

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

**Veränderungen der mitochondrialen  
Ketonkörper-Oxidation  
im insuffizienten und diabetischen Herzen**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Johannes Werner Schmidt

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der 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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Zweck, E., Piel, S., **Schmidt, J.W.**, Scheiber, D., Schön, M., Kahl, S., Burkart, V., Dewidar, B., Remus, R., Chadt, A., Al-Hasani, H., Mastrototaro, L., Aubin, H., Boeken, U., Lichtenberg, A., Distler, J., Polzin, A., Kelm, M., Westenfeld, R., Wagner, R., Schrauwen, P., Szendroedi, J., Roden, M., Granata, C., (2025), Impaired mitochondrial ketone body oxidation in insulin resistant states. *eBioMedicine*, (122)

# Zusammenfassung

Sowohl die Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) als auch Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) gehen mit Veränderungen des myokardialen mitochondrialen Stoffwechsels einher. Hierbei scheinen auch Veränderungen im Ketonkörper (KB)-Metabolismus eine wichtige Rolle zu spielen. Bisher wurde dieser im humanen Myokard jedoch nur mithilfe von Surrogat-Parametern untersucht. In welchem Ausmaß KB bei HFrEF und T2D tatsächlich zur myokardialen mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) verwendet werden, bleibt unklar.

In dieser Arbeit wurden die Hypothesen aufgestellt, dass (1) die KB-abhängige OXPHOS Kapazität in der HFrEF und (2) bei T2D verändert ist.

Hierzu wurden humane myokardiale Proben verschiedener Kollektive (mit und ohne HFrEF; mit und ohne T2D) untersucht. Das Myokard wurde während kardiochirurgischer Operationen oder als Endomyokardbiopsien mittels Herzkatheter akquiriert. Zusätzlich wurde murines Myokard ex-vivo von Mäusen mit oder ohne ischämische HFrEF, induziert mittels permanenter Ligation des Ramus interventricularis anterior, untersucht. Primärer Endpunkt war die mittels hochauflösender Respirometrie (HRR) bestimmte Substrat-abhängige mitochondriale Respiration. Verwendet wurden konventionelle Substrate (Fettsäuren, NADH-gekoppelte Substrate und Succinat) oder die KB  $\beta$ -Hydroxybutyrat (HBA) und Acetoacetat (ACA). Die myokardiale Citrat-Synthase-Aktivität (CSA) wurde als Marker der mitochondrialen Dichte in den murinen Gruppen bestimmt. Konzentrationen der zirkulierenden KBs wurden ebenfalls gemessen.

In der HFrEF-Studie wurden insgesamt 55 vs. 55 humane Probanden und 8 vs. 8 Mäuse mit und ohne HFrEF verglichen. Die maximale OXPHOS Kapazität bei HFrEF war geringer, die KB-spezifische OXPHOS Kapazität war hingegen nicht signifikant niedriger. Somit ergab sich ein höherer relativer Anteil der KB-spezifischen zur maximalen OXPHOS. Die CSA als Marker des Mitochondrien-Gehalts unterschied sich nicht zwischen HFrEF und Kontrollen. Bei HFrEF lagen erhöhte zirkulierende KB gegenüber Kontrollen vor, die jedoch innerhalb der HF-Gruppe negativ mit der Kapazität zur KB-Oxidation korrelierten.

In der T2D-Studie wurde der Einfluss von T2D auf gesunde Spenderherzen untersucht. Hierzu wurden humane Probanden ohne HF (nach Herztransplantation) verglichen, von denen 22 einen T2D und 35 keinen T2D („Kontrollen“) aufwiesen. Bei T2D zeigte sich hier wie schon in der HFrEF eine geringere maximale OXPHOS Kapazität. Die KB-spezifische OXPHOS Kapazität war jedoch bei T2D ebenfalls vermindert. Insbesondere die nicht von der 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase abhängigen Schritte der Ketolyse schienen stärker betroffen zu sein. Eine Korrelation von zirkulierenden KB und Respiration zeigte sich in dieser Kohorte nicht.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine teilweise erhaltene und relativ erhöhte myokardiale Kapazität zur KB-Oxidation bei HFrEF. Es scheint jedoch metabolisch maladaptive Stadien mit Verlust dieser Fähigkeit bei erhöhten Konzentrationen an zirkulierenden KB zu geben. Bei T2D ist die Kapazität KB mittels oxidativer Phosphorylierung zur Energiegewinnung zu verwenden hingegen niedriger und das eigentliche Angebot an KB kann bei T2D vom Myokard nicht genutzt werden. Sowohl für die HFrEF als auch T2D ergeben sich daraus mögliche therapeutische Angriffspunkte.

## Abstract

Heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) and Type 2 Diabetes (T2D) are associated with altered myocardial energy metabolism. Recent studies indicate a potential impact of ketone bodies (KB) as alternative mitochondrial substrates. However, so far KB-metabolism has only been assessed by surrogate parameters. The actual amount of KB-dependent mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) in failing or diabetic myocardium has not yet been quantified.

Therefore, we hypothesized that the myocardial capacity to utilize KBs for OXPHOS is altered (1) in HFrEF and (2) in T2D compared to controls.

To verify our hypotheses human myocardial samples from different cohorts (with and without HFrEF; with and without T2D) were examined. Human myocardium was collected during cardiac surgery or via endomyocardial biopsy during cardiac catheterization. Additionally, murine myocardium was examined ex-vivo from mice with or without chronic ischemic HFrEF induced by permanent ligation of the left anterior descending artery. The primary endpoint was substrate-dependent mitochondrial respiration measured by high-resolution respirometry (HRR). Conventional substrates (fatty acids, NADH-linked substrates and succinate) as well as the KBs  $\beta$ -hydroxybutyrate (HBA) and acetoacetate (ACA) were used. Myocardial citrate synthase activity (CSA) was determined as a marker of mitochondrial density in the murine groups. Concentrations of circulating KB were measured in human serum.

The HFrEF study included 110 humans (55 vs. 55) and 16 mice (8 vs. 8) with or without HFrEF, respectively. Here, lower OXPHOS capacity for all conventional respirometry substrates was observed in HFrEF. However, the absolute respiration derived via ketolysis was not different between the groups, resulting in a greater relative contribution of KBs to maximum OXPHOS capacity. CSA was not different between the murine groups with and without HFrEF, indicating comparable mitochondrial density. Interestingly, while HFrEF was characterized by elevated levels of circulating KBs, their serum concentrations were negatively associated with myocardial KB oxidative capacity within HFrEF.

In the T2D study, the influence of T2D on healthy donor hearts was studied. 57 previously heart transplanted human participants without HF were included and divided into 22 participants with T2D and 35 controls based on hemoglobin A<sub>1c</sub> and specific antihyperglycemic treatment. Similar to HFrEF, the T2D group also exhibited a tendency for lower maximum OXPHOS capacity compared to controls. However, unlike in HFrEF, the KB-dependent oxidative capacity was significantly impaired in T2D. Downstream ketolytic enzymes seemed to be impaired in particular. No correlations of circulating KBs and oxidative capacity were observed in T2D.

In conclusion, these findings suggest a partly maintained oxidative capacity for KBs in HFrEF despite a reduced overall oxidative capacity and therefore a greater relative KB contribution to mitochondrial oxidative phosphorylation. However, this ability seems to be lost with higher circulating KB levels. In contrast, T2D myocardium displays lower KB-dependent oxidative capacity. Thus, supply of KBs in T2D is mismatched and cannot be substantially used as alternative energy sources. Therefore, our findings hint towards KB metabolism as a potential therapeutic target in HF and T2D.

# Abkürzungsverzeichnis

|                         |                                                                    |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>ACA</b>              | Acetoacetat                                                        |
| <b>ADP</b>              | Adenosin-Diphosphat                                                |
| <b>ATP</b>              | Adenosin-Triphosphat                                               |
| <b>BDH1</b>             | D- $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase 1                         |
| <b>BIOPS</b>            | Biopsie-Erhaltungs-Lösung ( <i>biopsy preservation solution</i> )  |
| <b>BMI</b>              | <i>Body-Mass-Index</i>                                             |
| <b>CI</b>               | Herzindex ( <i>cardiac index</i> )                                 |
| <b>CoA</b>              | Coenzym A                                                          |
| <b>CSA</b>              | Citrat-Synthase-Aktivität                                          |
| <b>DbCM</b>             | Diabetische Kardiomyopathie                                        |
| <b>DTNB</b>             | 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure                                  |
| <b>cMRT</b>             | Kardiale Magnetresonanztomographie                                 |
| <b>EMB</b>              | Endomyokardbiopsie                                                 |
| <b>ETS</b>              | Elektronen-transferierendes System                                 |
| <b>FADH<sub>2</sub></b> | Flavin-Adenin-Dinucleotid                                          |
| <b>FCCP</b>             | Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon                     |
| <b>FCR</b>              | Fluss-Kontroll-Rate ( <i>Flux control ratio</i> )                  |
| <b>H<sub>2</sub></b>    | Wasserstoff                                                        |
| <b>HBA</b>              | $\beta$ -Hydroxybutyrat                                            |
| <b>HbA<sub>1c</sub></b> | Hämoglobin A <sub>1c</sub>                                         |
| <b>HF</b>               | Herzinsuffizienz ( <i>heart failure</i> )                          |
| <b>HFmrEF</b>           | Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter Ejektionsfraktion |
| <b>HFpEF</b>            | Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion                  |

|                      |                                                                                                                               |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>HFrEF</b>         | Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion                                                                            |
| <b>HMG</b>           | $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl                                                                                     |
| <b>HRR</b>           | Hochauflösende Respirometrie                                                                                                  |
| <b>HTX</b>           | Orthotope Herztransplantation                                                                                                 |
| <b>KB</b>            | Ketonkörper                                                                                                                   |
| <b>KL</b>            | Ketolyse                                                                                                                      |
| <b>LAD</b>           | Ramus interventricularis anterior ( <i>left anterior descending artery</i> )                                                  |
| <b>LVAD</b>          | Linksventrikuläres Herzunterstützungssystem<br>( <i>left ventricular assist device</i> )                                      |
| <b>LVEF</b>          | Linksventrikuläre Ejektionsfraktion                                                                                           |
| <b>MiRO5</b>         | Mitochondriales Respirations-Medium O5                                                                                        |
| <b>NADH</b>          | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid                                                                                                |
| <b>O<sub>2</sub></b> | Sauerstoff                                                                                                                    |
| <b>OXPHOS</b>        | Oxidative Phosphorylierung                                                                                                    |
| <b>ROX</b>           | Residuale Sauerstoff-Verbrauch                                                                                                |
| <b>SCOT</b>          | Succinyl-CoA:Acetoacetat-CoA-Transferase                                                                                      |
| <b>SGLT2</b>         | Natrium-Glukose-Cotransporter 2                                                                                               |
| <b>SUIT</b>          | Substrat-Entkoppler-Inhibitor ( <i>substrate-uncoupler-inhibitor</i> ) Titration                                              |
| <b>T1D</b>           | Diabetes mellitus Typ 1                                                                                                       |
| <b>T2D</b>           | Diabetes mellitus Typ 2                                                                                                       |
| <b>TNB</b>           | 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure                                                                                                     |
| <b>TTE</b>           | Transthorakale Echokardiographie                                                                                              |
| <b>ZETT</b>          | Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche<br>Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf |

# Inhaltsverzeichnis

|            |                                                              |           |
|------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung .....</b>                                      | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Herzinsuffizienz .....</b>                                | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Definition und Klassifikation.....                           | 1         |
| 1.1.2      | Epidemiologie .....                                          | 3         |
| 1.1.3      | Ätiologie und Pathogenese.....                               | 3         |
| <b>1.2</b> | <b>Diabetes mellitus .....</b>                               | <b>5</b>  |
| 1.2.1      | Definition und Klassifikation.....                           | 5         |
| 1.2.2      | Epidemiologie .....                                          | 6         |
| 1.2.3      | Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 .....  | 6         |
| 1.2.4      | Diabetische Kardiomyopathie .....                            | 7         |
| <b>1.3</b> | <b>Der mitochondriale Stoffwechsel.....</b>                  | <b>8</b>  |
| 1.3.1      | Oxidative Phosphorylierung .....                             | 8         |
| 1.3.2      | Messung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung..... | 10        |
| 1.3.3      | Bestimmung der mitochondrialen Dichte einer Probe.....       | 12        |
| <b>1.4</b> | <b>Physiologie der Ketonkörper .....</b>                     | <b>12</b> |
| 1.4.1      | Rolle und Funktion der Ketonkörper.....                      | 12        |
| 1.4.2      | Ketogenese und Ketolyse .....                                | 14        |
| <b>1.5</b> | <b>Energiestoffwechsel im Myokard.....</b>                   | <b>16</b> |
| 1.5.1      | Physiologischer myokardialer Energiestoffwechsel .....       | 16        |
| 1.5.2      | Myokardialer Energiestoffwechsel bei Pathologien .....       | 16        |
| <b>2</b>   | <b>Ziele und Hypothesen der Arbeit.....</b>                  | <b>20</b> |
| <b>3</b>   | <b>Material und Methoden .....</b>                           | <b>21</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Material .....</b>                                        | <b>21</b> |
| 3.1.1      | Verbrauchsmaterialien .....                                  | 21        |
| 3.1.2      | Chemikalien und Arzneimittel .....                           | 22        |
| 3.1.3      | Geräte.....                                                  | 24        |
| 3.1.4      | Software .....                                               | 24        |
| <b>3.2</b> | <b>Methoden .....</b>                                        | <b>25</b> |
| 3.2.1      | Studiendesign .....                                          | 25        |
| 3.2.2      | Humane Probanden .....                                       | 25        |
| 3.2.3      | Murine Individuen.....                                       | 31        |
| 3.2.4      | Hochauflösende Respirometrie an Myokard .....                | 33        |

|            |                                                                                    |           |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.5      | Messung der Citrat-Synthase Aktivität .....                                        | 39        |
| 3.2.6      | Messung der Ketonkörper-Konzentrationen im Serum .....                             | 41        |
| 3.2.7      | Statistische Analysen .....                                                        | 41        |
| <b>4</b>   | <b>Ergebnisse.....</b>                                                             | <b>46</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Ergebnisse der Herzinsuffizienz-Studie .....</b>                                | <b>46</b> |
| 4.1.1      | Humane Kohorten .....                                                              | 46        |
| 4.1.2      | Murine Gruppen .....                                                               | 54        |
| 4.1.3      | Gegenüberstellung der humanen und murinen Ergebnisse .....                         | 57        |
| <b>4.2</b> | <b>Ergebnisse der Diabetes mellitus-Studie .....</b>                               | <b>59</b> |
| 4.2.1      | Charakteristika der humanen Kohorten .....                                         | 59        |
| 4.2.2      | Respirometrie in den humanen Kohorten.....                                         | 62        |
| 4.2.3      | Konzentrationen der zirkulierenden Ketonkörper .....                               | 66        |
| 4.2.4      | Assoziation von zirkulierenden Ketonkörpern und Respirometrie .....                | 67        |
| <b>5</b>   | <b>Diskussion.....</b>                                                             | <b>68</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Eignung der untersuchten Gruppen .....</b>                                      | <b>68</b> |
| 5.1.1      | Gruppen, Modelle und Proben-Akquisition.....                                       | 68        |
| 5.1.2      | Charakteristika der Gruppen der Herzinsuffizienz-Studie.....                       | 69        |
| 5.1.3      | Charakteristika der Gruppen der Diabetes mellitus-Studie .....                     | 71        |
| <b>5.2</b> | <b>Metabolische Veränderungen des Myokards bei Herzinsuffizienz .....</b>          | <b>72</b> |
| 5.2.1      | Geringere OXPHOS Kapazität für konventionelle Substrate in der Herzinsuffizienz .. | 72        |
| 5.2.2      | Unterschiede der intrinsischen mitochondrialen Funktion.....                       | 72        |
| 5.2.3      | Ähnliche mitochondriale Dichte der Proben.....                                     | 73        |
| 5.2.4      | Ketonkörper-abhängige Respiration in der Herzinsuffizienz.....                     | 74        |
| <b>5.3</b> | <b>Metabolische Veränderungen des Myokards bei Diabetes mellitus Typ 2... 78</b>   |           |
| 5.3.1      | Geringere OXPHOS Kapazität bei Diabetes mellitus Typ 2 .....                       | 78        |
| 5.3.2      | Intrinsische mitochondriale Funktion .....                                         | 78        |
| 5.3.3      | Ketonkörper-abhängige Respiration bei Diabetes mellitus Typ 2.....                 | 79        |
| <b>5.4</b> | <b>Limitationen.....</b>                                                           | <b>82</b> |
| <b>6</b>   | <b>Schlussfolgerungen .....</b>                                                    | <b>85</b> |
| <b>7</b>   | <b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>                                     | <b>86</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

### 1.1.1 Definition und Klassifikation

Die Herzinsuffizienz (HF) ist von internationalen kardiologischen Fachgesellschaften in ihren aktuellen Leitlinien als klinisches Syndrom definiert, das durch Kardinalsymptome wie z.B. Luftnot, Müdigkeit und Knöchel-Ödeme charakterisiert ist [1-3]. Hervorgerufen wird es durch kardiale Funktionsstörungen und/oder Strukturdefekte mit daraus resultierenden erhöhten intrakardialen Drücken und/oder verminderter Herzleistung [1, 2]. Die hierfür ursächlichen Pathologien sind vielfältig, zumeist ist jedoch eine systolische, diastolische oder gemischte myokardiale Funktionsstörung zugrundeliegend (siehe 1.1.3) [1, 4].

Es existieren unterschiedliche Systeme, um die HF zu klassifizieren. Nach dem *American College of Cardiology* und der *American Heart Association* werden mit Fokus auf die Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankung die Stadien A bis D unterschieden (siehe Tabelle 1) [2, 3]. Klinisch kann eine Einteilung mit Blick auf den Schweregrad der Symptomatik nach der *New York Heart Association* (NYHA) vorgenommen werden (siehe Tabelle 2) [2, 5]. Phänotypisch erfolgt eine Klassifikation anhand der gemessenen linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) (siehe Tabelle 3), wobei sich die Phänotypen auch teils pathophysiologisch und ätiologisch unterscheiden [1-3]. Zudem kann grundsätzlich die akute HF von der chronischen HF unterschieden werden, wobei die akute HF eine rasch oder allmählich aufgetretene HF beschreibt, die aufgrund ihrer Schwere zu einer ungeplanten ärztlichen Vorstellung führt und der sowohl die Erstmanifestation einer neuen HF als auch, im häufigeren Fall, die Dekompensation einer chronischen HF zugrunde liegen kann [1].

| Stadium                               | Definition                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A:</b> Risiko für Herzinsuffizienz | Personen mit Risikofaktoren (z.B. arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit, positive Familienanamnese), aber ohne Symptome oder strukturelle oder funktionelle Herzerkrankung |
| <b>B:</b> Prä-Herzinsuffizienz        | Personen ohne Symptome einer Herzinsuffizienz, aber mit struktureller Herzerkrankung, erhöhten kardialen                                                                                                          |

|                                             |                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                             | Füllungsdrücken oder Risikofaktoren und laborchemisch erhöhtem B-Typ natriuretischem Peptid oder kardialem Troponin (ohne andere hierfür ursächliche Erkrankungen) |
| <b>C:</b> Symptomatische Herzinsuffizienz   | Personen mit aktuellen oder früheren Symptomen einer Herzinsuffizienz                                                                                              |
| <b>D:</b> Fortgeschrittene Herzinsuffizienz | Personen mit schweren Symptomen einer Herzinsuffizienz, die zu Einschränkung von Aktivitäten des täglichen Lebens oder wiederholter Hospitalisierung führen        |

**Tabelle 1: Stadien der Herzinsuffizienz nach dem *American College of Cardiology* und der *American Heart Association* [2, 3].**

| Stadium | Definition                                                                                                                                                                   |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I       | Herzinsuffizienz ohne Einschränkung von Aktivitäten oder Symptomen (Dyspnoe, Palpitationen, Erschöpfung oder Brustschmerz).                                                  |
| II      | Herzinsuffizienz mit Symptomen (Dyspnoe, Palpitationen, Erschöpfung oder Brustschmerz) bei stärkerer alltäglicher Belastung. Leichte Einschränkung der physischen Aktivität. |
| III     | Herzinsuffizienz mit Symptomen (Dyspnoe, Palpitationen, Erschöpfung oder Brustschmerz) bei leichter alltäglicher Belastung. Starke Einschränkung der physischen Aktivität.   |
| IV      | Herzinsuffizienz mit Symptomen (Dyspnoe, Palpitationen, Erschöpfung oder Brustschmerz) in Ruhe.                                                                              |

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

| Typ der Herzinsuffizienz                                                    | Kriterien                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF)                  | Symptome ± Untersuchungsbefund<br>LVEF $\leq$ 40%                                                                                                                                                                                                         |
| Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter Ejektionsfraktion (HFmrEF) | Symptome ± Untersuchungsbefund<br>LVEF 41%-49%                                                                                                                                                                                                            |
| Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF)                   | Symptome ± Untersuchungsbefund<br>LVEF $\geq$ 50%<br>Objektive Hinweise auf eine strukturelle und/oder funktionelle Anomalie, die auf eine diastolische Dysfunktion oder erhöhte Füllungsdrücke hinweist, inklusive erhöhtem B-Typ natriuretischem Peptid |

**Tabelle 3: Phänotypische Einteilung der Herzinsuffizienz anhand der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) nach der *European Society of Cardiology* [1].** HFrEF: *Heart failure with reduced ejection fraction*; HFmrEF: *Heart failure with mildly reduced ejection fraction*; HFpEF: *Heart failure with preserved ejection fraction*.

### **1.1.2 Epidemiologie**

National, wie auch international, stellt die HF auf individueller und gesamtgesellschaftlicher Ebene eine bedeutende Herausforderung im Gesundheitssystem dar [2, 6, 7]. Die Prävalenz der HF wird dabei global auf zwischen 37 Millionen und über 64 Millionen Betroffene geschätzt, wobei jedoch gerade für den südamerikanischen und afrikanischen Kontinent valide Daten fehlen [4, 7]. Für den europäischen und nordamerikanischen Raum beträgt die Prävalenz mit regionalen Unterschieden durchschnittlich 1-3 % [7]. In Deutschland liegt sie bei 3,9 % [8], wobei sie besonders mit zunehmendem Alter steigt und sich pro Lebensjahrzehnt ungefähr verdoppelt [4]. Generell scheint die Prävalenz in ihrer Tendenz steigend zu sein, was insbesondere auf eine alternde Gesellschaft und längeres Überleben durch verbesserte Therapien zurückzuführen ist [4, 7]. Die Inzidenz hingegen weist nach Stabilisierung in den letzten Jahrzehnten nun eine fallende Tendenz auf [7]. In Deutschland erkrankten pro Jahr ca. 655 von 100.000 Personen neu an einer HF [8]. Weiterhin hoch ist die Mortalität der HF mit einer Ein-Jahres-Mortalität von 15-30 % [7, 9] und einer Fünf-Jahres-Mortalität von bis zu 75 % [7]. Gesamtgesellschaftliche Relevanz erhält die HF zudem auch wegen häufiger Hospitalisationen: Ungefähr 1-2 % aller Hospitalisationen in der westlichen Welt sind auf eine HF zurückzuführen [4, 7]. Damit verbunden sind hohe Kosten von jährlich bis zu 25.000 Euro pro Patient [7, 10].

### **1.1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Das Syndrom der HF hat multiple Ursachen. Diese lassen sich orientierend in folgende drei große Gruppen unterteilen: Erkrankungen des Myokards (z.B. ischämische Herzerkrankung und Myokardinfarkt, immunologisch-vermittelte oder entzündliche Schädigungen, toxische Schädigungen, metabolische Störungen, Infiltrationen des Myokards und Speicherstörungen oder genetische Herzerkrankungen), Zustände der abnormalen Füllung (z.B. bei Herzklappenerkrankungen, arterieller und/oder pulmonaler Hypertonie, Volumenüberladung, Belastung durch gesteigerten Auswurf oder konstriktiven oder fibrosierenden Erkrankungen) und Arrhythmien (z.B. atriale oder ventrikuläre Tachy- oder Bradyarrhythmien, Überleitungsstörungen oder Pacing) [1, 2, 11]. Davon am häufigsten sind ischämische Herzerkrankungen, Myokardinfarkte, Hypertonien oder Herzklappen-Pathologien als Ursachen zu finden [2]. Während bei jüngeren Betroffenen oft ausschließlich oder vor allem das Herz betreffende

Erkrankungen vorliegen, sind ältere Betroffene meist auch generell kardiovaskulär gealtert [12]. Dabei spielen insbesondere die Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Prädiabetes und Diabetes mellitus, Adipositas und metabolisches Syndrom, Nikotinkonsum, Bewegungsmangel, ungesunde Ernährung, sowie Atherosklerose eine wichtige Rolle [2, 12, 13].

In der gemeinsamen Endstrecke kommt es häufig zu pathologischen Umbauprozessen (*Remodelling*) [14, 15], was zu mikro- und makrostrukturellen Änderungen der myokardialen Architektur führt [14]. Folge hiervon sind klinisch messbare Veränderungen des linken Ventrikels mit konzentrischer und/oder exzentrischer Hypertrophie und Dilatation [14].

In der Pathophysiologie der HF spielen auch biochemische, humorale und immunologische Veränderungen eine Rolle [14]. So wird z.B. das neurohumorale System und das Immunsystem aktiviert [14]. Ebenso sind insbesondere auch Veränderungen im kardialen Metabolismus mit der Entwicklung und Progression einer HF assoziiert (siehe 1.5.2.1) [14, 16, 17].

Generell unterscheiden sich die anhand der LVEF eingeteilten Phänotypen (siehe 1.1.1) auch in ihrer Ätiologie und Pathogenese [1, 2]. Zwar teilen sich sowohl die HF mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) als auch die HF mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) zuvor genannte Risikofaktoren und pathophysiologische Mechanismen [1, 18], während die HFrEF aber insbesondere auf Erkrankungen des Herzens selbst, wie der ischämischen Kardiomyopathie oder den heterogenen dilatativen Kardiomyopathien beruht [19], geht die sehr heterogene Erkrankung der HFpEF vor allem mit systemischen Erkrankungen, insbesondere dem metabolischen Syndrom einher [18]. Diese systemische Erkrankung führt pathogenetisch insbesondere über systemische Entzündung, endotheliale Dysfunktion und Störung der Mikrozirkulation zur Ausbildung einer HFpEF [18, 20-22]. Bei der HFpEF sind meist erhöhte ventrikuläre Füllungsdrücke messbar [20].

## 1.2 Diabetes mellitus

### 1.2.1 Definition und Klassifikation

Diabetes mellitus beschreibt eine Gruppe von Erkrankungen, die durch metabolische Störungen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels mit Überproduktion und verminderter Nutzung von Glucose gekennzeichnet sind und folglich mit einer Hyperglykämie einhergehen [23]. Die Diagnose eines Diabetes mellitus beruht auf der Messung der Hyperglykämie, entweder durch Bestimmung der Plasmaglukose oder durch Bestimmung des glykierten Hämoglobin (Hämoglobin A<sub>1c</sub>, HbA<sub>1c</sub>) [24]. Die möglichen diagnostischen Tests nach der *American Diabetes Association* sind in Tabelle 4 aufgeführt, wobei ein positives Ergebnis in einem der Tests bereits zur Diagnose eines Diabetes mellitus ausreicht [24].

| Diagnostischer Test                | Diagnose eines Diabetes mellitus bei       |
|------------------------------------|--------------------------------------------|
| Messung des HbA <sub>1c</sub>      | ≥ 6,5 %                                    |
| Messung der Nüchtern-Plasmaglukose | ≥ 126 mg/dl                                |
| Messung der Spontan-Plasmaglukose  | ≥ 200 mg/dl und Symptome der Hyperglykämie |
| Oraler Glucose-Toleranztest        | ≥ 200 mg/dl nach 2 Stunden                 |

**Tabelle 4: Tests zur Diagnose eines Diabetes mellitus nach der *American Diabetes Association* [24].** Nüchtern ist definiert als keine Kalorien-Zufuhr für mind. 8 Stunden. Durchführung des oralen Glucose-Toleranztests durch Zufuhr von 75 g Glucose als orale Lösung in nüchternem Zustand.

Der Diabetes mellitus kann in verschiedene, teils heterogene klinische Gruppen eingeteilt werden, die sich in ihrer Genese und Pathophysiologie unterscheiden [24]:

- Diabetes mellitus Typ 1 (T1D): Ausgelöst durch autoimmune Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas mit folgendem meist absolutem Insulinmangel
- Diabetes mellitus Typ 2 (T2D): Insulin Resistenz mit folgendem nicht-autoimmunem progressivem Verlust der Insulin-Sekretion aus den  $\beta$ -Zellen
- Weitere Typen: Ausgelöst z.B. durch Erkrankungen des Pankreas, monogenetischen Veränderungen oder Medikamente und chemische Substanzen
- Gestationsdiabetes: im Rahmen einer Schwangerschaft im zweiten oder dritten Trimester ohne vorbestehenden Diabetes mellitus

### **1.2.2 Epidemiologie**

Epidemiologisch betrachtet hat der Diabetes mellitus eine noch größere Bedeutung als die HF und geht ebenso mit enormen individuellen und gesamtgesellschaftlichen Herausforderungen einher. Die geschätzte alters-standardisierte Prävalenz liegt global bei 6,1 %, wobei Männer etwas häufiger als Frauen betroffen sind [25]. In Deutschland liegt sie mit über 9 % sogar noch höher [26, 27]. Insgesamt macht die Gruppe des T2D dabei ca. 90 % aller Diabetes mellitus Erkrankungen aus [24, 25]. Seit 1990 hat sich die Prävalenz des Diabetes mellitus fast verdoppelt und es wird geschätzt, dass sie bis 2050 weiter steigt, was durch eine Zunahme des Subtyps des T2D getrieben ist und insbesondere durch eine Zunahme an Risikofaktoren (siehe 1.2.3) für einen T2D begründet sein könnte [25]. Insbesondere bei älteren Personen ist die Prävalenz des Diabetes mellitus dabei hoch und liegt in der Gruppe der 65- bis 95-jährigen bei 20 % [25].

Auch auf individueller Ebene ist die Erkrankung des Diabetes mellitus äußerst relevant. So ist die Mortalität in Gruppen von Personen mit Diabetes mellitus im Vergleich zu gesunden Personen deutlich erhöht und wird auf ca. 11,3 % geschätzt [28]. In Deutschland können sogar bis zu 21 % aller Tode mit Diabetes mellitus in Verbindung gebracht werden [29]. Auch während des Lebens führt die Erkrankung durch Komplikationen und Folgen zu einer Einschränkung der Lebensqualität [30] und verursacht enorme Kosten für das Gesundheitssystem [31, 32].

