die weitere kurz- und langfristige Vorteile immunsuppressiver Therapie bei Patienten mit nicht-ischämischer, inflammatorischer Kardiomyopathie nachweisen konnten [116-119].

In der jüngeren Zeit haben klinische Studien zur immunsuppressiven Therapie auch bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung mit oder ohne systemische Inflammationszeichen stattgefunden. Dies geschah jedoch meist nicht mit dem Blick auf HF-assoziierte Endpunkte, sondern mit dem primären Ziel, die Rate kardiovaskulärer Ereignisse wie Myokardinfarkte zu senken, oder Endpunkte wie die Infarktgröße nach akutem Myokardinfarkt und Koronarintervention zu verbessern, was wechselhaften Erfolg lieferte [120-122]. Meist wurden zudem Patienten mit fortgeschrittener HF aus der Kohorte ausgeschlossen [120, 121]. Als *proof of principle* diente schließlich die *Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study* (CANTOS) [123]. Diese testete Canakinumab, einen monoklonalen Antikörper gegen Interleukin-1β mit antiinflammatorischer Wirkung, bei Patienten mit Myokardinfarkt in der Vorgeschichte und mit hochsensitivem C-reaktivem Protein (CRP) im Serum von mehr als 2 mg/L. Hierbei konnte durch Gabe von Canakinumab eine Reduktion von Myokardinfarkten, Schlaganfällen und kardiovaskulär bedingten Todesfällen im Vergleich zur Placebo-Gruppe herbeigeführt werden, während sich systemische Entzündungsparameter wie Interleukin-6 und hochsensitives CRP verringerten [123]. Eine Subanalyse dieser Studie zeigte zwar keinen signifikanten Vorteil der Gabe einer bestimmten Dosis Canakinumab, aber einen Trend zu dosisabhängiger Risikoreduktion bezüglich Hospitalisierungen aufgrund von HF bzw. HF-bedingten Todesfällen nach

Canakinumab-Gabe [124]. Hierbei lagen allerdings keine Informationen über die anfängliche LVEF der Patienten vor; auch wurden hochsensitives CRP und Interleukin-6 im Serum als einzige Marker für Entzündung betrachtet. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob auch Patienten mit ischämisch bedingter HF und mit manifester, histologisch gesicherter zellulärer myokardialer Inflammation deutlicher von immunsuppressiver Therapie profitieren könnten.

1.7 Ziele der Arbeit

Vor dem Hintergrund möglicher Therapieoptionen ist es klinisch relevant, über den Energiemetabolismus bei Herzinsuffizienzpatienten mit unterschiedlicher Ätiologie und unterschiedlichem myokardialem Inflammationsstatus genauere Informationen zu erhalten und potentielle Unterschiede zu identifizieren. In der bestehenden Literatur wird regelmäßig auf die Schwierigkeit hingewiesen, die durch die Heterogenität der HF-Ätiologien für die Untersuchung des Energiestoffwechsels besteht [24, 52, 56].

Ziel dieser Arbeit war, den myokardialen Energiemetabolismus von Patienten mit HF aufgrund von ICM und DCM genauer zu analysieren. Es sollte herausgestellt werden, inwiefern myokardiale Inflammation bei Patienten unterschiedlicher HF-Genese besteht und wie sich diese zur mitochondrialen Funktion verhält.

Daraus folgen die Hypothesen:

1. Die mitochondriale Respiration unterscheidet sich bei herzinsuffizienten Patienten, je nachdem, ob der Krankheit eine ICM oder DCM zugrunde liegt.
2. ICM und DCM sind unterschiedlicher Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies ausgesetzt.
3. Das Ausmaß der Fibrosierung sowie Inflammation im Myokard unterscheidet sich zwischen Patienten mit ICM und DCM.
4. Myokardiale Fibrose und Inflammation korrelieren mit mitochondrialer OXPHOS und oxidativem Stress im Herzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Blutentnahme

- Medizinische Untersuchungshandschuhe (Abena® Classic Nitrile Powder-Free, REF 290420, Abena GmbH, Zörbig, Deutschland)
- Hautantiseptikum (kodan® Tinktur forte farblos 250ml Flasche, Art.-Nr.: 104005, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Venenstauer (medimex Venenstauer classic, Art.-Nr.: 8M50100001, medimex GmbH, Limburg, Deutschland)
- Blutentnahmeset mit Halter (BD Vacutainer® Safety-Lok™ 21G (0,8 mm x 19 mm)/23G (0,6 mm x 19 mm), 305mm Schlauch, Luer-Adapter, REF 367286/367288, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Serum-Röhrchen 3,5mL/5mL (BD Vacutainer® SSTTM II Advance Plus Collection Blood Tubes, REF 367955/367957, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Citrat-Röhrchen 2,7 mL (BD Vacutainer® 9NC 0.129M, REF 363079, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- EDTA Blutbild-Röhrchen 3 ml (BD Vacutainer® K_2EDTA 5,4 mg, Plus Blood Collection Tubes, REF 368499, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Einmalhalter aus Kunststoff (BD Vacutainer® Einmalhalter, REF 364815, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Einmalspritze (B. Braun Injekt® Solo 2 mL/5 mL/10 mL/20 mL, Luer-Ansatz, REF 4606027V/4606051V/4606108V/4606205V, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Pflasterrolle (3M™ Transpore™ REF 1527-1; 2,5 cm x 9,1 m, 3M Deutschland GmbH Health Care Business, Neuss, Deutschland)
- Zellstofftupfer (L&R Zelletten®, 5 cm x 4 cm, REF 13356, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KGm Rengsdorf, Deutschland)

Labormaterialien

- Substratspritzen (Hamilton® Syringe 700 Series, 10µL [REF 80365]; 25 µL [REF 80465]; 50 µL [REF 80521], Hamilton Central Europe S.R.L., Ghiroda, Rumänien)

- Pipettenspitzen (epT.I.P.S.® Reloads 2-200 µl, LOT: F168959O; epT.I.P.S.® Reloads 50-1000 µl, LOT: F168847O; epT.I.P.S.® Standard/Bulk 100-5000 µl, LOT: F168993O, Eppendorf AH, Hamburg, Deutschland)
- 6-*well*-Zellkulturplatten (VWR® Treated Tissue Culture Plates: 6 wells, sterile, REF: 734-2323, VWR International, LLC, Radnor, USA)
- Reaktionsgefäß 1,5 mL (Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1.5 mL, LOT F169519P, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Röhrchen konisch 15 mL/50 mL (Falcon® 15 mL/50 mL High-Clarity Polypropylene Conical Tube, REF 352096/352098, Corning Science Mexico, Reynosa, Tarnaulipas, Mexiko)
- Filterpapier (VWR® Qualitative filterpaper, 410, REF 516-0804, VWR International, Leuven, Belgien)
- Vernichtungsbeutel (oehmen® Vernichtungsbeutel 300mm x 200mm x 0,05mm, Art.-Nr.: VB20, Oehmen Labortechnik, Essen, Deutschland)
- Glaskügelchen (Glas-Beads, 2mm, Katalog-Nr.: 1.04014, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 96-*well*-Platte (Greiner CELLSTAR® 96 well plate, Nr. 655180, M0812 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Hochauflösende Respirometrie

- Saponin aus der Quillaja-Rinde (S7900 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Malat (M1000 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)
- Glutamat (G1626 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)
- Succinat (S2378 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)
- Cytochrom c (C7752 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)
- Octanoyl-Carnitin (Katalog-Nr. 0605, TOCRIS Bioscience, Bristol, UK)
- Adenosin-Diphosphat (A5285 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)
- Oligomycin (O4876 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)
- Rotenon (R8875 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)

- Antimycin A (A8674 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)
- Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (C2920 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)
- Amplex® Red Reagens (A12222 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Meerrettich-Peroxidase (J60026.MC Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30% (H1009 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

Pufferlösungen

MiRO5 Oxygraphenpuffer, bestehend aus:

- Ethylenglycol-bis(aminoethylether-)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) [0,4 mmol/L] (E4378, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2$ $6H_2O$) [3 mmol/L] (M2670, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Kalium-Lactobionat [60 mmol/L] (153516, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Taurin [20 mmol/L] (T0625 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- KH_2PO_4 [10 mmol/L] (P5655 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) [20 mmol/L] (H7523, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Sucrose [110 mmol/L] (S7903 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Bovines Serum-Albumin [1g/L] (A6003 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

BIOPS Transport- und Aufbewahrungspuffer, bestehend aus:

- CaK_2 Ethylenglycol-bis(aminoethylether-)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) [2,77 mmol/L], enthaltend: EGTA (E4378 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland); $CaCO_3$ (C4830 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland)

- K_2EGTA [7,23 mmol/L], enthaltend: EGTA (E4378 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland); Kaliumhydroxid (P1767 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Na_2ATP [5,8 mmol/L] (A2383, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2$ $6H_2O$) [6,56 mmol/L] (MA 0036, Scharlab, Scharlau, Barcelona, Spanien)
- Taurin [20 mmol/L] (T0625, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Na_2Phosphocreatin [15 mmol/L] (P7936, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Imidazol [20 mmol/L] (56750, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure [50 mmol/L] (M8250, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Dithiothreitol (DTT) [0,5 mmol/L] (D0632, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

Citratsynthase-Aktivitätsmessung und Gesamtproteinbestimmung

- CelLytic™ MT Cell Lysis Reagent (C3228 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Proteasehemmer-Cocktail (P8340 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- *Assay*-Puffer für Citratsynthase (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 Lithiumsalz (A2181 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Citratsynthase (C4741 Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Oxalacetat (O4126 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)

2.1.3 Geräte

- Oxygraph (Oroboros® Oxygraph-2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich)
- Fluoreszensensor (Fluorescence-Sensor Green, O2k-Fluo LED2-Module for hydrogen peroxide, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich)
- Waage (ME-T Analysenwaage XP205, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA)
- Schüttelmaschine (VWR® Standard Analog Shaker, STD 3500, SN: 100831001, Model-Nummer: 980302EU, VWR International, Leuven, Belgien)
- Gewebehomogenisierer (TissueLyser II, Katalog-Nr.: 85300, Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Pipetten 2,5/10/100/1000/5000µl (Eppendorf Research® plus, Einkanal, Katalog-Nr. 3120000011/3120000020/3120000046/3121000120/3120000070, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- pH-Meter (PHM 220, MeterLab, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Vortexer (Reax™ top, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Zentrifuge (Heraeus™ Fresco™ 17 Microcentrifuge, 75002420, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Inkubator (Incubator Classic-Line, BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Detektionsplattenleser/Mikroplatten-*Reader* (Infinite® M Plex, Tecan, Männedorf, Schweiz)

2.1.4 Software

- DatLab® Version 6.1.0.7 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich)
- GraphPad Prism® Version 9.2.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA)
- IBM® SPSS® Version 27.0.1 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA)
- Microsoft Office® 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- i-control™ (Tecan, Männedorf, Schweiz)

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

In die vorliegende Studie wurden herzinsuffiziente Patienten eingeschlossen, um Einblicke in den Energiemetabolismus sowie Entzündungsreaktionen im versagenden menschlichen Herzen zu erhalten. In andere, hier nicht analysierte Arme der Studie wurden außerdem Patienten eingeschlossen, bei denen eine Myokardbiopsie aus anderen Gründen, z.B. virale Myokarditiden oder Abstoßungsscreening nach HTX, durchgeführt wurde. Diese prospektive, unizentrische Studie wurde am 21.12.2015 von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Aktenzeichen 5263R). Es handelt sich um eine Unteranalyse der unter *www.clinicaltrials.gov* mit der Registrierungsnummer NCT03386864 eingetragenen Studie. Das Studienprotokoll folgte den Richtlinien der Deklaration von Helsinki der *World Medical Association*. Alle eingeschlossenen Patienten gaben nach Aufklärung durch einen Studienarzt ihr informiertes schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

2.2.2 Patientenkohorte

Der Einschluss der hier untersuchten Patienten erfolgte zwischen Mai 2016 und Januar 2020. Alle Patienten hatten eine terminale HFrEF aufgrund einer ICM oder DCM mit ausgereizter konservativer Therapie und befanden sich zum stationären Aufenthalt in der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf, entweder zur Implantation eines LVAD oder zur HTX. Patienten, die vor der HTX bereits unter LVAD-Therapie gestanden hatten, wurden nicht untersucht, da der HTX vorausgegangenes linksventrikuläres *unloading* mittels LVAD einen Einfluss auf den myokardialen Energiestoffwechsel haben kann [21, 92, 93].

Folgende Ausschlusskriterien durften nicht auf die Patienten zutreffen:

- Alter <18 Jahre oder >80 Jahre
- Schwangerschaft
- Aktive Krebserkrankung
- Infektionserkrankungen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus, Hepatitis B, Hepatitis C oder ein hohes Risiko hierfür
- Immunschwächeerkrankungen
- Infektionserkrankungen in den der Untersuchung vorausgegangenen zwei Wochen
- Suchterkrankungen (Alkohol, Drogen)

Es wurden zunächst 124 Patienten eingeschlossen, die eine LVAD-Implantation (n=91) oder eine HTX erhielten (n=33). In anderen Armen dieser Studie wurden einige dieser Patienten zu anderen Zeitpunkten erneut untersucht, insbesondere im Rahmen von Verlaufs-Myokardbiopsien nach erfolgter HTX oder bei HTX nach erfolgter LVAD-Therapie. In der vorliegenden statistischen Auswertung wurde dabei von jedem Patienten nur ein Ereignis gewertet. Von den eingeschlossenen 124 Patienten wurden diejenigen Patienten aus der Analyse entfernt, die vor der HTX bereits eine LVAD-Therapie erhalten hatten (n=8), da dies die mitochondriale Funktion beeinflussen kann [21, 91-94], die andere Ätiologien ihrer HF als ICM oder DCM hatten (n=9, z.B. fulminante virale Myokarditis, Hypertrophe Kardiomyopathie usw.), Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 (n=1), Patienten mit DCM und zusätzlicher koronarer Herzerkrankung (n=4) sowie Patienten, die nach HTX ein LVAD implantiert bekamen (n=1). Von den übrigen 101 Patienten wurden alle Messungen verworfen, bei denen die äußere mitochondriale Membran nicht als intakt angesehen werden konnte (siehe Abschnitt 2.2.4), bei denen das Probengewicht außerhalb des Zielbereichs von 0,5 mg bis 1,5 mg lag, die mindestens eine Respiration unter OXPHOS-Bedingungen von 30 pmol O_2/(s*mg) aufwiesen, oder bei denen aufgrund von Gerätedefekten der verwendeten Oxygraphen keine Messung möglich war (n=20). Entsprechend lagen die Messergebnisse von 81 Patienten zur Auswertung vor (n(ICM)=44, n(DCM)=37 bzw. n(LVAD)=59, n(HTX)=22).

2.2.3 Studienablauf

2.2.3.1 Blutabnahme

Allen Patienten wurde möglichst unmittelbar vor der Operation Vollblut venös nach Venenpunktion oder aus einem bereits liegenden zentralen Venenkatheter entnommen und auf die in Tabelle 4 aufgezählten Parameter untersucht:

Materialart	Untersuchte Parameter
Serum	Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Magnesium, Creatinin, Cystatin C, Harnstoff, Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), γ-Glutamyltransferase, alkalische Phosphatase, Bilirubin, Cholinesterase, Laktat-Dehydrogenase, Creatin-Kinase, Gesamt-Eiweiß, Albumin, C-reaktives Protein, hochsensitives Troponin T

EDTA-Vollblut	Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), Hämoglobingehalt (MCH) und Hämoglobinkonzentration (MCHC), Thrombozyten, Hämoglobin A1c (HbA1c)
Citrat-Plasma	Quick, International Normalized Ratio (INR), Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

Tabelle 4: Im Blut der Studienpatienten analysierte Parameter.

Überschüssiges Probenmaterial wurde bei -80°C eingefroren, um für spätere Analysen zur Verfügung zu stehen. Aus der ersten Blutgasanalyse, die standardmäßig während der Operation durchgeführt wurde, konnten außerdem die momentane Blut-Glucosekonzentration und der Lactatspiegel übernommen werden.

2.2.3.2 Gewebeakquisition

2.2.3.2.1 Im Rahmen der LVAD-Implantation

Zur Implantation eines LVAD (HeartWare HVAD®, Medtronic plc, Dublin, Irland oder HeartMate 3® LVAD, Abbott Laboratories, Abbott Park, USA) werden die *Aorta ascendens* und der linksventrikuläre Teil des *Apex cordis* entweder mittels Sternotomie oder partieller Sternotomie mit zusätzlicher lateraler Thorakotomie links freigelegt. Nach Anschluss der Herz-Lungenmaschine und Aufnähen eines Halterings wird der apikale Teil des linken Ventrikels zirkulär exzidiert, um den Einflusstrakt des Unterstützungssystems in den Ventrikel einbringen zu können, und der Ausflusstrakt des Geräts mit der *Aorta ascendens* anastomosiert.

Aus dem herausgeschnittenen Stück des kardialen Apex wurde ein muskelreiches und makroskopisch narbenfreies Stück Myokard abgetrennt und unmittelbar in BIOPS-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.2) in einem 15 mL-Röhrchen auf Eis gekühlt transferiert. Der Transport ins Labor zur hochauflösenden Respirometrie wurde in den folgenden Minuten sichergestellt.

2.2.3.2.2 Im Rahmen der Herztransplantation

Bei der orthotopen Herztransplantation in bicavaler Technik wird das erkrankte Herz des Organempfängers nach Sternotomie, Präparation und Anschluss der Herz-Lungenmaschine an beiden *Venae cavae*, der *Aorta ascendens*, dem *Truncus pulmonalis* sowie dem linken

Vorhof aus dem Mediastinum getrennt. Das vorbereitete und zuvor im Operationssaal eingetroffene Spenderherz wird an den entsprechenden Stellen anschließend mit den nun entstandenen Gefäßstümpfen des Empfängers anastomosiert.
Aus der apikalen freien Wand des linken Ventrikels des erkrankten Herzens wurde ein muskelreiches und makroskopisch narbenfreies Stück herausgetrennt und unmittelbar in auf Eis gekühlten BIOPS-Puffer in einem 15 mL-Röhrchen transferiert. Der Transport ins Labor wurde in den folgenden Minuten sichergestellt und die Probe schnellstmöglich der hochauflösenden Respirometrie zugeführt. Für andere, hier nicht untersuchte Arme dieser Studie wurden in selber Weise auch aus beiden Vorhöfen sowie dem rechtsseitigen interventrikulären Septum Myokardproben entnommen, mit denen wie oben beschrieben verfahren wurde.

Ein Teil des nicht für die hochauflösende Respirometrie verbrauchten Materials wurde in Aufbewahrungsröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert, um später zu diagnostischen Zwecken durch die Histopathologie des Instituts für kardiale Diagnostik und Therapie (IKDT, Berlin, Deutschland) – unter Verblindung gegenüber allen patientenbezogenen Daten und Ergebnissen aus den sonstigen Experimenten – im Hinblick auf myokardiale Inflammation sowie Fibrose begutachtet zu werden [107]. Hierbei wurden insbesondere mittels computergestützter automatischer Zählung folgende Marker berücksichtigt: CD3 (Lymphozyten), CD4 (T-Helferzellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen), CD45R0 (T-Memoryzellen) und CD68 (Makrophagen). CD4, CD8, CD68 und CD45R0 wurden bei denjenigen Patienten erhoben, bei denen eine Infiltration von mehr als 7 CD3-positiven Lymphozyten pro mm^2 vorlag. Eine myokardiale Infiltration von 14 CD3-positiven Lymphozyten pro mm^2 oder mehr wurde als relevante Inflammation betrachtet, da dieses Inflammationsausmaß mit den diagnostischen Kriterien der inflammatorischen Kardiomyopathie vergleichbar ist, die ebenfalls mindestens 14 Zellen pro mm^2 voraussetzen [125].

2.2.4 Hochauflösende Respirometrie

Hochauflösende Respirometrie ist ein etabliertes und genaues Verfahren zur Analyse des Sauerstoffverbrauchs von Mitochondrien *in vitro* [49, 64]. Hierzu wurden die Myokardproben im Labor mittels feiner Pinzetten in BIOPS-Puffer unter ständiger Kühlung auf Eis separiert und in einzelne Fasern zerlegt. Um die Zellmembranen zu permeabilisieren und so die Mitochondrien den später zugeführten Substraten im Sinne der *skinned-fiber*-Methode

[126] zugänglich zu machen, folgte eine Inkubation mittels Saponin in einer Konzentration von 50 µg/mL über 30 Minuten unter ständiger Kühlung auf Eis und auf einer Schüttelmaschine (VWR® Standard Analog Shaker, VWR International, Leuven, Belgien) mit 80 Umdrehungen pro Minute. Saponin geht Bindungen mit Cholesterin ein, welches in der Plasmamembran der Zelle gehäuft vorkommt, in viel geringerer Menge aber in den Membranen der intrazellulären Organellen wie den Mitochondrien. Hierdurch wird die Plasmamembran aufgelöst, während die Mitochondrien intakt bleiben, wobei das Zytosol ausgewaschen und schnell durch Respirationsmedium ersetzt wird [127]. Um das Saponin und insbesondere Spuren von ADP und ATP auszuwaschen [127], fanden zwei Wasch-Schritte statt, in denen die Proben in MiRO5-Puffer für jeweils zehn Minuten bei 80 Umdrehungen pro Minute während ständiger Kühlung auf Eis auf der Schüttelmaschine behandelt wurden. Anschließend wurden die Proben auf durch vorsichtiges Tupfen auf Filterpapier getrocknet und gewogen. Je eine Probe mit einem Gewicht zwischen 0,5 mg und 1,5 mg wurde in eine der zwei Kammern der Oxygraphen (Oroboros® Oxygraph-2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich), gefüllt mit 2,3 mL MiRO5-Puffer bei 37°C, transferiert und die Messung begonnen. Alle Respirometrie-Experimente wurden demnach als Duplikate durchgeführt und der Mittelwert zweier Messungen als Ergebnis verwendet. Nach Verschluss der Kammer mit einem Stopfen folgte eine Hyperoxygenierung bis auf 400-450 nmol/mL. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs im geschlossenen System der Kammer und damit die mitochondriale Respiration wurde mittels einer im Gerät verbauten Clark-Elektrode bestimmt und mittels DatLab®-Software aufgezeichnet (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich). Nicht für die Respirometrie genutztes Gewebe wurde aus der Pufferlösung geborgen, getrocknet und gewogen und mittels flüssigen Stickstoffs in Aufbewahrungsröhrchen schockgefroren, um bei -80°C aufbewahrt werden zu können.

Mit den permeabilisierten Fasern wurden zwei Messprotokolle durchgeführt, die in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelistet sind.

Substrat	**Konzentration im Oxygraphen**	**Erreichter Respirationsmodus**
Malat	2 mmol/L	
Octanoyl-Carnitin	1 mmol/L	
Adenosin-Diphosphat	2,5 mmol/L	CETF

Glutamat	10 mmol/L	CETF+CI
Succinat	10 mmol/L	CETF+CI+CII (OXPHOS)
Cytochrom c	10 µmol/L	Kontrollschritt
Oligomycin	5 µmol/L	*LEAK/State* 4_O
FCCP	In 0,2 µmol/L-Schritten titriert	ETS-Kapazität*/State u*
Rotenon	0,5 µmol/L	ETS-Kapazität CII
Antimycin A	5 µmol/L	ROX

Tabelle 5: Substratreihenfolge und -konzentrationen im Messprotokoll mit mittelkettigen Fettsäuren. CETF: Kapazität des Elektronen-transferierenden Flavoproteins; CI/CII: Komplex I/II der Atmungskette; ETS: Elektronen-transferierendes System; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon; OXPHOS: oxidative Phosphorylierung; ROX: *residual oxygen consumption*

Substrat	**Konzentration im Oxygraphen**	**Respirationsmodus**
Malat	2 mmol/L	
Glutamat	10 mmol/L	
Adenosin-Diphosphat	2,5 mmol/L	CI
Succinat	10 mmol/L	CI+CII (OXPHOS)
Rotenon	0,5 µmol/L	CII
Cytochrom c	10 µmol/L	Kontrolle
Oligomycin	5 µmol/L	*LEAK*
FCCP	In 0,2 µmol/L-Schritten titriert	ETS-Kapazität CII
Antimycin A	5 µmol/L	ROX

Tabelle 6: Substratreihenfolge und -konzentrationen im Messprotokoll mit direkter Stimulation der Atmungskette. CI/CII: Komplex I/II der Atmungskette; ETS: Elektronen-transferierendes System; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon; OXPHOS: oxidative Phosphorylierung; ROX: *residual oxygen consumption*

Die Substrate wurden nacheinander in der aufgeführten Reihenfolge den Kammern zugeführt, jeweils nachdem sich der Sauerstoffffluss auf einem plateauartig-konstanten Niveau eingefunden hatte. Sättigung der Oxygraphenkammer mit Malat, Octynoylcarnitin und Adenosin-Diphosphat ergibt die fettsäureabhängige Respiration (Kapazität des Elektronen-transferierenden Flavoproteins, CETF). Hinzugabe von Glutamat als Substrat des Komplex I sowie Succinat für Komplex II führt zur Messung der maximalen oxidativen Kapazität (OXPHOS) der Atmungskette. Die Sättigung des Oxygraphen mit Cytochrom c

dient als Kontrolle der Intaktheit der äußeren mitochondrialen Membran. Bei einem Anstieg der Respiration von mehr als 15% nach Zugabe von Cytochrom c ist davon auszugehen, dass diese Membran geschädigt ist, weshalb eine entsprechende Messung als nicht verwertbar angesehen werden muss [127]. Oligomycin hemmt die ATP-Synthase, wodurch nur noch der Sauerstoffverbrauch gemessen wird, der zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials benötigt wird (*LEAK*). Mittels folgender Titrierung des Entkopplers Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) kann die maximale Kapazität des Elektronen-transferierenden Systems (ETS) bestimmt werden. Die Zugabe von Rotenon hemmt Komplex I, Antimycin A hemmt Komplex III, wodurch die gemeinsame Endstrecke und damit die vollständige Atmungskette inhibiert ist. Übrig bleibt der Sauerstoffverbrauch aus anderen Mechanismen der Zelle (*residual oxygen consumption*, ROX), der gegen null gehen sollte. Das zweite Messprotokoll mit ausschließlich direkter Stimulation der Atmungskette lieferte in unserer Versuchsreihe durch die abweichende Reihenfolge der Substrate und Hemmstoffe andere Modi der Respiration, die sich aus der jeweiligen Funktion der Stoffe ergeben und in Tabelle 6 aufgelistet sind.

Aus den erhaltenen Werten können *Flux Control Ratios* für gewichtsunabhängige Aussagen über intrinsische mitochondriale Funktion errechnet werden [49]. Die Respiratory Control Ratio (RCR=OXPHOS/LEAK bzw. *State* 3/*State* 4_O) ist zu einem gewissen Grad ein Maß der Kopplungseffizienz der Mitochondrien und zeigt das Verhältnis des Sauerstoffverbrauchs an, der für die oxidative Phosphorylierung verwendet werden kann, zu demjenigen, der für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials benötigt wird [128]. Die *LEAK Control Ratio* (LCR=LEAK/ETS-Kapazität bzw. *State* 4_O /*State u*) steht für den Grad der Entkopplung der Atmungskette. Wir errechneten außerdem den Beitrag des Elektronen-transferierenden Flavoproteins zur maximalen oxidativen Phosphorylierung als CETF-Beitrag=CETF/OXPHOS.

2.2.5 Messung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Vorbereitung der Proben für die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies im Gewebe inklusive Permeabilisierung, Waschschritten, Trocknen und Wiegen verlief wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Die Oxygraphen wurden zusätzlich mit Fluoreszenzsensoren (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) ausgestattet. Analog zu bereits beschriebenen Protokollen wurden die Messungen der stimulierten Emission reaktiver Sauerstoffspezies durchgeführt [129, 130]. Den Kammern mit jeweils 2,3 mL MiRO5-Respirationspuffer wurden Malat (2 mmol/L), das Fluorophor Amplex Red (10 mmol/L) (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, USA) sowie Meerrettich-Peroxidase (1 U/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hinzugefügt. Amplex Red und Wasserstoffperoxid formen unter Katalyse durch die Meerrettich-Peroxidase einen dem Resorufin ähnlichen fluoreszierenden Stoff (Exzitations-Wellenlänge 563 nm, Emissions-Wellenlänge 587 nm). Die während schrittweiser Titration von Succinat (erreichte Succinat-Konzentrationen von 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 1,5 mmol/L, 2,5 mmol/L, 5 mmol/L und 7,5 mmol/L) gemessene Intensitätsänderung der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Emission von radikalen Sauerstoffspezies [129]. Zur Kalibrierung der Messung wurde anschließend die Atmungskette der Mitochondrien mittels Rotenon (0,5 µmol/L) und Antimycin A (5 µmol/L) gehemmt und eine Kalibrierungsreihe mit Wasserstoffperoxid (Schritte von 0,1 µmol/L H_2O_2) in die Kammer titriert [129].

2.2.6 Citratsynthase-Aktivität und Gesamtproteingehalt

Für die Messung der Citratsynthase-Aktivität (CSA) normiert auf den Gesamtproteingehalt einer Probe wurden jeweils ca. 10 mg Myokard aus der Aufbewahrung bei -80°C entnommen. Unter ständiger Kühlung auf Eis wurden die Muskelstücke in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen in einer Pufferlösung (*CelLytic MT* und Protease Inhibitor Cocktail im Verhältnis 100:1; Probengewicht [mg] zu Volumen der Pufferlösung [mL] im Verhältnis 1:6) im Homogenisierer (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Zugabe von 4-8 Glaskügelchen (Glas-Beads 2 mm, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland) bei einer Schüttelfrequenz von 30/s für eine Minute homogenisiert. Nun wurden die Proben bei 12000 G für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und im Verhältnis 1:10 mit *Assay Buffer for CSA* vermischt. Diese Probenlösung wurde folgend für die Messung der CSA und des Gesamtproteingehalts verwendet.

Die Messung der CSA erfolgte mit einem CSA-Bestimmungs-Kit (CS0720, Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) unter Befolgung der Herstellerangaben analog zu in der Literatur bereits beschriebenen Versuchen [92, 131, 132]. Auf einer 96-*well*-Platte wurde eine Dreifach-Positivkontrolle mit Citratsynthase angelegt. Auch alle Proben wurden je dreifach (jeweils 2 µL) auf die Platte gebracht. Nach Zugabe von 2µL (10 mmol/L) 5,5‘-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure und 2µL (30 mmol/L) Acetyl-Coenzym A wurde zunächst die endogene Aktivität bei einer Wellenlänge von 412 nm spektrophotometrisch im Mikroplatten-*Reader* (Infinite M Plex, Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Ebenso wurde nach Zugabe von 10µL (10 mmol/L) Oxalacetat die maximale Aktivität bestimmt und die Differenz der beiden Werte gebildet. Aus den je drei nun erhaltenen

Werten pro Probe wurde der Mittelwert errechnet. Die CSA wurde als Absorption pro Minute angegeben und an das jeweilige Reaktionsvolumen von 0,2 mL, die Probenmenge von 2 µL, die ursprüngliche Probenverdünnung von 1:10 und die optische Weglänge der 96-*well*-Platte angepasst.

Für die Messung des Gesamtproteingehalts in der Probe mittels Bicinchinonsäureassay wurde zur Standardisierung eine doppelte Verdünnungsreihe von Bovinem Serumalbumin auf einer 96-*well*-Platte angelegt. Von den homogenisierten und verdünnten Proben wurden je 2 µL in je zwei *wells* auf der Platte pipettiert und 1:5 mit Wasser verdünnt. *Pierce™ BCA Protein Assay Reagent* A und B wurden im Verhältnis 50:1 gemischt und von der erhaltenen Kombinationslösung je 100 µL pro *well* der Platte hinzugefügt. Nach Inkubation bei 37°C für 30 Minuten wurde anschließend bei Raumtemperatur der Proteingehalt kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm im Mikroplatten-*Reader* (Infinite M Plex, Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

Die CSA wurde anschließend auf die Gesamtproteinmenge in der Probe normiert.

2.2.7 Statistische Auswertung

Sämtliche statistischen Auswertungen wurden mit Statistiksoftware (GraphPad Prism® Version 9.2.0 [GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA] und IBM® SPSS® Version 27.0.1 [International Business Machines Corporation, Armonk, USA]) durchgeführt. Abbildungen wurden mittels GraphPad Prism® Version 9.2.0 erstellt. Sofern nicht anders angegeben, sind Ergebnisse in Abbildungen als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Werte in Tabellen sowie im Text sind als Prozentsatz oder als Mittelwert ± Standardabweichung genannt, sofern nicht anders angegeben.

Zum Vergleich dichotomer Variablen zwischen zwei Gruppen wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Sofern die erwartete Häufigkeit eines Test-*Items* geringer als fünf war, wurde stattdessen das Ergebnis des Exakten Fisher-Tests gewählt. Kontinuierliche Variablen wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Nähe zur Gauß'schen Normalverteilung überprüft und, sofern die Annahme der Normalverteilung nicht verworfen werden musste, mittels *t*-Test, andernfalls mittels Mann-Whitney *U*-Test auf Gruppenunterschiede untersucht.

Die Stimulationsreihe zur Messung der reaktiven Sauerstoffspezies wurde nach Überprüfung auf Normalverteilung wie oben beschrieben mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (*2-way ANOVA*) mit Korrektur nach Geisser-Greenhouse und post-hoc Test nach Sidak überprüft, um Unterschiede zwischen einzelnen Stimulationsstufen sowie eine potentielle Interaktion

zwischen Zugehörigkeit zur Ätiologie-Gruppe und Reaktion auf die Stimulation beurteilen zu können.
Nach Überprüfung auf Normalverteilung wie oben beschrieben wurden Korrelationskoeffizienten nach Pearson bzw. Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Grafiken zur Verdeutlichung von Korrelationen enthalten zudem lineare Regressionslinien mit gestrichelten Linien zum Anzeigen der 95%-Konfidenzintervalle der Regressionslinie. Um den Einfluss mehrerer unabhängiger Variablen auf eine abhängige Variable im Sinne einer Sensitivitätsanalyse auf potentielle Confounder zu untersuchen, wurden rückwärtsgerichtete multiple lineare Regressionen unter Einschluss der angegebenen Parameter durchgeführt.