### **1.2.3 Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2**

Generell liegen dem T2D vier Faktoren in unterschiedlichen Ausprägungsgraden zugrunde: Eine Insulinresistenz, ein sekretorischer Defekt der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, eine fortschreitende Apoptose der  $\beta$ -Zellen und eine verminderte Insulinsekretion und -wirkung [33]. Diese Veränderungen können viele heterogene Ursachen haben [24, 34, 35]. Die pathophysiologischen Mechanismen des T2D sind zwar noch nicht vollständig verstanden, das metabolische Syndrom und Übergewicht, insbesondere ausgelöst durch Bewegungsmangel und hochkalorische, stark verarbeitete Mahlzeiten, spielen jedoch eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines T2D [24, 33, 36, 37]. Auch genetische Faktoren tragen zur Entwicklung bei [34, 35]. Hierdurch entwickelt sich in der Frühphase und auch schon bereits vor Manifestation der Erkrankung eine Insulinresistenz, die die pankreatischen  $\beta$ -Zellen zunächst mit einer vermehrten Insulin-Ausschüttung kompensieren können [34, 38]. Im Verlauf lässt die Kapazität der vermehrten Insulin-

Produktion jedoch nach und es kommt zur Manifestation der Hyperglykämie [34, 38]. Im komplexen metabolischen Zusammenspiel der Erkrankung spielen u.a. auch mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, Veränderungen des Mikrobioms und vermehrte Einlagerung von Fettsäuren eine Rolle [36, 38].

Klinische Folgen der Erkrankungen sind neben den unspezifischen Allgemeinsymptomen Müdigkeit und Leistungsminderung vor allem Komplikationen der Hyperglykämie, wie Retinopathien, Nephropathien, Neuropathien und Mikro- und Makroangiopathien [33]. So ist insbesondere auch das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit T2D erhöht [39].

#### **1.2.4 Diabetische Kardiomyopathie**

Auch unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren, koronaren Gefäßerkrankungen oder Herzklappenerkrankungen kann ein T2D zu einer myokardialen Dysfunktion führen [40-43]. Der Zustand dieser kardialen Dysfunktion wird dann als sogenannte diabetische Kardiomyopathie (DbCM) bezeichnet [40-43]. Frühe Manifestation dieser Kardiomyopathie ist eine diastolische Dysfunktion [40, 41]. Diese zunächst subklinische diastolische Dysfunktion kann sich fortschreitend klinisch manifestieren und zu einer HFpEF führen [2, 40]. Im weiteren Verlauf kann es auch zu einer systolischen Dysfunktion und Ausbildung einer HFrEF kommen [40]. Ursächlich für die Entwicklung der DbCM scheint die myokardiale Insulinresistenz und die damit einhergehenden metabolischen Veränderungen mit vermehrter Fettsäure-Akkumulation und -Oxidation zu sein (siehe 1.5.2.2) [40, 41, 44, 45]. Dies führt wiederum zu Lipotoxizität, vermehrtem oxidativem Stress, Inflammation, endoplasmatischem Retikulum-Stress, mitochondrialer Dysfunktion und Apoptose [40, 41, 44, 45]. In der Endstrecke kommt es so zu einem dysfunktionalen Umbau (*Remodeling*) des Myokards [40].

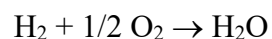
## 1.3 Der mitochondriale Stoffwechsel

### 1.3.1 Oxidative Phosphorylierung

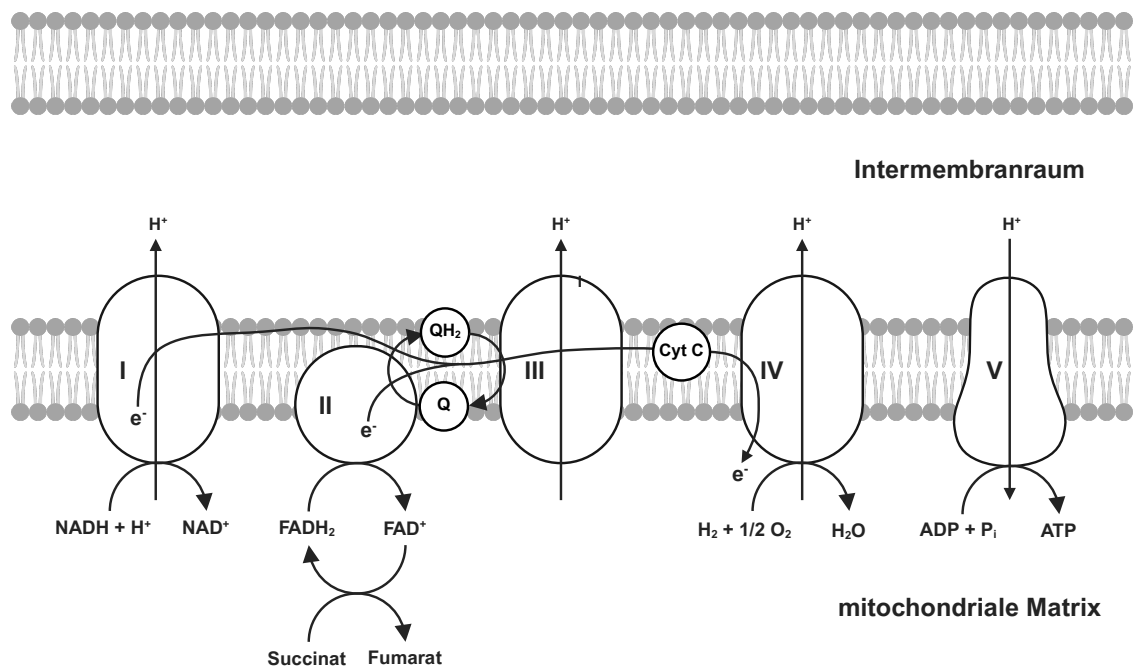
Der Energiestoffwechsel der Mitochondrien ist im menschlichen Körper der Hauptlieferant des universellen Energieträgers Adenosin-Triphosphat (ATP) [46]. Die ATP-Produktion findet hierbei nach dem grundlegenden Prinzip der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) statt, bei der mittels der mitochondrialen Atmungskette ein Elektronentransport erfolgt, der über den Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten an die ATP-Synthase gekoppelt ist. Die Atmungskette besteht aus den folgenden fünf, in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Komponenten:

- Komplex I: NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase
- Komplex II: Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase
- Komplex III: Ubihydrochinon:Cytochrom C-Oxidoreduktase
- Komplex IV: Cytochrom C-Oxidase
- Komplex V: F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub>-ATP-Synthase

Die Komplexe I-IV bauen den elektrochemischen Protonengradienten auf, indem sie Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum befördern. Die hierfür benötigte Energie liefert Wasserstoff (H<sub>2</sub>), das als Reduktionsäquivalent in Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) oder Flavin-Adenin-Dinucleotid (FADH<sub>2</sub>) zwischengespeichert ist. NADH und FADH<sub>2</sub> stammen aus dem Abbau von Nährstoffen, u.a. durch Glykolyse, β-Oxidation und Ketolyse auch mittels des Citratzyklus. In der Endstrecke des Aufbaus des Protonengradienten wird an Komplex IV unter Verwendung von Wasserstoff Sauerstoff (O<sub>2</sub>) verbraucht und Wasser gebildet:



Im letzten Schritt benutzt Komplex V den Protonengradienten, um durch Durchströmen von Protonen eine Rotationsbewegung anzutreiben, durch die die Phosphorylierung des Phosphatakzeptors Adenosin-Diphosphat (ADP) ermöglicht wird und ATP entsteht. Die gesamte Atmungskette ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.



**Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Atmungskette [46].** Komplexe I-V sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Elektronentransport und Aufbau eines Protonengradienten durch Komplexe I-IV. Dadurch Kopplung mit der Phosphorylierung von ADP zu ATP durch Komplex V. ADP: Adenosin-Diphosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat; Cyt C: Cytochrom C;  $e^-$ : Elektronen;  $\text{FADH}_2/\text{FAD}^+$ : Flavin-Adenin-Dinucleotid;  $\text{H}_2$ : Wasserstoff;  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ : Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid;  $\text{O}_2$ : Sauerstoff;  $\text{P}_i$ : anorganisches Phosphat; Q: Ubichinon. Erstellt mit biorender.com.

Die Atmungskette kann mit bestimmten Substanzen beeinflusst werden, die einzelne Komplexe hemmen oder die Atmungskette entkoppeln und sich deshalb experimentell zunutze gemacht werden können (siehe Tabelle 5) [47-52].

| Substanz    | Wirkort                     | Wirkung                                                  |
|-------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------|
| Rotenon     | Komplex I                   | Inhibition                                               |
| Malonat     | Komplex II                  | Inhibition                                               |
| Antimycin A | Komplex III                 | Inhibition                                               |
| Cyanid      | Komplex IV                  | Inhibition                                               |
| Oligomycin  | Komplex V                   | Inhibition                                               |
| FCCP        | Innere Mitochondrienmembran | Entkopplung, ermöglicht Protonen-Fluss durch die Membran |

**Tabelle 5: Inhibitoren und Entkoppler der Atmungskette [47-52].** FCCP: Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxy-phenylhydrazon.

### 1.3.2 Messung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten die Kapazität der mitochondrialen Atmung zu untersuchen, als Goldstandard wird hierbei jedoch die Untersuchung von Muskelbiopsien angesehen [53, 54]. Anhand dieser Proben ist es möglich, mittels Respirimetrie auf die mitochondriale oxidative Phosphorylierung zu schließen [54, 55]. Bei der Respirimetrie macht man sich den in 1.3.1 beschriebenen Sauerstoff-Verbrauch der Atmungskette zunutze [56]. Sie beruht also generell auf dem Prinzip der Messung der Sauerstoffkonzentration in einer geschlossenen Kammer mit einem polarographischen Sensor, der sogenannten Clark-Elektrode [53, 56].

Die hochauflösende Respirimetrie (HRR) stellt die Goldstandard-Methode der Respirimetrie dar, um substratabhängige Respiration, entsprechend der OXPHOS, zu quantifizieren [57]. Hierfür werden in geschlossenen Kammern eines Oxygraphen Substrat-Entkoppler-Inhibitor-Titration (*substrate-uncoupler-inhibitor titration*, SUIT) Protokolle durchgeführt, bei denen, wie der Name schon beschreibt, nacheinander verschiedene Substrate, gefolgt von der Atmungskette entkoppelnden und schließlich inhibierenden Substanzen in die Kammern gegeben werden [57, 58]. Aus der gemessenen Sauerstoffkonzentration berechnet sich die Respiration als Sauerstoff-Strom ( $O_2$ -flow), entsprechend dem Sauerstoffverbrauch pro Zeit, und nach Normalisierung für das in die Kammer gegebene Probengewicht als besser vergleichbarer Sauerstoff-Fluss ( $O_2$ -flux,  $JO_2$ ) [58].

#### 1.3.2.1 Respiratorische Stadien

Seit 1955 werden fünf respiratorische Stadien nach Chance and Williams unterschieden, die nach dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von Sauerstoff, ADP und Substraten definiert werden [59]. Diese Stadien können auf Respirimetrie-Messungen mit isolierten Mitochondrien angewendet werden [59], jedoch nicht uneingeschränkt auf ganze Zellen [58]. Daher wurden von Gnaiger et al. neue respiratorische Stadien definiert (siehe Tabelle 6) [58]: Die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS Kapazität, P), die „Leak“ Respiration (LEAK Respiration, L), die Kapazität des Elektronen-transferierenden Systems (ETS Kapazität, E) und der residuale Sauerstoff-Verbrauch (ROX).

| Stadium |                                      | Definition                                                                                                  | Art der Respiration                        |
|---------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| P       | OXPHOS Kapazität                     | Respiratorische Kapazität bei gesättigten Konzentrationen von ADP, Phosphat, O <sub>2</sub> und Substraten  | partiell gekoppelt, phosphorylierend       |
| L       | LEAK Respiration                     | Nicht-phosphorylierende Respiration, die für die Undichtigkeit der inneren Mitochondrienmembran kompensiert | partiell gekoppelt, nicht-phosphorylierend |
| E       | ETS Kapazität                        | Maximale Kapazität der entkoppelten Respiration                                                             | entkoppelt, nicht-phosphorylierend         |
| ROX     | Residualer O <sub>2</sub> -Verbrauch | Respiration aufgrund oxidativer Reaktionen neben der Atmungskette                                           | -                                          |

**Tabelle 6: Respiratorische Stadien nach Gnaiger et al. [58].** ADP: Adenosin-Diphosphat; ETS: Elektronen-transferierendes System; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; OXPHOS: Oxidative Phosphorylierung.

Im Rahmen von SUIT Protokollen werden diese Stadien durch Zugabe unterschiedlicher Substanzen experimentell hergestellt. Für die OXPHOS Kapazität müssen gesättigte Konzentrationen von ADP, Phosphat, Sauerstoff und Substraten vorhanden sein, sodass die maximal mögliche Respiration hierdurch nicht behindert wird und die Atmungskette vollständig ablaufen kann. Im Stadium der LEAK Respiration erfolgt keine Phosphorylierung, was entweder durch das Fehlen von ADP oder die Inhibition der ATP-Synthase (Komplex V), z.B. durch Oligomycin, erreicht werden kann. Die ETS Kapazität wird durch eine Entkopplung der Atmungskette durch sogenannte Protonophore, die einen Protonenfluss über die innere Mitochondrienmembran ermöglichen, erreicht. Ein solcher Protonophor ist beispielsweise Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP). Der residuale Sauerstoff-Verbrauch kann nach vollständiger Hemmung der Atmungskette, wie z.B. nach Komplex III-Inhibition durch Antimycin A gemessen werden.

### 1.3.2.2 Respiratorische Fluss-Kontroll-Raten

Aus den verschiedenen respiratorischen Stadien können sogenannte Fluss-Kontroll-Raten (*Flux control ratios*, FCR) gebildet werden, um gewebeunabhängig und intern normalisiert die mitochondriale Funktion und Kopplung der Atmungskette zu beurteilen [57, 58]. Wichtig im Folgenden sind hier insbesondere die *Respiratory Control Ratio* (RCR), die *Leak Control Ratio* (LCR) und das P/E Verhältnis (siehe Tabelle 7).

| Rate           | Berechnung                          | Aussage                                                                                            |
|----------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RCR            | $P / L$<br>(OXPHOS / LEAK)          | Kopplungseffizienz: je größer, desto bessere Kopplung                                              |
| LCR            | $L / E$<br>(LEAK / ETS Kapazität)   | Grad der Entkopplung/„Undichtigkeit“: je kleiner, desto besser gekoppelt/„dichter“ und effizienter |
| P/E Verhältnis | $P / E$<br>(OXPHOS / ETS Kapazität) | Grad der Limitation durch ATP-Synthase: je größer, desto weniger Limitation                        |

**Tabelle 7: Respiratorische Fluss-Kontroll-Raten (*Flux control ratios*, FCR) [57, 58].**  
E, ETS: Elektronen-transferierendes System; LCR: *Leak Control Ratio*; L, LEAK: „Undichte“ (*leak*) Respiration; P, OXPHOS: Kapazität der oxidativen Phosphorylierung; RCR: *Respiratory Control Ratio*.

### 1.3.3 Bestimmung der mitochondrialen Dichte einer Probe

Es gibt unterschiedliche Methoden, um auf die mitochondriale Dichte, bzw. Menge an Mitochondrien, in einer Muskelprobe zu schließen [60, 61]. Die Messung der Citrat-Synthase-Aktivität (CSA) stellt hierbei einen klassischen Surrogat-Parameter dar [60]. Das Grundprinzip dieser Messung erfolgt nach dem Ansatz, dass die Citrat-Synthase im Citratzyklus Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat und Coenzym A mit einer Thiolgruppe (CoA-SH) umsetzt, wobei die Thiolgruppe in Verbindung mit hinzugegebener 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) reagiert, die photometrisch als Absorption bei 412 nm gemessen werden kann [62]. Die Geschwindigkeit der Zunahme dieser Absorption während der Messung ist proportional zu CSA [62]. Die CSA wird typischerweise auf den Proteingehalt einer Probe normalisiert [63].

## 1.4 Physiologie der Ketonkörper

### 1.4.1 Rolle und Funktion der Ketonkörper

Ketonkörper (KB) übernehmen unterschiedliche Funktionen: Zum einen sind sie in ihrer Rolle als alternative Energiequellen bereits lange bekannt [46, 64, 65], zum anderen legen neuere Erkenntnisse auch eine Rolle als Botenstoff und in der Stoffwechsel-Regulation nahe [64, 66-68]. Es existieren die KB Aceton,  $\beta$ -Hydroxybutyrat (HBA) und Acetoacetat (ACA), wobei insbesondere HBA und ACA Funktionen als Metabolite und Signalmoleküle besitzen [46]. Im Blut wird der überwiegende Anteil der dort

zirkulierenden KB von HBA ausgemacht [46]. Die Prozesse der KB-Synthese und des KB-Abbau finden in den Mitochondrien statt [46]. Generell werden KB endogen in der Leber synthetisiert und von allen anderen Organen abgebaut (siehe 1.4.2) [46].

#### 1.4.1.1 Rolle der Ketonkörper als Energiesubstrat

Ursprünglich wurden KB Mitte des 19. Jahrhunderts im Blut von Patienten mit Diabetes mellitus entdeckt [65], wo sie oftmals erhöht und ein Marker der sogenannten diabetischen Ketoazidose sind [69]. Doch auch unabhängig von Pathologien sind KB wichtige alternative Energiequellen [46, 64, 65, 70]. Zwar nehmen sie unter normalen metabolischen Zuständen nur einen geringen Anteil an den extrahepatisch zur Energiegewinnung verwendeten Substraten ein, bei reduzierter Verfügbarkeit von Glucose als Energiesubstrat erhöht sich jedoch dieser Anteil ebenso wie die Blutkonzentrationen von KB [64, 71, 72]. Physiologisch tritt dies bei einem Energieverbrauch ohne neue Zufuhr an Nahrung auf, wie z.B. beim Fasten oder Ausdauertraining [46, 64, 71, 73]. Da KB aus Produkten des unvollständigen Fettsäure-Abbaus gebildet werden, können Serum-Konzentrationen von KB auch durch kohlenhydratarme, fettreiche Diäten erhöht werden [72, 74], was als sogenannte Ketogene-Diät von einigen Menschen teils auch unabhängig von bestehenden Pathologien durchgeführt wird [75]. In all diesen Zuständen erhöht sich der Anteil der KB an den Substraten zur Energiegewinnung teils drastisch [46]. Im Gehirn, das ansonsten obligat auf Glucose angewiesen ist, erhöht sich der Anteil so auf bis zu 70 % [46]. Bezogen auf die Masse an Gewebe ist jedoch das Myokard der größte KB-Verbraucher [72]. Die Regulation des KB-Stoffwechsels erfolgt insbesondere über das vorhandene Angebot an Fettsäuren für die Ketogenese und durch die Hormone Insulin und Glukagon, ebenso aber auch über Mechanismen der Produkt-Inhibition und weitere Metabolite oder Signalmoleküle [46, 68, 72]. Neben Diabetes mellitus existieren auch andere Pathologien, in denen die Rolle der KB als Energiesubstrat verändert ist [72]. Wichtig sind hier neben Diabetes mellitus insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die Herzinsuffizienz (siehe 1.5.2.3).

Auch exogen besteht die Möglichkeit KB-Konzentrationen im Blut zu erhöhen. Neben der bereits erwähnten Ketogenen-Diät [75, 76] ist auch eine Supplementation als Keton-Ester oder Keton-Salze möglich [77]. Darüber hinaus ist auch beschrieben, dass Medikamente KB-Spiegel erhöhen können, beispielsweise Natrium-Glukose-Cotransporter 2-Inhibitoren (SGLT2-Inhibitoren) [78, 79].

#### 1.4.1.2 Signalfunktion der Ketonkörper

KB haben vielfältige Funktionen als Signal-Metabolite [64, 67, 72]. Manche dieser Funktionen werden ausschließlich über HBA oder ACA vermittelt, manche über beide KB [72]. Generell wirken die KB hier u.a. über eine Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Inhibition von Histon-Deacetylasen, Modifikation von Histonen oder protranslationaler Modifikation von Proteinen [68, 72]. Hierüber können sie z.B. den Lipid-Stoffwechsel und Tumor-Wachstum modulieren und Inflammation, oxidativen Stress und Sympathikus-Aktivität reduzieren [67, 68, 72, 79]. So können KB auch die mitochondriale Funktion verbessern [79].

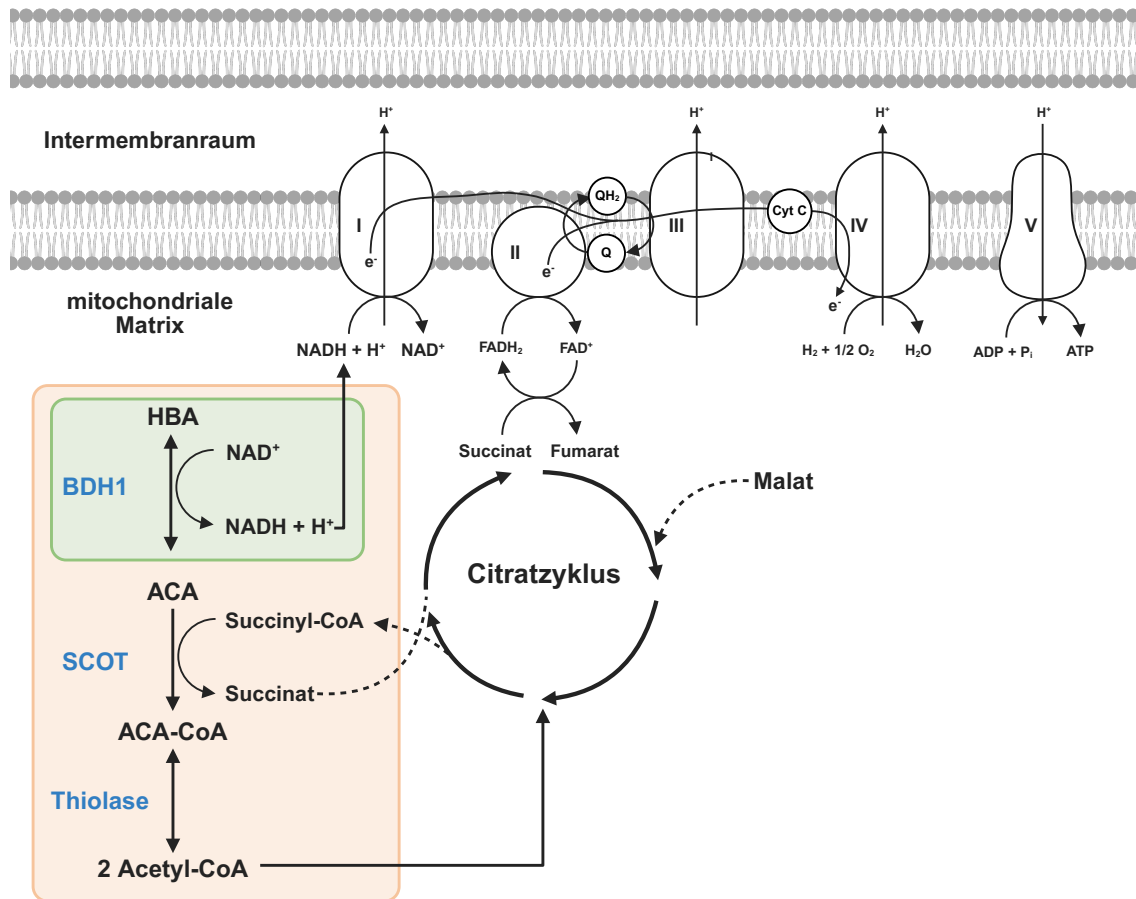
#### **1.4.2 Ketogenese und Ketolyse**

Die Bildung von KB findet ausschließlich in der Leber statt [46]. Die Ketogenese ist dabei mitochondrial lokalisiert und läuft in folgenden Schritten ab [46, 72]: Als Substrat wird ausschließlich Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) benötigt, welches als Produkt der  $\beta$ -Oxidation des Fettsäure-Abbaus entsteht. Zunächst entstehen durch die mitochondriale Thiolase aus zwei Acetyl-CoA Molekülen Acetoacetyl-CoA. Dieses wird dann durch die  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-CoA-Synthase (HMG-CoA-Synthase) zu HMG-CoA und schließlich durch die HMG-CoA-Lyase zu ACA umgesetzt. ACA kann in einer durch die D- $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase 1 (BDH1) katalysierten Reaktion zu HBA umgewandelt werden.

Der Transport der KB aus den Zellen erfolgt dann, ebenso wie auch die Aufnahme in die Zielorgane, über Monocarboxylat-Transporter [80]. Ketonkörper sind wasserlöslich und werden dementsprechend im Blut ungebunden transportiert [46].

Die ebenfalls in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Ketolyse findet v.a. in Gehirn, Myokard und Skelettmuskel statt und besteht aus folgenden Schritten (siehe Abb. 2) [46, 72]: Durch Umkehr der durch BDH1 katalysierten Reaktion wird zunächst HBA zu ACA umgewandelt. Bei dieser Reaktion entsteht das Reduktionsäquivalent NADH, das bereits in die Atmungskette eingeschleust werden kann (siehe 1.3.1). Im nächsten Schritt wird nun ACA durch die Succinyl-CoA:Acetoacetat-CoA-Transferase (SCOT) unter Verwendung von Succinyl-CoA aus dem Citratzyklus zu Acetoacetyl-CoA umgewandelt. Dieses kann nun wiederum durch die Thiolase in zwei Acetyl-CoA aufgespalten werden, die im Citratzyklus zur Energiegewinnung weiterverarbeitet werden können. Da die Leber das Enzym SCOT nicht besitzt, kann hier keine Ketolyse stattfinden [46].

Die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme von KB-Auf- und -Abbau sind die HMG-CoA-Synthase und SCOT, über die folglich auch die regulatorische Hormone Insulin und Glukagon sowie Signalmoleküle wirken [46, 72].



**Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Ketolyse im Zusammenspiel mit der mitochondrialen Atmungskette [81].** Der erste Schritt der Ketolyse (grün markiert) liefert Reduktionsäquivalente an Komplex I. Die weiteren Schritte der Ketolyse (orange markiert) können nur bei gleichzeitig ablaufendem Citratzyklus stattfinden, da Succinyl-CoA benötigt wird. Als Endprodukt können 2 Acetyl-CoA dem Citratzyklus und darüber der mitochondrialen Atmungskette zugeführt werden. Experimentell kann das Ablaufen des Citratzyklus bspw. durch Zugabe von Malat *in vitro* ermöglicht werden. ACA: Acetoacetat; ADP: Adenosin-Diphosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat; BDH1: D-β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase 1; CoA: Coenzym A Cyt C: Cytochrom C; e<sup>-</sup>: Elektronen; FADH<sub>2</sub>/FAD<sup>+</sup>: Flavin-Adenin-Dinucleotid; H<sub>2</sub>: Wasserstoff; HBA: β-Hydroxybutyrat; NADH/NAD<sup>+</sup>: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; O<sub>2</sub>: Sauerstoff P<sub>i</sub>: anorganisches Phosphat; Q: Ubichinon; SCOT: Succinyl-CoA:Acetoacetat-CoA-Transferase. Erstellt mit biorender.com.

## **1.5 Energiestoffwechsel im Myokard**

### **1.5.1 Physiologischer myokardialer Energiestoffwechsel**

Aufgrund der ständig wechselnden Kontraktion und Entspannung des Myokards, verbraucht das Herz eine enorme Menge an Energie, mehr als jedes andere Organ [82]. Es verbraucht ca. 6 kg ATP pro Tag, entsprechend dem 20-30-fachem des eigenen Gewichts [82], was unter extremer Anstrengung auf bis zu 30 kg gesteigert werden kann [83]. Stünde die ATP-Produktion still, würde das Herz bereits nach 2-10 Sekunden alle ATP-Reserven aufgebraucht haben [84]. Um diesen großen und ständigen Energiebedarf zu decken, bedarf es eines suffizienten Energiestoffwechsels.

Dieser Stoffwechsel beruht im Myokard nahezu ausschließlich auf mitochondrialer oxidativer Phosphorylierung; die anaerobe Glykolyse macht aufgrund ihrer deutlich geringeren Effizienz (38 ATP vs. 2 ATP) nur einen verschwindend geringen Teil aus [16, 85, 86]. Generell gilt das Herz dabei als metabolisch flexibel, es kann also unterschiedliche Substrate metabolisieren und sich dem vorhandenen Angebot anpassen [17, 82]. Hauptsächlich verstoffwechselt es Fettsäuren (ca. 60-90 %), gefolgt von Pyruvat aus der Glykolyse (ca. 10-40 %) und zu kleineren Teilen auch Laktat, Aminosäuren und KB [16, 17].

### **1.5.2 Myokardialer Energiestoffwechsel bei Pathologien**

#### **1.5.2.1 Myokardialer Energiestoffwechsel bei Herzinsuffizienz**

Die HF ist mit einem veränderten Energiemetabolismus assoziiert [16, 17, 84, 86]. Zum einen können angeborene Stoffwechselerkrankungen direkt eine HF verursachen [87, 88]. Zum anderen gehen aber auch alle häufigeren Formen der HF mit einem Energiedefizit, einem veränderten Stoffwechsel und einem Verlust der metabolischen Flexibilität einher [17, 84]. Während sowohl die HFpEF als auch die HFrEF durch ein Missverhältnis an Energiebedarf und -bereitstellung charakterisiert sind, unterscheiden sie sich in der Art des Verlustes der metabolischen Flexibilität und Pathophysiologie der metabolischen Störungen [89].

Bei der HFrEF werden insbesondere vermindert Fettsäuren oxidiert und es kommt zu einer Verschiebung hin zu den anderen Substraten, insbesondere zur weniger effizienten Glykolyse [16, 84, 89-91]. Im Gegensatz dazu scheint sich der Metabolismus bei HFpEF

durch eine Verschiebung der Substratverwendung zu noch stärkerer Fettsäure-Oxidation auszuzeichnen [16, 84, 89, 91, 92]. Auch die Oxidation von Ketonkörpern unterscheidet sich zwischen HFrEF und HFpEF (siehe 1.5.2.3).

Generell geht die HF mit einer Schädigung der Struktur und Funktion der myokardialen Mitochondrien einher [17]. Auch die Funktion der oxidativen Phosphorylierung ist gestört [82, 93]. Diese Schädigungen scheinen bei der HFpEF weniger stark ausgeprägt zu sein [94]. Ausdruck des gestörten mitochondrialen Metabolismus im insuffizienten Herzen ist auch ein vermehrtes Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies und eine gestörte mitochondriale Kalzium-Homöostase [84, 91]. Auch wenn die metabolischen Veränderungen im insuffizienten Herzen komplex und noch nicht vollständig verstanden sind, scheint das Herz insgesamt nicht mehr in der Lage zu sein, die benötigte Energie effizient zu produzieren [16, 86].

#### 1.5.2.2 Myokardialer Energiestoffwechsel bei Diabetes mellitus Typ 2

Auch T2D und die DbCM sind mit einem veränderten myokardialen Energiemetabolismus assoziiert [95-100]. Dabei sind die bei T2D vorhandenen myokardialen metabolischen Veränderungen auch ohne manifeste HF den Veränderungen bei der HFpEF ähnlich. Dies scheint aufgrund der ätiologischen Bedeutung des metabolischen Syndroms und des T2D für die Entwicklung einer HFpEF [20] auch nicht verwunderlich.

So ist auch das Myokard von Individuen mit T2D durch eine metabolische Inflexibilität charakterisiert [95-97, 100, 101]. So führt die Insulinresistenz, ggf. in Kombination mit einem Insulinmangel, zu einer verminderten Glucose-Aufnahme in das Myokard und es werden im diabetischen Herzen folglich weniger Glucose und vermehrt Fettsäuren zur Energieproduktion verwendet [95-97, 102]. Ebenso ist bei T2D und der DbCM die myokardiale mitochondriale Funktion an sich beeinträchtigt [97, 99, 100] und die Fähigkeit zur oxidativen Phosphorylierung vermindert [103, 104]. Zusammenfassend ist das diabetische Herz, ähnlich dem insuffizienten Herzen, nicht mehr dazu in der Lage, effizient Energie zu produzieren [95-97], was zur Entwicklung der DbCM (siehe 1.2.4) beitragen kann [45].

### 1.5.2.3 Rolle der Ketonkörper im kardialen Energiestoffwechsel bei Pathologien

Sowohl in der HF [16, 77] als auch bei T2D und der DbCM [96, 105] ist der KB-Metabolismus im Gesamt-Organismus und im Myokard im Vergleich zum physiologischen Zustand verändert.

In der HF scheint sich dabei die Rolle der KB zwischen HFpEF und HFrEF zu unterscheiden [89, 91]. So legen bisherige Studien nahe, dass KB in der HFrEF eine wichtige Rolle spielen und das insuffiziente Herz vermehrt KB verwendet [77]. Es finden sich erhöhte Serum-Konzentrationen an KB [16, 17, 77, 105], die Expressionen der ketolytischen Enzyme BDH1 und SCOT sind nachweislich im Myokard erhöht [16, 17, 77, 106] und das Myokard weist eine erhöhte KB-Aufnahme auf [16, 105, 106]. In Tierversuchen verschlechterte sich bei BDH1-Knockout ein pathologisches Remodelling nach Ischämie oder Druck-Überladung und exogene Erhöhung der Serum-HBA-Spiegel konnte kardiale Dysfunktion und pathologisches Remodelling verbessern [105]. KB könnten in der HFrEF also u.a. durch die Bereitstellung einer alternativen Energiequelle möglicherweise eine kardioprotektive Funktion haben. Gegenätzlich zur HFrEF scheint der myokardiale KB-Metabolismus in der HFpEF im Vergleich zum physiologischen Zustand reduziert zu sein [89, 107, 108], auch wenn hier bisher weniger valide Studien als in der HFrEF vorliegen [84, 91]. Insbesondere ist in der HFpEF offenbar eine verminderte Aktivität des ketolytischen Enzyms BDH1 trotz erhöhter Serum Konzentrationen an KB relevant [94, 107].

Generell könnte auch die kardioprotektive Wirkung der Medikamentenklasse der SGLT2-Inhibitoren möglicherweise über eine Erhöhung der Blutkonzentrationen an KB vermittelt sein und so den gestörten Energiemetabolismus in der HF verbessern [17, 78].

Neben den potenziell positiven Effekten von KB bei HF als Substrate und Signalmoleküle sind KB jedoch gleichzeitig auch mit unerwünschten Ereignissen assoziiert. So besteht eine Assoziation von erhöhten KB Spiegel im Blut und dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen in bisher kardiovaskulär gesunden Menschen [109]. Auch innerhalb der fortgeschrittenen HF sind erhöhte zirkulierende KB mit einer schlechteren Prognose assoziiert [110]. Hieraus ergibt sich das sogenannte „KB-Paradoxon“: Während KB und deren Supplementation auf der einen Seite vorteilhafte Effekte in Rahmen einer

HF zu haben scheinen [111], gehen im Gegensatz dazu intrinsisch erhöhte KB-Spiegel mit einer schlechteren Prognose einher [110].

Auch T2D geht durch Insulinresistenz und vermehrtem Angebot an Substraten für die Ketogenese durch Lipolyse generell mit erhöhten Serum-Konzentrationen an KB einher [16, 105]. So stellen erhöhte KB-Level auch einen frühen Marker für ein erhöhtes Risiko der Entwicklung eines Diabetes mellitus dar [112]. Dieses vermehrte Angebot an KB führt im diabetischen Herzen auch zu einer vermehrten Aufnahme von KB in das Myokard [113, 114]. Demgegenüber zeigen Tierversuche jedoch, dass ketolytische Enzyme im diabetischen Herzen vermindert exprimiert sind [115, 116] und das Myokard bei Diabetes mellitus vermindert KB zur Energiegewinnung oxidiert [117]. Damit zeigt sich die metabolische Dysfunktion im diabetischen Herzen auch mit Blick auf den KB-Metabolismus derer in der HFpEF ähnlich [94]. Im menschlichen Herzen ist bislang aber unklar, ob KB bei T2D – trotz vermehrter Aufnahme – tatsächlich auch vermehrt oder doch vermindert für die oxidative Phosphorylierung verwendet werden.

Generell wurden bisher sowohl bei HF als auch bei T2D ausschließlich Surrogat-Parameter der Energiegewinnung durch Ketolyse, wie Serum-Konzentrationen, Enzym-Expression oder KB-Aufnahme ins Myokard, untersucht [16, 77, 115-117]. Mittels Respirometrie wurde bislang lediglich beschrieben, dass der Anteil von KB zum Gesamtmaß der oxidativen Phosphorylierung in gesundem Myokard gering ist [118]. Ob und in welchem Ausmaß KB also tatsächlich zur mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung in einem funktionellen System bei HF oder T2D im Vergleich zu Kontrollen verwendet werden, ist in der bisherigen Studienlage nicht quantifiziert und weist somit eine Lücke in der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnis auf.

## **2 Ziele und Hypothesen der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, die Kapazität der Verwendung von KB zur mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung im Myokard bei HFrEF und T2D mittels hochauflösender Respirometrie zu quantifizieren und mit nicht-herzinsuffizienten, bzw. nicht-diabetischen Kontrollen zu vergleichen.

Dabei wurden die folgenden Hypothesen aufgestellt:

- I. Die KB-spezifische myokardiale mitochondriale oxidative Kapazität ist bei Menschen mit HFrEF im Vergleich zu Menschen ohne HF verändert.
- II. Die KB-spezifische myokardiale mitochondriale oxidative Kapazität ist bei T2D im Vergleich zu Menschen ohne Diabetes Mellitus verändert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

- Lithium-Heparin-Röhrchen 4,5 ml (BD Vacutainer® LH PST™ II Plus Blood Collection Tubes, REF 366567, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, UK)
- Serum-Röhrchen 5 ml (BD Vacutainer® SST™ II Advance Plus Blood Collection Tubes, REF 366566, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, UK)
- Citrat-Röhrchen 2,7 ml (BD Vacutainer® Buffered Sodium Citrate Plus Blood Collection Tubes, REF 364305, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)
- EDTA-Röhrchen 3 ml (BD Vacutainer® Plus Blood Collection Tubes, REF 368499, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, UK)
- Einmalhalter für Blutentnahmeröhrchen (Vacutainer® Einmalhalter, REF 364815, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)
- Blutentnahme-Set (BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blutentnahmeset, REF 367282, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)
- Venenstauer (Venenstauer classic, REF 310005, Roeser Medical GmbH, Essen, Deutschland)
- Alkoholisches Hautantiseptikum (koda® Tinktur forte farblos, REF 104012, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Hände-Desinfektionsmittel (Sterillium® classic pure, REF 975512, Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Untersuchungshandschuhe (Vasco® Nitril blue, REF 9209825, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Teststreifen für Point-of-Care Keton-Messgerät (StatStrip® Ketone-Test Strips, REF 46951, Nova Biomedical GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland)
- Kontrolllösung für Point-of-Care Glukose- und Keton-Messgerät hohe Konzentration (StatStrip® Kontrolllösung Level 3, REF 46949, Nova Biomedical GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland)
- Kontrolllösung für Point-of-Care Keton-Messgerät niedrige Konzentration (StatStrip® Kontrolllösung Level 1, REF 46947, Nova Biomedical GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland)

- Bioptom (Biopsiepinzette, REF 504-300, Cordis Germany GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Skalpellklinge (BAYHA® Skalpellklinge Nr. 11, C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen (Falcon® Multiwell 6 Well, REF 353046, Corning Incorporated, Corning, USA)
- Mikroplatte mit 96 Vertiefungen (Microplate 96 Well, REF 655101, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Reagiergefäß 1,5 ml (SafeSeal Gefäß, REF 72.706, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- Zentrifugen-Röhrchen 50 ml (Cellstar® Tubes, REF 227261, Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Filterpapier (VWR® Qualitative filterpaper, 410, REF: 516-0804, Leuven, Belgien)

### **3.1.2 Chemikalien und Arzneimittel**

- Saponin (CAS-Nr.: 8047-15-2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- DL-β-Hydroxybuttersäure Natriumsalz (CAS-Nr.: 150-83-4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Lithium Acetoacetat (CAS-Nr.: 3483-11-2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Malat (CAS-Nr.: 97-67-6, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Octanoylcarnitin (CAS-Nr.: 14919-35-8, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland)
- Adenosin-5'-Diphosphat (CAS-Nr.: 72696-48-1, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Glutamat (CAS-Nr.: 142-47-2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Succinat (CAS-Nr.: 6106-21-4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Cytochrom C (CAS-Nr.: 9007-43-6, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Oligomycin (CAS-Nr.: 1404-19-9, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

- Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon (CAS-Nr.: 370-86-5, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Antimycin A (CAS-Nr.: 1397-94-0, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Rotenon (CAS-Nr.: 83-79-4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- BIOPS Präservations-Lösung bestehend aus:
  - Taurin (20 mmol/l)
  - Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat (5,77 mmol/l)
  - Calcium-Dikalium-Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure ( $\text{CaK}_2\text{EGTA}$ ) (2,77 mmol/l)
  - Dikalium-Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure ( $\text{K}_2\text{EGTA}$ ) (7,23 mmol/l)
  - Magnesiumchlorid-Hexahydrat (6,56 mmol/l)
  - Kreatinphosphat Dinatriumsalz Hydrat (15 mmol/l)
  - Imidazol (20 mmol/l)
  - Dithiothreitol (0,5 mmol/l)
  - 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (50 mmol/l)
- MiRO5 Respirations-Medium bestehend aus:
  - Taurin (20 mmol/l)
  - D-Saccharose (110 mmol/l)
  - Magnesiumchlorid-Hexahydrat (3 mmol/l)
  - Lactobionsäure (60 mmol/l)
  - Kaliumdihydrogenphosphat (10 mmol/l)
  - Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) (0,5 mmol/l)
  - 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (20 mmol/l)
  - Bovines Serum-Albumin (1 g/l)
- Citrat-Synthase-Assay-Kit (Katalog Nummer: CS0720, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

- DC™-Protein Assay Kit II (Katalog Nummer: 5000112, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)
- Ketamin (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland)
- Xylazin (Elanco Deutschland GmbH, Monheim, Deutschland)
- Isofluran (CAS-Nr.: 26675-46-7, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

### **3.1.3 Geräte**

- Point-of-Care Keton-Messgerät (StratStrip® GLU/KET, REF 54796 Nova Biomedical GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland)
- Pipetten 2,5/10/100/1000/5000µl (Eppendorf Research® plus, Einkanal, Katalog-Nr. 3120000011/3120000020/3120000046/3121000120/3120000070, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Oxygraph (Oroboros® O2k, Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Österreich)
- Mikroliter-Spritzen (Hamilton® Spritzen 10 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl, Produkt-Nr.: 203194, 80285, 80975, 203235, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Taumelschüttler (Heidolf Duomax 2030, No.: 542.30005.01, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland)
- Vortex-Mischer (VWR® Vortexmischer, Art.-Nr.: 444-1372, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Waage (Analysewaage, Produkt-Nr.: 50609650, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Mikroplatten-Lesegerät (FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland)
- Schwingmühle (Schwingmühle MM 400, Retsch GmbH, Haan, Deutschland)
- Zentrifuge (VWR MICRO STAR 17R, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- pH-Meter (pH Meter Lab 850, Schott Instruments, Mainz, Deutschland)

### **3.1.4 Software**

- Microsoft Office® Version 16 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- iWork® Version 13 (Apple Inc., Cupertino, USA)
- DatLab® Version 7.4.0.4 (Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Österreich)
- Reader Control Software und MARS Data Analysis Software (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland)

- GraphPad Prism® Version 10.2 (GraphPad Software, LLC., Boston, USA)
- RStudio (Posit® Software, Boston, USA)
- draw.io® (draw.io AG, Zürich, Schweiz)
- BioRender® (BioRender, Toronto, Kanada)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Studiendesign**

Um die Hypothesen dieser Arbeit zu überprüfen, wurden zum einen humane Probanden in die Studie eingeschlossen, die dann in Kohorten mit HFrEF und ohne HF sowie mit und ohne T2D eingeteilt wurden (siehe 3.2.2). Zum anderen wurde auch ein mauserperimentelles Modell der ischämischen HFrEF verwendet (siehe 3.2.3). In beiden Fällen wurden Myokardproben gesammelt und anschließend HRR verwendet, um die Respiration unter Verwendung unterschiedlicher Substrate zu quantifizieren (siehe 3.2.4).

### **3.2.2 Humane Probanden**

#### **3.2.2.1 Rekrutierung**

Im Rahmen einer laufenden Kohortenstudie (ClinicalTrials.gov Identifikationsnummer: NCT05958706), die im Jahr 2025 Teil der METAB-HTX-Studie wurde [119], wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die eine der folgenden klinisch indizierten Prozeduren erhielten:

- Orthotope Herztransplantation (HTX) (HTX Gruppe)
- Implantation eines linksventrikulären Herzunterstützungssystem (LVAD) (LVAD Gruppe)
- Endomyokardbiopsie (EMB), aufgrund neu aufgetretener HF zu diagnostischen Zwecken (HF EMB Gruppe)
- Routinemäßige EMB, im Rahmen der Transplantatnachsorge nach früherer HTX zur Kontrolle auf mögliche Abstoßungsreaktionen (Post-HTX Gruppe).

Für alle Probanden galten folgende weitere, zwingend zu erfüllende Einschlusskriterien:

- Alter  $\geq 20$  und  $\leq 85$  Jahre

- Schriftliche Einwilligung in die Studienteilnahme.

Nicht eingeschlossen wurden Patienten, auf die mindestens eines der folgenden Ausschlusskriterien zutraf:

- Akute Infektionserkrankung innerhalb der letzten 2 Wochen
- Autoimmunerkrankung oder akute immunkompromittierende Erkrankung mit  $< 5000$  Leukozyten pro  $\mu\text{l}$
- Schwangerschaft
- Aktive Krebserkrankung
- Suchterkrankung mit Einnahme von Alkohol oder Drogen, psychiatrische Erkrankung
- Verdacht auf oder manifestes *Acquired immune deficiency syndrome* (AIDS)
- Hepatitis B oder C
- Lebererkrankung, die nicht auf das Vorliegen einer nicht-alkoholischen Fettleberhepatitis oder einer Stauungshepatopathie bei HF zurückgeführt werden kann
- Fehlende Einwilligungsfähigkeit.

In die HFrEF-Studie wurden von Februar 2023 bis einschließlich November 2025 Probanden eingeschlossen. Für die T2D-Studie belief sich der Einschluss-Zeitraum von März 2023 bis einschließlich Oktober 2024.

### 3.2.2.2 Ablauf und klinische Prozeduren der Studie

Alle Untersuchungen der Studie wurden im Rahmen der regulären stationären Aufenthalte der Patienten durchgeführt. Diese betrug bei bereits früher herztransplantierten Patienten, die zur routinemäßigen EMB stationär aufgenommen wurden, (Post-HTX Gruppe) meist drei Tage. Herzinsuffiziente Patienten, die eine EMB, HTX oder LVAD-Implantation erhielten, waren oft deutlich länger, bis hin zu mehreren Wochen, stationär in der Klinik, wobei die Untersuchungen der Studie auch hier im engen zeitlichen Rahmen um die EMB, HTX oder LVAD-Implantation durchgeführt wurden.

Probanden, die im Rahmen einer EMB in die Studie eingeschlossen wurden, erhielten folgende Untersuchungen, die teils in den nächsten Abschnitten genauer erläutert werden:

- Venöse Blutentnahme (siehe 3.2.2.2.1)
- Bestimmung der kardialen Pumpfunktion mittels transthorakaler Echokardiographie (TTE) oder kardialer Magnetresonanztomographie (cMRT) (siehe 3.2.2.2.2)
- EMB, bei der neben den klinisch indizierten Proben auch zusätzliche Proben für die Studie entnommen wurden (siehe 3.2.2.2.3).

Probanden, die im Rahmen einer aktuellen HTX oder LVAD-Implantation in die Studie eingeschlossen wurden, erhielten aus logistischen und klinischen Gründen nur folgende Untersuchungen:

- Venöse Blutentnahme, die bereits standardmäßig und auch unabhängig der Studie im Rahmen des klinischen Prozederes vor der HTX erfolgte (siehe 3.2.2.2.1)
- Bestimmung der kardialen Pumpfunktion mittels transthorakaler Echokardiographie (TTE) (siehe 3.2.2.2.2)
- HTX oder LVAD-Implantation, bei der myokardiale Proben des explantierten Herzens, bzw. des ausgestanzten apikalen Myokard entnommen wurden (siehe 3.2.2.2.3).

Zusätzlich wurde bei allen Probanden auf routinemäßig aus klinischen Gründen erhobene Daten, wie z.B. *Body-Mass-Index* (BMI), Vorerkrankungen und bestehende Medikation, zurückgegriffen.

#### 3.2.2.2.1 Venöse Blutentnahme

Bei allen Probanden wurden venöse Blutentnahmen im nüchternen Zustand durchgeführt. Es wurden die in der folgenden Tabelle 8 aufgeführten laborchemischen Parameter bestimmt.

| Kategorie   | Bestimmter Parameter | Entnahme-Röhrchen |
|-------------|----------------------|-------------------|
| Hämatologie | Leukozyten           | EDTA-Röhrchen     |
|             | Erythrozyten         | EDTA-Röhrchen     |

|                                        |                   |                          |
|----------------------------------------|-------------------|--------------------------|
|                                        | Hämoglobin        | EDTA-Röhrchen            |
|                                        | Hämatokrit        | EDTA-Röhrchen            |
|                                        | Thrombozyten      | EDTA-Röhrchen            |
| Elektrolyte                            | Natrium           | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | Kalium            | Lithium-Heparin-Röhrchen |
| Kardiale Belastung                     | NT-proBNP         | Lithium-Heparin-Röhrchen |
| Entzündung                             | CRP               | Lithium-Heparin-Röhrchen |
| Endokrine Regulation                   | TSH               | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | ft4               | Lithium-Heparin-Röhrchen |
| Energiemetabolismus/-<br>substrate     | HbA <sub>1c</sub> | EDTA-Röhrchen            |
|                                        | Triglyceride      | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | Gesamtcholesterin | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | LDL-Cholesterin   | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | HDL-Cholesterin   | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | Freie Fettsäuren  | Serum-Röhrchen           |
| Zellschädigung                         | LDH               | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | Kreatinkinase     | Lithium-Heparin-Röhrchen |
| Leberfunktion                          | AST               | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | ALT               | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | y-GT              | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | AP                | Lithium-Heparin-Röhrchen |
| Nierenfunktion und<br>Harnstoffwechsel | Kreatinin         | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | Harnsäure         | Lithium-Heparin-Röhrchen |
|                                        | Harnstoff         | Lithium-Heparin-Röhrchen |

**Tabelle 8: Laborchemisch aus human-venösem Blut bestimmte Parameter.** ALT: Alanin-Aminotransferase; AP; Alkalische Phosphatase; AST: Aspartat-Aminotransferase; CRP: C-reaktives Protein; y-GT: Gamma-Glutamyltransferase; ft4: freies Thyroxin; HbA<sub>1c</sub>: Hämoglobin A<sub>1c</sub>; HDL: High Density Lipoprotein; LDH: Laktatdehydrogenase; LDL: Low Density Lipoprotein; NT-proBNP: n-terminales pro-Brain natriuretisches Peptid; PCT: Procalcitonin; TSH: Thyreoidea-stimulierendes Hormon.

Zudem wurde neben den für die Bestimmung von laborchemischen Parametern verwendeten Röhrchen ein zusätzliches Serum-Röhrchen mit venösem Blut befüllt. Innerhalb von 90 min wurde dieses Röhrchen für 10 min bei 3.500 G zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Aus logistischen Gründen war dies insbesondere im Rahmen der Operationen nur bei einem Teil der Probanden möglich. Das so konservierte Serum wurde nachfolgend zur Bestimmung von Konzentrationen des Ketonkörpers HBA verwendet (siehe 3.2.6).

#### 3.2.2.2.2 Bestimmung der kardialen Pumpfunktion

Als klinische Routine erhielten alle Probanden eine transthorakale Echokardiographie (TTE). Diese erfolgte entweder im Rahmen der Transplantatnachsorge am Tag nach der EMB oder bei Probanden mit HF in den Tagen, bzw. Wochen vor der HTX, LVAD-Implantation oder EMB. Zudem wurde im Rahmen der EMB auch invasiv die Hämodynamik gemessen. Sofern ausreichende Kapazitäten und keine expliziten Ausschlusskriterien (Kontraindikationen (z.B. implantiertes Metall), zu starkes Übergewicht oder Ablehnung des Probanden) bestanden, wurde ebenfalls eine kardiale Magnetresonanztomographie (cMRT) durchgeführt. Mithilfe dieser Untersuchungen wurden folgende Parameter erhoben, die zur Bestimmung der kardialen Pumpfunktion und Quantifizierung einer möglichen HF herangezogen wurden:

- Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) = prozentualer Anteil des Schlagvolumens im Vergleich zum enddiastolischen Volumens
- Herzindex (*cardiac index*, CI) = Herzzeitvolumen pro Körperoberfläche.

#### 3.2.2.2.3 Probengewinnung

##### Endomyokardbiopsien

Alle EMBs wurden aus klinischer Indikation, entweder zur Transplantatnachsorge bei früherer HTX oder bei HF unklarer Genese zur weiteren Diagnostik, durchgeführt. Die Biopsien wurden unter sterilen Bedingungen in einem der Herzkatheterlabore der Universitätsklinik Düsseldorf, von einem darin geübten kardiologischen Oberarzt und unter stetiger Röntgenkontrolle entnommen. Hierfür wurde zunächst eine Schleuse in die Vena femoralis eingelegt, ein Draht und eine weitere Schleuse bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben und schließlich eine spezielle Biopsiezange eingeführt. Alle Myokardbiopsien wurden sodann aus dem intraventrikulären Septum entnommen. Neben den klinisch indizierten Proben wurden je nach Größe der Ausbeute ein bis drei weitere

Proben zu Studienzwecken entnommen. Alle Proben wurden mittels kleiner Skalpelle von der Biopsiezange in kleine Reagiergefäße verbracht. Zu klinischen Zwecken wurden hier ein mit Formaldehyd und zwei bis drei mit RNAlater® präparierte Gefäße befüllt und zur weiteren Diagnostik von Histologie, Immunhistochemie und Virologie zum „Institut Kardiologie Diagnostik und Therapie“ nach Berlin gesendet. Die im Rahmen der Studie entnommenen Proben wurden in einem mit spezieller Biopsie-Präservations-Lösung (*biopsy preservation solution*, BIOPS) gefüllten Gefäß gesammelt, sofort auf Eis gekühlt und schnellstmöglich ins Labor gebracht, um innerhalb von maximal einer Stunde mit dem Prozess der Respirometrie-Messung (siehe 3.2.4) starten zu können.

#### Herztransplantationen

Unter Verwendung einer Herzlungenmaschine wird bei einer orthotopen HTX das „alte“ Herz des Patienten explantiert und ein „neues“ Spenderherz an dieselbe Stelle im Thorax transplantiert. Im Rahmen der Studie wurden noch im Operationssaal vom explantierten Herzen linksventrikuläre myokardiale Proben mithilfe von Pinzette, Skalpell und Schere entnommen. Diese Proben wurden ebenfalls schnellstmöglich in mit BIOPS gefüllte kleine Reagiergefäße überführt, auf Eis gekühlt und ins Labor verbracht, um innerhalb von maximal einer Stunde den Prozess der Respirometrie (siehe 3.2.4) zu beginnen.

#### LVAD-Implantationen

Eine LVAD-Implantation erfolgt operativ unter Verwendung einer Herzlungenmaschine. Dabei wird im Bereich des Apex des linken Ventrikels ein rundliches Loch ausgestanzt, über das sodann das LVAD fest am Myokard durch Nähte befestigt werden kann. Im Rahmen der Studie wurden wie auch bei der HTX noch im Operationssaal von dem ausgestanzten linksventrikulär apikalen Myokard Proben mithilfe von Pinzette, Skalpell und Schere entnommen und schnellstmöglich in mit BIOPS gefüllte kleine Reagiergefäße überführt und auf Eis gekühlt. Ebenfalls innerhalb von maximal einer Stunde wurde sodann im Labor mit dem Prozess der Respirometrie (siehe 3.2.4) begonnen.

#### 3.2.2.3 Ethik

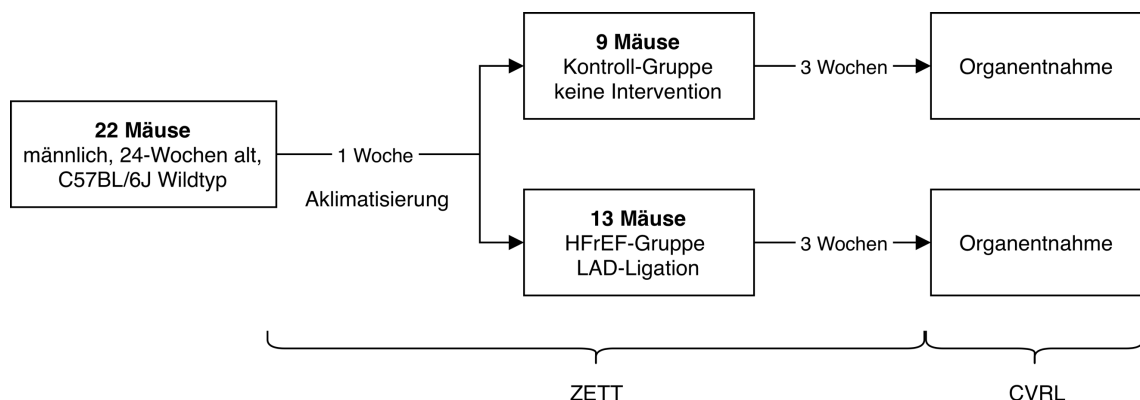
Die Studie mit humanen Probanden wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit zwei Ethikvoten am 13.12.2021 (Studennummer 2021-1635) und 19.05.2022 (Studennummer 2022-1962) genehmigt. Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (*World*

*Medical Association*) durchgeführt. Alle Probanden wurden vor Studienteilnahme ausführlich über diese informiert und gaben ihre schriftliche Einwilligung.

### 3.2.3 Murine Individuen

#### 3.2.3.1 Ablauf der Studie

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden 22 männliche Mäuse des Wildtyp C57BL/6J der Firma Janvier-Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Alle Mäuse waren 24-Wochen alt. Sie wurden zunächst eine Woche in der in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (ZETT) zur Akklimation gehalten. Zur Induktion einer HF wurde ein bereits etabliertes Modell verwendet, bei dem mittels Ligation des Ramus interventricularis anterior (*left anterior descending artery*, LAD) ohne Reperfusion für drei Wochen eine ischämische HF verursacht wird (siehe 3.2.3.1.1) [120, 121]. Dieses Modell wurde bei 13 der 22 Mäuse angewendet, die so die HF-Gruppe bildeten. Die verbleibenden 9 Mäuse ohne HF bildeten die Kontroll-Gruppe. Mit der ungleichen Aufteilung wurden potenzielle Ausfälle im Rahmen des HF-Modells berücksichtigt. Nach ca. 3 Wochen wurden schließlich bei allen 22 Mäusen Blut und Proben des linksventrikulären Myokards entnommen (siehe 3.2.3.1.2) und das Myokard mittels Respirometrie untersucht (siehe 3.2.4). Alle Mäuse hatten stets Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Der Versuchsablauf ist in Abb. 3 veranschaulicht.



**Abb. 3: Zeitlicher Ablauf der murinen Studie.** CVRL: Kardiologisches Forschungslabor (*Cardiovascular Research Laboratory*); HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; LAD: Ramus interventricularis anterior (*left anterior descending artery*); ZETT: Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben.

#### 3.2.3.1.1 Induktion der Herzinsuffizienz

Wie bereits beschrieben, ist die Ligation des LAD für drei Wochen ohne Reperfusion ein etabliertes Mausmodell zur Induktion einer ischämischen HF [120, 121]. Die Intervention wurde in der ZETT von einem erfahrenen wissenschaftlichen Mitarbeiter des kardiologischen Labors mit erfolgreicher Teilnahme am Versuchstierkudkurs durchgeführt. Wie bereits etabliert, wurde bei den Mäusen nach Anästhesie mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) und nach Intubation inhalativem 2 Vol.-% Isofluran der LAD ligiert [121]. Der Erfolg der Ligation wurde mittels ST-Strecken Hebungen im Elektrokardiogramm kontrolliert [121]. Nach erfolgreicher Operation erhielten die Mäuse zur Schmerzreduktion bis zu drei Tage Buprenorphin (0.1 mg/kg). Bereits in vorherigen Studien konnte eine Reduktion der LVEF durch die LAD-Ligation sicher nachgewiesen werden [121], sodass in dieser Studie auf eine Bestimmung der LVEF verzichtet wurde.

#### 3.2.3.1.2 Organentnahme

Nach Verbringung der Tiere von der ZETT ins kardiologische Forschungslabor, wurde die Organentnahme ebenfalls von einem erfahrenen wissenschaftlichen Mitarbeiter des kardiologischen Labors mit entsprechender Qualifikation durchgeführt. Zunächst erfolgte die Anästhesie wie bereits in 3.2.3.1.1 beschrieben. Durch direkte Punktion des Herzens wurde Blut entnommen und die aktuelle Glukose-Konzentration mittels eines *Point-of-Care* Glukosemessgerätes bestimmt. Anschließend erfolgte die Entnahme des linken Ventrikels und Exzision kleinerer Myokardproben. Diese wurden analog zu den humanen Proben in mit BIOPS gefüllte kleine Reagiergefäße überführt, auf Eis gekühlt und innerhalb von maximal einer Stunde der Respirometrie zugeführt (siehe 3.2.4). Zusätzlich wurden Myokardproben für die spätere Messung der CSA bei -80 °C eingefroren.

#### 3.2.3.2 Ethik

Die tierexperimentellen Untersuchungen mit Mäusen wurden vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz genehmigt (LANUV Aktenzeichen: 81-02.04.2022.A185) und in Übereinstimmung mit dem europäischen Übereinkommen zum Schutz von Wirbeltieren, die zu Versuchszwecken und anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden (*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, Council of Europe Treaty Series No. 123*) durchgeführt. Die Organentnahmen wurden von der ZETT der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Aktenzeichen: O85-23) und von einem

erfahrenen wissenschaftlichen Mitarbeiter des kardiologischen Labors mit entsprechender Qualifikation vorgenommen.