Für alle durchgeführten Tests wurden zweiseitige p-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen und $p <0,1$ als Trend gewertet. Alle p-Werte wurden auf drei Nachkommastellen gerundet oder als „<0,001“ angegeben. Alle r-Werte wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet und im Falle signifikanter Korrelation in schwache, mittlere oder starke Effekte eingeteilt [133].

3 Ergebnisse

3.1 Gute Vergleichbarkeit von Patienten mit ICM und DCM

Alle Patienten wiesen eine Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion nach der Definition der Leitlinie zur Herzinsuffizienz der *European Society of Cardiology* auf [1]. Die nach Ätiologie eingeteilten Gruppen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Alter, Geschlecht, Anteil von HTX- bzw. LVAD-Patienten, *Body-Mass Index*, Komorbiditäten, eingenommene Medikamente und die meisten untersuchten Laborparameter. Insbesondere zeigte sich eine vergleichbare Anzahl von Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus. Signifikante Unterschiede ergaben sich insbesondere in Form eines höheren mittleren Hämoglobins (Hb) in der DCM-Gruppe im Vergleich zur ICM-Gruppe, wobei gleichzeitig entsprechend seltener eine Anämie (definiert als Hb <12 mg/dL bei Frauen und Hb <13 mg/dL bei Männern) vorlag. Die mittlere Thrombozytenzahl war signifikant höher in der ICM-Gruppe, wobei hier beide Mittelwerte im physiologischen Bereich lagen. In Tabelle 7 ist ein Überblick über die Gruppenvergleiche dargestellt.

Untersuchte Parameter (Einheit)	**ICM (n=43)**	**DCM (n=37)**	**p-Wert**
Demographische und klinische Daten			
HTX (%)	20	37	0,139
Männlich (%)	86	84	0,725
Body-Mass Index (kg/m^2)	27,8±4,9	26,2±5,5	0,188
Alter (Jahre)	61,5±5,7	56,5±12,7	0,164
Komorbiditäten			
Arterielle Hypertonie (%)	50	32	0,099
Chronische Niereninsuffizienz > Stadium III (%)	8	11	>0,999
Vorhofflimmern (%)	31	24	0,175
Typ 2 Diabetes mellitus (%)	34	18	0,126
Begleitmedikation			
Insulin (%)	22	11	0,228
Protonenpumpeninhibitoren (%)	84	92	0,479
Diuretika (%)	84	81	0,719
Beta-Rezeptorenblocker (%)	70	61	0,465
ACE-Inhibitoren (%)	24	42	0,140

Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten (%)	62	42	0,112
Phosphodiesterase 5-Inhibitoren (%)	70	60	0,360
Statine (%)	81	61	0,080
Acetyl-Salicylsäure (%)	78	72	0,595
Phenprocoumon (%)	70	46	0,080
Laborergebnisse			
Blutzucker zum Operationsbeginn (mg/dL)	144±56	132±28	0,265
HbA_{1c} (%)	5,89±1,17	5,9±0,73	0,994
Hämoglobin (g/dL)	10,8±1,8	12,1±2,4	**0,008**
Anämie (%)	84	51	**0,003**
Thrombozyten (x1000/µL)	220,7±114,9	175,5±66,8	**0,032**
Leukozyten (x1000/µL)	8,5±3,1	8,6±4,9	0,449
C-Reaktives Protein (mg/dL)	4,3±6,7	2,9±5,2	0,298
Creatinin (mg/dL)	1,35±0,49	1,72±1,77	0,439
Laktat-Dehydrogenase (U/L)	381±292	450±383	0,638
ASAT (U/L)	88±216	139±387	0,661
ALAT (U/L)	93±192	190±497	0,411
Bilirubin (mg/dL)	1,62±1,71	1,89±2,64	0,572
Hochsensitives Troponin T	477±1558	637±1890	0,912

Tabelle 7: Klinische Charakteristika von Patienten mit Ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) im Vergleich. Ergebnisse angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Prozentsätze. p-Werte berechnet nach Chi-Quadrat-Test bzw. Exaktem Test nach Fisher für kategorische Variablen und nach *t*-Test bzw. Mann-Whitney *U*-test für kontinuierliche Variablen (siehe Abschnitt 2.2.7). ACE: *Angiotensin converting enzyme*; ALAT: Alanin-Aminotransferase; AST: Aspartat-Aminotransferase; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; HbA_{1c}: Glykiertes Hämoglobin A1c; HTX: Herztransplantation; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion.

3.2 Höhere mitochondriale Respiration im Myokard von Patienten mit DCM im Vergleich zu ICM bei vergleichbarer Effizienz der Mitochondrien

Die auf das Probengewicht normierte mitochondriale Respiration im Myokard von Patienten mit DCM war signifikant höher als bei Patienten mit ICM (Abb. 3). Dies galt für die Kapazität des Elektronen-transferierenden Flavoproteins (CETF) (61,8±20,4 vs. 75,8±30,7 pmol/(s*mg), p=0,022), die CETF+CI-unterstützte Respiration (76,2±26,5 vs. 97,9±40,2 pmol/(s*mg), p=0,007) sowie die maximale OXPHOS-Kapazität (CETF+CI+CII), welche

bei DCM um 23% höher war als bei ICM (108,6±41,4 vs. 141,9±59,9 pmol/(s*mg), p=0,006). Ebenso zeigten sich bei DCM signifikant höhere *LEAK*-Respiration (55,1±19,8 vs. 66,9±24,6 pmol/(s*mg), p=0,025), eine um 20% höhere Kapazität des Elektronen-transferierenden Systems (ETS-Kapazität) (112,2±44,6 vs. 140,0±49,6 pmol/(s*mg), p=0,015) und um 31% höhere ETS-Kapazität des Komplex II nach Hemmung des Komplex I (60,6±27,0 vs. 88,1±33,3 pmol/(s*mg), p=0,003), wogegen die *residual oxygen consumption* (ROX) vergleichbar groß war (6,0±6,6 vs. 6,9±4,5 pmol/(s*mg), p=0,480).

In der Messreihe, die sich nur auf direkte Stimulation der Atmungskette durch Glutamat und Succinat ohne Zugabe mittelkettiger Fettsäuren stützte, zeigte sich ebenfalls eine geringere mitochondriale Respiration bei Patienten mit ICM auf allen Stufen des Experiments nach dem Ausgangswert (Abb. 4). Hier ergab sich auch eine unterschiedliche endogene Respiration (ROX) nach Hemmung der gesamten Atmungskette (5,9±4,9 vs. 10,4±4,6 pmol/(s*mg), p=0,014). Normierung auf die jeweilige ROX änderte die statistischen Signifikanzniveaus nicht.

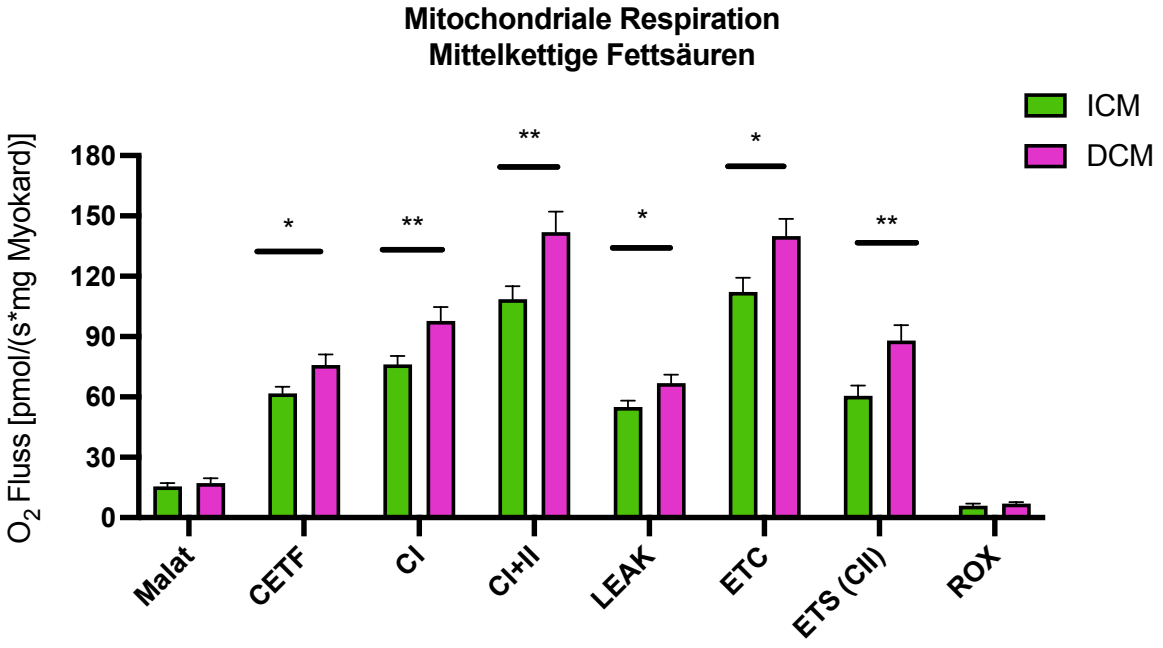

Abb. 3: Signifikant höhere mitochondriale Respiration bei Patienten mit DCM im Vergleich zu ICM. Mittelwerte mit Standardfehler. Ungepaarte zweiseitige *t*-Tests. n(ICM)=40 vs. n(DCM)=34. *p<0,05; **p<0,01. CI/II: Komplex I/II der Atmungskette; CETF: Kapazität des Elektronen-transferierenden Flavoproteins; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ETC: Kapazität des Elektronen-transferierenden Systems; ETS: Elektronen-transferierendes System; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; LEAK: Leck-Strom (vgl. Abschnitte 1.2.4 und 2.2.4); ROX: *residual oxygen consumption*.

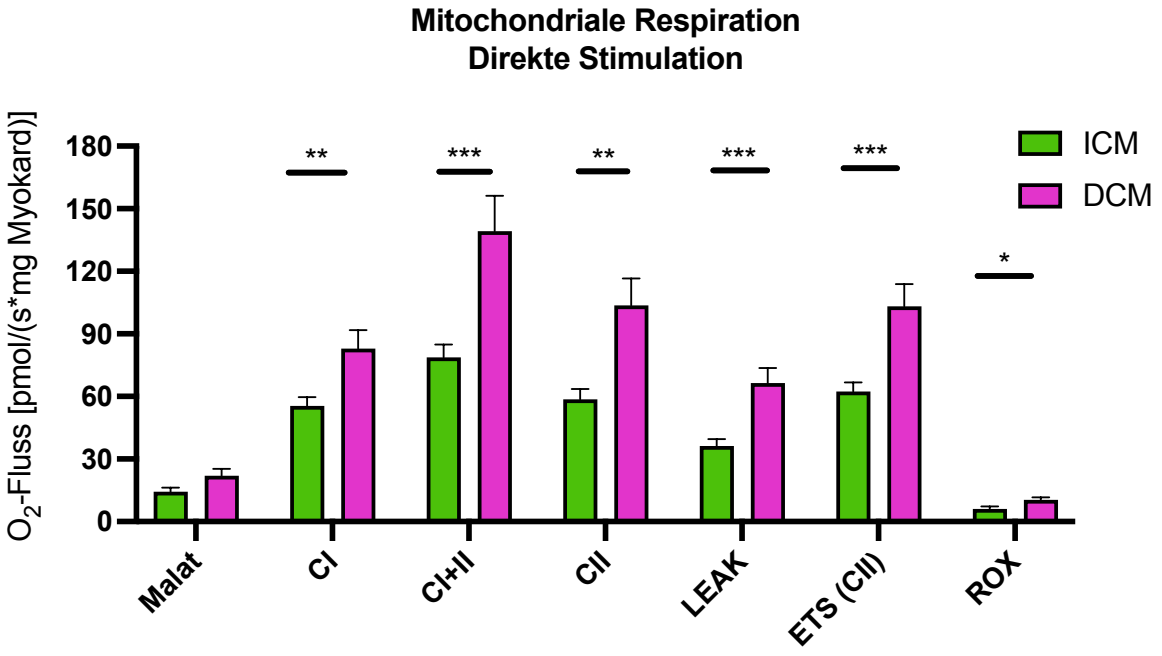

Abb. 4: Geringere mitochondriale Respiration bei ICM im Vergleich zu DCM unter direkter Stimulation der Atmungskette durch Glutamat und Succinat. Mittelwerte mit Standardfehler. Ungepaarte zweiseitige *t*-Tests. n(ICM)=20 vs. n(DCM)=13. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001. CI/II: Komplex I/II der Atmungskette; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ETS: Elektronen-transferierendes System; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; LEAK: Leck-Strom (vgl. Abschnitte 1.2.4 und 2.2.4); ROX: *residual oxygen consumption*.

Die Errechnung der *Respiratory Control Ratio* (RCR) ermöglichte eine Abschätzung der mitochondrialen Kopplungseffizienz. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Myokard von Patienten mit ICM verglichen mit DCM (2,06±0,70 vs. 2,16±0,59 [*Arbitrary Unit*], p=0,517). Ebenso zeigte auch ein Vergleich der *Leak Control Ratio* (LCR) als Parameter für den Grad der Entkopplung der Atmungskette keinen signifikanten Unterschied (0,51±0,12 vs. 0,49±0,11 [*Arbitrary Unit*], p=0,412). Wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, errechneten wir zusätzlich den Beitrag der fettsäureassoziierten Respiration zur maximalen oxidativen Phosphorylierung (CETF-Beitrag). Auch dieser Parameter lieferte ein vergleichbares Ergebnis in ICM und DCM (0,58±0,13 vs. 0,55±0,11 [*Arbitrary Unit*], p=0,274). Die Citratsynthase-Aktivität (CSA) als etablierter Marker für den mitochondrialen Gehalt im Gewebe zeigte einen um 29% geringeren Wert im Myokard von Patienten mit ICM als bei DCM (359,6±164,1 vs. 503,0±198,5 nmol/min/mg Protein, p=0,002) (Abb. 5A), wobei der zur Normierung genutzte und mittels Bicinchinonsäureassay ermittelte Gesamtproteingehalt im Myokard vergleichbare Werte bei Patienten mit ICM und DCM ergab (8,19±3,02 vs. 8,25±2,09 µg/µl, p=0,921) (Abb. 5B). Aufgrund der limitierten

Verfügbarkeit der Myokardproben konnte die CSA nur bei 67 von 81 Patienten bestimmt werden (n[ICM]=35, n[DCM]=32).

Anschließend wurde die in Abb. 3 dargestellte mitochondriale Respiration auf die CSA und damit auf den geschätzten mitochondrialen Gehalt im Myokard normiert. Nun ergab sich für keines der erhobenen Respirationsstadien ein signifikanter Unterschied der normierten Respiration zwischen Patienten mit ICM und DCM (Abb. 6).

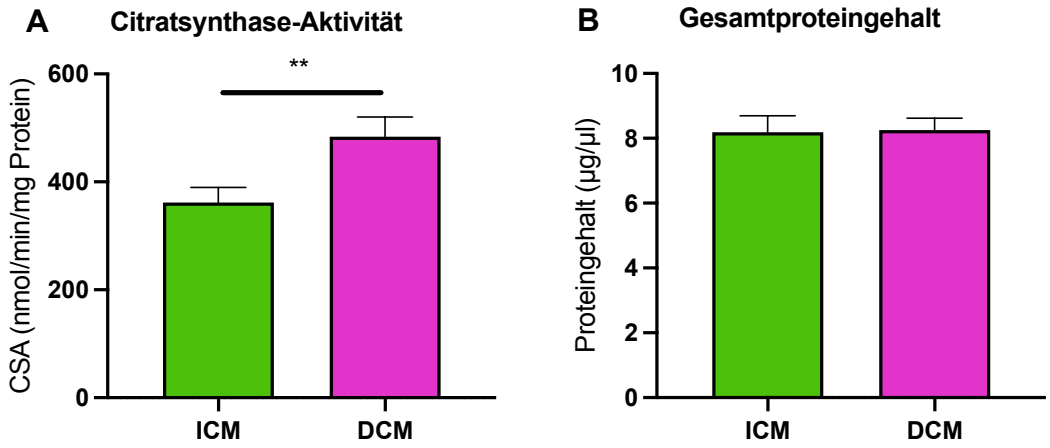

Abb. 5: (A) Signifikant geringere Citratsynthase-Aktivität (CSA) im Myokard von Patienten mit ICM im Vergleich zu DCM. (B) Vergleichbarer Gesamtproteingehalt im Myokard bei ICM und DCM. Mittelwerte mit Standardfehler. Ungepaarte zweiseitige *t*-Tests. n(ICM)=35, n(DCM)=32. **p<0,01. CSA: Citratsynthase-Aktivität; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ICM: Ischämische Kardiomyopathie.