### **3.2.4 Hochauflösende Respirometrie an Myokard**

#### **3.2.4.1 Probenvorbereitung**

Um die Durchführung einer HRR zu ermöglichen, muss eine gesonderte Vorbereitung und Permeabilisierung der Proben erfolgen, damit die während SUI-Protokollen zugegebenen Substanzen die Mitochondrien erreichen können und freie zytosolische Substanzen ausgewaschen werden [57]. Hierzu wurde Standard-Protokoll entsprechend [56, 57] und wie bereits in vorherigen Studien an der Heinrich-Heine-Universität beschrieben [122] nach der sogenannten Methode der *skinned muscle fibers* [123] vorgegangen: Die in BIOPS präservierten Proben wurden zunächst in eine mit 2,5 ml BIOPS präparierte Vertiefung einer 6-Well-Zellkulturplatte überführt und während aller folgenden Schritte weiterhin auf Eis gekühlt. Unter Vergrößerung mithilfe eines Mikroskops wurden die Myokard-Proben vorsichtig mit spitzen Pinzetten durch leichtes Ziehen separiert und ggf. größere Proben gleichmäßig mit einer Schere in ca. 0,5-1,5 mg große Stücke zerteilt, um mindestens zwei Proben eines Individuums zu erhalten. Anschließend wurde Saponin in die Vertiefung hinzugegeben, sodass eine Konzentration von 50 µg/ml erreicht wurde, und die Myokardfasern darin für 30 min auf einer Schüttel-Platte mit ca. 80 Umdrehungen inkubiert. Hierdurch wurde die Plasmamembran durch ihren hohen Cholesterin-Gehalt selektiv permeabilisiert, während die mitochondrialen Membranen mit geringerem Cholesterin-Gehalt intakt blieben [57, 124].

Nach Permeabilisierung wurden die Proben insgesamt zweimal in die entsprechend nächste Vertiefung der 6-Well-Zellkulturplatte überführt und dort in Respiromedien (*mitochondrial respiration medium* O5, MiRO5) für jeweils 10 min ebenfalls unter ständigen Umdrehungen der Schüttel-Platte gewaschen [122]. Hiernach wurden die Proben kurz mit Filterpapier abgetrocknet und das Trockengewicht mittels einer Milligramm-Waage bestimmt.

#### **3.2.4.2 Respirometrie-Protokolle**

Als Respirometer zur Durchführung der HRR wurde der Oxygraph® 2k der Firma OROBOROS® Instruments (Innsbruck, Österreich) verwendet, der über zwei geschlossene Kammern mit je 2 ml Volumen und je einer Clark-Elektrode zur Erfassung

der Sauerstoffkonzentration (siehe 1.3.2) verfügt und somit simultan zwei voneinander unabhängige Messungen ermöglicht. Die Registrierung der Daten erfolgte mit der zugehörigen Software DatLab derselben Firma. Die Temperatur in den Kammern lag bei 37 °C und die Kammern waren vollständig mit dem Respirations-Medium MiRO5 gefüllt.

Pro Individuum und Untersuchungszeitpunkt wurden zwei SUIT-Protokolle (siehe 1.3.2) verwendet [81]: In einer Kammer des Respirometers wurde ein Protokoll mit konventionellen Substraten angewandt (siehe 3.2.4.2.1). In der zweiten Kammer wurde mit dem zweiten Teil der Probe(n) gleichzeitig ein Protokoll durchgeführt, mit der die KB-abhängige Respiration quantifiziert werden kann (siehe 3.2.4.2.2) [81]. So konnte zum einen eine Vergleichbarkeit der KB-bedingten Respiration mit der maximal möglichen Kapazität der oxidativen Phosphorylierung aus dem konventionellen Protokoll ermöglicht werden und zum anderen eine Vergleichbarkeit mit früheren Studien, die ebenfalls Protokolle mit konventionellen Substraten verwendet haben, hergestellt werden. In beiden Protokollen wurden nach Zugabe jeder Substanz stabile Messwerte abgewartet, um danach einen ausreichend großen Zeitraum mit stabiler Messung auszuwählen und aus allen darin erfassten Messwerten den Mittelwert zu bilden. Dieser Mittelwert wurde dann für die weitere Auswertung verwendet.

#### *3.2.4.2.1 Respirometrie-Protokoll mit konventionellen Substraten*

Mit dem konventionellen SUIT-Protokoll wurde die OXPHOS Kapazität für die konventionellen Substrate Fettsäuren, NADH-gekoppelte Substrate und Succinat gemessen. Ebenso wurde die maximale OXPHOS Kapazität, die maximale LEAK Respiration und die maximale ETS Kapazität erfasst. Es beinhaltete die in Tabelle 9 aufgelisteten Substanzen, die in chronologischer Reihenfolge in die Respirometrie-Kammer gegeben wurden [57, 58, 122]. Nach jeder Zugabe einer Substanz wurde eine stabile Messung des O<sub>2</sub>-Flusses abgewartet, bevor die nächste Substanz appliziert wurde. In Abb. 4 ist das Protokoll mit der zugehörigen Nomenklatur der erfassten respiratorischen Stadien [58] schematisch dargestellt.

| Substanz         | Konzentration im Oxygraphen | Respiratorisches Stadium | Besonderheit |
|------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------|
| Malat            | 2 mM                        | -                        | -            |
| Octanoylcarnitin | 1 mM                        | [F] <sub>L</sub>         | -            |

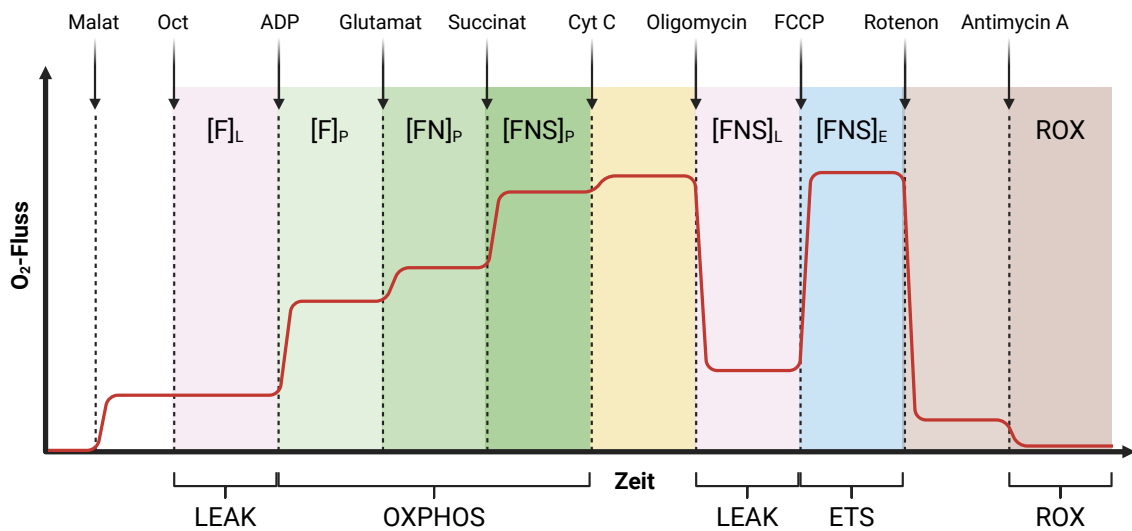
|             |                               |                    |                                                                  |
|-------------|-------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------|
| ADP         | 2,5 mM                        | [F] <sub>p</sub>   | -                                                                |
| Glutamat    | 10 mM                         | [FN] <sub>p</sub>  | -                                                                |
| Succinat    | 10 mM                         | [FNS] <sub>p</sub> | -                                                                |
| Cytochrom C | 0,01 mM                       | -                  | -                                                                |
| Oligomycin  | 0,0025 mM                     | [FNS] <sub>L</sub> | Mind. 10 min warten bis stabile Messung                          |
| FCCP        | Titration in 0,2 µM Schritten | [FNS] <sub>E</sub> | Titration bis keine weitere Steigerung des O <sub>2</sub> -Fluss |
| Rotenon     | 0,001 mM                      | -                  | Mind. 10 min warten bis stabile Messung                          |
| Antimycin A | 0,005 mM                      | ROX                | Mind. 10 min warten bis stabile Messung                          |

**Tabelle 9: SUT-Protokoll mit konventionellen Substraten und zugehörige respiratorische Stadien [58].** ADP: Adenosin-Diphosphat; <sub>E</sub>: entkoppelte Respiration; ETS: Elektronen-transferierendes System; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon; <sub>L</sub>: undichte (leak) Respiration; <sub>p</sub>: phosphorylierende Respiration; ROX: residualer Sauerstoff-Verbrauch.

In dem Protokoll wird zunächst Malat appliziert, um als Substrat des Citrat-Zyklus dessen Ablauf zu ermöglichen. So kann nach Zugabe der Fettsäure (F) Octanoylcarnitin die Fettsäure-Oxidation als LEAK Respiration gemessen werden ([F]<sub>L</sub>), da bei Fehlen des Phosphatakzeptors ADP noch keine Phosphorylierung stattfinden kann. Nach Gabe von ADP wird nun die phosphorylierende Respiration als OXPHOS Kapazität unter Verwendung von Fettsäuren erfasst ([F]<sub>p</sub>). Durch die Applikation der Substrate Glutamat, das NADH-vermittelt (N) in die Atmungskette eingeschleust wird, ([FN]<sub>p</sub>) und Succinat (S, [FNS]<sub>p</sub>) wird schließlich die maximale OXPHOS Kapazität quantifiziert. Durch die folgende Zugabe von Cytochrom C lässt sich die Qualität der Permeabilisierung und Intaktheit der äußeren mitochondrialen Membran testen, wobei bei einer stärkeren Schädigung die Respiration nach Zugabe deutlich (> 15-20 %) ansteigen würde [57, 58].

Oligomycin verhindert durch Hemmung der ATP-Synthase die Phosphorylierung, sodass nach dessen Zugabe nur noch eine LEAK Respiration stattfinden kann ([FNS]<sub>L</sub>). Das Protonophor FCCP entkoppelt die Atmungskette, wodurch die ETS Kapazität gemessen werden kann ([FNS]<sub>E</sub>). Nach Zugabe des Komplex I-Inhibitors Rotenon und des Komplex III-Inhibitors Antimycin A kommt die Respiration zum Erliegen und die ROX wird erfasst.

Anhand des Protokolls mit konventionellen Substraten wurden ebenfalls die drei bereits in 1.3.2.2 beschriebenen Fluss-Kontroll-Raten gebildet.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Respirometrie-Protokolls mit konventionellen Substraten [58].** ADP: Adenosin-Diphosphat; Cyt C: Cytochrom C; E: entkoppelte Respiration; ETS: Elektronen-transferierendes System; F: Fettsäuren; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon; L: undichte (leak) Respiration; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Oct: Octanoylcarnitin; N: NADH-gekoppelte Substrate; OXPHOS: oxidative Phosphorylierung; P: phosphorylierende Respiration; ROX: residualer Sauerstoff-Verbrauch; S: Succinat. Erstellt mit biorender.com.

### 3.2.4.2.2 Respirometrie-Protokoll mit Ketonkörpern

Das SUIT-Protokoll zur Quantifizierung der KB-abhängigen Respiration wurde erst kürzlich an der Heinrich-Heine-Universität entwickelt [81] und ist mit den verwendeten Substanzen in Tabelle 10 aufgeführt und schematisch in Abb. 5 veranschaulicht.

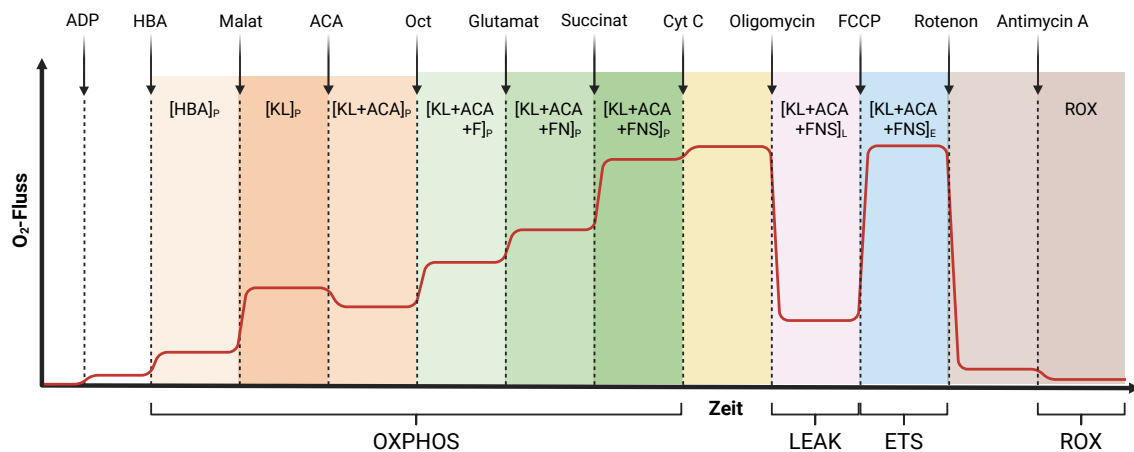
| Substanz         | Konzentration im Oxygraphen | Respiratorisches Stadium  | Besonderheit |
|------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------|
| ADP              | 2,5 mM                      | -                         | -            |
| HBA              | 5 mM                        | [HBA] <sub>P</sub>        |              |
| Malat            | 2 mM                        | [KL] <sub>P</sub>         | -            |
| ACA              | 5 mM                        | [KL+ACA] <sub>P</sub>     |              |
| Octanoylcarnitin | 1 mM                        | [KL+ACA+F] <sub>P</sub>   | -            |
| Glutamat         | 10 mM                       | [KL+ACA+FN] <sub>P</sub>  | -            |
| Succinat         | 10 mM                       | [KL+ACA+FNS] <sub>P</sub> | -            |
| Cytochrom C      | 0,01 mM                     | -                         | -            |

|             |                               |                           |                                                                  |
|-------------|-------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Oligomycin  | 0,0025 mM                     | [KL+ACA+FNS] <sub>L</sub> | Mind. 10 min warten bis stabile Messung                          |
| FCCP        | Titration in 0,2 µM Schritten | [KL+ACA+FNS] <sub>E</sub> | Titration bis keine weitere Steigerung des O <sub>2</sub> -Fluss |
| Rotenon     | 0,001 mM                      | -                         | Mind. 10 min warten bis stabile Messung                          |
| Antimycin A | 0,005 mM                      | ROX                       | Mind. 10 min warten bis stabile Messung                          |

**Tabelle 10: SUIT-Protokoll mit Ketonkörpern und zugehörige respiratorische Stadien [81].**  
ACA: Acetoacetat; ADP: Adenosin-Diphosphat; <sub>E</sub>: entkoppelte Respiration; ETS: Elektronen-transferierendes System; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon; HBA: β-Hydroxybutyrat; KL: Ketolyse; <sub>L</sub>: undichte (leak) Respiration; <sub>P</sub>: phosphorylierende Respiration; ROX: residualer Sauerstoff-Verbrauch.

Nach Zugabe von ADP als Phosphatakzeptor werden die Ketonkörper HBA und ACA appliziert [81]. Da für den vollständigen Ablauf der Ketolyse der CoA aus dem TCA-Zyklus benötigt wird (siehe 1.4.2) kann erst nach Applikation von Malat die oxidative Phosphorylierung unter gesamter Ketolyse gemessen werden [81]. Nach HBA-Gabe wird somit folglich nur der erste durch BDH1 vermittelte Schritt der Ketolyse (HBA zu ACA) erfasst. Durch die zusätzliche Gabe von ACA nach Erfassen der Gesamt-Ketolyse wird sichergestellt, dass die KB-basierte OXPHOS Kapazität mit gesättigten Konzentrationen aller KB gemessen wird und nicht BDH1 geschwindigkeitslimitierend die Ergebnisse vermindert [81]. Somit ergeben sich die respiratorischen Stadien der KB-abhängigen Respiration (siehe Tabelle 10 und Abb. 5).

Der weitere Verlauf des Protokolls entspricht dem in der anderen Kammer verwendeten konventionellen SUIT-Protokoll (siehe 3.2.4.2.1). Da bereits gezeigt wurde, dass die maximal gemessene Respiration im KB-Protokoll nach Zugabe aller konventionellen Substrate (Stadium [KL+ACA+FNS]<sub>P</sub>) signifikant geringer ausfällt als im konventionellen Protokoll ohne vorherige Gabe von KB (Stadium [FNS]<sub>P</sub>) [81], wurde die maximale phosphorylierende, partiell-gekoppelte Respiration nur mit dem konventionellen Protokoll ermittelt. In den Ergebnissen sind dementsprechend nur die Schritte der KB-abhängigen Respiration des KB-Protokolls aufgeführt. Der weitere Verlauf des KB-Protokolls wurde jedoch verwendet, um, wie in 3.2.4.2.1 beschrieben, mittels Cytochrom C auf die Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran der verwendeten Proben zu testen.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Respirometrie-Protokolls mit Ketonkörpern [81].** ACA: Acetoacetat; ADP: Adenosin-Diphosphat; Cyt C: Cytochrom C; <sub>E</sub>: entkoppelte Respiration; ETS: Elektronen-transferierendes System; F: Fettsäuren; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon; HBA:  $\beta$ -Hydroxybutyrat; KL: Ketolyse; <sub>L</sub>: undichte (leak) Respiration; O<sub>2</sub>: Sauerstoff; Oct: Octanoylcarnitin; N: NADH-gekoppelte Substrate; OXPHOS: oxidative Phosphorylierung; <sub>P</sub>: phosphorylierende Respiration; ROX: residualer Sauerstoff-Verbrauch; S: Succinat. Erstellt mit biorender.com.

Zur Berechnung der relativen Kontribution der KB zur maximal möglichen gekoppelten oxidativen Phosphorylierung wurde jedes KB-abhängige Respirationsstadium mit der maximal gekoppelten Respiration aus dem konventionellen Protokoll verglichen und somit folgende Verhältnisse gebildet [81]:

- $\frac{[\text{HBA}]_P}{[\text{FNS}]_P}$
- $\frac{[\text{KL}]_P}{[\text{FNS}]_P}$
- $\frac{[\text{KL}+\text{ACA}]_P}{[\text{FNS}]_P}$ .

### 3.2.4.3 Kriterien einer erfolgreichen Respirometrie

Unterschiedliche Faktoren können dazu führen, dass eine Respirometrie-Messung fehlschlägt und keine validen Ergebnisse liefert. Insbesondere relevant ist hierbei die Qualität der verwendeten Probe [125]. Die Probe kann beispielsweise ein zu geringes Probengewicht, einem zu hohen Fett-Anteil oder eine zu starke Permeabilisierung und Schädigung der mitochondrialen Membran aufweisen. Folgende Kriterien wurden daher auf die verwendeten Protokolle in beiden Studien angewandt, um eine Messung als erfolgreich zu werten:

- Gesamt-Gewicht der Probe(n) > 0,4 mg
- Anstieg der Respiration nach Cytochrom C-Gabe  $\leq 20 \%$

- Anstieg der Respiration nach Succinat-Gabe
- Anstieg der Respiration nach ADP-Gabe (nur im konventionellen Protokoll)
- Respiration nach HBA-Gabe  $> 0 \text{ pmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (nur im KB-Protokoll)
- Anstieg der Respiration nach Malat-Gabe (nur im KB-Protokoll)
- Höhere Respiration nach Succinat-Gabe als nach ACA-Gabe (nur im KB-Protokoll).

Zudem wurden in beiden Studien teils unterschiedliche Kriterien angewandt. Aufgrund des größeren möglichen Proben-Volumens des in der HTX- und LVAD-Gruppe entnommenen Myokard konnten in der HFrEF-Studie teils strengere Grenzwerte verwendet werden, welche im Folgenden aufgelistet sind:

- Respiration nach Succinat-Gabe  $> 40 \text{ pmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (nur im konventionellen Protokoll)
- Respiration nach Succinat-Gabe  $> 30 \text{ pmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (nur im KB-Protokoll)
- Respiration nach Malat-Gabe  $> 20 \text{ pmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (nur im KB-Protokoll).

Da die Kohorten der T2D-Studie ausschließlich aus Probanden der Post-HTX Gruppe ausgemacht werden konnten und die Proben in dieser Gruppe durch Entnahme mittels Biopsie teils eine eingeschränkere Größe aufwiesen, wurden hier die folgenden, etwas liberaleren zusätzlichen Kriterien verwendet:

- Respiration nach Succinat-Gabe  $> 20 \text{ pmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (nur im konventionellen Protokoll)
- Respiration nach Succinat-Gabe  $> 10 \text{ pmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (nur im KB-Protokoll)
- Respiration nach Malat-Gabe  $> 5 \text{ pmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (nur im KB-Protokoll).

### **3.2.5 Messung der Citrat-Synthase Aktivität**

Zur Bestimmung der mitochondriale Dichte einer Probe wurde die auf den Proteingehalt normalisierte Messung der CSA verwendet (siehe 1.3.3). Da die Menge an Probenmaterial in den humanen Gruppen aus technischen und ethischen Gründen limitiert war, konnte die Messung der CSA nur in den murinen Gruppen erfolgen. Hierfür wurden

bei -80 °C gelagerte Myokardproben verwendet. Die Messung erfolgte mit dem *Citrate Synthase Assay Kit* der Firma Sigma-Aldrich® und nach den offiziellen Produktinformationen.

Zunächst wurden die Proben gewogen und mit 100 µl Homogenisierungspuffer (bestehend aus CellLytic MT *Cell Lysis Reagent* und *Protease Inhibitor Cocktail*) pro mg Probengewicht gemischt. In diesem Gemisch wurden die Proben mechanisch mittels Schwingmühle für dreimal eine Minute homogenisiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16.000 G wurde der Überstand zur Messung abpipettiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 750 nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät und durch Vergleich mit einer Standard-Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin. Hierfür wurden die Proben auf eine 96-Well-Mikroplatte pipettiert und mit Protein Assay Reagenz A und B vermischt. Nach Inkubation für 15 min erfolgte die photometrische Messung.

Vor Durchführung des Assays zur CSA-Messung wurde die Proben auf 0,125 µl Protein pro µl verdünnt. Die Messung wurde mithilfe des Assay-Kit nach Herstellerangaben und mit Positivkontrollen durchgeführt. Nach Zugabe von Acetyl-CoA und 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) erfolgte zunächst eine Messung der endogenen CSA als Baseline. Danach wurde nach Zugabe von Oxalacetat erneut einmal pro Minute für 10 min die Absorption bei 412 nm gemessen. Pro Probe wurden je zwei gleichzeitige Messungen durchgeführt.

Wie in 1.3.3 beschrieben, wurde die CSA als Rate der Änderung der Absorption pro Zeit berechnet. Für die Auswertung der gemessenen CSA, bzw. der Rate der Änderung der photometrischen Messung, wurde das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) für die Streuung der einzelnen Messpunkte über den Zeitraum der 10 min berechnet. Um für möglichst viele der Messungen ein  $R^2$  möglichst nahe 1,0 zu erzielen, wurden innerhalb des 10-minütigen Messzeitraumes die fünf Messpunkte von Minute 3 bis einschließlich 7 ausgewählt. Messungen mit einem  $R^2 < 0,95$  wurden exkludiert. So konnte pro Individuum mindestens eine der doppelten Messung ausgewertet werden oder der Mittelwert gebildet werden. Schlussendlich wurde die CSA auf den Proteingehalt der Proben normiert und so für weitere Vergleiche zwischen den Gruppen verwendet.

### 3.2.6 Messung der Ketonkörper-Konzentrationen im Serum

Zur Messung der Konzentrationen von zirkulierenden KB wurde bei -80 °C konserviertes Serum verwendet, welches zum Zeitpunkt der Myokardproben-Entnahme abgenommen und innerhalb von 90 min eingefroren worden war (siehe 3.2.2.2.1). Das gefrorene Serum wurde zunächst über einen Zeitraum von mehreren Stunden langsam auf Eis aufgetaut. Nach vollständigem Auftauen wurden die einzelnen Proben durch mehrmaliges manuelles Invertieren gemischt. Die Bestimmung der KB-Konzentrationen erfolgte dann durch ein *Point-of-Care* Ketonmeter. Hierzu wurde das Gerät zunächst mittels Kontrolllösungen kalibriert und sodann für jede Probe das Serum einem entsprechenden Teststreifen mithilfe einer Pipette zugeführt.

Durch das *Point-of-Care* Ketonmeter wurde ausschließlich die Konzentration von HBA gemessen. Als den überwiegenden Teil der zirkulierenden ausmachender KB (siehe 1.4.1), wurde die Konzentration an HBA als für alle zirkulierenden KB ausreichend repräsentativ erachtet.

### 3.2.7 Statistische Analysen

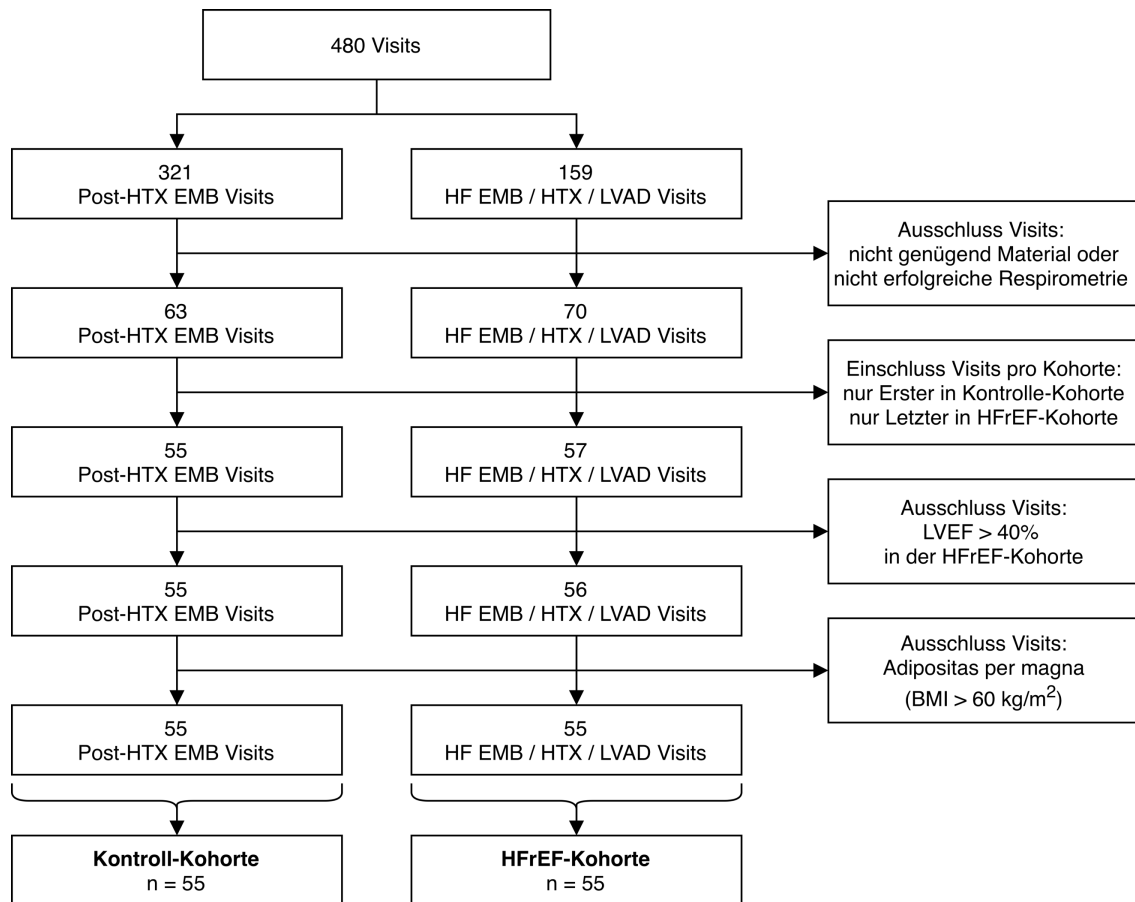
#### 3.2.7.1 Selektion und Einteilung der humanen Kohorten der HF-Studie

Im Zeitraum der HF-Studie von Februar 2024 bis einschließlich Dezember 2025 wurden zu insgesamt 114 Zeitpunkten Untersuchungen mittels HRR durchgeführt, wobei teils auch einzelne Probanden mehrfach untersucht wurden. Alle Untersuchungszeitpunkte (*Visits*) wurden in eine der folgenden zwei Kohorten eingeteilt:

- HFrEF-Kohorte, bestehend aus den Untersuchungszeitpunkten HTX wegen HFrEF im Endstadium (HTX *Visits*), LVAD-Implantation wegen HFrEF im Endstadium (LVAD *Visits*) oder EMB zur HFrEF Diagnostik (HF EMB *Visits*)
- Kontroll-Kohorte, bestehend aus den Untersuchungszeitpunkten EMB post-HTX, ohne Zeichen einer aktuellen HF (Post-HTX *Visits*).

Im Folgenden wurden alle Untersuchungszeitpunkte ausgeschlossen, bei denen nicht genügend Probenmaterial für die Durchführung beider HRR-Protokoll gewonnen werden konnte, die Durchführung mindestens eines der Protokolle nicht als erfolgreich gewertet werden konnte (siehe 3.2.4.3) oder es sich um einen doppelten Untersuchungszeitpunkt innerhalb einer Kohorte handelte (siehe Abb. 6). Mehrfache Untersuchungszeitpunkte

eines Probanden waren dementsprechend weiterhin möglich, sofern beide Zeitpunkte jeweils unterschiedlichen Kohorten zugeordnet waren.



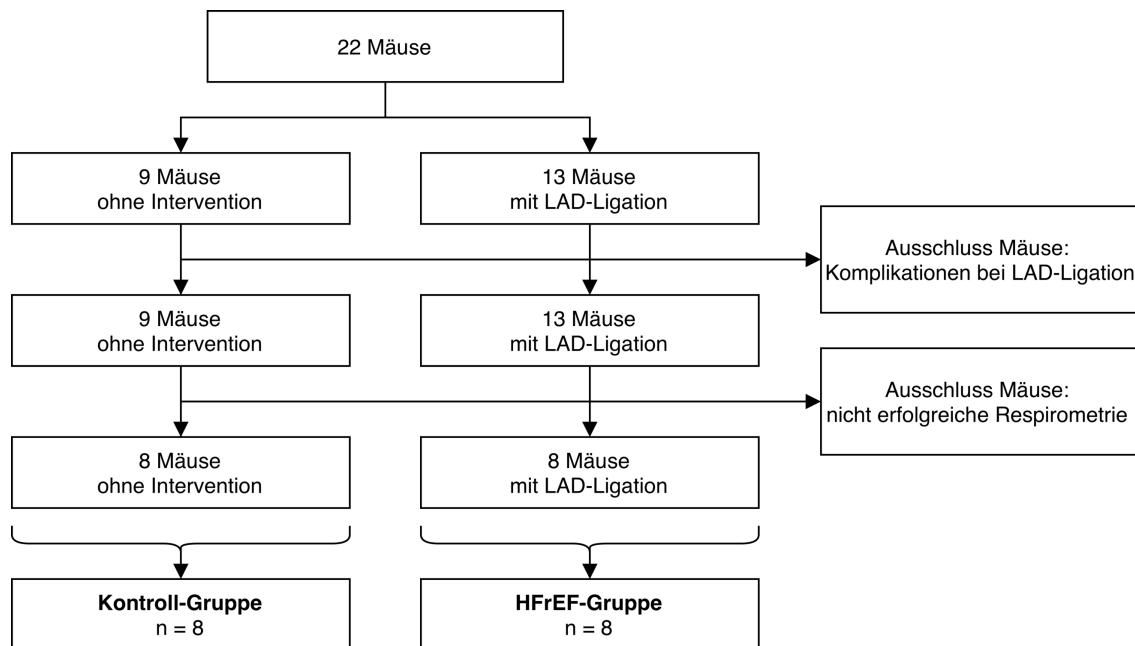
**Abb. 6: Selektion der Untersuchungszeitpunkte und Einteilung der humanen Kohorten der Herzinsuffizienz-Studie.** BMI: *Body-Mass-Index*; EMB: Endomyokardbiopsie; HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; HTX: Herztransplantation; LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion *Visit*: Untersuchungszeitpunkt.

### 3.2.7.2 Selektion und Einteilung der murinen Gruppen der HI-Studie

Die 22 Mäuse wurden je nach Intervention (siehe 3.2.3.1.1) in eine der folgenden zwei Gruppen eingeteilt:

- HFrEF-Gruppe, bestehend aus allen Mäusen mit LAD-Ligation
- Kontroll-Gruppe, bestehend aus allen Mäusen ohne Intervention.

Alle durchgeführten Interventionen der LAD-Ligation verliefen erfolgreich. Identisch zu der Selektion der humanen Probanden, wurden daher nur Individuen exkludiert, deren Proben in der Untersuchung in mindestens einem Spirometrie-Protokoll keine als erfolgreich zu wertende Ergebnisse (siehe 3.2.4.3) lieferten (siehe Abb. 7).



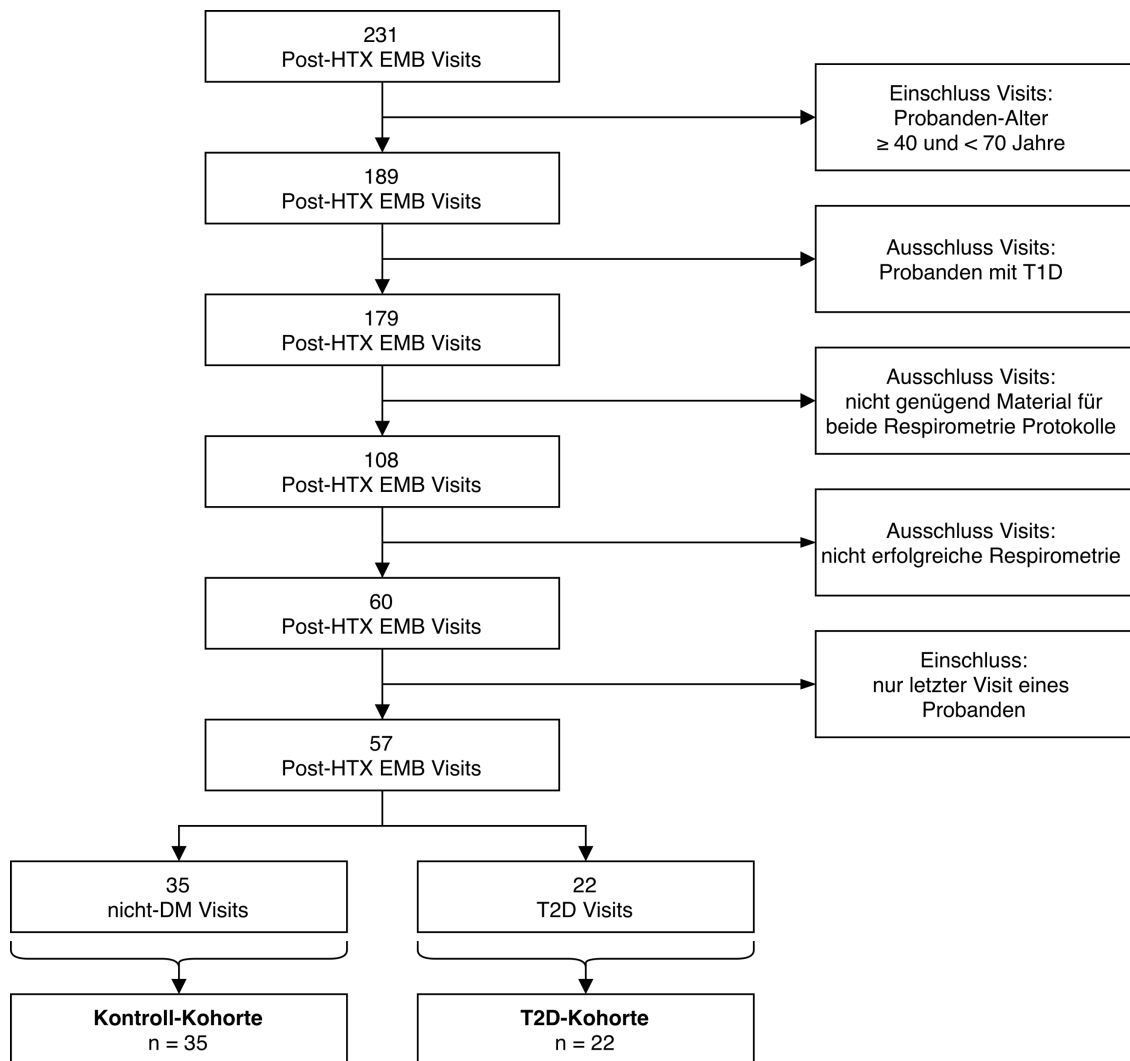
**Abb. 7: Selektion der Mäuse und Einteilung der murinen Gruppen der Herzinsuffizienz-Studie.** HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; LAD: Ramus interventricularis anterior (*left anterior descending artery*).

### 3.2.7.3 Selektion und Einteilung der humanen Kohorten der T2D-Studie

In die T2D-Studie wurden ausschließlich Probanden eingeschlossen, die keine HF aufwiesen und eine EMB im Rahmen der routinemäßigen Transplantatnachsorge erhielten (Post-HTX Gruppe). Im Zeitraum der Studie von März 2023 bis einschließlich Oktober 2024 wurden 231 Untersuchungszeitpunkte (*Visits*) der Post-HTX Gruppe erfasst, wobei Probanden teils mehrfach innerhalb dieses Zeitraumes untersucht wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Ätiologie wurden Probanden mit T1D aus der Analyse ausgeschlossen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Kohorten wurden nur Probanden mit einem Alter zwischen 40 und 70 Jahren zum Zeitpunkt der Untersuchung eingeschlossen. Alle Untersuchungszeitpunkte, bei denen nicht genügend Material für die Durchführung beider HRR-Protokolle gesammelt werden konnte, mindestens eines der beiden durchgeführten Protokolle nicht als erfolgreich gewertet werden konnte (siehe 3.2.4.3) oder es sich nicht um den letzten Untersuchungszeitpunkt eines Probanden handelte, wurden exkludiert. Alle verbleibenden Untersuchungszeitpunkte wurden dann in T2D und Kontrollen eingeteilt (siehe Abb. 8).

Ein T2D wurde bei Zutreffen mindestens eines der folgenden Kriterien diagnostiziert:

- $HbA_{1c} \geq 6,5 \%$
- Vorhandensein von spezifischer anti-hyperglykämischer Medikation (Insulin, Metformin, Sulfonylharnstoff, DPP4-Inhibitor oder Glitazon).



**Abb. 8: Selektion der Untersuchungszeitpunkte und Einteilung der humanen Kohorten der T2D-Studie.** DM: Diabetes mellitus; EMB: Endomyokardbiopsie; HTX: Herztransplantation; T1D: Diabetes mellitus Typ 1; T2D: Diabetes mellitus Typ 2; Visit: Untersuchungszeitpunkt.

### 3.2.7.4 Statistische Tests

Alle statistischen Tests wurden mit der GraphPad Prism® Software durchgeführt. Ebenso wurden hiermit die Abbildungen der Ergebnisse als Graphen erstellt.

Bei den humanen und murinen Charakteristika wurden sowohl binäre als auch metrische Variablen erfasst. Deskriptiv wurde für alle binären Charakteristika neben der absoluten

Häufigkeit eines Merkmals auch die relative Häufigkeit in Prozent berechnet. Für die Abschätzung der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der exakte Test nach Fisher (*Fisher's exact test*) verwendet. Bei kontinuierlichen Variablen wurden Median und Quartile errechnet und die Unterschiede zwischen den Gruppen mittels multipler Mann-Whitney-U-Tests beurteilt.

Die Ergebnisse der Respirometrie-Messung, Messung der CSA und Messung der KB-Konzentrationen wurden deskriptiv als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) abgebildet. Bei Vergleichen von nur einem Ergebnis zwischen zwei Gruppen innerhalb einer Analyse wurde zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test und Quantil-Quantil-Diagramm auf eine mögliche Normalverteilung geprüft. Je nach wahrscheinlicher Verteilung wurde entweder der Mann-Whitney-U-Test verwendet oder ein F-Test zum Vergleich der Varianzen durchgeführt und dann entweder der zweiseitige, unabhängige t-Test oder bei signifikant unterschiedlichen Varianzen der Welch's t-Test benutzt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen bei gleichzeitigem Vergleich von mehreren Ergebnissen wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit wiederholten Messungen oder gemischtem Modell mit wiederholten Messungen (*repeated measures mixed-effects model*) getestet. Gleichzeitig wurde stets für die Falscherkennungsrate (*False Discovery Rate*, FDR) mit der Benjamini-Krieger-Yekutieli Methode korrigiert [126]. Adjustierte Analysen wurden mittels linearer Regression mit der Methode der kleinsten Quadrate (*least squares method*) durchgeführt. Korrelationsanalysen wurden mit Spearman Korrelationen durchgeführt und der Rangkorrelationskoeffizient „r“ angegeben.

Als statistisch signifikant wurden Testergebnisse mit einem  $p < 0,05$ , bzw.  $q < 0,05$ , gewertet. Alle p-Werte wurden in Text, Tabellen oder Abbildungen auf drei Nachkommastellen gerundet angegeben. Wurde bei einem Test für die Falscherkennungsrate kontrolliert, so wurde bei einem signifikanten q-Wert der entsprechende p-Wert zusätzlich mit einem Sternchen („\*“) gekennzeichnet und somit als unter Kontrolle der Falscherkennungsrate signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Herzinsuffizienz-Studie

#### 4.1.1 Humane Kohorten

##### 4.1.1.1 Charakteristika der humanen Kohorten

Die Charakteristika der humanen Kohorten der HFrEF-Studie zum Zeitpunkt der respirometrischen Untersuchung sind in Tabelle 11 aufgeführt. Beide Kohorten glichen sich in den demographischen Parametern Alter, Geschlecht und BMI. Sie unterschieden sich signifikant in der kardialen Funktion, gemessen an LVEF und Herzindex, und im gemessenen n-terminalen pro-*Brain* natriuretischen Peptid. Wie erwartbar zeigten sich auch Unterschiede in der aktuellen Medikation mit häufigerer Einnahme von HFrEF-Medikation (SGLT2-Inhibitoren, Betablockern, Angiotensin-Rezeptor-Nepilysin-Inhibitoren und Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten), Diuretika und Amiodaron in der HFrEF-Kohorte und häufigerer Einnahme von Protonenpumpen-Inhibitoren, Calcium-Kanal-Antagonisten, Angiotensin-II-Rezeptorblockern, Acetylsalicylsäure, Statinen und immunsuppressiver Therapie in der Kontroll-Kohorte.

| Parameter                         | Kontroll-Kohorte     | HFrEF -Kohorte       | p-Wert |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|--------|
| Anzahl der Probanden              | 55                   | 55                   |        |
| <b>Demografie</b>                 |                      |                      |        |
| Alter (Jahre)                     | 58,64 [52,99; 64,56] | 58,13 [51,59; 61,67] | 0,425  |
| Geschlecht (männlich)             | 38 (69,1 %)          | 38 (69,1 %)          | >0,999 |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )          | 24,90 [21,30; 28,31] | 25,86 [24,14; 29,37] | 0,117  |
| <b>Kardiale Funktion</b>          |                      |                      |        |
| LVEF (%)                          | 61,00 [58,00; 64,00] | 23,00 [20,00; 29,00] | <0,001 |
| Herzindex (l/min/m <sup>2</sup> ) | 2,98 [2,42; 3,55]    | 1,96 [1,64; 2,42]    | <0,001 |
| <b>Vorerkrankungen</b>            |                      |                      |        |
| Type 1 Diabetes                   | 0 (0 %)              | 0 (0 %)              | >0,999 |
| Type 2 Diabetes                   | 12 (21,8 %)          | 11 (20 %)            | >0,999 |

|                          |             |             |        |
|--------------------------|-------------|-------------|--------|
| Arterielle Hypertonie    | 24 (43,6 %) | 17 (30,9 %) | 0,237  |
| Vorhofflimmern           | 2 (3,6 %)   | 13 (23,6 %) | 0,004  |
| COPD                     | 5 (9,1 %)   | 4 (7,3 %)   | >0,999 |
| Dialysepflichtigkeit     | 9 (16,4 %)  | 5 (9,1 %)   | 0,392  |
| <b>Medikation</b>        |             |             |        |
| Insulin                  | 7 (12,7 %)  | 5 (9,1 %)   | 0,761  |
| Metformin                | 5 (9,1 %)   | 8 (14 %)    | 0,558  |
| SGLT2 Inhibitor          | 13 (23,6 %) | 33 (60 %)   | <0,001 |
| Sulfonylharnstoff        | 0 (0 %)     | 0 (0 %)     | >0,999 |
| GLP1-Analogon            | 1 (1,8 %)   | 4 (7,3 %)   | 0,363  |
| DPP4-Inhibitor           | 3 (5,5 %)   | 2 (3,6 %)   | >0,999 |
| Acetylsalicylsäure       | 45 (81,8 %) | 19 (34,6 %) | <0,001 |
| ACE Inhibitor            | 10 (18,2 %) | 6 (10,9 %)  | 0,418  |
| ARB                      | 12 (21,8 %) | 3 (5,5 %)   | 0,024  |
| ARNI                     | 1 (1,8 %)   | 25 (45,5 %) | <0,001 |
| Calciumkanal-Antagonist  | 23 (41,8 %) | 6 (10,9 %)  | <0,001 |
| Betablocker              | 15 (27,3 %) | 36 (65,5 %) | <0,001 |
| Amiodaron                | 2 (3,6 %)   | 14 (25,5 %) | 0,002  |
| MRA                      | 2 (3,6 %)   | 32 (58,2 %) | <0,001 |
| Diuretika                | 31 (56,4 %) | 42 (76,4 %) | 0,043  |
| PDE-5-Inhibitor          | 12 (21,8 %) | 17 (30,9 %) | 0,387  |
| Protonenpumpen-Inhibitor | 48 (87,3 %) | 33 (60 %)   | 0,002  |
| L-Thyroxin               | 24 (43,6 %) | 20 (36,4 %) | 0,560  |
| Thyreostatikum           | 2 (3,6 %)   | 1 (1,8 %)   | >0,999 |
| Statin                   | 48 (87,3 %) | 33 (60 %)   | 0,002  |
| Glukokortikoide          | 53 (96,4 %) | 15 (27,3 %) | <0,001 |
| Calcineurin-Inhibitor    | 54 (98,2 %) | 8 (14,6 %)  | <0,001 |

|                           |                         |                         |        |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| mTOR-Inhibitor            | 29 (52,7 %)             | 2 (3,6 %)               | <0,001 |
| IMPDH-Inhibitor           | 25 (45,5 %)             | 6 (10,9 %)              | <0,001 |
| <b>Laborparameter</b>     |                         |                         |        |
| NT-proBNP (ng/l)          | 645 [302; 1895]         | 2241 [664; 4417]        | 0,003  |
| Leukozyten (/µl)          | 6500 [4800; 8875]       | 8400 [6150; 10625]      | 0,009  |
| Erythrozyten (*1000/µl)   | 4,06 [3,57; 4,76]       | 4,06 [3,29; 4,62]       | 0,396  |
| Hämoglobin (g/dl)         | 11,60 [10,50; 12,40]    | 11,10 [10,15; 13,15]    | 0,714  |
| Hämatokrit (%)            | 37,25 [33,16; 40,25]    | 35,80 [31,20; 41,55]    | 0,524  |
| Thrombozyten (*1000/µl)   | 193,50 [150,50; 227,00] | 208,00 [149,00; 262,50] | 0,248  |
| Natrium (mmol/l)          | 141,00 [139,00; 142,00] | 139,00 [137,00; 141,00] | 0,055  |
| Kalium (mmol/l)           | 4,10 [3,80; 4,60]       | 4,40 [4,00; 4,74]       | 0,157  |
| CRP (mg/dl)               | 0,30 [0,10; 0,50]       | 0,40 [0,10; 1,79]       | 0,083  |
| TSH (mU/l)                | 0,98 [0,53; 1,69]       | 2,33 [1,71; 4,13]       | <0,001 |
| ft4 (pmol/l)              | 13,90 [12,70; 15,60]    | 15,40 [1,95; 17,93]     | 0,614  |
| HbA <sub>1c</sub> (%)     | 5,80 [5,30; 6,30]       | 5,70 [5,18; 6,23]       | 0,477  |
| Triglyceride (mg/dl)      | 132,00 [97,00; 175,00]  | 105,50 [69,25; 141,75]  | 0,050  |
| Gesamtcholesterin (mg/dl) | 143,00 [123,00; 194,00] | 136,00 [114,00; 179,00] | 0,548  |
| LDL-Cholesterin (mg/dl)   | 76,00 [57,00; 108,00]   | 72,00 [49,50; 116,50]   | 0,847  |
| HDL-Cholesterin (mg/dl)   | 52,00 [43,00; 59,00]    | 45,00 [36,00; 60,50]    | 0,304  |
| LDH (mg/dl)               | 213,50 [175,75; 254,50] | 244,00 [207,00; 407,00] | 0,002  |
| Kreatinkinase (mg/dl)     | 51,00 [31,00; 84,00]    | 58,00 [38,00; 119,50]   | 0,149  |
| AST (U/l)                 | 24,50 [17,00; 29,00]    | 33,00 [24,00; 62,50]    | <0,001 |
| ALT (U/l)                 | 21,90 [16,00; 34,25]    | 33,00 [21,00; 46,00]    | 0,001  |
| γ-GT (U/l)                | 38,00 [23,00; 99,75]    | 48,00 [25,75; 118,75]   | 0,327  |
| AP (U/l)                  | 80,50 [62,75; 108,50]   | 80,00 [67,75; 101,00]   | 0,820  |
| Kreatinin (mg/dl)         | 1,34 [1,04; 2,02]       | 1,20 [0,98; 1,51]       | 0,106  |
| Harnstoff (mg/dl)         | 45,00 [36,00; 63,00]    | 45,50 [32,00; 67,75]    | 0,819  |

|                   |                   |                   |       |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| Harnsäure (mg/dl) | 6,25 [4,75; 7,65] | 5,10 [4,30; 6,20] | 0,030 |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------|

**Tabelle 11: Charakteristika der humanen Kohorten der HFrEF-Studie.** Für kontinuierliche Variablen: Angabe von Median [25% Quartil; 75% Quartil], Berechnung der p-Werte mittels Mann–Whitney-U-Tests. Für binäre Variablen: Angabe von Anzahl (prozentualer Anteil an Anzahl der Probanden), Berechnung der p-Werte mittels exaktem Test nach Fisher. ALT: Alanin-Aminotransferase; AP: Alkalische Phosphatase; ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker; ARNI: Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitor; AST: Aspartat-Aminotransferase; BMI: *Body-Mass-Index*; COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung; CRP: C-reaktives Protein; fT4: freies Thyroxin;  $\gamma$ -GT: Gamma-Glutamyltransferase; HbA<sub>1c</sub>: Hämoglobin A<sub>1c</sub>; HDL: High Density Lipoprotein; HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; IMPDH: Inosinmonophosphat-Dehydrogenasen; LDH: Laktatdehydrogenase; LDL: Low Density Lipoprotein; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; MRA: Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist; mTOR: mechanistic target of Rapamycin; NT-proBNP: n-terminales pro-*Brain* natriuretisches Peptid; PCT: Procalcitonin; PDE-5: Phosphodiesterase-5; SGLT2: Natrium-Glukose-Cotransporter 2; TSH: Thyreoidea-stimulierendes Hormon.

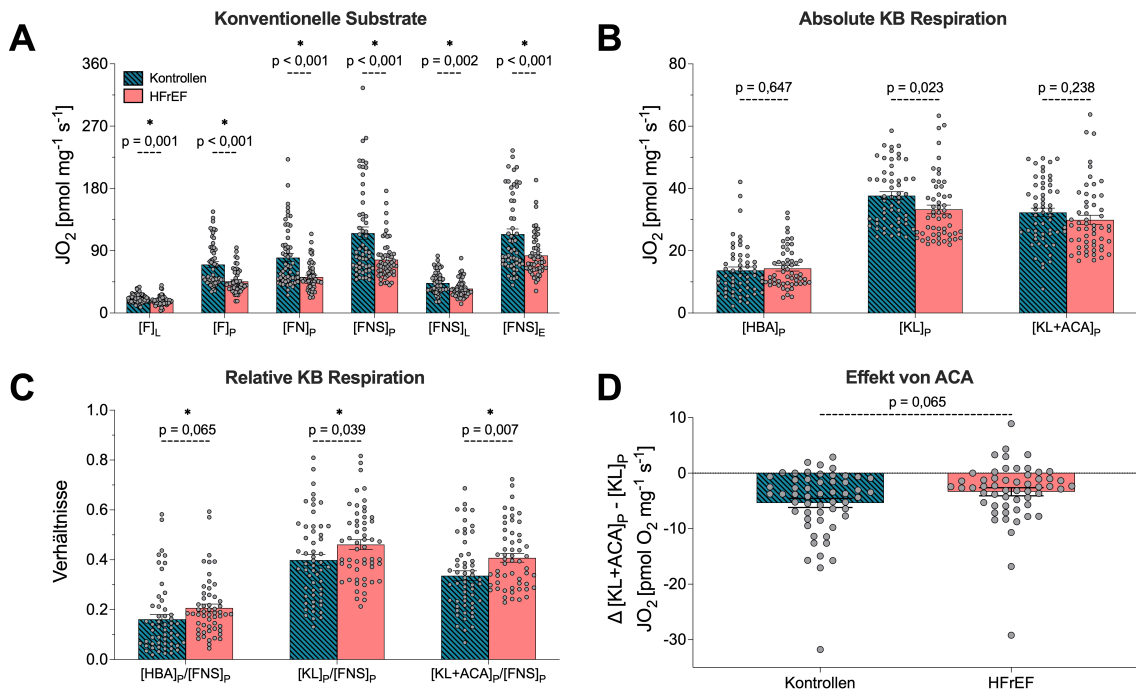
#### 4.1.1.2 Respirometrie in den humanen Kohorten

Zunächst sollen die mit dem Protokoll mit konventionellen Substraten gemessenen myokardialen oxidativen Kapazitäten verglichen werden (siehe Abb. 9 A). Hier zeigte sich eine signifikant geringere OXPHOS Kapazität für alle verwendeten Substrate (Respirationsstadien [F]<sub>p</sub>, [FN]<sub>p</sub> und [FNS]<sub>p</sub>) in der HFrEF-Kohorte. Ebenso waren die mit Fettsäure-Oxidation ([F]<sub>L</sub>) und mit allen Substraten ([FNS]<sub>L</sub>) gemessenen LEAK Respirationen und die ETS Kapazität ([FNS]<sub>E</sub>) in den insuffizienten Herzen signifikant erniedrigt.

Im Protokoll zur Quantifizierung der KB-abhängigen Respiration präsentierten sich beide Kohorten mit statistisch vergleichbaren absoluten Werten (siehe Abb. 9 B). Zwar stellte sich die Respiration unter gesamter Ketolyse ([KL]<sub>p</sub>) mit einer Tendenz zu geringeren Werten in der HFrEF-Kohorte dar, dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Demgegenüber wurde bei der Berechnung der relativen Kontribution der KB zur maximalen OXPHOS Kapazität jedoch ein signifikant höherer Anteil der KB an der Gesamtrespiration in insuffizienten Herzen ersichtlich (siehe Abb. 9 C). Dies traf auf alle gebildeten Vergleiche zu ([HBA]<sub>p</sub>/[FNS]<sub>p</sub>, [KL]<sub>p</sub>/[FNS]<sub>p</sub> und [KL+ACA]<sub>p</sub>/[FNS]<sub>p</sub>).

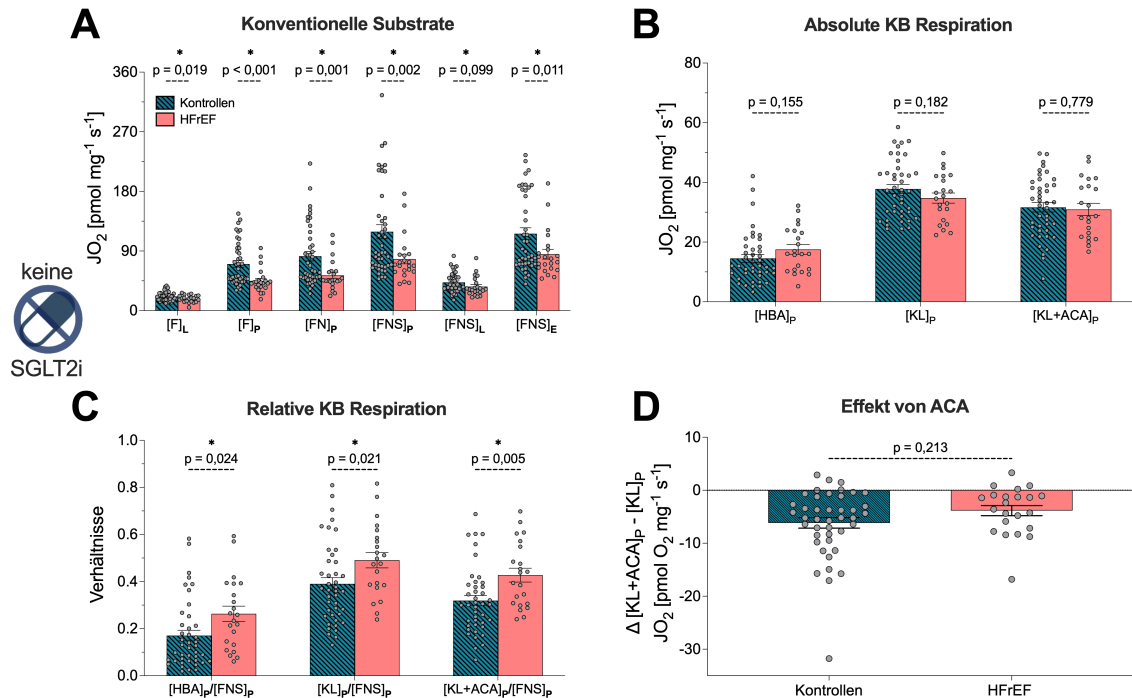
Während sich die Respiration in der Kontroll-Kohorte nach der weiteren Zugabe von ACA bei bereits vollständig ablaufender Ketolyse im Mittel um -5,38 pmol O<sub>2</sub>/mg/min verringerte, fiel die Reduktion in der HFrEF-Kohorte mit einer mittleren Differenz von -3,35 pmol O<sub>2</sub>/mg/min geringer aus (siehe Abb. 9 D). Dieser tendenzielle Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.



**Abb. 9: Respirometrie der humanen Kohorten der HFrEF-Studie.** **A** HRR-Protokoll mit konventionellen Substraten. **B** HRR-Protokoll mit Ketonkörpern. **C** Relativer Anteil der Ketonkörper an der maximal gemessenen gekoppelten oxidativen Phosphorylierung. **D** Effekt der Zugabe von ACA im Ketonkörper Protokoll. Kontrollen  $n=55$  vs. HFrEF  $n=55$ . Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM. A-C: Zweifaktorieller ANOVA oder gemischtes Modell mit wiederholten Messungen und Korrektur für die Falscherkennungsrate (FDR) nach Benjamini-Krieger-Yekutieli. D: Mann-Whitney-U-Test. Angabe aller p-Werte, bei Korrektur für die FDR zusätzliche Markierung mit Sternchen (\*) bei  $q < 0,05$ . ACA: Acetoacetat; E: entkoppelte Respiration; F: Fettsäuren; HBA:  $\beta$ -Hydroxybutyrat; HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion;  $JO_2$ : Sauerstoff-Fluss pro Masse; KB: Ketonkörper; KL: Ketolyse; L: undichte (leak) Respiration; N: NADH-vermittelte Substrate; p: phosphorylierende Respiration; S: Succinat.

Um den möglichen Einfluss von SGLT2-Inhibitoren und eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch Störvariablen zu untersuchen, wurden zudem Sensitivitätsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden Teilgruppen von Probanden ohne die Einnahme von SGLT2-Inhibitoren gebildet ( $n=42$  Kontrollen vs. 22 HFrEF) und die gemessene Respiration erneut verglichen. Es zeigten sich dabei mit der Gesamt-Analyse vergleichbare Ergebnisse (siehe Abb. 10). Lediglich in der Differenz der Respiration nach Zugabe von ACA wurden anders als in der Gesamt-Analyse keine tendenziellen Unterschiede ersichtlich (siehe Abb. 10 D). Zum Ausschluss von einer Beeinflussung der Ergebnisse durch Alter, BMI oder Einnahme von SGLT2-Inhibitoren wurden die Respirometrie-Ergebnisse für diese Parameter adjustiert (siehe Tabelle 12). Hierbei bildeten sich für die in der nicht-adjustierten Gesamtanalyse beobachteten Unterschiede weiterhin signifikante p-Werte ab. Nur die Differenz der Respiration nach Zugabe von

ACA stellte sich nach Adjustierung wie auch schon in der Analyse der Teilgruppen ohne SGLT2-Inhibitoren als nicht mehr statistisch tendenziell unterschiedlich dar.