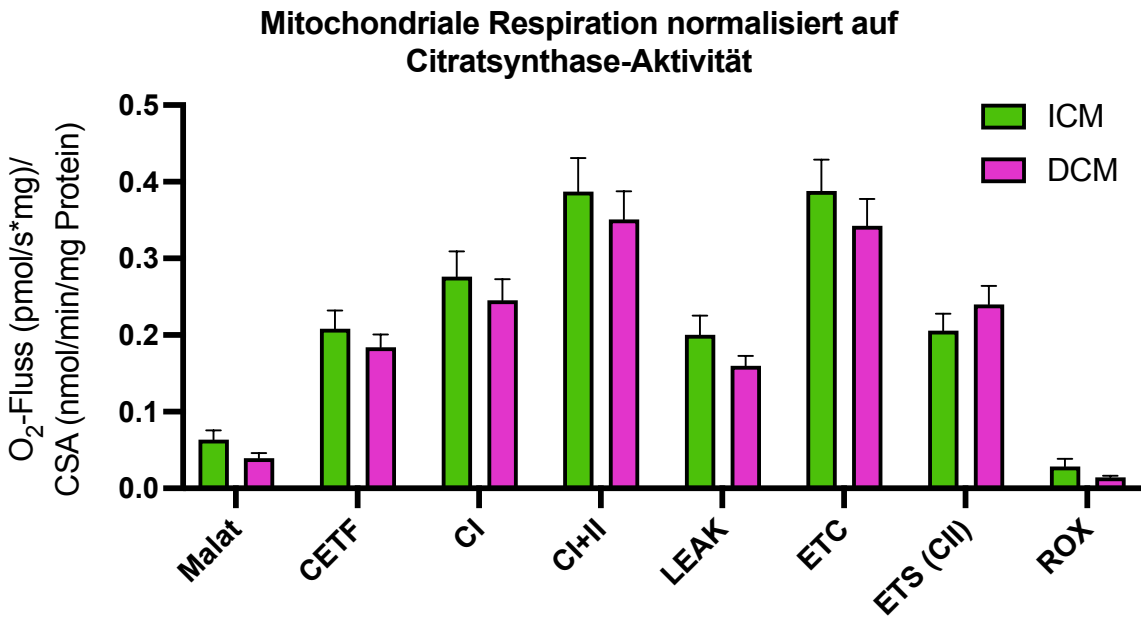

Abb. 6: Kein signifikanter Unterschied der mitochondrialen Respiration nach Normierung auf die Citratsynthase-Aktivität. Mittelwerte mit Standardfehler. Ungepaarte zweiseitige *t*-Tests. n(ICM)=35 vs. n(DCM)=30. CI/II: Komplex I/II der Atmungskette; CETF: Kapazität des Elektronen-transferierenden Flavoproteins; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ETC: Kapazität des Elektronen-transferierenden Systems; ETS: Elektronen-transferierendes System; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; LEAK: Leck-Strom (vgl. Abschnitte 1.2.4 und 2.2.4); ROX: *residual oxygen consumption*.

3.3 Vergleichbare Emission reaktiver Sauerstoffspezies in ICM und DCM

Die Emission reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurden in einer Stimulationsreihe gemessen. Hierbei fanden wir die maximale ROS-Aktivität bei einer Succinat-Konzentration von 5 mmol/L in der Oxygraphenkammer. Bei maximaler Stimulation war die gemessene ROS-Emission nicht signifikant unterschiedlich zwischen Patienten mit ICM und DCM (0,59±0,28 vs. 0,69±0,36 pmol/(s*ml), p=0,196). Auch bei geringerer Stimulation, d.h. unter anderen Succinat-Konzentrationen, die jeweils geringere ROS-Belastung nach sich zogen, war kein signifikanter Unterschied auszumachen. Eine Interaktion von Ätiologie und Stimulation war ebenfalls nicht erkennbar, d.h. der Anstieg der ROS-Emission während der Stimulationsreihe war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen ICM und DCM ($p_{\text{Ätiologie x Stimulation}}$=0,714) (Abb. 7 A).

Auch die Ergebnisse aus der ROS-Messung wurden auf die CSA als Marker für den mitochondrialen Gehalt normiert, wonach sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in

der normierten ROS-Belastung zwischen Patienten mit ICM und DCM herausstellten und sich erneut keine signifikante Interaktion zeigte ($p_{Ätiologie\ x\ Stimulation}$=0,644) (Abb. 7 B).

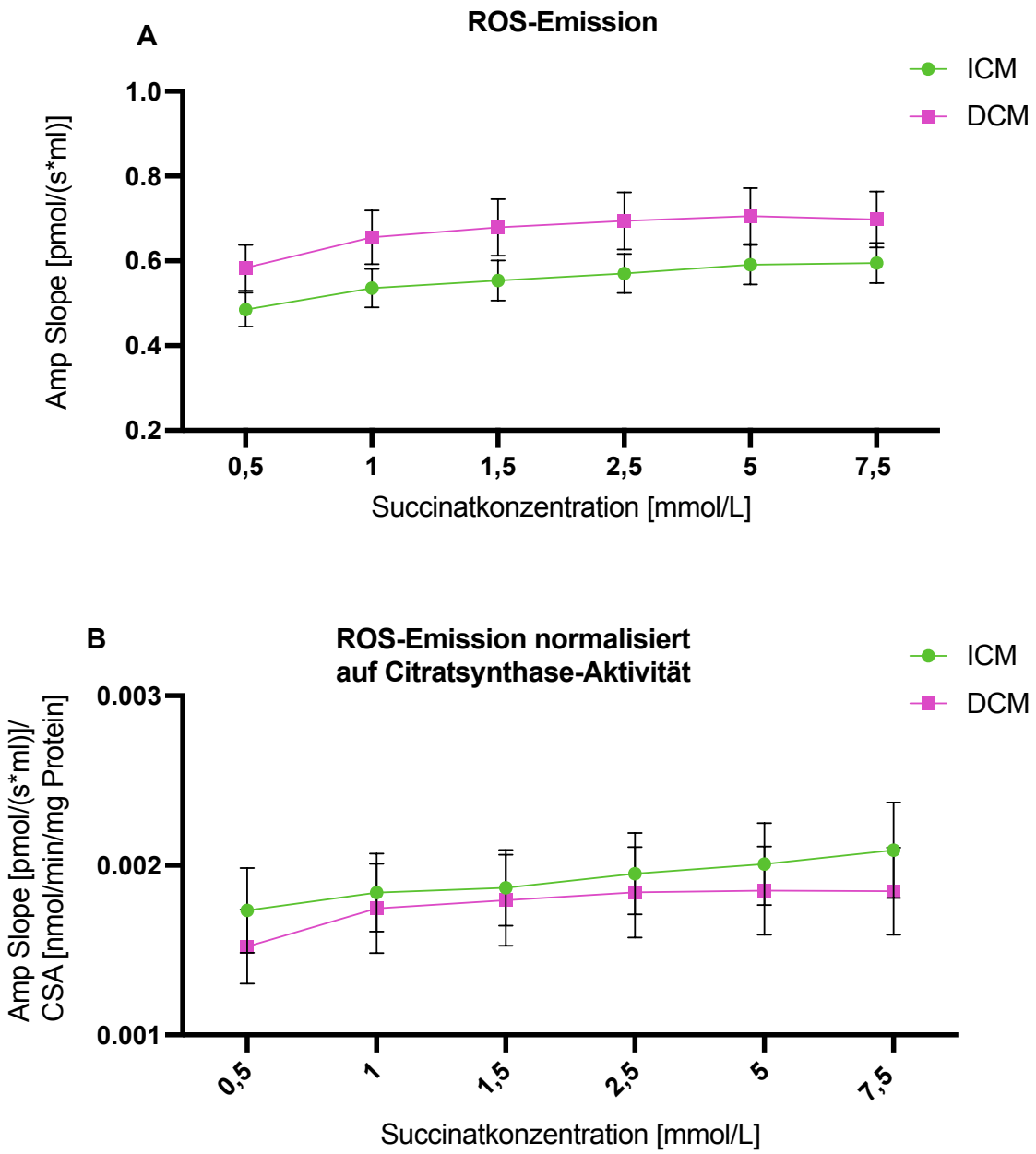

Abb. 7: (A) Keine signifikant unterschiedliche Emission reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei Patienten mit ICM bzw. DCM, sowie (B) ebenfalls kein Unterschied nach Normierung auf Citratsynthase-Aktivität als Marker für mitochondrialen Gehalt im Myokard. Mittelwerte mit Standardfehler. *2-way ANOVA* mit Geisser-Greenhouse-Korrektur und post-hoc-Test nach Sidak. (A) n(ICM)=37 vs. n(DCM)=30. (B) n(ICM)=31 vs. n(DCM)=18. Ama: Antimycin A; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies.

3.4 Keine Assoziation von Parametern der Glykämie und mitochondrialer Respiration

Patienten mit ICM bzw. DCM zeigten keine Unterschiede sowohl im Hinblick auf ihren HbA_{1c} als Parameter für die Langzeit-Glykämie als auch auf den momentanen Blutzucker zum Zeitpunkt des Operationsbeginns (siehe Abschnitt 3.1). OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität und oxidativer Stress korrelierten nicht mit diesen Glykämie-Parametern (Abb. 8). Der Hämoglobin-Wert korrelierte positiv mit der oxidativen Kapazität sowie dem oxidativen Stress im Muskel. Mittels rückwärtsgerichteter multipler linearer Regression unter Einschluss der Ätiologie und des Hb-Werts konnte jedoch gezeigt werden, dass der Hb-Wert anders als die HF-Ätiologie kein Prädiktor für OXPHOS (p=0,183) oder ROS-Emission (p=0,122) ist.

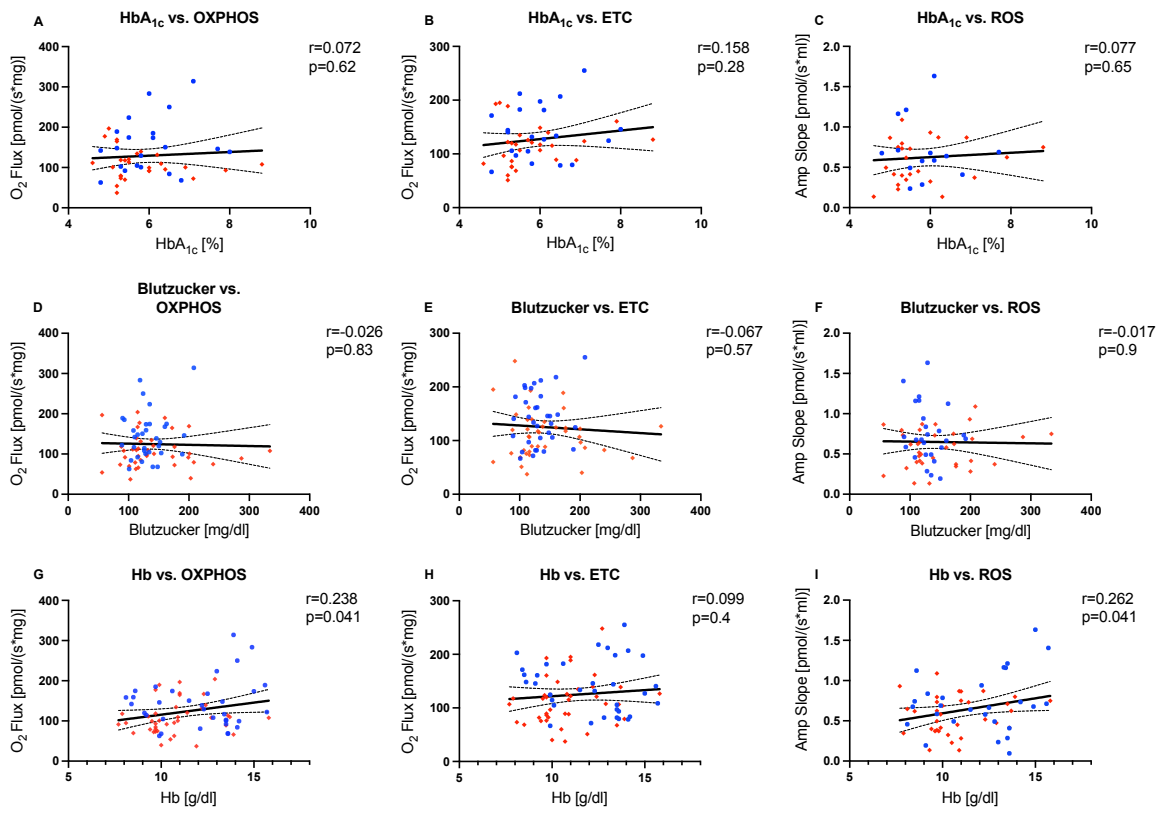

Abb. 8: Parameter der Glykämie waren nicht mit mitochondrialer Funktion assoziiert, aber das Hämoglobin zeigte eine schwache Korrelation mit der OXPHOS-Kapazität und oxidativem Stress. (A-F) Keine signifikante Korrelation konnte zwischen momentanem Blutzucker zum Start der Operation bzw. HbA1c und OXPHOS- bzw. ETS-Kapazität festgestellt werden. (G-I) Das Hämoglobin korrelierte nicht mit der ETS-Kapazität, zeigte aber eine geringe Assoziation mit ROS-Produktion und OXPHOS-Kapazität. (A, B) n=49, (C) n=39, (D, E) n=73, (F) n=60, (G, H) n=74, (I) n=61. Rote Rauten: ICM, blaue Punkte: DCM. Pearson-Korrelationen mit linearer Regressionslinie und 95%-Konfidenzintervall. DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ETC: Kapazität des Elektronen-

transferierenden Systems; Hb: Hämoglobin; HbA1c: glykiertes Hämoglobin A1c; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; OXPHOS: Oxidative Phosphorylierung; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies.

3.5 Assoziation von Inflammation mit reduzierter mitochondrialer Respiration und ICM

Das Myokard von Patienten mit ICM wies signifikant größere Proportionen fibrosierter Querschnittsfläche auf als bei DCM (20,9±21,2 vs. 7,2±5,6%, p=0,001) (Abb. 9 A). Der Anteil fibrosierter Fläche am Myokard korrelierte nicht signifikant mit der mitochondrialen oxidativen Kapazität, der ETS-Kapazität oder dem oxidativen Stress. Diese Beobachtung galt sowohl für die Gesamtheit der Patienten als auch für die getrennte Betrachtung von ICM und DCM (Abb. 9 B-D).

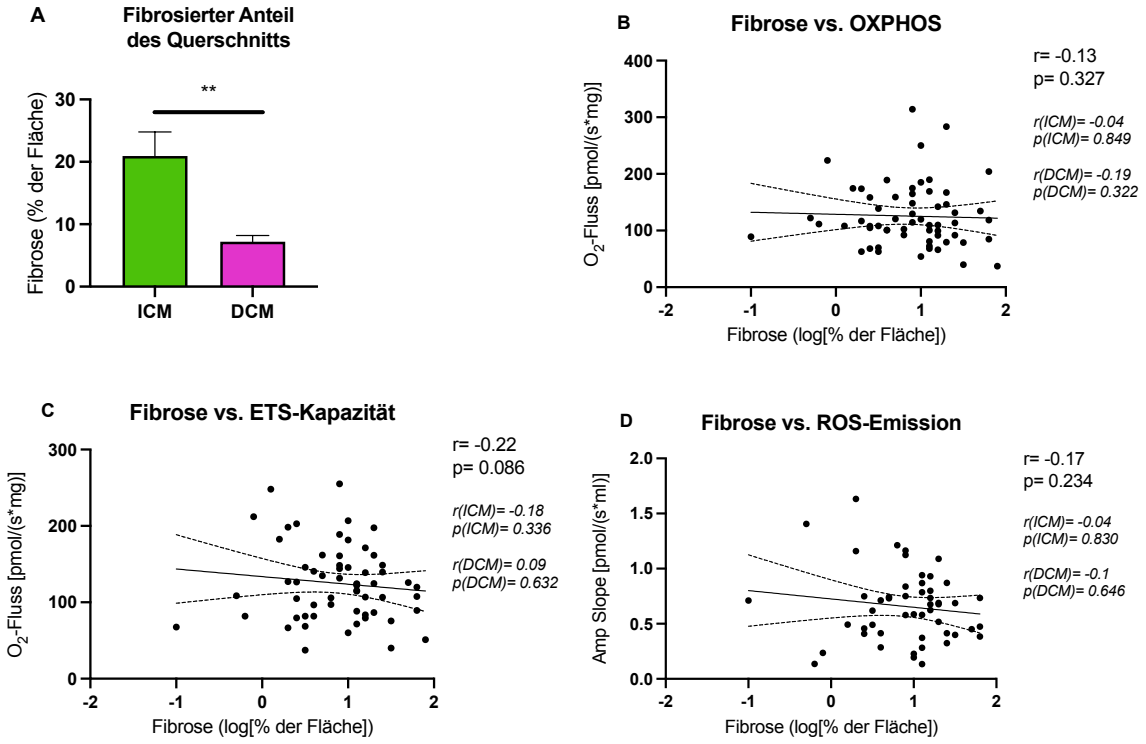

Abb. 9: Fibrose im Myokard bei ICM und DCM im Vergleich sowie ihr Verhältnis zu Markern der mitochondrialen Funktion. Mittelwerte mit Standardfehler bzw. lineare Regressionsgerade mit 95%-Konfidenzintervall. (A) Mann-Whitney *U*-Test; (B-D) Pearson-Korrelationen. n(ICM)=30, n(DCM)=30, n(Inflammation)=11, n(keine Inflammation)=51. DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ETS: Elektronen-transferierendes System; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies.