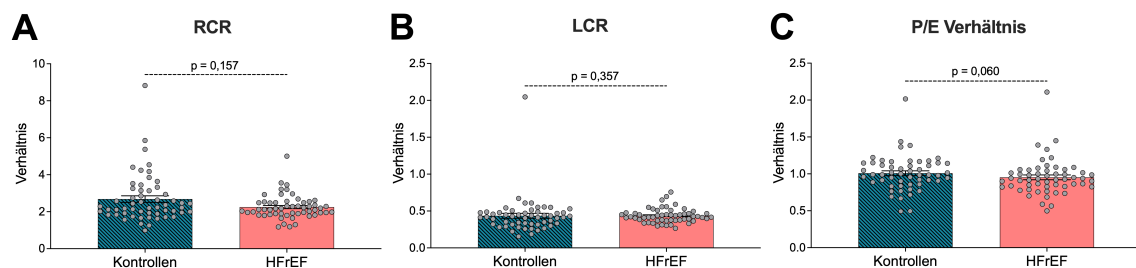
**Abb. 10: Respirimetrie in humanen Kohorten der HFrEF-Studie ohne SGLT2-Inhibitoren.** **A** HRR-Protokoll mit konventionellen Substraten. **B** HRR-Protokoll mit Ketonkörpern. **C** Relativer Anteil der Ketonkörper an der maximal gemessenen gekoppelten oxidativen Phosphorylierung. **D** Effekt der Zugabe von ACA im Ketonkörper Protokoll. Kontrollen n=42 vs. HFrEF n=22. Dargestellt ist Mittelwert ± SEM. A-C Zweifaktorieller ANOVA oder gemischtes Modell mit wiederholten Messungen und Korrektur für die Falscherkennungsrate (FDR) nach Benjamini-Krieger-Yekutieli. D: Mann-Whitney-U-Test. Angabe aller p-Werte, bei Korrektur für die FDR zusätzliche Markierung mit Sternchen (\*) bei q<0,05. ACA: Acetoacetat; E: entkoppelte Respiration; F: Fettsäuren; HBA: β-Hydroxybutyrat; HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; JO<sub>2</sub>: Sauerstoff-Fluss pro Masse; KB: Ketonkörper; KL: Ketolyse; L: undichte (leak) Respiration; N: NADH-vermittelte Substrate; P: phosphorylierende Respiration; S: Succinat. SGLT2i: Natrium-Glukose-Cotransporter 2-Inhibitoren. Symbole übernommen von biorender.com.

| Respiratorisches Stadium | p-Wert nicht adjustiert | p-Wert adjustiert für Alter + BMI + SGLT2i Therapie |
|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|
| [F] <sub>L</sub>         | 0,001                   | 0,001                                               |
| [F] <sub>P</sub>         | <0,001                  | <0,001                                              |
| [FN] <sub>P</sub>        | <0,001                  | <0,001                                              |
| [FNS] <sub>P</sub>       | <0,001                  | <0,001                                              |
| [FNS] <sub>L</sub>       | 0,002                   | 0,003                                               |
| [FNS] <sub>E</sub>       | <0,001                  | 0,002                                               |

|                                                    |       |       |
|----------------------------------------------------|-------|-------|
| [HBA] <sub>p</sub>                                 | 0,647 | 0,115 |
| [KL] <sub>p</sub>                                  | 0,023 | 0,042 |
| [KL+ACA] <sub>p</sub>                              | 0,238 | 0,209 |
| [HBA] <sub>p</sub> /[FNS] <sub>p</sub>             | 0,065 | 0,006 |
| [KL] <sub>p</sub> /[FNS] <sub>p</sub>              | 0,039 | 0,048 |
| [KL+ACA] <sub>p</sub> /[FNS] <sub>p</sub>          | 0,007 | 0,023 |
| $\Delta$ [KL+ACA] <sub>p</sub> - [KL] <sub>p</sub> | 0,065 | 0,232 |

**Tabelle 12: Für Alter, BMI und SGLT2-Inhibitor Therapie adjustierte p-Werte der Ergebnisse der humanen Kohorten der HFrEF-Studie.** Berechnung der adjustierten p-Werte mittels multipler linearer Regression mit der Methode der kleinsten Quadrate (*least squares method*). ACA: Acetoacetat; BMI: *Body-Mass-Index*; <sub>E</sub>: entkoppelte Respiration; F: Fettsäuren; HBA:  $\beta$ -Hydroxybutyrat; JO<sub>2</sub>: Sauerstoff-Fluss pro Masse; KB: Ketonkörper; KL: Ketolyse; L: undichte (leak) Respiration; N: NADH-vermittelte Substrate; p: phosphorylierende Respiration; S: Succinat; SGLT2i: Natrium-Glukose-Cotransporter 2-Inhibitoren.

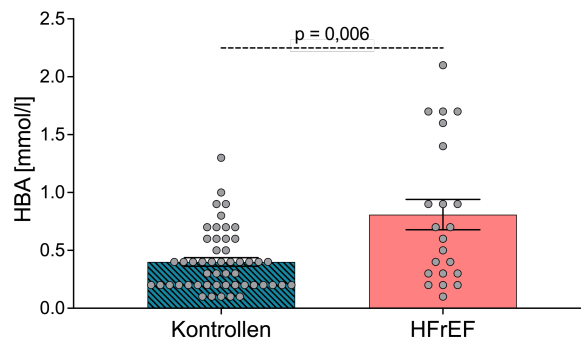
Mit Blick auf die berechneten Fluss-Kontroll-Raten waren sowohl die Kopplungseffizienz der Atmungskette (RCR, siehe Abb. 11 A) als auch der Grad der Entkopplung (LCR, siehe Abb. 11 B) zwischen beiden Kohorten vergleichbar. Das P/E Verhältnis als Parameter für den Grad der Limitation der maximal möglichen Respiration durch die ATP-Synthase zeigte die Tendenz, in der HFrEF-Kohorte geringer zu sein (siehe Abb. 11 C), entsprechend einer stärkeren Limitation.



**Abb. 11: Fluss-Kontroll-Raten (Flux control ratios, FCR) der humanen Kohorten der HFrEF-Studie.** **A** RCR: *Respiratory Control Ratio*. **B** LCR: *Leak Control Ratio*. **C** P/E Verhältnis. Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM. Mann-Whitney-U Tests. HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Pumpfunktion.

#### 4.1.1.3 Konzentrationen der zirkulierenden Ketonkörper

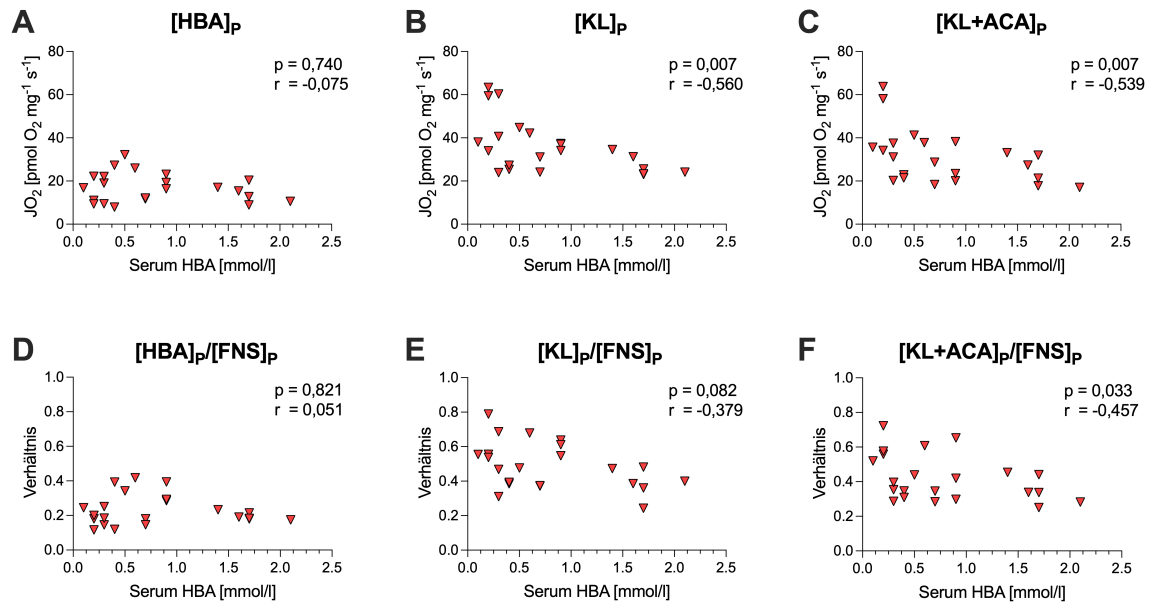
Zur Einordnung der myokardialen Respirometrie in einen systemischen Kontext und die Verfügbarkeit an Ketonkörpern als Substrate erfolgte zudem der Vergleich der Konzentrationen an zirkulierendem HBA. Insgesamt konnten hier 74 Probanden gegenübergestellt werden (n=51 Kontrollen vs. 22 HFrEF). Es zeigte sich eine signifikant höhere HBA-Konzentration in der HFrEF-Kohorte (siehe Abb. 12).



**Abb. 12: Serum  $\beta$ -Hydroxybutyrat (HBA) Konzentrationen der humanen Kohorten der HFrEF-Studie.** Kontrollen n=51 vs. HFrEF n=22. Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM. Mann-Whitney-U Test. HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion.

#### 4.1.1.4 Assoziation von zirkulierenden Ketonkörpern und Respirometrie

Innerhalb der HFrEF-Kohorte wurden die absolute und relative KB-abhängige Respiration den systemisch zirkulierenden HBA-Konzentrationen gegenübergestellt. Hierbei zeigte sich eine signifikante negative Korrelation von absoluter Respiration unter vollständig ablaufender Ketolyse und zirkulierendem Serum HBA (siehe Abb. 13 B und C). Die Gegenüberstellung von zirkulierendem HBA zur relativen Kontribution der KB zur maximalen oxidativen Kapazität wies die Tendenz einer vergleichbaren negativen Korrelation auf (siehe Abb. 13 E). Höhere zirkulierende HBA Konzentrationen gingen also mit einer geringeren Kapazität der mitochondrialen KB-abhängigen Respiration einher. Bei der isolierten Betrachtung des ersten Schrittes der Ketolyse zeigte sich die Korrelation nicht (siehe Abb. 13 A und D).



**Abb. 13: Korrelation von Ketonkörper (KB)-abhängiger Respiration und Serum  $\beta$ -Hydroxybutyrat (HBA) Konzentration in der humanen HFrEF-Kohorte.** A-C Korrelation von Serum HBA zu Stadien der absoluten KB-abhängigen Respiration. D-F Korrelation von Serum HBA zu dem relativen Anteil der KB-abhängigen Respiration an der maximalen oxidativen Kapazität (FNS). Spearman Korrelationen. ACA: Acetoacetat; HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; KL: Ketolyse; p: phosphorylierende Respiration.

## 4.1.2 Murine Gruppen

### 4.1.2.1 Charakteristika der murinen Gruppen

Die Charakteristika der murinen Gruppen der HFrEF-Studie sind in Tabelle 13 gezeigt. Beide Gruppen waren in den demographischen Kriterien Alter, Geschlecht und Körpergewicht vergleichbar.

| Parameter             | Kontroll-Gruppe      | HFrEF-Gruppe         | p-Wert |
|-----------------------|----------------------|----------------------|--------|
| Anzahl der Individuen | 8                    | 8                    |        |
| <b>Demographie</b>    |                      |                      |        |
| Alter (Wochen)        | 28,00 [28,00; 28,00] | 28,00 [27,25; 28,00] | >0,999 |
| Geschlecht (männlich) | 8 (100 %)            | 8 (100 %)            | n/a    |
| Körpergewicht (g)     | 29,50 [27,73; 35,73] | 30,10 [30,00; 31,00] | 0,631  |

**Tabelle 13: Charakteristika der murinen Gruppen der HFrEF-Studie.** Für kontinuierliche Variablen: Angabe von Median [25% Quartil; 75% Quartil], Berechnung der p-Werte mittels Mann-Whitney-U-Tests. Für binäre Variablen: Angabe von Anzahl (prozentualer Anteil an der Gesamtanzahl der Individuen), Berechnung der p-Werte mittels exaktem Test nach Fisher. HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion.

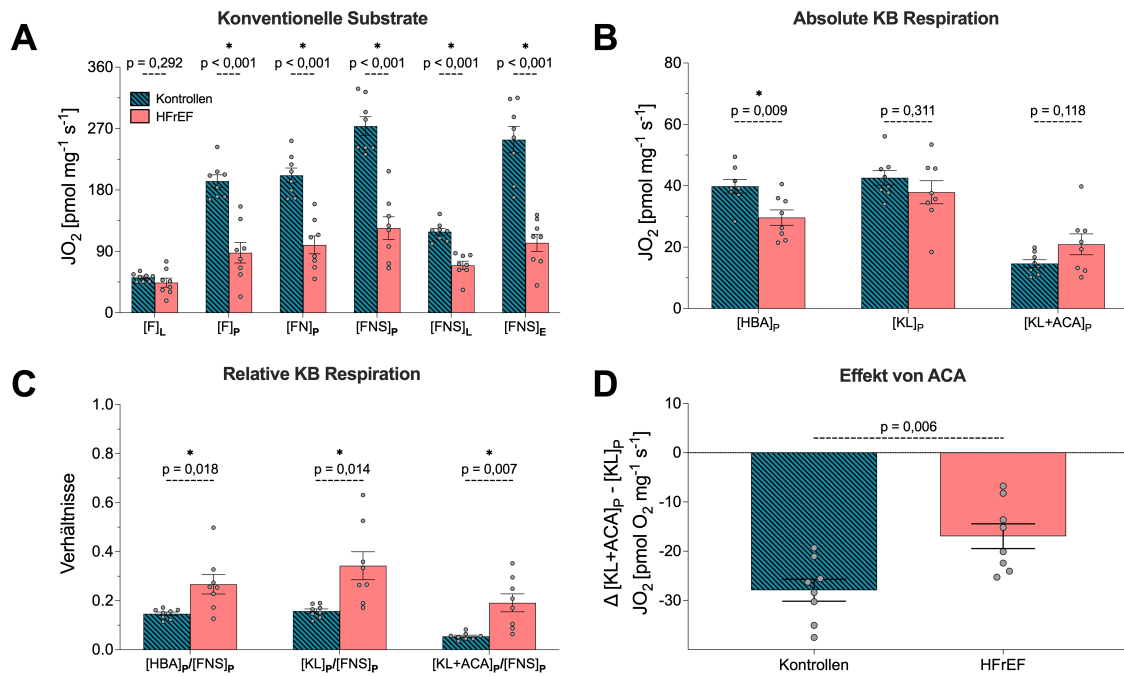
#### 4.1.2.2 Respirometrie in den murinen Gruppen

Bei den murinen Gruppen zeigten sich in der HFrEF-Gruppe in nahezu allen erfassten respiratorischen Stadien signifikant verminderte Werte (siehe Abb. 14 A). In allen gemessenen phosphorylierenden Stadien ( $[F]_P$ ,  $[FN]_P$  und  $[FNS]_P$ ) war die OXPHOS Kapazität um mindestens 50 % im Vergleich zu den Kontrollen verringert. Auch die nach Zugabe aller Substrate gemessene LEAK Respiration ( $[FNS]_L$ ) und die Kapazität des ETS ( $[FNS]_E$ ) stellten sich in der HFrEF-Gruppe als stark reduziert dar. Einzig die ausschließlich unter Fettsäure-Oxidation gemessene LEAK Respiration ( $[F]_L$ ) war zwischen beiden Gruppen ähnlich.

Die absolute Respiration war für die Stadien der vollständigen Ketolyse ( $[KL]_P$  und  $[KL+ACA]_P$ ) zwischen Kontroll- und HFrEF-Gruppe nicht unterschiedlich (siehe Abb. 14 B). Die ausschließlich von dem durch BDH1 vermittelten ersten Schritt der Ketolyse abhängige Respiration ( $[HBA]_P$ ) zeigte sich jedoch in den insuffizienten Herzen signifikant vermindert.

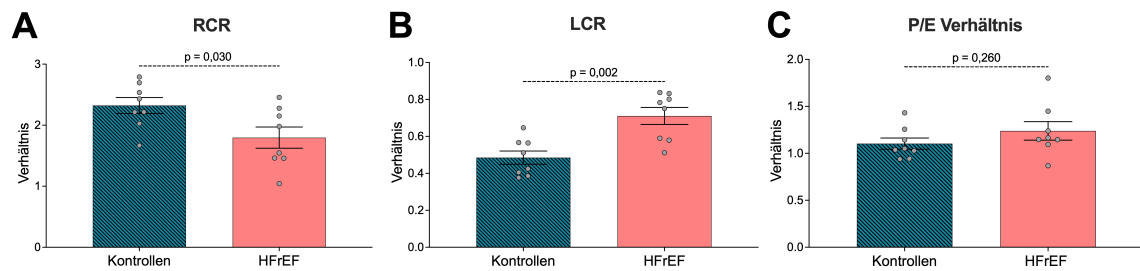
Alle berechneten Vergleiche zur Bestimmung der relativen Kontribution der KB zur maximalen OXPHOS Kapazität ( $[HBA]_P/[FNS]_P$ ,  $[KL]_P/[FNS]_P$  und  $[KL+ACA]_P/[FNS]_P$ ) ergaben eine signifikant erhöhte relative KB-abhängige Respiration in der HFrEF (siehe Abb. 14 C).

Eine Zugabe von ACA nach bereits vollständig laufender Ketolyse bewirkte in beiden Gruppen eine Reduktion des Sauerstoff-Flusses, in der HFrEF-Gruppe fiel diese Differenz jedoch im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant geringer aus (siehe Abb. 14 D).



**Abb. 14: Respirometrie der murinen Gruppen der HFrEF-Studie.** **A** HRR-Protokoll mit konventionellen Substraten. **B** HRR-Protokoll mit Ketonkörpern. **C** Relativer Anteil der Ketonkörper an der maximal gemessenen gekoppelten oxidativen Phosphorylierung. **D** Effekt der Zugabe von ACA im Ketonkörper Protokoll. Kontrollen n=8 vs. HFrEF n=8. Dargestellt ist Mittelwert ± SEM. A-C: Zweifaktorieller ANOVA oder gemischtes Modell mit wiederholten Messungen und Korrektur für die Falscherkennungsrate (FDR) nach Benjamini-Krieger-Yekutieli. D: zweiseitiger, unabhängiger t-Test. Angabe aller p-Werte, bei Korrektur für die FDR zusätzliche Markierung mit Sternchen (\*) bei q<0,05. ACA: Acetoacetat; E: entkoppelte Respiration; F: Fettsäuren; HBA: β-Hydroxybutyrat; HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; JO<sub>2</sub>: Sauerstoff-Fluss pro Masse; KB: Ketonkörper; KL: Ketolyse; L: undichte (*leak*) Respiration; N: NADH-vermittelte Substrate; p: phosphorylierende Respiration; S: Succinat.

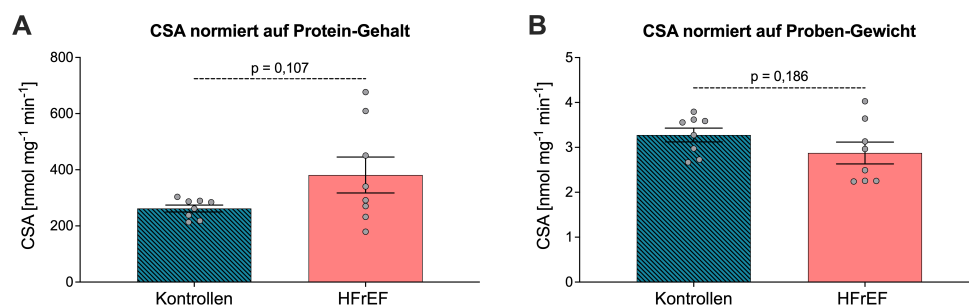
Die Berechnung der Fluss-Kontroll-Raten zeigte sowohl bei der RCR als auch bei der LCR signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Kopplungseffizienz (RCR) war in der HFrEF-Gruppe erniedrigt (siehe Abb. 15 A), der Grad der Entkopplung, bzw. die „Undichtigkeit“ der Mitochondrienmembran, (LCR) erhöht (siehe Abb. 15 B). Kein Unterschied zwischen Kontrollen und HFrEF-Gruppe fand sich hingegen beim Grad der Limitation durch die ATP-Synthase (P/E Verhältnis) (siehe Abb. 15 C).



**Abb. 15: Fluss-Kontroll-Raten (Flux control ratios, FCR) der murinen Gruppen der HFrEF-Studie.** **A** RCR: *Respiratory Control Ratio*. **B** LCR: *Leak Control Ratio*. **C** P/E Verhältnis. Kontrollen n=8 vs. HFrEF n=8. Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM. Zweiseitige, unabhängige t-Tests. HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion.

#### 4.1.2.3 Citrat-Synthase-Aktivität in den murinen Gruppen

Beim Vergleich der CSA zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen und somit keine unterschiedliche Dichte an Mitochondrien pro Probe (siehe Abb. 16). Zwar wiesen die gemessenen CSA-Werte normiert auf den Protein-Gehalt numerische Unterschiede zwischen den Gruppen auf, eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch nicht (siehe Abb. 16 A). Bei Normierung auf das Probengewicht bestand ein geringerer numerischer Unterschied zwischen HFrEF und Kontrollen (siehe Abb. 16 B).



**Abb. 16: Citrat-Synthase-Aktivität (CSA) der murinen Gruppen der HFrEF-Studie.** **A** CSA normiert auf den Protein-Gehalt gemessen in mg Protein. **B** CSA normiert auf das Gewicht der Proben gemessen in mg. Kontrollen n=8 vs. HFrEF n=8. Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM. Welch's t-Test. HFrEF: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion.

#### 4.1.3 Gegenüberstellung der humanen und murinen Ergebnisse

Sowohl in den humanen als auch murinen Gruppen zeigte sich signifikant niedrigere myokardiale OXPHOS Kapazitäten für alle konventionellen Substrate, LEAK Respiration und ETS Kapazitäten in den HFEF-Gruppen. Relativ war die Verminderung der OXPHOS Kapazität bei HFEF in den murinen Gruppen stärker ausgeprägt (mind. 50 % bei den Mäusen vs. ca. 35 % bei den Menschen). Im Mittel wiesen die Gruppen der Mäuse höhere gemessene Sauerstoff-Flüsse als die menschlichen Kohorten auf.

Für die absolute Respiration unter vollständiger Ketolyse waren in beiden Spezies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu finden. Anders als in den humanen Probanden, zeigten die murinen HFrEF-Individuen jedoch eine signifikant verminderte Respiration für den durch BDH1 katalysierten und über NADH in die Atmungskette eingeschleusten ersten Schritt der Ketolyse.

Die relative Kontribution der KB zur maximalen OXPHOS Kapazität war in der humanen und murinen HFrEF-Gruppe für alle gebildeten Raten signifikant erhöht.

Die Respiration nach Zugabe von ACA war in den murinen Gruppen generell stärker vermindert und es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und HFrEF. Zwischen den humanen Kohorten wurde zwar ebenfalls eine geringere Verminderung der Respiration in den insuffizienten Herzen ersichtlich, dieser erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Bei den errechneten Fluss-Kontroll-Raten war ein eher heterogeneres Bild zu sehen. Während sich in den humanen Kohorten keine Unterschiede in Bezug auf Kopplungseffizienz (RCR) und Grad der Entkopplung/„Undichtigkeit“ der inneren mitochondrialen Membran (LCR) fanden, so war die Kopplungseffizienz in der murinen HI-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert und der Grad der Entkopplung erhöht. Bei der Limitation der Respiration durch die ATP-Synthase (P/E Verhältnis) waren sowohl in den humanen als auch in den murinen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und HFrEF-Gruppen zu sehen.

Die CSA als Marker der mitochondrialen Dichte konnte, wie bereits in den Methoden beschrieben (siehe 3.2.5), aufgrund von Probenlimitation nur in den murinen Gruppen gemessen werden und kann daher nicht verglichen werden.

## 4.2 Ergebnisse der Diabetes mellitus-Studie

### 4.2.1 Charakteristika der humanen Kohorten

Die Charakteristika der humanen Kohorten der T2D-Studie sind in Tabelle 14 aufgeführt. Beide Kohorten weisen eine ähnliche Geschlechtsverteilung und noch vergleichbares Alter auf. Die T2D-Kohorte präsentiert sich mit höherem BMI, HbA<sub>1c</sub> und Einnahme von spezifischer antihyperglykämischer Medikation. Darüber hinaus sind insbesondere Unterschiede in den gemessenen Konzentrationen an Triglyceriden, HDL-Cholesterin und freien Fettsäuren auffällig. Die LVEF unterschied sich zwischen beiden Kohorten nicht, der Herzindex hingegen schon, beide Parameter konnten jedoch nicht bei allen Probanden der Kohorten erhoben werden.

| Parameter                         | Kontroll-Kohorte     | T2D-Kohorte          | p-Wert |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|--------|
| Anzahl der Probanden              | 35                   | 22                   |        |
| <b>Demografie</b>                 |                      |                      |        |
| Alter (Jahre)                     | 56,00 [50,00; 61,00] | 62,00 [55,50; 64,25] | 0,064  |
| Geschlecht (männlich)             | 27 (77,2 %)          | 17 (77,3 %)          | >0,999 |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )          | 24,21 [21,30; 26,30] | 26,58 [23,33; 30,72] | 0,018  |
| <b>Kardiale Funktion</b>          |                      |                      |        |
| LVEF (%)                          | 59,00 [53,00; 63,00] | 61,50 [54,75; 67,50] | 0,201  |
| Herzindex (l/min/m <sup>2</sup> ) | 3,19 [2,74; 3,62]    | 2,36 [2,05; 2,62]    | <0,013 |
| <b>Vorerkrankungen</b>            |                      |                      |        |
| Arterielle Hypertonie             | 8 (22,9 %)           | 8 (36,4 %)           | 0,366  |
| Pulmonale Hypertonie              | 2 (5,7 %)            | 2 (9,1 %)            | 0,636  |
| Koronare Herzkrankheit            | 4 (11,4 %)           | 2 (9,1 %)            | >0,999 |
| Vorhofflimmern                    | 1 (2,9 %)            | 0 (0 %)              | >0,999 |
| COPD                              | 3 (8,6 %)            | 2 (9,1 %)            | >0,999 |
| Schlafapnoesyndrom                | 1 (2,9 %)            | 2 (9,1 %)            | 0,553  |
| Dialysepflichtigkeit              | 4 (11,4 %)           | 1 (4,6 %)            | 0,639  |

| <b>Medikation</b>        |             |             |        |
|--------------------------|-------------|-------------|--------|
| Insulin                  | 0 (0 %)     | 5 (22,7 %)  | 0,006  |
| Metformin                | 0 (0 %)     | 5 (22,7 %)  | 0,006  |
| SGLT2 Inhibitor          | 5 (14,3 %)  | 14 (63,6 %) | <0,001 |
| Sulfonylharnstoff        | 0 (0 %)     | 1 (4,6 %)   | 0,386  |
| GLP1-Analogon            | 0 (0 %)     | 1 (4,6 %)   | 0,386  |
| DPP4-Inhibitor           | 0 (0 %)     | 5 (22,7 %)  | 0,006  |
| Acetylsalicylsäure       | 28 (80 %)   | 16 (72,7 %) | 0,536  |
| ACE Inhibitor            | 6 (17,1 %)  | 5 (22,7 %)  | 0,733  |
| ARB                      | 7 (20 %)    | 4 (18,2 %)  | >0,999 |
| ARNI                     | 0 (0 %)     | 1 (4,6 %)   | 0,386  |
| Calciumkanal-Antagonist  | 13 (37,1 %) | 11 (50 %)   | 0,413  |
| Betablocker              | 9 (25,7 %)  | 10 (45,5 %) | 0,155  |
| Amiodaron                | 2 (5,7 %)   | 1 (4,6 %)   | 0,518  |
| MRA                      | 2 (5,7 %)   | 9 (50 %)    | >0,999 |
| Diuretika                | 19 (54,3 %) | 14 (63,6 %) | 0,586  |
| PDE-5-Inhibitor          | 6 (17,1 %)  | 5 (22,7 %)  | 0,733  |
| Protonenpumpen-Inhibitor | 29 (82,9 %) | 22 (100 %)  | 0,072  |
| L-Thyroxin               | 16 (45,7 %) | 9 (40,9 %)  | 0,789  |
| Thyreostatikum           | 0 (0 %)     | 1 (4,6 %)   | 0,386  |
| Statin                   | 26 (74,3 %) | 22 (100 %)  | 0,009  |
| Allopurinol              | 11 (31,4 %) | 4 (18,2 %)  | 0,360  |
| Glukokortikoide          | 33 (94,3 %) | 22 (100 %)  | 0,518  |
| Calcineurin-Inhibitor    | 35 (97,2 %) | 22 (100 %)  | >0,999 |
| mTOR-Inhibitor           | 17 (48,6 %) | 14 (63,6 %) | 0,290  |
| IMPDH-Inhibitor          | 18 (51,4 %) | 8 (36,4 %)  | 0,290  |
| <b>Laborparameter</b>    |             |             |        |

|                           |                         |                         |        |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Leukozyten (/μl)          | 6100 [5175; 8100]       | 6550 [5000; 8500]       | 0,603  |
| Erythrozyten (*1000/μl)   | 4,02 [3,55; 4,55]       | 4,62 [4,12; 5,16]       | 0,008  |
| Hämoglobin (g/dl)         | 11,35 [10,18; 12,55]    | 12,85 [11,48; 14,35]    | 0,014  |
| Hämatokrit (%)            | 36,75 [33,20; 40,80]    | 39,60 [36,50; 42,15]    | 0,059  |
| Thrombozyten (*1000/μl)   | 203,00 [158,00; 230,00] | 172,00 [151,50; 231,00] | 0,535  |
| Natrium (mmol/l)          | 140,00 [138,00; 142,00] | 142,50 [139,00; 141,00] | 0,821  |
| Kalium (mmol/l)           | 4,20 [3,90; 4,70]       | 3,90 [3,60; 4,20]       | 0,048  |
| NT-proBNP (ng/l)          | 583,0 [244,0; 2436,0]   | 540,5 [306,3; 681,0]    | 0,761  |
| CRP (mg/dl)               | 0,30 [0,10; 0,70]       | 0,30 [0,10; 0,4]        | 0,850  |
| PCT (ng/ml)               | 0,05 [0,03; 0,10]       | 0,04 [0,03; 0,07]       | 0,710  |
| TSH (mU/l)                | 0,77 [0,37; 1,30]       | 0,71 [0,41; 1,23]       | 0,711  |
| HbA <sub>1c</sub> (%)     | 5,70 [5,20; 5,90]       | 6,85 [6,48; 7,53]       | <0,001 |
| Triglyceride (mg/dl)      | 104,00 [57,00; 163,00]  | 144,00 [104,75; 221,75] | 0,029  |
| Gesamtcholesterin (mg/dl) | 140,00 [120,00; 190,00] | 141,50 [119,50; 191,25] | 0,900  |
| LDL-Cholesterin (mg/dl)   | 73,00 [55,00; 94,00]    | 73,00 [58,75; 105,00]   | 0,663  |
| HDL-Cholesterin (mg/dl)   | 54,00 [44,00; 63,00]    | 45,00 [38,00; 55,25]    | 0,012  |
| Freie Fettsäuren (μmol/l) | 590,0 [430,0; 1400,0]   | 1350,0 [862,5; 2325,0]  | 0,007  |
| LDH (mg/dl)               | 211,00 [179,00; 268,00] | 216,50 [171,50; 255,00] | 0,611  |
| Kreatinkinase (mg/dl)     | 49,00 [28,00; 82,00]    | 52,00 [40,50; 77,00]    | 0,693  |
| AST (U/l)                 | 22,00 [17,00; 29,00]    | 25,00 [21,00; 30,25]    | 0,123  |
| ALT (U/l)                 | 21,00 [15,00; 29,00]    | 26,00 [17,00; 34,75]    | 0,231  |
| γ-GT (U/l)                | 33,00 [20,00; 94,00]    | 39,50 [21,00; 137,50]   | 0,742  |
| AP (U/l)                  | 77,00 [58,00; 110,00]   | 87,00 [65,00; 96,25]    | 0,583  |
| Kreatinin (mg/dl)         | 1,36 [0,95; 3,04]       | 1,77 [1,19; 5,65]       | 0,058  |
| Harnsäure (mg/dl)         | 5,10 [3,50; 6,80]       | 6,00 [4,93; 7,03]       | 0,131  |
| Harnstoff (mg/dl)         | 42,00 [35,00; 59,00]    | 44,00 [32,25; 62,00]    | 0,792  |

**Tabelle 14: Charakteristika der humanen Kohorten der T2D-Studie.** Teils übernommen nach Zweck et al. [81]. Für kontinuierliche Variablen: Angabe von Median [25% Quartil; 75% Quartil], Berechnung der p-Werte mittels Mann-Whitney-U-Tests. Für binäre Variablen: Angabe von Anzahl (prozentualer Anteil an

Anzahl der Probanden), Berechnung der p-Werte mittels exaktem Test nach Fisher. ALT: Alanin-Aminotransferase; AP: Alkalische Phosphatase; ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker; ARNI: Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitor; AST: Aspartat-Aminotransferase; BMI: *Body-Mass-Index*; COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung; CRP: C-reaktives Protein;  $\gamma$ -GT: Gamma-Glutamyltransferase; HbA<sub>1c</sub>: Hämoglobin A<sub>1c</sub>; HDL: High Density Lipoprotein; IMPDH: Inosinmonophosphat-Dehydrogenasen; LDH: Laktatdehydrogenase; LDL: Low Density Lipoprotein; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; MRA: Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist; mTOR: mechanistic target of Rapamycin; NT-proBNP: n-terminales pro-*Brain* natriuretisches Peptid; PCT: Procalcitonin; PDE-5: Phosphodiesterase-5; SGLT2: Natrium-Glukose-Cotransporter 2; TSH: Thyreoidea-stimulierendes Hormon; Z.n.: Zustand nach.

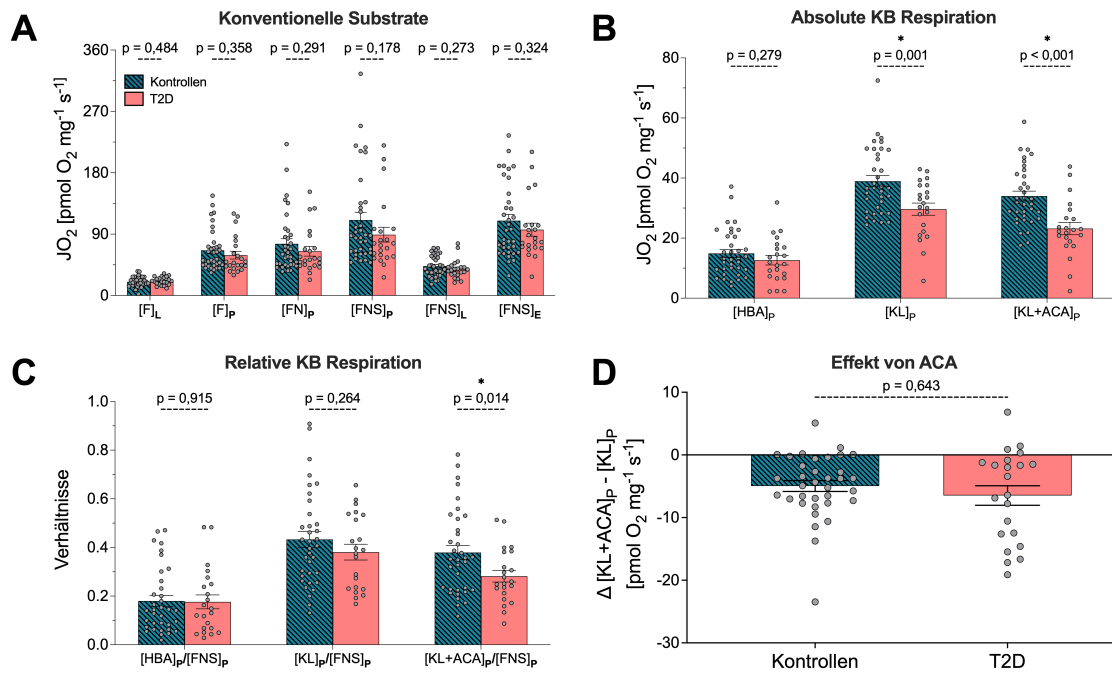
#### 4.2.2 Respirometrie in den humanen Kohorten

In der Respirometrie mit konventionellen Substraten zeigte sich eine Tendenz zur niedrigeren myokardialen OXPHOS Kapazität in der T2D-Kohorte im Vergleich zur Kontroll-Kohorte ( $[FNS]_P$ ), jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (siehe Abb. 17 A). Die gemessenen LEAK Respirationen ( $[F]_L$  und  $[FNS]_L$ ) und die ETS Kapazität ( $[FNS]_E$ ) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kohorten.

Die von der vollständig ablaufenden Ketolyse abhängige Respiration ( $[KL]_P$  und  $[KL+ACA]_P$ ) präsentierte sich in der T2D-Kohorte als signifikant verringert (siehe Abb. 17 B). Die ausschließlich über den ersten Schritt der Ketolyse induzierte Respiration ( $[HBA]_P$ ) war hingegen nicht signifikant zwischen beiden Kohorten unterschiedlich.

Die Berechnung der relativen Kontribution der partiellen und gesamten Ketolyse zur maximal gemessenen OXPHOS Kapazität ( $[HBA]_P/[FNS]_P$  und  $[KL]_P/[FNS]_P$ ) ergab keine Unterschiede zwischen T2D und Kontrollen (siehe Abb. 17 C). Demgegenüber zeigte sich der relative Anteil der Respiration nach zusätzlicher Gabe von ACA in der T2D-Kohorte signifikant im Vergleich zur Kontroll-Kohorte vermindert.

Nach Zugabe von ACA nach bereits vollständig ablaufender Ketolyse wurde in beiden Kohorten eine Reduktion der Respiration beobachtet, deren Ausmaß sich zwischen beiden Kohorten nicht unterschied.



**Abb. 17: Respirometrie der humanen Kohorten der T2D-Studie.** Teils übernommen nach Zweck et al. [81]. **A** HRR-Protokoll mit konventionellen Substraten. **B** HRR-Protokoll mit Ketonkörpern. **C** Relativer Anteil der Ketonkörper an der maximal gemessenen gekoppelten oxidativen Phosphorylierung. **D** Effekt der Zugabe von ACA im Ketonkörper Protokoll. Kontrollen n=35 vs. T2D n=22. Dargestellt ist Mittelwert ± SEM. A-C: Zweifaktorieller ANOVA oder gemischtes Modell mit wiederholten Messungen und Korrektur für die Falscherkennungsrate (FDR) nach Benjamini-Krieger-Yekutieli. D: Mann-Whitney-U-Test. Angabe aller p-Werte, bei Korrektur für die FDR zusätzliche Markierung mit Sternchen (\*) bei q<0,05. ACA: Acetoacetat; E: entkoppelte Respiration; F: Fettsäuren; HBA: β-Hydroxybutyrat; JO<sub>2</sub>: Sauerstoff-Fluss pro Masse; KB: Ketonkörper; KL: Ketolyse; L: undichte (leak) Respiration; N: NADH-vermittelte Substrate; P: phosphorylierende Respiration; S: Succinat; T2D: Diabetes mellitus Typ 2.

Aufgrund des Unterschieds der beiden Kohorten im BMI und der Tendenz eines höheren Alters in der T2D-Kohorte (siehe 4.2.1) wurden die statistischen Ergebnisse für Alter und BMI adjustiert. Hierbei zeigten sich größtenteils vergleichbare statistische Ergebnisse, lediglich die relative Kontribution der Ketolyse nach zusätzlicher Gabe von ACA zur maximalen OXPHOS Kapazität ([KL+ACA]<sub>P</sub>/[FNS]<sub>P</sub>) wies nach Adjustierung keine statistische Signifikanz, sondern nur noch eine Tendenz zur geringeren Kontribution bei T2D auf (siehe Tabelle 15).

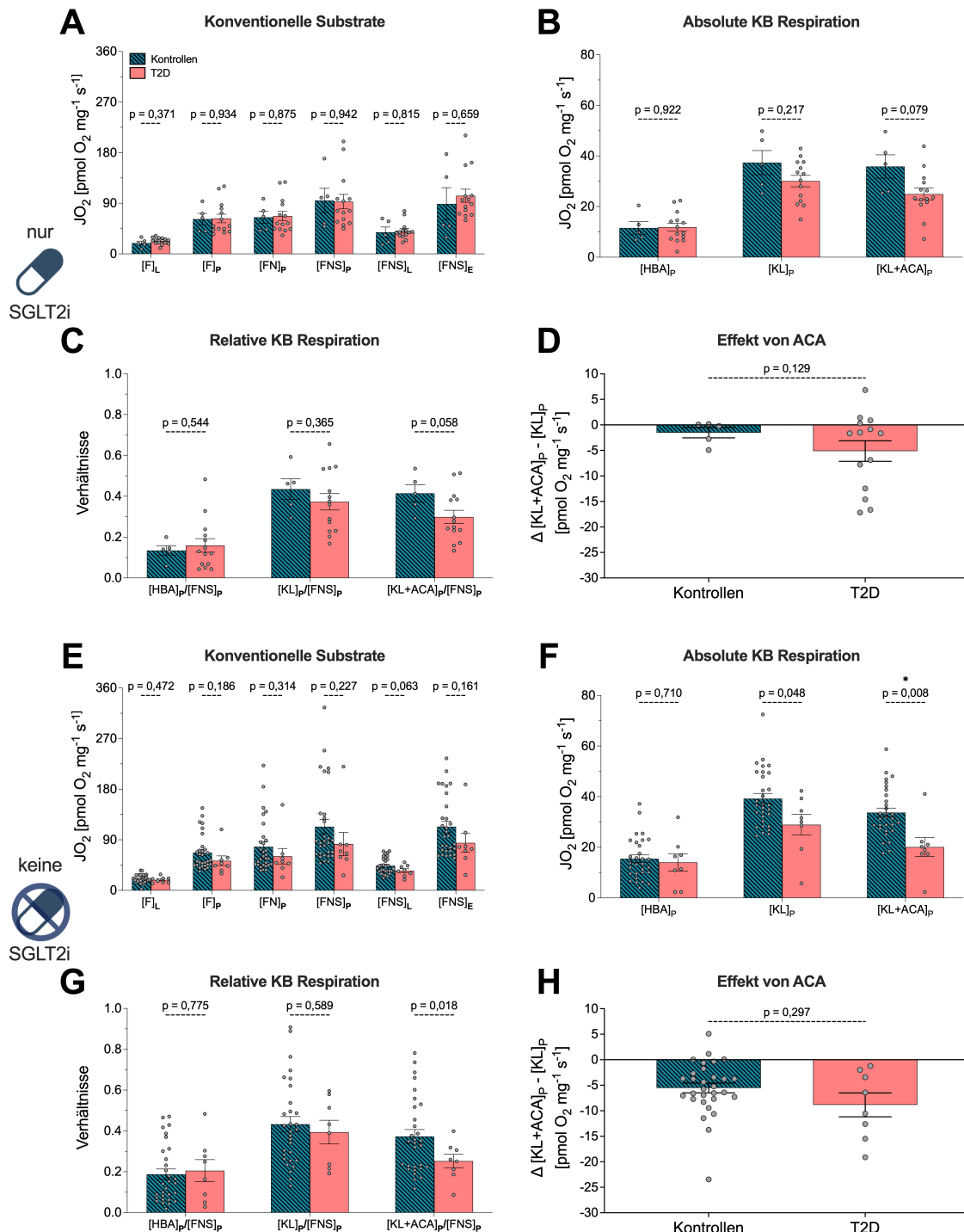
| Respiratorisches Stadium | p-Wert<br>nicht adjustiert | p-Wert<br>adjustiert für Alter + BMI |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| [F] <sub>L</sub>         | 0,484                      | 0,354                                |
| [F] <sub>P</sub>         | 0,358                      | 0,325                                |
| [FN] <sub>P</sub>        | 0,291                      | 0,344                                |
| [FNS] <sub>P</sub>       | 0,178                      | 0,213                                |

|                                            |         |         |
|--------------------------------------------|---------|---------|
| [FNS] <sub>L</sub>                         | 0,273   | 0,187   |
| [FNS] <sub>E</sub>                         | 0,234   | 0,427   |
| [HBA] <sub>P</sub>                         | 0,279   | 0,533   |
| [KL] <sub>P</sub>                          | 0,001   | 0,004   |
| [KL+ACA] <sub>P</sub>                      | < 0,001 | < 0,001 |
| [HBA] <sub>P</sub> /[FNS] <sub>P</sub>     | 0,915   | 0,668   |
| [KL] <sub>P</sub> /[FNS] <sub>P</sub>      | 0,264   | 0,416   |
| [KL+ACA] <sub>P</sub> /[FNS] <sub>P</sub>  | 0,014   | 0,066   |
| Δ [KL+ACA] <sub>P</sub> -[KL] <sub>P</sub> | 0,643   | 0,526   |

**Tabelle 15: Für Alter und BMI adjustierte p-Werte der Ergebnisse der humanen Kohorten der T2D-Studie.** Teils übernommen nach Zweck et al. [81]. Berechnung der adjustierten p-Werte mittels multipler linearer Regression mit der Methode der kleinsten Quadrate (*least squares method*). ACA: Acetoacetat; BMI: *Body-Mass-Index*; E: entkoppelte Respiration; F: Fettsäuren; HBA: β-Hydroxybutyrat; JO<sub>2</sub>: Sauerstoff-Fluss pro Masse; KB: Ketonkörper; KL: Ketolyse; L: undichte (leak) Respiration; N: NADH-vermittelte Substrate; P: phosphorylierende Respiration; S: Succinat.

Auch in der T2D-Studie sollte ein möglicher Einfluss der SGLT2-Inhibitoren auf die Respirometrie-Ergebnisse untersucht werden. Da hier trotz einer vermehrten Einnahme von SGLT2-Inhibitoren eine verminderte KB-abhängige Respiration in der T2D-Kohorte gemessen wurde, wurden Teilgruppen von sowohl Probanden mit (n=5 Kontrollen vs. 14 T2D) und als auch ohne (n=30 vs. 8) SGLT2-Inhibitoren gebildet. Hierbei zeigten sich in den Teilkohorten, die SGLT2-Inhibitoren einnahmen, anders als in der Gesamt-Analyse keine Unterschiede für die unter Verwendung von konventionellen Substraten gemessene OXPHOS Kapazität (siehe Abb. 18 A) und nur die Tendenz einer geringeren durch Ketolyse getriebenen Respiration in der T2D-Teilkohorte, insbesondere nach zusätzlicher Gabe von ACA (siehe Abb. 18 B). Die Teilkohorten ohne eingenommene SGLT2-Inhibitoren wiesen angedeutete Tendenzen der geringeren OXPHOS Kapazität, LEAK Respiration und ETS Kapazität in der T2D-Teilkohorte auf (siehe Abb. 18 E). Ebenso war die absolut gemessene KB-vermittelte Respiration tendenziell und nach Zugabe von ACA signifikant in der T2D-Teilkohorte im Vergleich zur Kontroll-Teilkohorte vermindert (siehe Abb. 18 F). Sowohl in der Analyse der Teilkohorten mit als auch ohne SGLT2-Inhibitoren ergab sich mit Blick auf die relative Kontribution der Ketolyse zur maximalen OXPHOS Kapazität nur für die Ketolyse nach zusätzlicher ACA-Gabe die Tendenz der geringeren Kontribution bei T2D (siehe Abb. 18 C und G). Die Zugabe von ACA führte,

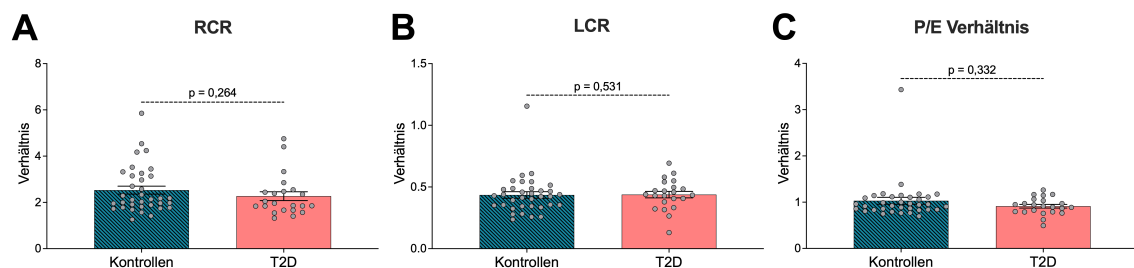
wie auch in der Gesamt-Analyse, in allen Teilkohorten zu einer Reduktion der Respiration ohne signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und T2D (siehe Abb. 18 D und H).



**Abb. 18: Respirometrie in humanen Gruppen der T2D-Studie mit und ohne SGLT2-Inhibitoren.** Teils übernommen nach Zweck et al. [81]. **A/E** HRR-Protokoll mit konventionellen Substraten. **B/F** HRR-Protokoll mit Ketonkörpern. **C/G** Relativer Anteil der Ketonkörper an der maximal gemessenen gekoppelten oxidativen Phosphorylierung. **D/H** Effekt der Zugabe von ACA im Ketonkörper Protokoll. A-D mit SGLT2-Inhibitoren, Kontrollen n=5 vs. T2D n=14. E-H ohne SGLT2-Inhibitoren, Kontrollen n=30 vs. T2D n=8. Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM. A-C/E-G: Zweifaktorieller ANOVA oder gemischtes Modell mit wiederholten Messungen und Korrektur für die Falscherkennungsrate (FDR) nach Benjamini-Krieger-Yekutieli. D: Welch's t-Test. H: Mann-Whitney-U-Test. Angabe aller p-Werte, bei Korrektur für die FDR

zusätzliche Markierung mit Sternchen (\*) bei  $q < 0,05$ . ACA: Acetoacetat; E: entkoppelte Respiration; F: Fettsäuren; HBA:  $\beta$ -Hydroxybutyrat;  $\text{JO}_2$ : Sauerstoff-Fluss pro Masse; KB: Ketonkörper; KL: Ketolyse; L: undichte (leak) Respiration; N: NADH-vermittelte Substrate; P: phosphorylierende Respiration; S: Succinat. SGLT2i: Natrium-Glukose-Cotransporter 2-Inhibitoren; T2D: Diabetes mellitus Typ 2. Symbole übernommen von biorender.com.

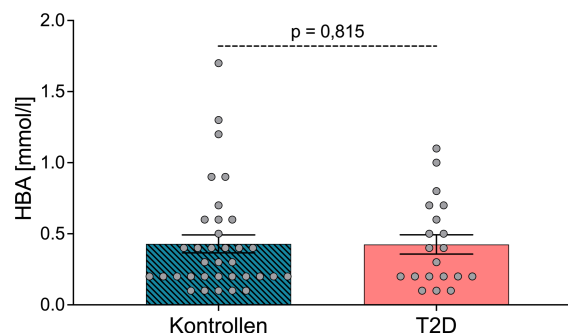
Die Berechnung der Fluss-Kontroll-Raten ergab keine Unterschiede hinsichtlich der Kopplungseffizienz (RCR, siehe Abb. 19 A), dem Grad der Entkopplung (LCR, siehe Abb. 19 B) oder der Limitation durch die ATP-Synthase (P/E Verhältnis, siehe Abb. 19 C) zwischen Kontroll- und T2D-Kohorte.



**Abb. 19: Fluss-Kontroll-Raten (Flux control ratios, FCR) der humanen Gruppen der T2D-Studie.** **A** RCR: Respiratory Control Ratio. **B** LCR: Leak Control Ratio. **C** P/E Verhältnis: Kapazität der oxidativen Phosphorylierung im Verhältnis zur Kapazität des Elektronen-transferierenden Systems. Kontrollen  $n=35$  vs. T2D  $n=22$ . Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM. Mann-Whitney-U Tests. T2D: Diabetes mellitus Typ 2.

### 4.2.3 Konzentrationen der zirkulierenden Ketonkörper

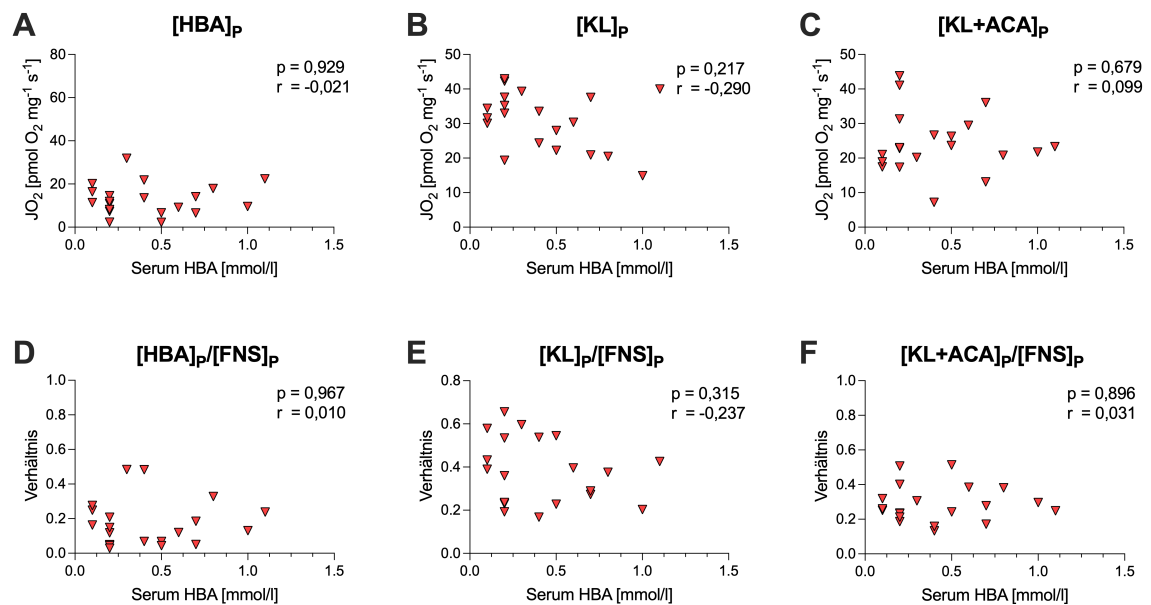
Wie auch in der HI-Studie wurden zur Einordnung der myokardialen Respirometrie in einen systemischen Kontext und die Verfügbarkeit an Ketonkörpern als Substrate die Konzentrationen an zirkulierendem HBA verglichen. Dieser Vergleich konnte mit 56 Probanden durchgeführt werden ( $n=35$  Kontrollen vs. 20 T2D). Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen T2D und Kontrollen (siehe Abb. 20)



**Abb. 20: Serum  $\beta$ -Hydroxybutyrat (HBA) Konzentrationen der humanen Kohorten der T2D-Studie.** Kontrollen  $n=35$  vs. T2D  $n=20$ . Dargestellt ist Mittelwert  $\pm$  SEM. Mann-Whitney-U Test. T2D: Diabetes mellitus Typ 2.

#### 4.2.4 Assoziation von zirkulierenden Ketonkörpern und Respirometrie

Ebenfalls erfolgte die Gegenüberstellung von zirkulierenden KB-Konzentrationen gemessen an HBA im Serum und der KB-abhängigen oxidativen Kapazität. Für alle erfassten Stadien der KB-vermittelten Respiration wie auch für die relative Kontribution der KB zur maximalen gemessenen oxidativen Kapazität stellte sich hierbei keine signifikante Korrelation zur Konzentration der zirkulierenden KB dar (siehe Abb. 21).



**Abb. 21: Korrelation von Ketonkörper (KB)-abhängiger Respiration und Serum  $\beta$ -Hydroxybutyrat (HBA) Konzentration in der humanen T2D-Kohorte.** A-C Korrelation von Serum HBA zu Stadien der absoluten KB-abhängigen Respiration. D-F Korrelation von Serum HBA zu dem relativen Anteil der KB-abhängigen Respiration an der maximalen oxidativen Kapazität (FNS).  $n = 20$ . Spearman Korrelationen. ACA: Acetoacetat; KL: Ketolyse; p: phosphorylierende Respiration; T2D: Diabetes mellitus Typ 2.

## 5 Diskussion

In Bezug auf die eingangs aufgestellten Hypothesen können anhand der beschriebenen Ergebnisse folgende Aussagen getroffen werden:

- I. Die OXPHOS Kapazität für konventionelle Substrate (Fettsäuren, NADH-gekoppelte Substrate und Succinat) ist in der HFrEF vermindert. Die absolute myokardiale OXPHOS Kapazität unter Verwendung von KB ist in der HFrEF im Vergleich zu Kontrollen jedoch nicht oder zu einem geringeren Grad vermindert. Der relative Beitrag der KB zur OXPHOS ist somit in der HFrEF erhöht.
- II. Die absolute OXPHOS Kapazität unter Verwendung von KB und somit die Fähigkeit KB zur ATP-Produktion zu verwenden ist im Myokard bei T2D vermindert. Zudem ist die relative OXPHOS Kapazität nach zusätzlicher Gabe von ACA erniedrigt, was auf eine potenziell stärkere Einschränkung der nachgeschalteten ketolytischen Enzyme hindeutet.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen an zirkulierenden KB in der HFrEF zwar erhöht sind, ein erhöhtes systemisches Angebot jedoch nicht mit einer erhöhten, sondern eher geringeren Kapazität zur myokardialen KB-Oxidation einhergeht.

### 5.1 Eignung der untersuchten Gruppen

#### 5.1.1 Gruppen, Modelle und Proben-Akquisition

Studien mit Myokard-Akquisition sind mit Tiermodellen von kardiovaskulären Erkrankungen mit Blick auf ethische und praktische Gesichtspunkte meist einfacher durchzuführen als mit humanen Probanden, für welche es deutlich mehr Hürden gibt [127, 128]. Zwar spielen Tiermodelle eine wichtige Rolle in der Erforschung der HF [120] und des T2D [129], dennoch können sie die komplexen Zusammenhänge der Erkrankung nicht vollständig abbilden [127, 130]. Daher wurde in diesen Studien humanes Myokard untersucht. Eine gut etablierte Möglichkeit zur Gewinnung von humanen Myokardproben ist die Entnahme während herzchirurgischen Operationen [131]. Diese Probanden sind jedoch meist erkrankt. Es stellt daher eine Hürde dar, für die Kontrollgruppe Myokard von gesunden Probanden zu erhalten, da Myokard Biopsien aus ethischen Gründen wegen seltener, aber möglicher Komplikationen [132] meist nicht ausschließlich zu

Studienzwecken durchgeführt werden können. Eine Möglichkeit ist, Myokard von gesunden Organspendern zu entnehmen, deren Organ nach Begutachtung für nicht transplantabel erklärt wurde [133]. Bei der generellen Knappheit an Organspendern [134] wäre es hier aber schwierig eine ausreichend große Kohorte zu bilden. Bereits in einigen anderen Studien wurden herztransplantierte Personen rekrutiert, die im Rahmen der Transplantatnachsorge eine EMB erhalten und keine schwere kardiale Erkrankung aufweisen [81, 104, 135, 136]. Diese können so nicht-herzinsuffiziente Kohorten darstellen. Es wurde auch bereits gezeigt, dass die bei einer EMB rechtsventrikulär aus dem interventrikulären Septum entnommenen Proben mit den linksventrikulären Proben aus herzchirurgischen Operationen mit Blick auf die Respirometrie vergleichbar sind [135]. Patienten zur Transplantatnachsorge sind ebenso wie Patienten zu herzchirurgischen Operationen gut charakterisiert und können im Rahmen ihrer Klinik-Aufenthalte ohne größeren zeitlichen Aufwand in Studien eingeschlossen werden.

Somit wurde in dieser Studie nach Abwägung aller ethischen und logistischen Möglichkeiten auf durchaus etablierte humane Gruppen und Proben zurückgegriffen. In der HF-Studie wurde die Kohorte herzinsuffizienter Probanden durch den Einschluss von Patienten mit HFrEF, die eine EMB erhielten, zudem heterogener und bestand nicht nur aus Patienten mit HF im Endstadium zur LVAD-Implantation oder Herztransplantation.

Auch das verwendete Mausmodell in der HFrEF-Studie war bereits etabliert und für die Darstellung einer ischämischen HF geeignet [120, 121]. Zwar bildet es so nur einen Teilaspekt der Pathogenese einer HFrEF ab, während in der humanen HFrEF-Kohorte unterschiedliche Genesen zu finden sind; aus ethischen Überlegungen in Bezug auf die benötigte Gruppengröße bei unterschiedlichen Interventionen und durch das gleichzeitige Untersuchen der pathogenetisch heterogeneren humanen Kohorte wurde dieser Teilaspekt jedoch als ausreichend repräsentativ betrachtet. In Kombination mit den humanen Untersuchungen konnte so von den heterogeneren humanen Kohorten ein Vergleich zu den untereinander ähnlicheren Maus-Gruppen gezogen werden.

### **5.1.2 Charakteristika der Gruppen der Herzinsuffizienz-Studie**

Zwischen den humanen Kohorten der HFrEF-Studie zeigten sich einige Unterschiede. Signifikant niedrigere LVEF und Herzindex in der HFrEF-Kohorte sprechen hierbei für ein erfolgreiches Einteilen der beiden Kohorten.

Unterschiede in der Medikation lassen sich größtenteils auf die klinische Notwendigkeit von leitlinienbasierten Therapien zurückführen. In der HFrEF-Kohorte betrifft dies als Teil der medikamentöse Herzinsuffizienztherapie Natrium-Glukose-Cotransporter 2-Inhibitoren, Betablocker, Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren und Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten [1]. Probanden der Kontrollgruppe erhielten passend zum leitliniengerechten Vorgehen nach Transplantationen [137] mehr Immunsuppressiva und Statine. Auch Acetylsalicylsäure wird zur Primärprävention nach Herztransplantation eingesetzt [137], wohingegen es bei Probanden der HFrEF-Kohorte vor allem bei koronarer Erkrankung indiziert wäre [138]. Aufgrund einer heterogenen HFrEF-Kohorte mit nicht nur vaskulär bedingter HFrEF ist die Einnahme von Acetylsalicylsäure in dieser Studie signifikant häufiger in der Kontroll-Gruppe zu finden. Die vermehrte Einnahme von Calcium-Kanal-Antagonisten und Angiotensin-II-Rezeptorblockern in der Kontroll-Kohorte lässt sich durch die Notwendigkeit von antihypertensiver Therapie erklären, wohingegen diese in der HFrEF-Gruppe bereits durch blutdrucksenkende Effekte der HFrEF-Medikation erfolgt.

Die erhöhten Alanin- und Aspartat-Aminotransferasen könnte in der HFrEF-Kohorte als Ausdruck einer Stauungshepatitis zur HF passen [33]. Die Leukozyten- und Thrombozytenzahl und der Wert des Thyroidea-stimulierenden Hormons bewegen sich trotz Unterschieden alle im physiologischen Referenzbereich [33], sodass deren Einfluss auf manifeste Unterschiede der Probanden eher als gering angesehen werden kann und möglicherweise statistisch auf Zufall beruht.