Als Schwelle zur relevanten Inflammation wurde eine zelluläre Infiltration von 14 $CD3^+$ Zellen pro mm^2 oder mehr betrachtet. Dieses Kriterium erfüllten signifikant mehr Patienten mit ICM als mit DCM (27% vs. 6%, p=0,024). Nun wurden die Patienten nach dem Status der Inflammation neu aufgeteilt in „Relevante Inflammation“ (>14 $CD3^+$ Zellen/mm^2) und „Keine relevante Inflammation“ (<14 $CD3^+$ Zellen/mm^2). Patienten mit relevanter Inflammation wiesen signifikant geringere OXPHOS-Kapazität auf als Patienten ohne relevante Inflammation (92,3±40,1 vs. 131,6±55,6 pmol/(s*mg), p=0,031). Ein entsprechender Unterschied in der ETS-Kapazität wurde als Tendenz gewertet (98,6±43,1 vs. 129,7±48,3 pmol/(s*mg), p=0,053), wohingegen sich der oxidative Stress bei Patienten mit oder ohne Inflammation nicht signifikant unterschied (0,51±0,21 vs. 0,67±0,33 pmol/(s*ml), p=0,170) (Abb. 10). Die myokardiale Infiltration mit $CD3^+$ Lymphozyten korrelierte mit mittlerer Effektstärke mit der OXPHOS-Kapazität (r= -0,30, p=0,019). Eine mittels rückwärtsgerichteter multipler linearer Regression durchgeführte Sensitivitätsanalyse unter Einschluss von HF-Ätiologie, Inflammationsstatus und OXPHOS-Kapazität lieferte den Schluss, dass nach Berücksichtigung der Ätiologie auch die Inflammation kein signifikanter Prädiktor für die mitochondriale Respiration ist ($p_{Ätiologie}$ = 0,045, $p_{Inflammation}$= 0,113).

CRP als systemischer Marker für Inflammation unterschied sich nicht zwischen Patienten mit ICM oder DCM (siehe Tabelle 7), ebenso nicht zwischen Patienten mit kardialer Inflammation über bzw. unter der Schwelle von 14 $CD3^+$ Zellen pro mm^2 (3,95±4,04 vs. 3,72±6,45 mg/dL, p=0,911). Um eine Normalverteilung der CRP-Werte herzustellen und so weiterführende Analysen möglich zu machen, wurde eine logarithmische Transformation der Werte durchgeführt. Nun stellte sich heraus, dass CRP und Infiltration mit $CD3^+$ Lymphozyten im Myokard nicht miteinander korrelierten (r=0,09, p=0,507). Auch hingen CRP und OXPHOS-Kapazität nicht zusammen (r= -0,13, p=0,269).

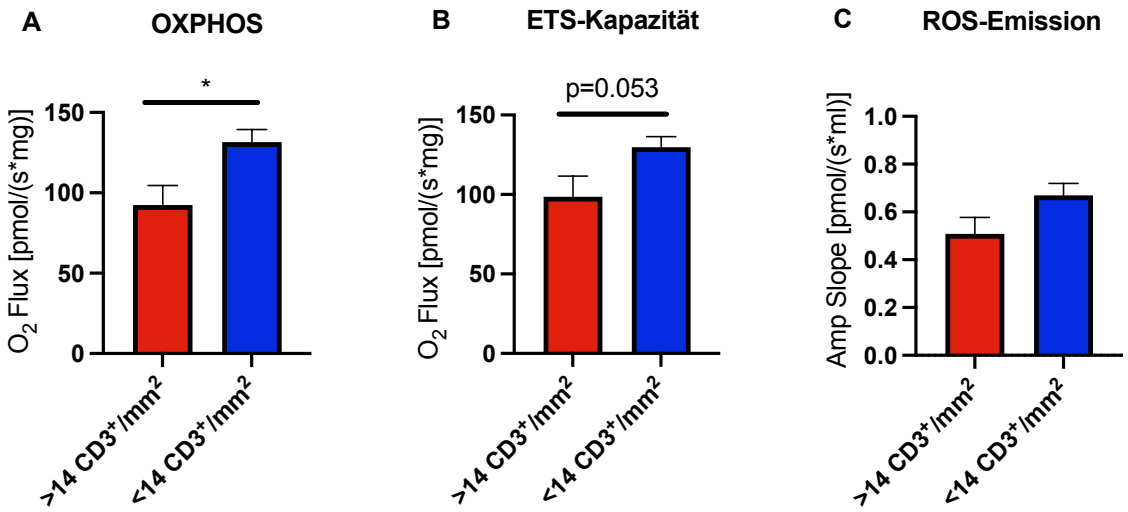

Abb. 10: Inflammation bei ICM und DCM sowie der Zusammenhang zu mitochondrialer Respiration im Myokard nach Status der Inflammation. Mittelwerte mit Standardfehler. Ungepaarte zweiseitige t-Tests. n(ICM)=33 vs. n(DCM)=32. CD: *cluster of differentiation*; ETS: Elektronen-transferierendes System; OXPHOS: Oxidative Phosphorylierung; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies.

Bei allen Patienten, die mehr als 7 $CD3^+$ Lymphozyten pro mm^2 aufwiesen, wurden zusätzlich $CD4^+$ T-Helferzellen, $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, $CD45R0^+$ T-Memoryzellen und $CD68^+$ Makrophagen im Myokard bestimmt. Es zeigte sich eine Tendenz zu mehr T-Helferzellen bei Patienten mit ICM als DCM (p=0,095), wohingegen die anderen untersuchten Zelltypen sich nicht signifikant nach Ätiologie unterschieden (Abb. 11 A). Zudem konnte eine Tendenz zur Korrelation von Infiltration durch zytotoxische T-Zellen und oxidativem Stress gezeigt werden (Abb. 11 B), während diese Zellart weder mit oxidativer Kapazität (r= -0,30, p= 0,22) noch ETS-Kapazität (r= -0,23, p= 0,36) korrelierte. Die Anzahl an $CD4^+$ Zellen pro mm^2 korrelierte mit keinem der untersuchten Parameter für mitochondriale Funktion (r_{OXPHOS}= -0,30, p_{OXPHOS}= 0,23; r_{ETC}= -0,27, p_{ETC}= 0,29; r_{ROS}= -0,41, p_{ROS}= 0,13).

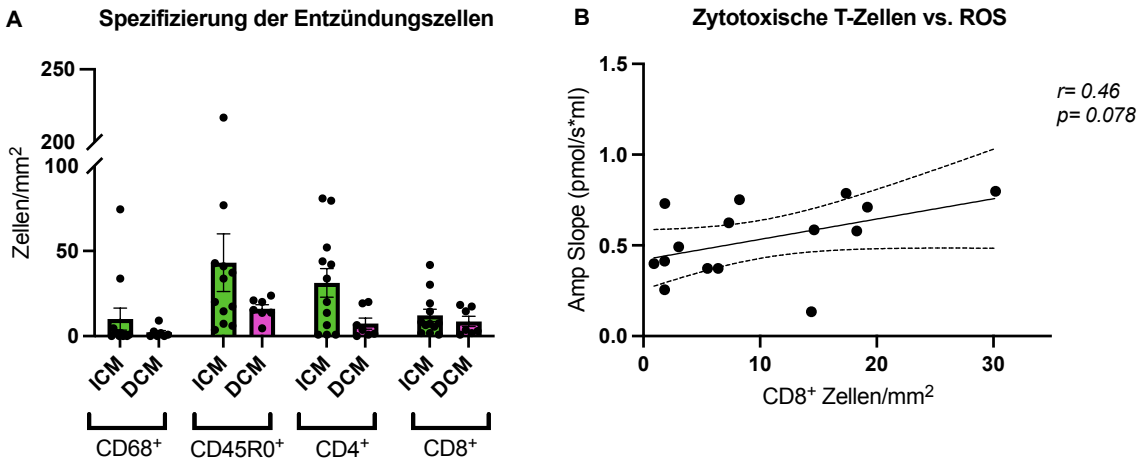

Abb. 11: (A) Spezifikation der Entzündungszellen bei Patienten mit mehr als 7 Lymphozyten pro mm^2. (B) Eine Tendenz zur Korrelation zwischen Ausmaß der Infiltration mit zytotoxischen T-Zellen und oxidativem Stress. (A) Mittelwerte mit Standardfehler. Mann-Whitney U-Tests. n(ICM)=12, n(DCM)=7. (B) Pearson-Korrelation mit linearer Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. n=15. CD: *cluster of differentiation*; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ICM: Ischämische Kardiomyopathie; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies.

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die myokardiale mitochondriale Respiration, oxidativer Stress und lymphozytäre Inflammation sowie Fibrose im Myokard bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz ischämischer bzw. nicht-ischämischer Genese analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei ICM-Patienten häufiger ein relevantes Ausmaß von zellulärer myokardialer Inflammation als bei DCM vorliegt und dass lymphozytäre Inflammation mit verringerter mitochondrialer Respiration assoziiert ist. Dies deutet darauf hin, dass die weitere Untersuchung immunsuppressiver Therapie für Patienten mit ischämisch bedingter HF nach entsprechender histologischer Sicherung der myokardialen Inflammation sinnvoll sein könnte. Bei vergleichbarer mitochondrialer Effizienz zwischen den Ätiologie-Gruppen zeigte sich eine verringerte Dichte von Mitochondrien im Myokard und geringere oxidative Kapazität bei ischämischer HF-Genese. Die Genese der Herzinsuffizienz sollte demnach in zukünftigen Studien als potentieller Einflussfaktor auf die myokardiale mitochondriale Respiration berücksichtigt werden.

4.1 Gute Vergleichbarkeit der Ätiologie-Gruppen

In dieser Arbeit wurden Patienten mit fortgeschrittener HFrEF untersucht und verglichen. Die metabolischen Charakteristika von Patienten mit unterschiedlichen Stadien der Herzinsuffizienz können sich unterscheiden, wobei insbesondere für den Substratgebrauch in frühen Stadien der Herzinsuffizienz nicht völlig einheitliche Daten vorliegen [22, 24, 52]. Auch die Expression der Enzyme der Atmungskette und weitere Parameter der mitochondrialen Energieproduktion verändern sich im Krankheitsverlauf [22]. Daher ist es wichtig, vergleichbar weit fortgeschrittene Erkrankungen zu betrachten. Alle Patienten, die in dieser Studie untersucht wurden, hatten eine terminal fortgeschrittene Herzinsuffizienz, sodass die Implantation eines LVADs oder eine Herztransplantation erforderlich wurde, was einen gewissen Grad an Homogenität des Krankheitsstadiums unter den Patientengruppen annehmen lässt.

Zunächst wurden in dieser Studie die Ätiologie-Gruppen auf die Vergleichbarkeit ihrer Charakteristika überprüft. Signifikant unterschiedlich zwischen ICM- und DCM-Patienten präsentierten sich nur die Thrombozytenzahl, die im Mittel normwertig war [134], sowie der Hämoglobinwert. Hierbei zeigte sich in beiden Gruppen, häufiger aber bei Patienten mit ICM, eine begleitende Anämie. Die Eisenmangelanämie ist eine häufige Komorbidität bei

Herzinsuffizienz [135] und kann die Prognose betroffener Patienten verschlechtern [136], wobei allerdings der Eisenmangel selbst die größere Rolle spielt als die Anämie [137]. Tatsächlich korrelierte in unseren Daten ein höherer Hämoglobinwert schwach mit einer höheren OXPHOS-Kapazität und ROS-Produktion, nicht aber mit einer höheren ETS-Kapazität. Die durchgeführten Analysen mittels multivariabler Regression mit Hämoglobinwert und Ätiologie zeigten hingegen, dass bei Berücksichtigung der Ätiologie weder das Hämoglobin noch der Anämie-Status Prädiktoren für bessere OXPHOS-Kapazität oder höheren oxidativen Stress waren. Dies entspricht den Ergebnissen von Melenovsky *et al*., die in explantierten Herzen von HTX-Patienten keine Assoziation zwischen Anämie und Aktivität der Atmungskette fanden [138]. Einen relevanten negativen Einfluss auf die mitochondriale Funktion hätte hingegen eine reduzierte myokardiale Eisenkonzentration [138, 139], wobei auch eine Überladung mit Eisen pathologische Effekte auf die Mitochondrien ausüben kann [140]. Die Eisenkonzentration im Myokard korreliert allerdings lediglich äußerst schwach mit dem Hämoglobin und zeigt eher einen direkten Einfluss auf den ROS-Stoffwechsel als auf die OXPHOS-Kapazität [138]. Eine direkte Bestimmung der Eisenkonzentration im Herzen war in dieser Untersuchung leider nicht möglich. Ein möglicher Unterschied dieser zwischen Patienten mit ICM und DCM lässt sich aus den Ergebnissen zur Anämie allerdings nicht ableiten, zumal sich, wie oben erwähnt, weder Anämie-Status noch Hb als Prädiktoren für die mitochondriale Funktion erwiesen. Auch in Sensitivitätsanalysen dieser Studie war der Hb-Wert unter Einbeziehung der HF-Ätiologie kein Einflussfaktor auf die mitochondriale Funktion. Erst weitere Studien könnten einen möglichen Zusammenhang zwischen myokardialem Eisenstoffwechsel, Ätiologie der Herzinsuffizienz und mitochondrialer Funktion detaillierter aufschlüsseln.

In beiden Gruppen fanden sich erhöhte Werte für Gesamt-Bilirubin, Creatinin, Lactat-Dehydrogenase, Transaminasen sowie C-reaktives Protein. Hierbei handelt es sich um typische Begleiterscheinungen der Herzinsuffizienz [1, 134]. Zwischen den Gruppen waren die jeweiligen Werte nicht signifikant unterschiedlich. Da auch darüber hinaus bei den hier untersuchten Patienten weder ein signifikanter Unterschied der Dauermedikation noch der Komorbiditäten oder weiterer demographischer, klinischer sowie laborchemischer Parameter zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden konnte, lässt sich ein möglicher Einfluss dieser Faktoren auf alle weiteren Ergebnisse der Vergleiche zwischen den Gruppen als sehr unwahrscheinlich ablehnen.

4.2 Eingeschränkte Datenlage zur mitochondrialen Respiration im versagenden Herzen nach verschiedener Ätiologie

Eine limitierte Anzahl bisheriger Studien hat die mitochondriale Funktion im menschlichen versagenden Herzmuskel untersucht und dabei die Ätiologie der HF speziell berücksichtigt. Keine dieser Studien, sofern sie einen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Ätiologien angestellt haben, konnte signifikante Unterschiede zwischen ICM und DCM nachweisen. Alle hatten hingegen relevante Einschränkungen im Vergleich mit unserer Studie, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

Sharov und Kollegen wiesen nach, dass die mitochondriale Respiration in verschiedenen Bereichen des versagenden Herzens nach Explantation bei HTX im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aus nicht transplantierten Spenderherzen reduziert ist [53]. Die Arbeitsgruppe stimulierte ihre Proben nicht mit Fettsäuren und benutzte eine Clark-Elektrode zur Messung des Sauerstoffverbrauchs. Hierbei fiel ein nicht signifikanter Trend auf, nach dem DCM-Herzen (n=9) eine geringere maximale Respiration als ICM-Herzen (n=9) zeigten [53]. Jarreta *et al*. untersuchten die Aktivität der Komplexe der Atmungskette in DCM-Herzen (n=17) im Vergleich zu ICM-Herzen (n=6) und einer Kontrollgruppe (n=17). Auch in dieser Studie wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen ICM und DCM gezeigt, die entsprechenden Direktvergleiche werden allerdings nicht berichtet. Ein Vergleich der gemessenen Komplexaktivitäten lässt allerdings die Vermutung zu, dass die untersuchten ICM-Herzen bei vergleichbarem Mitochondriengehalt möglicherweise eine höhere Aktivität von Komplex III zeigen könnten als die Proben aus DCM-Herzen [58]. Auch Quigley *et al*., deren Studie mit sechs Patienten mit ischämischer und acht mit anderer, nicht weiter benannter Ursache der Herzinsuffizienz ebenfalls eher kleine Gruppen aufweist, berichten von keinem signifikanten Unterschied der Aktivität von Komplex IV und der CSA zwischen der ischämischen und nicht-ischämischen Gruppe [141].

In einer weiteren Studie, die die Enzymexpression der Glycolyse, der Citratsynthase und weiterer Stoffe in Herzen mit DCM (n=14) und HCM (n=5) zum Ziel hatte, wurden diskrete Unterschiede zwischen den Ätiologie-Gruppen gefunden, die sich mindestens im Fall einer unterschiedlichen Hexokinase aber durchaus manifest zeigten [71]. Dies lässt die Vermutung von speziellen Unterschieden im myokardialen Energiestoffwechsel zwischen Patienten mit HF verschiedener Ätiologien zu. Melenovsky *et al*., die den Effekt von verringerter Eisenkonzentration auf verschiedene Parameter der mitochondrialen Funktion in

explantierten Herzen von HTX-Patienten untersuchten, fanden ebenfalls Anzeichen für pathologische mitochondriale Funktion im versagenden Herzen im Vergleich zu Spenderherzen als Kontrollen. Sie wiesen darauf hin, dass in ihrer Analyse kein signifikanter Unterschied der Atmungskettenaktivität zwischen Patienten mit ischämischer im Vergleich zu nicht-ischämischer Ursache der Herzinsuffizienz bestand [138]. Leider fehlen hierbei Angaben über die möglicherweise sehr heterogene Zusammensetzung von HF-Ursachen der nicht-ischämischen Gruppe. Ebenso besteht ein wichtiger methodischer Unterschied: Die betreffende Arbeitsgruppe untersuchte (ebenso wie Quigley *et al*. und Jarreta *et al*. [58, 141]) in primär schockgefrorenem Gewebe Enzymaktivitäten, die die Aktivität der Atmungskette widerspiegeln sollten. Möglicherweise unterschätzt diese Methode aber bestehende mitochondriale Defekte im Vergleich zur Untersuchung intakter Zellen, da insbesondere unklar bleibt, wie einzelne Komplexe der Atmungskette miteinander interagieren [127, 141]. Die Untersuchung vitalen Myokards mit intakten Mitochondrien im Zellverband mittels hochauflösender Respirometrie ist hingegen eher in der Lage, die mitochondriale Funktion im möglichst physiologischen Milieu zu bewerten [49, 127].

An mehreren Stellen in der Literatur wird auf die Problematik der Vergleichbarkeit von Ergebnissen von HF-Patienten mit verschiedener Ätiologie hingewiesen [21, 24, 52, 56]. Obwohl außerdem die oben beschriebenen Ergebnisse durchaus erste Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen bieten, beruft sich mindestens eine folgende Studie von Stride *et al.* darauf und führt sie als Argument an, nach dem eine Unterscheidung nach Ätiologie bei der Messung mitochondrialer Funktion im versagenden Herzen nicht notwendig sei [54]. Auch diese Studie, in der die mitochondriale Respiration bei HF mit einer Kontrollgruppe verglichen wird, unterscheidet ihre Patienten nach ICM und DCM, berichtet aber leider nur den direkten Vergleich der HF-Patienten mit T2DM bzw. mit ICM zur Kontrollgruppe.
Garnier und Kollegen wiesen 2009 verringerte CSA und mitochondriale Respiration bei HF (n=20) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aus nicht transplantierten Herzen (n=17) nach [56]. Die HF-Gruppe umfasste Patienten mit sechs verschiedenen HF-Ätiologien, worauf in der Studie gesondert hingewiesen wird. Die Reduktion der CSA bei HF im Vergleich zu gesunden Herzen ist nicht zweifelsfrei nachgewiesen, da manche Gruppen in ihren Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied festgestellt haben [54, 58], andere hingegen schon [56, 71, 138].

4.3 Geringere myokardiale mitochondriale Respiration bei Patienten mit ischämischer als nicht-ischämischer Herzinsuffizienz

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Herzen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz aufgrund von ICM sich in ihrer mitochondrialen Funktion signifikant von vergleichbaren Herzen mit DCM unterscheiden. Hierbei wiesen Herzen mit ICM geringere Werte auf als Herzen mit DCM, was die OXPHOS-Kapazität, die ETS-Kapazität und die Citrat-Synthase-Aktivität betraf, nicht aber die ROS-Produktion.

Die mitochondriale Respiration zeigte sich je nach stimulierender bzw. inhibierender Substratkombination im Myokard der ICM-Patienten im Vergleich zu DCM-Patienten um 18-31% verringert. Dies beinhaltete reduzierte OXPHOS-Kapazität und ETS-Kapazität sowie eine reduzierte Kapazität des Fettsäuren-verwertenden ETF-Systems. Der relative Beitrag der Fettsäuren zur Respiration, ausgedrückt als CETF geteilt durch die maximale OXPHOS-Kapazität (vergleiche Abschnitt 2.2.4), unterschied sich allerdings nicht signifikant zwischen Patienten mit ICM und DCM. Hieraus lässt sich ableiten, dass keine der beiden Gruppen in besonderer Weise von der Zugabe von Fettsäuren zu den Mitochondrien profitieren konnte und dass das ETF-System in beiden Gruppen in vergleichbarer Ausprägung zum Elektronentransport beiträgt.
Diese Ergebnisse weichen in Teilen von bisherigen Studien ab: So fanden Sharov *et al.* keinen signifikanten Unterschied der OXPHOS-Kapazität zwischen ICM und DCM, wohl aber einen nicht-signifikanten Trend, nach welchem die OXPHOS-Kapazität im ICM-Myokard höher sei als bei DCM [53]. Das unterschiedliche Ergebnis ist möglicherweise durch folgende Punkte zu erklären: Die Verteilung von Patienten mit Diabetes mellitus zwischen den Ätiologie-Gruppen bleibt in den Ergebnissen unklar, könnte aber bei ungleichem Verhältnis durchaus den Vergleich der mitochondrialen Funktion beeinflusst haben [74, 77]. Sharov *et al.* berichten außerdem alle Ergebnisse normiert auf nicht-Kollagen-Protein und nicht auf Probengewicht bzw. Citratsynthase-Aktivität oder einen anderen Marker für mitochondrialen Gehalt im Gewebe. Es wurde außerdem keine durch Fettsäuren unterstützte Respiration erhoben. Nicht zuletzt könnte die abweichende Messmethode (konventionelle Clark-Elektrode vs. Hochauflösende Respirometrie) [142] eine Rolle für unterschiedliche Ergebnisse gespielt haben.

Im zweiten Messprotokoll konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Respiration bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz aufgrund von ICM im Vergleich zu DCM auch ohne Zugabe von Fettsäuren und entsprechend ausschließlich direkter Stimulation der Atmungskette signifikant reduziert ist. Hierzu wurden Glutamat zur Herstellung von NADH für Komplex I sowie Succinat zur Regeneration von $FADH_2$ für Komplex II hinzugefügt. Die Differenz zwischen Patienten mit ICM oder DCM lag zwischen 32-44%. Bemerkenswerterweise zeigte sich die von Komplex I getragene Respiration im ICM-Myokard weniger deutlich vermindert (32%) als die Komplex II-assoziierte Respiration (42%). Auch hier lässt sich keine definitive Aussage über eine mögliche stärkere Beteiligung eines bestimmten Komplexes treffen, nichtsdestotrotz kann diese Beobachtung als Startpunkt für weitere Studien mit genaueren, Komplex-spezifischen Protokollen genutzt werden.

Die auf das Probengewicht normierte OXPHOS- und ETS-Kapazität bietet die beste Möglichkeit, die gesamte funktionelle aerobe Leistungsfähigkeit der kardialen Mitochondrien integrativ zu beurteilen [46]. Hierbei werden mitochondriale Qualität und Quantität im Gesamtbild betrachtet. Als gewichtsunabhängige Indikatoren für die intrinsische mitochondriale Funktion und Effizienz dienen *Flux Control Ratios* [46]. Die Untersuchung dieser ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen ICM und DCM. Weder in der Kopplungseffizienz (*Respiratory Control Ratio*), noch im Entkopplungsgrad (*Leak Control Ratio*) unterschieden sich Patienten mit ICM und DCM signifikant, was darauf hindeutet, dass anstelle eines qualitativen Defektes der OXPHOS eher ein quantitativer Defekt der Mitochondriendichte im Myokard von Patienten mit ICM vorliegt. Dies wird durch Ergebnisse der vorausgegangenen Studie von Sharov *et al.* unterstützt, die ebenfalls keinen Unterschied der *Respiratory Control Ratio* zwischen ICM und DCM feststellen konnte [53]. Weiterhin zeigte sich im linksventrikulären Myokard der ICM-Patienten bei vergleichbarem Gesamtproteingehalt eine um 29% reduzierte Citrat-Synthase-Aktivität im Vergleich zu DCM-Myokard. Die CSA ist ein etablierter Marker für mitochondrialen Gehalt im Herzen bzw. Skelettmuskel [54-57, 92, 143, 144], ist allerdings als solcher im Skelettmuskel besser etabliert als im Myokard [57, 144] und stellt keinen definitiven Wert für die Mitochondriendichte dar. Insbesondere elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten in der Lage sein, hierüber exaktere Erkenntnisse zu liefern. Dass die CSA bei Patienten mit ICM verringert war, gibt allerdings zunächst einen deutlichen Hinweis auf geringere Mitochondrienanzahl bei ICM. Dies passt zu den Ergebnissen von Ahuja *et al*., die im Myokard einer kleinen Gruppe von ICM- und DCM-Patienten elektronenmikroskopisch

deutlich verringerten mitochondrialen Gehalt und kleinere Mitochondrien bei ICM-Patienten feststellten, während sich die Mitochondrien in DCM-Herzen deutlich vermehrt und dysmorph zeigten [21]. Begleitet wurde dies von einer verstärkten Expression von PGC-1α als Treiber der mitochondrialen Biogenese bei DCM, nicht aber bei ICM.

Nach Normalisierung der Respiration auf CSA stellte sich unter allen untersuchten Substratkombinationen kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit ICM bzw. DCM heraus. Jarreta *et al.*, die anstelle der Respiration die Aktivität der Komplexe der Atmungskette untersuchten, fanden ebenfalls nach Normierung auf CSA keinen signifikanten Unterschied zwischen ICM- und DCM-Herzen [58]. In der erwähnten Studie ist der Direktvergleich zwischen ICM und DCM nicht berichtet, sondern lediglich im Mehrgruppenvergleich (ICM vs. DCM vs. Kontrolle) mittels ANOVA aufgeführt worden, was vor der Normierung auf CSA zu einem signifikanten Unterschied führte. Dies bietet keinen genauen Aufschluss über einen möglichen Unterschied zwischen ICM und DCM, schließt diesen aber auch nicht aus.

Da in dieser Arbeit ein Komplex-unspezifisches Messprotokoll durchgeführt wurde, lässt sich keine sichere Aussage über eine besondere Beteiligung eines Komplexes an der Reduktion der OXPHOS oder ETS-Kapazität treffen. Auffällig war allerdings, dass der relative Unterschied zwischen ICM und DCM bei der Messung der ETS-Kapazität nach spezifischer Hemmung von Komplex I am größten war, die relative Reduktion der Respiration durch Komplex-I-Hemmung sich zwischen den Gruppen aber nicht signifikant unterschiedlich zeigte. Erst weitere Studien mit Komplex-spezifischen Messprotokollen wären in der Lage, die hieraus resultierende Frage zu klären, ob der Beitrag von Komplex II zur ETS-Kapazität bei ICM-Patienten im Nebenvergleich mit DCM-Patienten möglicherweise stärker beeinträchtigt sein könnte als der Beitrag von Komplex I.

In einem weiteren Experiment wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gemessen, wobei sich bei maximaler Stimulation der Mitochondrien keine signifikante Differenz zwischen Myokard mit ICM bzw. DCM zeigte. Dieses Ergebnis blieb auch nach Normierung auf CSA bestehen. Bei Herzinsuffizienz ist der oxidative Stress im Myokard erhöht und es gibt einige Ansätze zur Therapie der Herzinsuffizienz durch die Reduktion der ROS im Herzen [18, 19, 50, 70, 90]. Anhand unserer Ergebnisse lässt sich keine verlässliche Aussage darüber treffen, ob Patienten mit ICM bzw. DCM prinzipiell in besonderer Weise von einer

solchen Therapie profitieren könnten. Die direkte Untersuchung eines möglichen Einflusses der Herzinsuffizienz-Ätiologie auf die Wirksamkeit eines potentiellen ROS-reduzierenden Medikaments in den entsprechenden Wirksamkeitsstudien ist nichtsdestotrotz das Augenmerk wert. In einer Studie zum Effekt der Substitution von Coenzym Q10 bei herzinsuffizienten Patienten wurde bereits ein nicht-signifikanter Trend zu einer besseren Wirksamkeit des untersuchten Wirkstoffs im Hinblick auf die Verhinderung kardialer Ereignisse bei Patienten mit DCM im Vergleich zu Studienteilnehmern mit anderer Ursache der Herzinsuffizienz festgestellt [90].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine unterschiedliche myokardiale mitochondriale Leistungsfähigkeit zwischen herzinsuffizienten Patienten mit ICM bzw. DCM besteht. Diese ist bei Betrachtung vergleichbarer Ergebnisse für die Parameter der mitochondrialen Effizienz maßgeblich auf eine verminderte Mitochondriendichte im Myokard von ICM-Patienten zurückzuführen. Zukünftige Studien, die sich mit der mitochondrialen Funktion im versagenden menschlichen Herzen auseinandersetzen, sollten eine mögliche Beeinflussung ihrer Ergebnisse durch die Ätiologie der Herzinsuffizienz nicht außer Acht lassen.

4.4 Keine Assoziation verschiedener Glykämieparameter mit mitochondrialer Respiration

Der Substratgebrauch des Myokards zur Energieproduktion verändert sich im Krankheitsverlauf der Herzinsuffizienz deutlich. Bei weit fortgeschrittener Herzinsuffizienz nimmt sowohl die Fettsäure- als auch die Glucoseverwertung ab [59, 60, 65], letztere allerdings zu einem geringeren Anteil, was in einem gestiegenen relativen Beitrag des Glucosestoffwechsels zum Energiemetabolismus resultiert [29].

Der wohl wichtigste Einflussfaktor auf die Glucoseverwertung im Myokard ist der diabetische Status und eine mögliche Insulinresistenz, wie sie sich häufig bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz entwickelt [29, 66]. Ein klinisch relevanter und etablierter Marker für langfristige Glykämiebestimmung in einem Zeitraum von 8-12 Wochen ist der Wert für das glykierte Hämoglobin, HbA_{1c} [84]. Unsere Daten zeigten weder bei der Zugabe von Fettsäuren noch bei ausschließlich direkter Stimulation der Atmungskette eine Assoziation zwischen HbA_{1c} und OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität oder oxidativem

Stress. In mehreren vorausgegangenen Studien ist gezeigt worden, dass der HbA_{1c}-Wert im nicht versagenden Herzen invers mit der mitochondrialen Respiration korreliert [75, 76, 78]. In diesen Studien wurden Patienten mit einer zu geringen LVEF allerdings ausgeschlossen, wobei die Grenze teils bereits bei einer LVEF von weniger als 50% angesetzt wurde [75]. Dies schränkt die Vergleichbarkeit der vorausgegangenen Studien mit unserer Kohorte von Patienten mit fortgeschrittener HFrEF deutlich ein, wenngleich zu beachten ist, dass auch beim Vorliegen einer LVEF von über 50% eine Herzinsuffizienz vorliegen kann [1]. Da darüber hinaus bereits auf Unsicherheiten in der Nutzung des HbA_{1c} zur genauen und verlässlichen Erfassung der Glykämie hingewiesen worden ist [84], ist an anderer Stelle die aktuelle Plasmaglucose als Momentaufnahme der Glykämie und als Referenz genutzt worden [44, 79]. In der Analyse eines anderen Arms dieser Studie zeigte sich keine Korrelation des HbA_{1c}, sehr wohl aber der aktuellen Plasmaglucose mit der mitochondrialen Respiration [44]. Auch dieser Wert stand bei unseren Patienten allerdings nicht im Zusammenhang mit OXPHOS-Kapazität, ETS-Kapazität oder oxidativem Stress. Die Vermutung liegt nahe, dass mögliche Einflüsse der Glykämie auf die mitochondriale Funktion durch die deutliche Einschränkung durch die bei unseren Patienten vorliegende terminale Herzinsuffizienz übertüncht werden könnten. Um hierüber eine verlässlichere Aussage treffen zu können, sind weitere Studien vonnöten, die auch weitere Parameter der Insulinsensitivität mit einbeziehen.

Seit 2021 sind mit den SGLT2-Inhibitoren Dapagliflozin und Empagliflozin orale Antidiabetika als Erstlinienmedikamente für die Therapie der HFrEF in die Leitlinien der *European Society of Cardiology* aufgenommen worden, nachdem sie sich unabhängig von Diabetes-Status und der Glykämie als prognoseverbessernd erwiesen hatten [1, 145, 146]. Tatsächlich entfalten SGLT2-Inhibitoren ihre Wirkung wohl auch über eine neurohumorale Beeinflussung des mitochondrialen Energiestoffwechsels und demonstrieren so das Potential von Herzinsuffizienztherapien, welche die mitochondriale Funktion verbessern [147]. Unterschiedliche Effektivität von Dapagliflozin und Empagliflozin in Bezug auf den primären Endpunkt bei HF aus ischämischer bzw. nicht-ischämischer Genese wurde allerdings nicht beobachtet [145, 146].

4.5 Vermehrte Inflammation im Myokard bei ischämischer Herzinsuffizienz

Zelluläre kardiale Inflammation begleitet den Krankheitsverlauf der HF und beeinflusst ihn ungünstig [102]. Die hieraus resultierende Vermutung, dass immunsuppressive Therapie die klinischen Langzeitergebnisse bei HF-Patienten verbessern kann, wurde in mehreren klinischen Studien bei Patienten mit nicht-ischämischer HF bzw. inflammatorischer Kardiomyopathie bestätigt [116-119]. In der Studie „*Tailored IMmunosuppression in virus-negative Inflammatory Cardiomyopathy*“ (TIMIC) konnte eine Kombination aus Azathioprin und Prednison unter anderem bei 88% der Patienten zu einer Verbesserung der Pumpfunktion führen, jedoch bei keinem Patienten der Kontrollgruppe ein positiver Effekt beobachtet werden [116]. Dieser Effekt persistierte nach 20 Jahren im Vergleich mit einer nach *propensity score matching* konstruierten Kontrollgruppe, wobei auch das Langzeitüberleben nach Immunsuppression signifikant erhöht war [119]. In diesen Studien wurden allerdings Patienten mit kardialer Ischämie aus den Analysen ausgeschlossen.

Während sich in der CANTOS-Studie ein Vorteil immunsuppressiver Therapie bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung in Bezug auf Myokardinfarkte zeigte [123], konnte hierbei in einer Subanalyse eine dosisabhängige Reduktion von HF-assoziierten Hospitalisierungen in der Gesamtkohorte beobachtet werden, allerdings ohne dass sich ein verbessertes Ergebnis bei einer bestimmten Canakinumab-Dosis herausstellte [124]. In der CANTOS-Studie standen Patienten mit HF oder inflammatorischer Kardiomyopathie nicht im Vordergrund und nicht alle HF-bezogenen Werte sind bei Einschluss erhoben worden. Daher ist aus mehreren Gründen die Übertragbarkeit auf die hier vorliegende Patientengruppe eingeschränkt: Erstens lagen keine Informationen über die anfängliche LVEF vor, was eine HF-Einteilung erschwert. Zweitens wurden Patienten mit und ohne HF-Vorgeschichte eingeschlossen und drittens wurden all diejenigen Patienten eingeschlossen, die erhöhte Werte des hochsensitiven CRP aufwiesen, ohne dass die tatsächliche myokardiale Inflammation berücksichtigt wurde. Es stellt sich daher die Frage, ob auch in dieser Studie die Berücksichtigung relevanter kardialer Inflammation in vergleichbarem Ausmaß zur inflammatorischen Kardiomyopathie zu erhöhter Trennschärfe beigetragen hätte.

Es liegen wenig Daten zu direkten Vergleichen von zellulärer Inflammation im Herzen zwischen Patienten mit HF aus unterschiedlicher Ätiologie vor. Eine Studie fand eine vergleichbare Anzahl von Makrophagen im Myokard bei Patienten mit ICM und DCM [100], was auch unserem Ergebnis entspricht. Allerdings fand sich in der hier vorliegenden

Kohorte die Vermutung bestätigt, dass ein relevanter Anteil aller Patienten mit ICM kardiale Inflammation aufweist und dass dieser Anteil größer ist als unter Patienten mit DCM. Das CRP war zwischen Patienten mit ICM und DCM nicht unterschiedlich, ebenso fanden wir keinen Unterschied im CRP zwischen Patienten mit überschwelliger bzw. unterschwelliger kardialer Inflammation. Höhere lymphozytäre Inflammation im Myokard, nicht aber höheres Serum-CRP hing hierbei in der Gesamtgruppe der Patienten mit schlechterer mitochondrialer oxidativer Kapazität zusammen, außerdem zeigte sich verringerte oxidative Kapazität bei Patienten mit Inflammation in der Größenordnung der inflammatorischen Kardiomyopathie. Ein Zusammenhang reduzierter oxidativer Kapazität mit begleitender myokardialer Inflammation konnte bereits bei Patienten mit Abstoßungsreaktion nach HTX beobachtet werden [107], ist aber bei Patienten ohne immunsuppressive Therapie noch nicht beschrieben worden. Da die myokardiale mitochondriale OXPHOS-Kapazität wiederum mit der Herzfunktion unmittelbar zusammenhängt [55], lässt sich vermuten, dass eine zusätzliche Berücksichtigung der myokardialen Inflammation gegenüber alleiniger Betrachtung systemischer Inflammationsparameter eine bessere Selektion von Patienten mit relevanter Inflammation im Herzen erlaubt, welche von immunsuppressiver Therapie möglicherweise stärker profitieren könnten. Nach Stratifikation für HF-Ätiologie zeigte sich der Inflammationsstatus als dichotome Variable allerdings nicht als Prädiktor für oxidative Kapazität im Myokard. Es lässt sich daher nicht schlussfolgern, dass myokardiale Inflammation, wenn sie bei HF-Patienten vorliegt, in der einen oder anderen Ätiologie-Gruppe einen stärkeren Einfluss auf die mitochondriale Funktion hat als in der anderen. Die Dichotomisierung des Inflammationsstatus anhand der gesetzten Grenze von 14 $CD3^+$ Zellen pro mm^2 verringert hierbei allerdings relevant die Trennschärfe durch das Auslassen einer Gewichtung; die Einbeziehung der nicht-normalverteilten Dichte von Lymphozyten im Myokard in die lineare Regression, welche die Annahme von Normalverteilung voraussetzt, war jedoch entsprechend nicht möglich. Bezüglich der Frage nach einem Zusammenhang relevanter myokardialer Inflammation mit klinischen Langzeitresultaten in beiden ätiologischen Kontexten sind daher weitere Studien nötig, die bei HF-Patienten verschiedener Ätiologien bereits zu früheren Zeitpunkten im Krankheitsverlauf die myokardiale Inflammation erheben und mit Langzeitdaten in Verbindung bringen. Beim Nachweis eines Zusammenhangs myokardialer zellulärer Inflammation mit schlechteren klinischen Resultaten könnten klinische Studien zur Immunsuppression bei vorselektierten Patienten mit nachgewiesener lymphozytärer Inflammation im Myokard neue Aufschlüsse über die Wirksamkeit dieser Therapien bei HF verschiedener Ätiologie erbringen.

Oxidativer Stress ist bei HF im Myokard erhöht [50] und trägt wiederum selbst zur Emission von ROS bei [70]. Kardiale Fibrose ist ein unabhängiger Prädiktor für schlechtere klinische Verläufe bei Patienten mit HF und hängt ebenfalls mit reduzierter mitochondrialer Funktion und ROS-Belastung zusammen [108, 109]. In unserer Studie zeigten sich größere fibrotische Areale im Myokard vom ICM-Patienten im Vergleich zu DCM, wobei das Ausmaß der Fibrose weder in einer der Ätiologie-Gruppen noch in der Gesamtheit der Patienten mit oxidativer Kapazität oder ROS-Emission korrelierte. Auch eine Erhöhung der ROS-Belastung bei Patienten mit relevanter Inflammation konnte nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass alle Patienten eine weit fortgeschrittene HF aufwiesen und Effekte von Fibrosierung auf die mitochondriale Funktion, welche noch in früheren Stadien der Erkrankung hätten nachgewiesen werden können, bereits von der fortgeschrittenen Einschränkung der Mitochondrien, die die HF begleitet, übertüncht worden sein könnten. Für eine zuverlässige Klärung dieser Frage wäre allerdings eine Kontrollgruppe unerlässlich.

4.6 Limitationen

Die *ex vivo*-Untersuchung menschlichen Myokardgewebes bringt einige wichtige Limitationen mit sich, die zum Teil genereller Natur sind. In erster Linie zu nennen ist die Schwierigkeit, eine verlässliche, möglichst gesunde Kontrollgruppe zu finden. In vielen bisherigen Studien wurde zu diesem Zweck auf nicht transplantierte Spenderherzen zurückgegriffen [53, 56, 71, 138] oder atriales Gewebe von Patienten verwendet, die am Herzen operiert wurden [54], was nicht zuletzt aufgrund der unterschiedlichen Verarbeitung der Proben seine eigenen Limitationen mit sich bringt und in dieser Studie darüber hinaus nicht zur Verfügung stand.

Obwohl die erhaltenen Proben aus LVAD- bzw. HTX-Operationen im Vergleich zu solchen aus Myokardbiopsien [55] deutlich mehr Masse aufweisen, reichte das Gewebe nicht immer für alle notwendigen Untersuchungen, sodass einige Ergebnisse nur in Untergruppen der Kohorten untersucht werden konnten. Auch Expressions- oder Proteinanalysen konnten bisher nicht durchgeführt werden, welche genaueren Aufschluss über Stoffwechselwege liefern könnten. Des Weiteren weisen Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz häufig schwere Komorbiditäten auf, bei denen ein möglicher Einfluss auf die mitochondriale Funktion nicht im Einzelfall ausgeschlossen werden kann. Selbiges gilt für die

Polymedikation. Da sich die Gruppen im Hinblick auf die Verteilung dieser Faktoren hier allerdings gut vergleichbar zeigten (vgl. Abschnitt 3.1), lässt sich ein relevanter Einfluss dieser auf den hier gezogenen Vergleich als unwahrscheinlich einstufen. Nicht in allen Fällen lagen außerdem exakte und kürzlich erhobene Angaben zu hämodynamischen Parametern wie kardialen Drücken, LVEF oder *Cardiac Index* vor. Eine mögliche Korrelation zwischen OXPHOS-Kapazität und kardialer Leistungsfähigkeit, wie sie bereits in anderen Studien beobachtet worden ist [55, 141] konnte daher nicht untersucht werden.

Das Bild der Dilatativen Kardiomyopathie umfasst außerdem bereits eine Vielzahl an Entstehungswegen, wozu genetische Mutationen, endokrine und Autoimmunerkrankungen, postentzündliche oder postinfektiöse Veränderungen und mehrere weitere Faktoren gehören [148]. Eine individuelle genaue Ursachensuche und damit exaktere ätiologische Aufschlüsselung der DCM-Patientengruppe war hier nicht möglich, könnte aber einen weiteren Aufschluss über die mitochondriale Pathophysiologie bei Herzinsuffizienz liefern.

In den vorliegenden histologischen Analysen liegen nur Ergebnisse zur zellulären Inflammation im Myokard vor, was möglicherweise relevante Aspekte des humoralen Immunsystems außer Acht lässt. Auch war es hier aufgrund der zu geringen Anzahl von Patienten nicht möglich, Makrophagen nach verschiedenen etablierten Kriterien in Untergruppen mit durchaus verschiedenen Funktionen einzuteilen [100, 149], was zu genauerer Differenzierung führen könnte.

5 Schlussfolgerungen

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Herzinsuffizienz ischämischer und nicht-ischämischer Genese sich im Hinblick auf den mitochondrialen Energiemetabolismus und mitochondriale Dichte unterscheiden. In zukünftigen Studien zum mitochondrialen Metabolismus bei HF sollte die Ätiologie nicht außer Acht gelassen werden. Auch unterscheiden sich Patienten mit ICM und DCM im Hinblick auf die Häufigkeit relevanter myokardialer Inflammation; das Ausmaß der kardialen Inflammation hängt dabei mit der mitochondrialen oxidativen Kapazität im Myokard zusammen. Da Immunsuppression bereits vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit nicht-ischämischer HF gezeigt hat und Hinweise auf Vorteile immunsuppressiver Therapie in Bezug auf HF-assoziierte klinische Endpunkte bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung gezeigt wurden, können Studien folgen, welche kardiale Inflammation bereits zu früheren Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs erheben und spezifisch therapieren. Ein Zusammenhang

kardialer Inflammation mit schlechteren klinischen Verläufen könnte den Grundstein für klinische Studien legen, in denen die Wirksamkeit immunsuppressiver Therapie bei vorselektierten Patienten mit ICM-bedingter HF und bestätigter kardialer Inflammation untersucht wird.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. McDonagh, T.A., et al., *2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure.* Eur Heart J, 2021. **42**(36): p. 3599-3726.
2. Katz, A.M. and Katz, P.B., *Diseases of the heart in the works of Hippocrates.* Br Heart J, 1962. **24**: p. 257-64.
3. Katz, A.M., *Heart Failure: Pathophysiology, Molecular Biology, and Clinical Management*. 2000, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
4. Packer, M., *Development and Evolution of a Hierarchical Clinical Composite End Point for the Evaluation of Drugs and Devices for Acute and Chronic Heart Failure: A 20-Year Perspective.* Circulation, 2016. **134**(21): p. 1664-1678.
5. Packer, M., *How should physicians view heart failure? The philosophical and physiological evolution of three conceptual models of the disease.* Am J Cardiol, 1993. **71**(9): p. 3C-11C.
6. Bloom, M.W., et al., *Heart failure with reduced ejection fraction.* Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17058.
7. Kurmani, S. and Squire, I., *Acute Heart Failure: Definition, Classification and Epidemiology.* Curr Heart Fail Rep, 2017. **14**(5): p. 385-392.
8. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, *Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019.* Lancet, 2020. **396**(10258): p. 1204-1222.
9. Roth, G.A., et al., *Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study.* J Am Coll Cardiol, 2020. **76**(25): p. 2982-3021.
10. Bragazzi, N.L., et al., *Burden of heart failure and underlying causes in 195 countries and territories from 1990 to 2017.* Eur J Prev Cardiol, 2021.
11. Stork, S., et al., *Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study.* Clin Res Cardiol, 2017. **106**(11): p. 913-922.
12. Dorr, M., et al., *Hospitalizations for heart failure: still major differences between East and West Germany 30 years after reunification.* ESC Heart Fail, 2021. **8**(4): p. 2546-2555.
13. Cook, C., et al., *The annual global economic burden of heart failure.* Int J Cardiol, 2014. **171**(3): p. 368-76.
14. Ziaeian, B. and Fonarow, G.C., *Epidemiology and aetiology of heart failure.* Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(6): p. 368-78.
15. Baldasseroni, S., et al., *Left bundle-branch block is associated with increased 1-year sudden and total mortality rate in 5517 outpatients with congestive heart failure: a report from the Italian network on congestive heart failure.* Am Heart J, 2002. **143**(3): p. 398-405.
16. Stevenson, L.W., et al., *INTERMACS profiles of advanced heart failure: the current picture.* J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(6): p. 535-41.
17. Saeed, D., et al., *The 2023 International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for Mechanical Circulatory Support: A 10- Year Update.* J Heart Lung Transplant, 2023. **42**(7): p. e1-e222.
18. Brown, D.A., et al., *Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure.* Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(4): p. 238-250.
19. Bayeva, M., Gheorghiade, M., and Ardehali, H., *Mitochondria as a therapeutic target in heart failure.* J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(6): p. 599-610.
20. Sabbah, H.N., *Targeting the Mitochondria in Heart Failure: A Translational Perspective.* JACC Basic Transl Sci, 2020. **5**(1): p. 88-106.

21. Ahuja, P., et al., *Divergent mitochondrial biogenesis responses in human cardiomyopathy.* Circulation, 2013. **127**(19): p. 1957-67.
22. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel.* N Engl J Med, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
23. Hom, J. and Sheu, S.S., *Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells.* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 811-20.
24. Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D., *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart.* Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
25. Neupert, W. and Herrmann, J.M., *Translocation of proteins into mitochondria.* Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 723-49.
26. Reichert, A.S. and Neupert, W., *Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 41-9.
27. Annesley, S.J. and Fisher, P.R., *Mitochondria in Health and Disease.* Cells, 2019. **8**(7).
28. Nunnari, J. and Suomalainen, A., *Mitochondria: in sickness and in health.* Cell, 2012. **148**(6): p. 1145-59.
29. Bertero, E. and Maack, C., *Metabolic remodelling in heart failure.* Nat Rev Cardiol, 2018. **15**(8): p. 457-470.
30. Cook, S.A., Sugden, P.H., and Clerk, A., *Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential.* Circ Res, 1999. **85**(10): p. 940-9.
31. Taegtmeyer, H., et al., *Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart.* Ann N Y Acad Sci, 2004. **1015**: p. 202-13.
32. Greenwell, A.A., Gopal, K., and Ussher, J.R., *Myocardial Energy Metabolism in Non-ischemic Cardiomyopathy.* Front Physiol, 2020. **11**: p. 570421.
33. Karwi, Q.G. and Lopaschuk, G.D., *Ketone bodies are important metabolic fuel for the heart.* J Physiol, 2021.
34. Taegtmeyer, H., *Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications.* Curr Probl Cardiol, 1994. **19**(2): p. 59-113.
35. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease.* Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
36. Berger, J. and Moller, D.E., *The mechanisms of action of PPARs.* Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 409-35.
37. Ingwall, J.S., *Energy metabolism in heart failure and remodelling.* Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 412-9.
38. Arany, Z., et al., *Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle.* Cell Metab, 2005. **1**(4): p. 259-71.
39. St-Pierre, J., et al., *Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators.* Cell, 2006. **127**(2): p. 397-408.
40. Puigserver, P., et al., *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.* Cell, 1998. **92**(6): p. 829-39.
41. Oka, S.I., et al., *Multiple Levels of PGC-1alpha Dysregulation in Heart Failure.* Front Cardiovasc Med, 2020. **7**: p. 2.
42. Letts, J.A. and Sazanov, L.A., *Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain.* Nat Struct Mol Biol, 2017. **24**(10): p. 800-808.
43. Heinrich, P.C., Müller, M. and Graeve, L., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage, 2014, Berlin, Heidelberg: Springer.

44. Zweck, E., *Energiestoffwechsel des humanen Myokards bei Herzinsuffizienz und Diabetes Mellitus Typ 2*. Dissertation im Fach Medizin, 2021, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
45. Gnaiger, E., *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis*. 4th ed. 2014, Innsbruck: Mitochondr Physiol Network 19.12.
46. Gnaiger, E., *Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology.* Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(10): p. 1837-45.
47. Eaton, S., *Control of mitochondrial beta-oxidation flux.* Prog Lipid Res, 2002. **41**(3): p. 197-239.
48. Chance, B. and Williams, G.R., *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state.* J Biol Chem, 1955. **217**(1): p. 409-27.
49. Pesta, D. and Gnaiger, E., *High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle.* Methods Mol Biol, 2012. **810**: p. 25-58.
50. Munzel, T., et al., *Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series.* J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(2): p. 212-229.
51. Taegtmeyer, H., *Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure.* Circulation, 2004. **110**(8): p. 894-6.
52. Doenst, T., Nguyen, T.D. and Abel, E.D., *Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production.* Circ Res, 2013. **113**(6): p. 709-24.
53. Sharov, V.G., et al., *Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium.* J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(12): p. 2361-7.
54. Stride, N., et al., *Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction.* Eur J Heart Fail, 2013. **15**(2): p. 150-7.
55. Scheiber, D., et al., *High-resolution respirometry in human endomyocardial biopsies shows reduced ventricular oxidative capacity related to heart failure.* Exp Mol Med, 2019. **51**(2): p. 1-10.
56. Garnier, A., et al., *Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II.* Circ Heart Fail, 2009. **2**(4): p. 342-50.
57. Lemieux, H., et al., *Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart.* Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(12): p. 1729-38.
58. Jarreta, D., et al., *Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.* Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 860-5.
59. Osorio, J.C., et al., *Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure.* Circulation, 2002. **106**(5): p. 606-12.
60. Bedi, K.C., Jr., et al., *Evidence for Intramyocardial Disruption of Lipid Metabolism and Increased Myocardial Ketone Utilization in Advanced Human Heart Failure.* Circulation, 2016. **133**(8): p. 706-16.
61. Opie, L.H. and Knuuti, J., *The adrenergic-fatty acid load in heart failure.* J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(18): p. 1637-46.
62. Szendroedi, J. and Roden, M., *Ectopic lipids and organ function.* Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(1): p. 50-6.
63. Wende, A.R. and Abel, E.D., *Lipotoxicity in the heart.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 311-9.

64. Szendroedi, J., Phielix, E., and Roden, M., *The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus.* Nat Rev Endocrinol, 2011. **8**(2): p. 92-103.
65. Paolisso, G., et al., *Total-body and myocardial substrate oxidation in congestive heart failure.* Metabolism, 1994. **43**(2): p. 174-9.
66. Young, M.E., McNulty, P. and Taegtmeyer, H., *Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms.* Circulation, 2002. **105**(15): p. 1861-70.
67. Taegtmeyer, H., et al., *Insulin resistance protects the heart from fuel overload in dysregulated metabolic states.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(12): p. H1693-7.
68. Taegtmeyer, H. and Ballal, K., *No low-fat diet for the failing heart?* Circulation, 2006. **114**(20): p. 2092-3.
69. Santos, C.X., Raza, S., and Shah, A.M., *Redox signaling in the cardiomyocyte: From physiology to failure.* Int J Biochem Cell Biol, 2016. **74**: p. 145-51.
70. Zhou, B. and Tian, R., *Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure.* J Clin Invest, 2018. **128**(9): p. 3716-3726.
71. Kalsi, K.K., et al., *Energetics and function of the failing human heart with dilated or hypertrophic cardiomyopathy.* Eur J Clin Invest, 1999. **29**(6): p. 469-77.
72. Stride, N., et al., *Impaired mitochondrial function in chronically ischemic human heart.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(11): p. H1407-14.
73. Roden, M. and Shulman, G.I., *The integrative biology of type 2 diabetes.* Nature, 2019. **576**(7785): p. 51-60.
74. Riehle, C. and Bauersachs, J., *Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy.* Basic Res Cardiol, 2018. **114**(1): p. 2.
75. Ljubkovic, M., et al., *Disturbed Fatty Acid Oxidation, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis in Left Ventricle of Patients With Type 2 Diabetes.* Diabetes, 2019. **68**(10): p. 1924-1933.
76. Anderson, E.J., 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**(20): p. 1891-8.
77. Zweck, E., et al., *Exposure to Type 2 Diabetes Provokes Mitochondrial Impairment in Apparently Healthy Human Hearts.* Diabetes Care, 2021. **44**(5): p. e82-e84.
78. Montaigne, D., 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**(7): p. 554-64.
79. Croston, T.L., et al., *Functional deficiencies of subsarcolemmal mitochondria in the type 2 diabetic human heart.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **307**(1): p. H54-65.
80. Jelenik, T., et al., *Insulin Resistance and Vulnerability to Cardiac Ischemia.* Diabetes, 2018. **67**(12): p. 2695-2702.
81. Ferdinandy, P., Schulz, R. and Baxter, G.F., *Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning.* Pharmacol Rev, 2007. **59**(4): p. 418-58.
82. Bertrand, L., et al., *Insulin signalling in the heart.* Cardiovasc Res, 2008. **79**(2): p. 238-48.
83. Mazumder, P.K., et al., *Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts.* Diabetes, 2004. **53**(9): p. 2366-74.
84. Wright, L.A. and Hirsch, I.B., *Metrics Beyond Hemoglobin A1C in Diabetes Management: Time in Range, Hypoglycemia, and Other Parameters.* Diabetes Technol Ther, 2017. **19**(S2): p. S16-S26.

85. Ardehali, H., et al., *Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies.* Eur J Heart Fail, 2012. **14**(2): p. 120-9.
86. Daubert, M.A., et al., *Novel Mitochondria-Targeting Peptide in Heart Failure Treatment: A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Elamipretide.* Circ Heart Fail, 2017. **10**(12).
87. Sabbah, H.N., et al., *Chronic Therapy With Elamipretide (MTP-131), a Novel Mitochondria-Targeting Peptide, Improves Left Ventricular and Mitochondrial Function in Dogs With Advanced Heart Failure.* Circ Heart Fail, 2016. **9**(2): p. e002206.
88. Fragasso, G., et al., *A randomized clinical trial of trimetazidine, a partial free fatty acid oxidation inhibitor, in patients with heart failure.* J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(5): p. 992-8.
89. Winter, J.L., et al., *Effects of trimetazidine in nonischemic heart failure: a randomized study.* J Card Fail, 2014. **20**(3): p. 149-54.
90. Mortensen, S.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.* JACC Heart Fail, 2014. **2**(6): p. 641-9.
91. Zafeiridis, A., et al., *Regression of cellular hypertrophy after left ventricular assist device support.* Circulation, 1998. **98**(7): p. 656-62.
92. Scheiber, D., et al., *Reduced Myocardial Mitochondrial ROS Production in Mechanically Unloaded Hearts.* J Cardiovasc Transl Res, 2019. **12**(2): p. 107-115.
93. Chokshi, A., et al., *Ventricular assist device implantation corrects myocardial lipotoxicity, reverses insulin resistance, and normalizes cardiac metabolism in patients with advanced heart failure.* Circulation, 2012. **125**(23): p. 2844-53.
94. Heerdt, P.M., et al., *Disease-specific remodeling of cardiac mitochondria after a left ventricular assist device.* Ann Thorac Surg, 2002. **73**(4): p. 1216-21.
95. Adamo, L., et al., *Reappraising the role of inflammation in heart failure.* Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(5): p. 269-285.
96. Van Linthout, S. and Tschope, C., *Inflammation - Cause or Consequence of Heart Failure or Both?* Curr Heart Fail Rep, 2017. **14**(4): p. 251-265.
97. Mann, D.L., et al., *Innate immunity in the adult mammalian heart: for whom the cell tolls.* Trans Am Clin Climatol Assoc, 2010. **121**: p. 34-50; discussion 50-1.
98. Ferrari, R., et al., *Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure.* Circulation, 1995. **92**(6): p. 1479-86.
99. Mann, D.L., *Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future.* Circ Res, 2002. **91**(11): p. 988-98.
100. Bajpai, G., et al., *The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions.* Nat Med, 2018. **24**(8): p. 1234-1245.
101. Hu, S., et al., *Different Roles of Resident and Non-resident Macrophages in Cardiac Fibrosis.* Front Cardiovasc Med, 2022. **9**: p. 818188.
102. Blanton, R.M., Carrillo-Salinas, F.J., and Alcaide, P., *T-cell recruitment to the heart: friendly guests or unwelcome visitors?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019. **317**(1): p. H124-H140.
103. Nevers, T., et al., *Left Ventricular T-Cell Recruitment Contributes to the Pathogenesis of Heart Failure.* Circ Heart Fail, 2015. **8**(4): p. 776-87.
104. Abbate, A., et al., *Widespread myocardial inflammation and infarct-related artery patency.* Circulation, 2004. **110**(1): p. 46-50.
105. Noutsias, M., et al., *Phenotypic characterization of infiltrates in dilated cardiomyopathy - diagnostic significance of T-lymphocytes and macrophages in inflammatory cardiomyopathy.* Med Sci Monit, 2002. **8**(7): p. CR478-87.

106. Oka, T., et al., *Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure.* Nature, 2012. **485**(7397): p. 251-5.
107. Scheiber, D., et al., *Human myocardial mitochondrial oxidative capacity is impaired in mild acute heart transplant rejection.* ESC Heart Fail, 2021. **8**(6): p. 4674-4684.
108. Humeres, C. and Frangogiannis, N.G., *Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart.* JACC Basic Transl Sci, 2019. **4**(3): p. 449-467.
109. Gibb, A.A., Lazaropoulos, M.P., and Elrod, J.W., *Myofibroblasts and Fibrosis: Mitochondrial and Metabolic Control of Cellular Differentiation.* Circ Res, 2020. **127**(3): p. 427-447.
110. Gourdie, R.G., Dimmeler, S., and Kohl, P., *Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease.* Nat Rev Drug Discov, 2016. **15**(9): p. 620-638.
111. Santos-Gallego, C.G., et al., *Empagliflozin Ameliorates Diastolic Dysfunction and Left Ventricular Fibrosis/Stiffness in Nondiabetic Heart Failure: A Multimodality Study.* JACC Cardiovasc Imaging, 2021. **14**(2): p. 393-407.
112. Sabe, S.A., et al., *Canagliflozin Improves Myocardial Perfusion, Fibrosis, and Function in a Swine Model of Chronic Myocardial Ischemia.* J Am Heart Assoc, 2023. **12**(1): p. e028623.
113. Parrillo, J.E., et al., *A prospective, randomized, controlled trial of prednisone for dilated cardiomyopathy.* N Engl J Med, 1989. **321**(16): p. 1061-8.
114. Wojnicz, R., et al., *Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results.* Circulation, 2001. **104**(1): p. 39-45.
115. Frustaci, A., et al., *Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders.* Circulation, 2003. **107**(6): p. 857-63.
116. Frustaci, A., Russo, M.A., and Chimenti, C., *Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study.* Eur Heart J, 2009. **30**(16): p. 1995-2002.
117. Escher, F., et al., *Long-term outcome of patients with virus-negative chronic myocarditis or inflammatory cardiomyopathy after immunosuppressive therapy.* Clin Res Cardiol, 2016. **105**(12): p. 1011-1020.
118. Merken, J., et al., *Immunosuppressive Therapy Improves Both Short- and Long-Term Prognosis in Patients With Virus-Negative Nonfulminant Inflammatory Cardiomyopathy.* Circ Heart Fail, 2018. **11**(2): p. e004228.
119. Chimenti, C., Russo, M.A., and Frustaci, A., *Immunosuppressive therapy in virus-negative inflammatory cardiomyopathy: 20-year follow-up of the TIMIC trial.* Eur Heart J, 2022. **43**(36): p. 3463-3473.
120. Ridker, P.M., et al., *Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events.* N Engl J Med, 2019. **380**(8): p. 752-762.
121. Nidorf, S.M., et al., *Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease.* N Engl J Med, 2020. **383**(19): p. 1838-1847.
122. Stahli, B.E., et al., *Mammalian Target of Rapamycin Inhibition in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction.* J Am Coll Cardiol, 2022. **80**(19): p. 1802-1814.
123. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease.* N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
124. Everett, B.M., et al., *Anti-Inflammatory Therapy With Canakinumab for the Prevention of Hospitalization for Heart Failure.* Circulation, 2019. **139**(10): p. 1289-1299.

125. Caforio, A.L., et al., *Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases.* Eur Heart J, 2013. **34**(33): p. 2636-48, 2648a-2648d.
126. Veksler, V.I., et al., *Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers.* Biochim Biophys Acta, 1987. **892**(2): p. 191-6.
127. Kuznetsov, A.V., et al., *Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells.* Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 965-76.
128. Salin, K., et al., *The RCR and ATP/O Indices Can Give Contradictory Messages about Mitochondrial Efficiency.* Integr Comp Biol, 2018. **58**(3): p. 486-494.
129. Makrecka-Kuka, M., Krumschnabel, G., and Gnaiger, E., *High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria.* Biomolecules, 2015. **5**(3): p. 1319-38.
130. Starkov, A.A., *Measurement of mitochondrial ROS production.* Methods Mol Biol, 2010. **648**: p. 245-55.
131. Morgunov, I. and Srere, P.A., *Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate.* J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29540-4.
132. Benard, G., et al., *Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation.* Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1172-82.
133. Cohen, J., *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed. 1988, Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates. xxi, 567 p.
134. Suttorp, N., Möckel, M., Siegmund, B. and Dietel, M., *Harrisons Innere Medizin*. 20th ed. 2020, Stuttgart: Thieme
135. Jankowska, E.A., et al., *Iron deficiency and heart failure: diagnostic dilemmas and therapeutic perspectives.* Eur Heart J, 2013. **34**(11): p. 816-29.
136. Kurz, K., et al., *Anaemia, iron status, and gender predict the outcome in patients with chronic heart failure.* ESC Heart Fail, 2020. **7**(4): p. 1880-1890.
137. Klip, I.T., et al., *Iron deficiency in chronic heart failure: an international pooled analysis.* Am Heart J, 2013. **165**(4): p. 575-582 e3.
138. Melenovsky, V., et al., *Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis.* Eur J Heart Fail, 2017. **19**(4): p. 522-530.
139. Hoes, M.F., et al., *Iron deficiency impairs contractility of human cardiomyocytes through decreased mitochondrial function.* Eur J Heart Fail, 2018. **20**(5): p. 910-919.
140. Lupu, M., Tudor, D.V., and Filip, G.A., *Influence of mitochondrial and systemic iron levels in heart failure pathology.* Heart Fail Rev, 2019. **24**(5): p. 647-659.
141. Quigley, A.F., et al., *Mitochondrial respiratory chain activity in idiopathic dilated cardiomyopathy.* J Card Fail, 2000. **6**(1): p. 47-55.
142. Djafarzadeh, S. and Jakob, S.M., *High-resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function in Permeabilized and Intact Cells.* J Vis Exp, 2017(120).
143. Krajcova, A., et al., *High resolution respirometry to assess function of mitochondria in native homogenates of human heart muscle.* PLoS One, 2020. **15**(1): p. e0226142.
144. Larsen, S., et al., *Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects.* J Physiol, 2012. **590**(14): p. 3349-60.
145. McMurray, J.J.V., et al., *Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction.* N Engl J Med, 2019. **381**(21): p. 1995-2008.
146. Packer, M., et al., *Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure.* N Engl J Med, 2020. **383**(15): p. 1413-1424.

147. Packer, M., *Molecular, Cellular, and Clinical Evidence That Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Act as Neurohormonal Antagonists When Used for the Treatment of Chronic Heart Failure.* J Am Heart Assoc, 2020. **9**(16): p. e016270.
148. Schultheiss, H.P., et al., *Dilated cardiomyopathy.* Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 32.
149. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages.* Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 986-95.

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Julia Szendrödi und Ralf Westenfeld, die meine Arbeit ursprünglich betreut und mich für Mitochondrien und Herzinsuffizienz begeistert haben, sowie Daniel Scheiber, der über die ganzen Jahre mein primärer Ansprechpartner war. Ihr habt mir über dieses spannende Projekt viele Türen geöffnet, dabei meine ersten wissenschaftlichen Gehversuche ermöglicht und mit mir akribisch die Ergebnisse diskutiert, wobei ich ungeahnte Mengen gelernt habe.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Elric Zweck, der mich überhaupt erst an das Projekt herangeführt hat, mir immer mit hilfreichem Rat zur Seite stand und mir geduldig immer wieder etwas beibringen konnte. Das Projekt wäre auch ohne meine weiteren Vorgänger und Nachfolger Sophie Albermann, Martin Leung, Constanze Moos und Max Karschnia niemals so ordentlich geworden.

Viel Unterstützung ist mir auch aus dem Laborteam des Deutschen Diabetes-Zentrums entgegengekommen, insb. Ilka Rokitta, Fariba Zivehe, und Myrko Eßer. Dank gilt auch Malte Kelm und Michael Roden, deren Institute mich während meiner Arbeit beherbergt haben, sowie der Klinik für Herzchirurgie in Düsseldorf, namentlich Payam Akhyari, Diyar Saeed, Udo Boeken und Artur Lichtenberg.

Unschätzbar geholfen hat mir immer die Unterstützung meiner Eltern und Geschwister mit ihren verständnisvollen offenen Ohren und andauernder Motivation. Auch all meine Freunde haben mich immer wieder motiviert und gelegentlich aufgefangen, allen voran Aglaia.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei Amin Polzin und Christian Buchbender für die unkomplizierte und entgegenkommende Übernahme der Betreuung und das Finalisieren meines Projekts.