Generell ist der Großteil der Unterschiede zwischen den humanen klinischen Kohorten also auf die angewendeten Kriterien zur Einteilung der Kohorten zurückzuführen und unterstreicht somit den Erfolg der gewünschten Einteilung. Unterschieden in Charakteristika, die möglicherweise einen verändernden Einfluss auf den kardialen Metabolismus haben, wurde mittels adjustierter Analysen begegnet (siehe 4.1.1.2 und 5.2.4.1).

Die murinen Gruppen glichen sich in den erfassten Charakteristika und unterschieden sich somit nur durch die Intervention, sodass hier von einer guten Vergleichbarkeit ausgegangen werden kann.

### 5.1.3 Charakteristika der Gruppen der Diabetes mellitus-Studie

Die Kohorten der T2D-Studie unterschieden sich in einigen der erfassten Charakteristika. Der signifikant höhere HbA<sub>1c</sub>-Wert und die vermehrte Einnahme von antihyperglykämischer Medikation in der T2D-Kohorte sprechen für ein erfolgreiches Einteilen der Probanden in T2D und Kontrollen. Die Tendenz eines höheren Alters der Probanden, der signifikant erniedrigte BMI, sowie die erhöhten Triglyceride, die erhöhten freien Fettsäuren und das erniedrigte HDL-Cholesterin in der T2D-Kohorte passen zu Risikofaktoren, Ätiologie und Pathogenese des T2D [24, 33, 36]. Den Unterschieden im Alter und BMI wurde dennoch mit adjustierten Analysen begegnet (siehe 4.2.2), um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu prüfen. Über die erhöhten Blutfettwerte könnte auch die signifikant vermehrte Einnahme an Statinen von Probanden mit T2D zu erklären sein, auch wenn leitliniengerecht als Prävention nach Herztransplantation auch die Probanden der Kontroll-Kohorte Statine erhalten sollten [137]. Mit Blick auf die Herzfunktion zeigten Probanden mit T2D einen erniedrigten Herzindex. Dieser konnte jedoch nur bei 24 der 35 Kontrollen und bei 5 der 22 Probanden mit T2D bestimmt werden, sodass die Aussagekraft hier eher als begrenzt anzusehen ist. Zudem spricht auch das Fehlen von Unterschieden zwischen beiden Kohorten in erfasster LVEF und n-terminalem pro-*Brain* natriuretischem Peptid gegen das Vorliegen von Unterschieden in der Herzfunktion und gegen eine Herzinsuffizienz in der T2D-Kohorte. Außerdem unterschieden sich beide Kohorten in Kalium-Konzentrationen im Serum. Zwar können bei T2D durchaus Elektrolyt-Konzentrationen verändert sein [139], da in dieser Studie die Werte beider Kohorten im Normbereich lagen [33], ist hier jedoch eher nicht ein klinisch relevanter Unterschied der Probanden anzunehmen. Darüber hinaus sind beide Kohorten jedoch aufgrund der Charakteristika als gut vergleichbar anzusehen.

## **5.2 Metabolische Veränderungen des Myokards bei Herzinsuffizienz**

### **5.2.1 Geringere OXPHOS Kapazität für konventionelle Substrate in der Herzinsuffizienz**

Sowohl im Menschen als auch in Mäusen zeigte sich in dieser Studie eine geringere OXPHOS Kapazität für alle getesteten konventionellen Substrate (Fettsäuren, NADH-gekoppelte Substrate und Succinat). Vor dem Hintergrund der generell etablierten Meinung, dass die HF mit einer abnormalen Funktion der myokardialen Mitochondrien einhergeht [17, 82, 140, 141], waren diese Ergebnisse durchaus zu erwarten. Zwar konnten manche Studien keinen Unterschied der OXPHOS Kapazität zwischen HF und Kontrollen feststellen [142], der weit überwiegende Anteil der bisher durchgeführten Studien ergab jedoch bereits eine signifikant geringere Respiration [135, 143-145] oder geringere Enzym-Aktivität [143, 146, 147] in der HF [93]. Insofern liefern die Ergebnisse dieser Studie weitere Unterstützung für die Thesen einer eingeschränkten OXPHOS Kapazität in der HF und einer Einschränkung der mitochondrialen Funktion als Domäne der HF.

In der Respirometrie ergab die Untersuchung der murinen Proben in der Kontroll-Gruppe im Vergleich zu der humanen Kontroll-Kohorte eine im Mittel mindestens doppelt so hohe Respiration für alle erfassten respiratorischen Stadien. Ähnliche Unterschiede zwischen humanen und murinen Proben konnten bereits im Skelettmuskel gezeigt werden [148], sodass auch hier im Myokard möglicherweise ein physiologischer Unterschied besteht.

### **5.2.2 Unterschiede der intrinsischen mitochondrialen Funktion**

Die intrinsische Funktion der Mitochondrien wurde mit der Berechnung der Fluss-Kontroll-Raten RCR, LCR und P/E Verhältnis auf Defekte und Effizienz überprüft. Hier zeigten sich Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies: Die Effizienz der Mitochondrien in der humanen HFrEF-Kohorte war mit derer der Kontroll-Kohorte vergleichbar. In den murinen Gruppen bot sich ein gegensätzliches Bild mit signifikant schlechterer Effizienz der Mitochondrien in insuffizienten Herzen. Eine statistisch signifikante Limitation der Respiration durch die ATP-Synthase (P/E Verhältnis) war in beiden Spezies nicht ersichtlich. Auch in der Literatur zeigt sich hier ein heterogenes Bild.

Teils werden Fluss-Kontroll-Raten und die Effizienz der Mitochondrien in der HF als vermindert [131, 143, 145], teils als unverändert [144] beschrieben. Ein Vergleich zwischen humanen und murinen Proben insuffizienter Herzen existiert bisher nicht. Zwar ist nicht auszuschließen, dass die HFrEF auf die Mitochondrien von Menschen und Mäusen unterschiedliche Effekte in Bezug auf die intrinsische Funktion hat, hier wären jedoch noch weitere Studien mit größerer Anzahl an untersuchten Proben nötig, um Aussagen mit größerer Sicherheit treffen zu können.

Bei der Interpretation der Fluss-Kontroll-Raten ist jedoch zu beachten, dass eine Messung der ETS Kapazität in SUIT-Protokollen nach bereits erfolgter Zugabe von Oligomycin als unsicher angesehen wird und die ETS Kapazität teils unterschätzt wird [58]. Somit sind die unter Hinzunahme der ETS Kapazität berechneten Raten LCR und P/E Verhältnis nur mit äußerster Vorsicht zu interpretieren. Die RCR als Marker der Kopplungseffizienz ist hiervon jedoch nicht betroffen.

Für die Interpretation der Respirometrie Ergebnisse bedeutet dies, dass in den Mäusen intrinsische Defekte der Effizienz der Mitochondrien für die verminderte Respiration in der HFrEF-Gruppe verantwortlich sein könnten. Auf die Ergebnisse der KB-abhängigen Respiration und daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen haben die vorliegenden Ergebnisse der Fluss-Kontroll-Raten jedoch keinen verändernden Einfluss, da selbst trotz möglicher Beeinträchtigung der intrinsischen mitochondrialen Funktion ein Erhalt der KB-abhängigen OXPHOS Kapazität vorläge, was die Bedeutung der KB in der HFrEF nur weiter unterstreichen würde (siehe 5.2.4).

### **5.2.3 Ähnliche mitochondriale Dichte der Proben**

Die Messung der CSA als Marker der mitochondrialen Dichte erfolgte aufgrund von Probenlimitation nur in den murinen Gruppen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und HFrEF, weshalb folglich von einer ähnlichen Anzahl an Mitochondrien pro Gewicht und Volumen an Myokard auszugehen ist. Generell zeigt die Studienlage hier ein heterogenes Bild, oft wird die CSA bei HF als vermindert angesehen, manche Studien zeigen aber auch keinen Unterschied [16]. Hier bringen die Ergebnisse dieser Studie mit den  $n = 8$  vs. 8 untersuchten Individuen keine weitere Klarheit bzgl. der generellen mitochondrialen Dichte bei HF. In Bezug auf die Einordnung der Respirometrie-Ergebnisse liefern sie jedoch den wichtigen Hinweis, dass die mitochondriale Dichte in dieser Studie zwischen den murinen Gruppen

wahrscheinlich nicht verschieden war und die Ergebnisse der veränderte Respirometrie bei HFrEF nicht lediglich auf einen höheren oder niedrigeren Mitochondrien-Gehalt zurückzuführen sein könnten.

## **5.2.4 Ketonkörper-abhängige Respiration in der Herzinsuffizienz**

### **5.2.4.1 Erhaltene und relativ erhöhte Ketonkörper-vermittelte OXPHOS**

#### **Kapazität in der Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion**

Während die myokardialen OXPHOS Kapazitäten für die getesteten konventionellen Substrate in der HFrEF und somit auch die maximal gemessene OXPHOS Kapazität signifikant und deutlich verringert waren (siehe 5.2.1), zeigte sich die absolute KB-abhängige OXPHOS Kapazität in der HFrEF nur tendenziell in geringem Ausmaß vermindert und im Vergleich zu Kontrollen ohne statistisch signifikanten Unterschied. Der relative Anteil der KB an der maximalen OXPHOS Kapazität in der HFrEF war hingegen signifikant erhöht.

In den Kontroll-Gruppen kam es nach Zugabe von ACA nach bereits vollständig ablaufender Ketolyse stets zu einer Reduktion der erfassten Respiration, woraus sich eine mögliche Produkt-Inhibition des in der Reaktions-Kette aufwärts gelegenen Enzyms BDH1 ableiten lässt. Dass diese Reduktion in den HFrEF-Gruppen beider untersuchten Spezies weniger stark oder gar nicht auftrat, spricht für eine stärkere Verstoffwechselung von ACA und folglich eine höhere Aktivität des hierfür verantwortlichen Enzyms SCOT bei HFrEF im Vergleich zu Kontrollen. Einschränkend muss hierbei jedoch festgestellt werden, dass dieser Unterschied nur in den murinen Gruppen statistische Signifikanz erreichte und zwischen humanen Kontrollen und HFrEF-Kohorte in adjustierten Analysen auch nicht mehr als Tendenz nachzuweisen war. Möglicherweise könnten hier also Störfaktoren eine Rolle spielen.

Generell ist es in der Literatur bereits allgemein anerkannte Meinung, dass KB bei HFrEF eine wichtige Rolle auch als Energiequelle spielen könnten [17, 77, 105, 149]. Viele Studien konnten bereits erhöhte Serum-KB-Konzentrationen, erhöhte Expressionen der ketolytischen Enzyme BDH1 und SCOT und erhöhte KB-Aufnahmen in das Myokard bei HFrEF zeigen [16, 17, 105, 106, 150]. Da HRR jedoch nicht nur einzelne Parameter, sondern den mitochondrialen Energiestoffwechsel inklusive der KB-Oxidation als Ganzes erfasst [57, 81], konnte nun erstmalig der tatsächliche Anteil der KB-Oxidation

an der myokardialen Respiration in einem vollständigen System abgebildet werden. Insofern liefern die Ergebnisse dieser Studie mit erstmaliger Verwendung von Respirometrie zur Quantifizierung der myokardialen KB-abhängigen oxidativen Kapazität bei HFrEF nun Klarheit darüber, was bisher nur diese Surrogat-Parameter haben vermuten lassen: Das insuffiziente Herz kann tatsächlich relativ gesehen mehr KB zur OXPHOS verwenden.

Da SGLT2-Inhibitoren Serum-Konzentrationen an KB erhöhen können und dies sogar als ein möglicher Mechanismus der kardioprotektive Effekte dieser Medikamenten-Klasse angesehen wird [78], wurden hier in den humanen Kohorten weitere Analysen mit Vergleich von Teilkohorten ohne SGLT2-Inhibitoren und Adjustierung durchgeführt. Hierbei zeigten sich in Bezug auf maximale oxidative Kapazität und relativem Anteil der KB-Respiration mit der Gesamt-Analyse vergleichbare Ergebnisse. Dasselbe galt für die zusätzliche Adjustierung für Alter und BMI. Insofern scheinen die beobachteten Ergebnisse des höheren Anteils der KB an der Gesamt-Respiration in der HFrEF unabhängig von Alter, BMI oder Einnahme von SGLT2-Inhibitoren zu sein.

Anders als in den humanen Kohorten präsentierte sich in den murinen Gruppen die absolute Respiration für den ersten, durch BDH1 katalysierten Schritt der Ketolyse als in der HFrEF vermindert. In diesem ersten Schritt entsteht NADH, welches über Komplex I in die Atmungskette eingeschleust wird und für die gemessene Respiration verantwortlich ist (siehe 1.4.2) [46, 81]. Dieser Weg der Respiration über NADH scheint jedoch nach den Ergebnissen des konventionellen Protokolls in den Mäusen bei HFrEF relativ gesehen stärker vermindert zu sein als in den humanen Probanden (siehe 5.2.1). Unter dieser Annahme lässt sich auch die absolut geringere BDH1-vermittelte Respiration in der murinen HFrEF-Gruppe erklären. Auch dafür spricht, dass der Unterschied zu der humanen HFrEF-Kohorte nach Normalisierung für die maximal gemessene OXPHOS Kapazität ( $[HBA]_p/[FNS]_p$ ) nicht mehr im selben Umfang zu sehen war.

#### 5.2.4.2 Negative Korrelation von zirkulierenden Ketonkörpern und Ketonkörper-abhängiger Respiration

Im Einklang mit vorherigen Studien [16, 17, 105, 106, 150], stellten sich die Serum-Konzentrationen an KB gemessen an HBA, welches den mit Abstand größten Anteil der zirkulierenden KB ausmacht [46], als in der HFrEF erhöht dar. Insofern bestätigt diese

Studie, dass das intrinsische Angebot an KB zur Ketolyse in Personen mit insuffizienten Herzen erhöht zu sein scheint.

Es ist etablierte Meinung, dass, zumindest in gesunden Organismen, das Ausmaß der KB-Oxidation und Aufnahme in Organe bis zu einer Sättigung des KB-oxidierenden Systems maßgeblich durch das Angebot an KB bestimmt wird [70]. Dies wurde auch für das Herz gezeigt [151]. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass dieser Zusammenhang in der HFrEF so nicht uneingeschränkt zuzutreffen scheint. Höhere zirkulierende KB-Konzentrationen korrelierten statistisch signifikant mit einer verminderten maximalen Fähigkeit zur Verwendung von KB zur mitochondrialen OXPHOS. Zwar kann durch HRR nicht der tatsächliche *in vivo* Zustand erfasst werden, dennoch legt diese negative Korrelation nahe, dass bei HFrEF keinesfalls allein von der Konzentration an zirkulierenden KB als Surrogat-Parameter auf das Ausmaß der KB-Oxidation geschlossen werden kann.

Mit Blick auf zirkulierende KB-Konzentrationen stellt sich in der HF zudem ein Paradoxon dar: Während KB-Supplementation positive Effekte in der Therapie der HFrEF zu haben scheint [111], gehen gleichzeitig erhöhte intrinsische Serum KB-Konzentrationen mit einem erhöhten Risiko für eine Verschlechterung einer bestehenden HF [110] und einem generell erhöhten kardiovaskulären Risiko [109] einher. Hier liefert die in dieser Studie gezeigte verminderte Fähigkeit zur KB-Oxidation bei intrinsisch erhöhten Serum Konzentrationen an KB einen potenziellen Beitrag zur mechanistischen Erklärung des sogenannten KB-Paradoxon. Innerhalb der Erkrankung der HFrEF scheint es metabolisch maladaptive Stadien zu geben, in denen trotz vermehrter Ketogenese und einem erhöhten Angebot an zirkulierenden Ketonkörpern nur eine verminderte Oxidation der KB erfolgen kann. Ursächlich hierfür könnte insbesondere eine vermehrte generelle myokardiale Schädigung mit ebenfalls vermehrter Störung der mitochondrialen Funktion sein. Zwar konnte dies in dieser Studie nicht eindeutig gezeigt werden, andere Studien legen jedoch nahe, dass diese zunehmende generelle mitochondriale Schädigung insbesondere mit zunehmender Schwere der HFrEF einhergeht [152-154]. Insofern könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass die Adaption des insuffizienten Herzens vermehrt KB zur Aufrechterhaltung der myokardialen Energieversorgung zu verwenden, in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung nicht mehr möglich ist und das Herz in ein auf mit Blick auf die KB zunehmend metabolisch maladaptives Stadium übergeht.

#### 5.2.4.3 Ausblick und Potential von Ketonkörpern in der Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion

Generell sprechen viele Studien für eine Funktion von KB als alternative Energiesubstrate in der HFrEF, die den myokardialen Energiemetabolismus aufrechterhalten oder zumindest unterstützen können [149, 150, 155]. Zudem wird ein möglicher therapeutischer Nutzen von einigen Studien bestärkt [156]. Unter anderem konnte bereits gezeigt werden, dass ein Ausschalten von BDH1 pathologische Umbauprozesse nach Myokardschädigung verstärkt [157], dass exogen erhöhte KB-Serum-Konzentrationen kardiale Dysfunktion und pathologische Umbauprozesse abmildern [157] und dass HBA-Infusionen in humanen Probanden die kardiale Auswurf-Leistung erhöhen [158].

Mögliche therapeutische Optionen zur endogenen oder exogenen Erhöhung von Serum-KB-Konzentration stellen die Ketogene Diät, Fasten/Kalorienrestriktion oder die Zufuhr von Keton-Salzen, Keton-Estern oder Fettsäuren dar, die gleichwohl alle mit ihren eigenen Vor- und Nachteilen einhergehen [77, 105].

Neben der Rolle als Energiesubstrat haben KB aber auch andere wichtige Funktion, u.a. in der Regulierung von Stoffwechsel, Inflammation und oxidativem Stress [64]. Auch diese scheinen bei der positiven Beeinflussung einer HFrEF eine nicht zu vernachlässigende, möglicherweise sogar wesentlichere Rolle zu spielen [16, 77, 105]. Zudem wurden teils auch vasoaktive Effekte der KB beobachtet [16]. Dass der KB-Metabolismus ggf. sogar gar nicht relevant für die Therapie einer HF sein könnte, legt eine Studie mit Tiermodell nahe, in der eine Ketogene Diät, völlig unabhängig davon, ob die Ketolyse ablaufen konnte oder mittels Knockout vollständig ausgeschaltet war, eine HF verbessern konnte [159].

Ob die Verwendung von KB als Energiesubstrat gegenüber anderen Effekten von KB daher nur eine untergeordnete Rolle spielt, sich beide Funktionen verstärkend ergänzen und inwiefern die Effekte von KB in der HFrEF als therapeutischer Angriffspunkt in der breiten Masse der klinischen Versorgung ausgenutzt werden können, ist somit noch von zukünftigen Studien weiter zu eruieren. Unsere Studie stärkt hier jedoch das Konzept der therapeutischen Ketonkörper Supplementation bei HFrEF auf mechanistischer Ebene, als dass das insuffiziente Herz dieses exogen erhöhte Substrat-Angebot auch zu einem größeren Anteil zur Energiegewinnung mittels mitochondrialer OXPHOS nutzen könnte. Wichtig ist hierbei jedoch, dass diese Fähigkeit insuffizienter Herzen in Stadien

zunehmender metabolischer Maladaptation, womöglich insbesondere bei fortschreitender Erkrankung, vermindert zu sein scheint. In diesen Stadien wäre eine Supplementation aus rein metabolischen Gesichtspunkten also möglicherweise nicht mehr zielführend.

## **5.3 Metabolische Veränderungen des Myokards bei Diabetes mellitus Typ 2**

### **5.3.1 Geringere OXPHOS Kapazität bei Diabetes mellitus Typ 2**

Die Ergebnisse der T2D-Studie zeigten eine tendenziell erniedrigte maximale OXPHOS Kapazität im diabetischen Myokard. Eine mitochondriale Dysfunktion bei T2D im Gesamt-Organismus [36, 38] und im Herzen [97, 99, 160-162] ist wissenschaftlich bereits etablierte Meinung. Mittels Respirometrie konnte bereits in anderen Studien mit Tiermodellen [163, 164] und humanen Proben [103, 104] eine verringerte OXPHOS Kapazität im diabetischen Myokard nachgewiesen werden. Auch Aktivitäten der Komplexe der Atmungskette scheinen bei T2D vermindert zu sein [103, 165]. Insofern passen die beobachteten Tendenzen zu bereits bestehenden Studien und der generell akzeptierten Meinung der mitochondrialen Dysfunktion im diabetischen Herzen. Größere Kohorten unserer Studienpopulation hätten hier ggf. weitere Klarheit bei dann möglicherweise signifikanten Veränderungen liefern können.

Während die separaten Analysen von Probanden mit und ohne SGLT2-Inhibitoren in dieser Studie insbesondere wegen deren potenziellen Einfluss auf den KB-Metabolismus durchgeführt wurden, konnte interessanterweise zwischen den SGLT2-Inhibitor-einnehmenden Teilkohorten mit und ohne T2D, anders als zwischen den Teilkohorten ohne SGLT2-Inhibitoren, kein Unterschied in der mitochondrialen Respiration unter Verwendung konventioneller Substrate festgestellt werden. Zwar sind diese Ergebnisse nicht konklusiv und auch nicht der Fokus dieser Studie, sie passen dennoch zu bereits bestehenden Vorarbeiten [166] und der These der Verbesserung der mitochondrialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus durch SGLT2-Inhibitoren.

### **5.3.2 Intrinsische mitochondriale Funktion**

Der Grad der Entkopplung (LCR), die Kopplungseffizienz (RCR) und die Limitation der Respiration durch die ATP-Synthase (P/E Verhältnis) unterschieden sich in dieser Studie

nicht zwischen Kontrollen und Probanden mit T2D. In der Literatur ist überwiegend eine verminderte Effizienz und vermehrte Entkopplung der Atmungskette [103, 104, 165, 167, 168], sowie eine verminderte Aktivität der ATP-Synthase [169, 170] beschrieben. Somit passen diese Ergebnisse unserer Studie nur bedingt zu bisherigen Ergebnissen.

Für die Interpretation der Respirometrie-Ergebnisse unserer Studie bedeutet dies, dass die beobachtete verminderte oxidative Kapazität bei T2D womöglich nicht ausschließlich durch verminderte Kopplungseffizienz, vermehrte Entkopplung oder Limitation durch die ATP-Synthase bedingt zu sein scheint, sondern andere Mechanismen, z.B. auf enzymaler Ebene, eine Rolle spielen könnten.

### **5.3.3 Ketonkörper-abhängige Respiration bei Diabetes mellitus Typ 2**

#### **5.3.3.1 Verminderte Ketonkörper-vermittelte OXPHOS Kapazität bei Diabetes mellitus Typ 2**

In der T2D-Studie wurde eine signifikant verringerte Ketolyse-bedingte OXPHOS Kapazität bei T2D ersichtlich. Ebenso wie die maximale Respiration bei Verwendung konventioneller Substrate (siehe 5.3.1) ist also auch die Respiration bei Verwendung von KB bei T2D eingeschränkt.

Auch wenn unsere Studie keinen Unterschied in der Konzentration zirkulierender KB zwischen Kontrollen und T2D feststellen konnte, ist generell in der Literatur etabliert, dass T2D mit erhöhten KB-Konzentrationen im Serum [16, 70, 105, 171] und einer vermehrten Aufnahme von KB in zur Ketolyse fähigen Zielorgane, wie Herz oder Skelettmuskel, [113, 114, 171] einhergeht. Da die Aufnahme von KB maßgeblich über das bereitgestellte Angebot an Substraten geregelt ist [172, 173], erscheint dies plausibel. Neuere Studien legen jedoch nahe, dass das diabetische Herz trotz vermehrter Aufnahme nicht unbedingt auch vermehrt, sondern, ganz im Gegenteil, vermindert KB zur Ketolyse und oxidativen Phosphorylierung verwendet [115-117]. Diese Vermutungen konnten nun durch unsere Studie bestätigt werden, indem wir erstmals die tatsächliche KB-vermittelte Respiration mittels Respirometrie als bei T2D vermindert quantifizieren konnten. Auch in der Analyse der Korrelation von zirkulierenden KB und KB-vermittelter Respiration innerhalb der T2D-Kohorte konnte keine Assoziation nachgewiesen werden, sodass eine Erhöhung des Angebotes an KB in T2D anscheinend nicht zu einer Erhöhung der

Kapazität zur KB-Oxidation führt. Neben dem Angebot an Substraten, spielen also vor allem andere Mechanismen, wie Aktivität und Gehalt an Enzymen der Ketolyse und der Atmungskette, eine entscheidende Rolle für die Möglichkeit der Energiegewinnung durch KB. Dies unterstreicht auch die Wichtigkeit der Methode der HRR zur direkten Quantifizierung der tatsächlich möglichen Respiration unter Verwendung bestimmter Substrate und nicht das alleinige Verlassen auf Surrogat-Parameter wie Angebot oder Aufnahme ins Gewebe.

Anders als die Respiration unter Ablauf der gesamten Ketolyse ( $[KL]_P$  und  $[KL+ACA]_P$ ), war die Respiration unter ausschließlicher Verwendung des ersten, durch BDH1 vermittelten Schritt der Ketolyse ( $[HBA]_P$ ) nicht bei T2D vermindert. Ebenso zeigte sich zwar kein Unterschied in der Differenz der Respiration zwischen T2D und Kontrollen nach Zugabe von ACA bei bereits ablaufender Ketolyse, die Ketolyse nach zusätzlicher Gabe von ACA präsentierte sich im Verhältnis zur maximalen Respiration bei T2D im Vergleich zu Kontrollen aber signifikant vermindert, wohingegen die relative Respiration durch Ketolyse ohne vorherige Gabe von ACA nicht vermindert war. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die gemessene verminderte KB-vermittelte Respiration bei T2D weniger durch BDH1 und den ersten Schritt der Ketolyse, sondern eher durch die darauffolgenden Schritte, wie z.B. durch das ketolytische Enzym SCOT, ausgemacht zu sein scheint. Bisherige Studien zeigten jedoch sowohl für BDH1 als auch für SCOT eine verminderte Expression in diabetischen Herzen [115, 116], sodass für unsere Beobachtung eher eine verminderte Aktivität von SCOT oder Effekte im Bereich der Atmungskette ursächlich sein könnten.

Bereits von Zweck et al. konnte gezeigt werden, dass T2D einen Einfluss auf die mitochondriale Respiration hat, nicht jedoch der BMI [104]. Dennoch wurden in dieser Studie lineare Regressionsanalysen zur Adjustierung der Respirometrie-Ergebnisse für die wichtigen Charakteristika Alter und BMI, in den sich beide Kohorten tendenziell (Alter) oder signifikant (BMI) unterschieden, durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine Assoziation der Respiration mit Alter und BMI und die adjustierten Ergebnisse stellten mit der nicht-adjustierten Analyse vergleichbare Signifikanzen oder Tendenzen dar. Somit ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der (KB-abhängigen) oxidativen Kapazität dieser Studie durch T2D ausgemacht und nicht maßgeblich durch Alter oder BMI beeinflusst werden.

Da SGLT2-Inhibitoren den KB-Metabolismus beeinflussen können [79] und sich beide Kohorten in der Einnahme dieser Medikamente aufgrund deren Indikation bei T2D unterscheiden, wurden weiterführende Analysen mit Teilkohorten von Probanden mit und ohne SGLT2-Inhibitoren durchgeführt und dort erneut T2D und Kontrollen verglichen. Auch wenn ein Effekt von SGLT2-Inhibitoren auf die Respiration unter Verwendung konventioneller Substrate nicht von der Hand zu weisen ist (siehe 5.3.1), zeigten sich für die KB-abhängige oxidative Kapazität mit der Gesamt-Analyse vergleichbare Ergebnisse, wobei einige Vergleiche, möglicherweise aufgrund geringerer Teilkohorten-Größe, ihre Signifikanz verloren. Insgesamt ist somit nicht anzunehmen, dass die Ergebnisse dieser Studie in Bezug auf die KB-Respiration durch die Medikamentenklasse der SGLT2-Inhibitoren verändernd beeinflusst wurden.

Generell unterstützen unsere Ergebnisse das Konzept der myokardialen metabolische Inflexibilität bei T2D [95-97, 100, 101]. So scheint das diabetische Herz nicht in der Lage zu sein, auf KB im physiologischen Umfang zur Energiegewinnung zurückzugreifen. Diese Veränderung im Myokard ist konsistent zu ähnlichen Veränderungen der KB-Oxidation in anderen Ketolyse-praktizierenden Organen [81]. Insbesondere relevant ist die Verminderung der Fähigkeit der KB-Oxidation zur ATP-Generierung vor dem Hintergrund des eigentlich erhöhten oder in den Ergebnissen unserer Studie zumindest unveränderten Angebots an KB bei T2D. Es besteht also ein klares Missverhältnis zwischen Angebot und tatsächlicher Fähigkeit zur Oxidation von KB bei T2D.

#### 5.3.3.2 Ausblick und klinische Bedeutung der Ketonkörper im diabetischen Herzen

Klinische Relevanz erhält die Veränderung der KB-Oxidation insbesondere dadurch, dass die DbCM durch mitochondriale Dysfunktion und metabolische Einschränkungen ausgemacht wird (siehe 1.2.4) [40, 41, 44, 45]. Die verminderte Fähigkeit zur KB-Oxidation könnte hier also einen weiteren pathogenetischen Teilfaktor darstellen.

Es existieren bereits einige Ansätze, die metabolischen Veränderungen in der DbCM als mögliche Therapieziele zu adressieren [174-176]. Der KB-Metabolismus ist in bisherigen Überlegungen jedoch kein explizites Therapieziel. Um der metabolischen Inflexibilität bei T2D entgegenzuwirken und das Herz wieder metabolisch breiter aufzustellen, könnte es jedoch ein Ansatz sein, die Fähigkeit zur KB-Oxidation bei T2D und der DbCM zu verbessern. Unsere Ergebnisse legen hierbei nahe, dass durch die Einschränkung der

Oxidation trotz erhöhtem Angebot keine reine KB-Supplementation zu einer Verbesserung des KB-Metabolismus führen kann. Vielmehr müsste die Expression und Aktivität von Enzymen der Ketolyse oder der Atmungskette direktes therapeutisches Ziel sein, um das eigentlich hohe Angebot an KB für das Myokard nutzbar zu machen.

Neben der Verminderung der Fähigkeit KB als Energiesubstrate zu nutzen, könnten KB bei T2D dennoch positive Wirkungen durch regulatorische Effekte der KB [64] auf die DbCM haben. Die Fragen, inwiefern diese regulatorischen Effekte eine therapeutische Rolle spielen könnten, wie die Enzyme der Ketolyse und Atmungskette als therapeutisches Ziel genutzt werden können und inwieweit T2D den Stoffwechsel bei Personen mit manifester HF verändert, bedürfen noch weiterer Forschung und könnten somit von zukünftigen Studien adressiert werden.

## **5.4 Limitationen**

Aus den vorherigen Erläuterungen ergeben sich folgende Limitationen dieser Arbeit bezüglich der in die Studien eingeschlossenen Individuen: Wie beschrieben, ist es aus ethischen Gründen nur eingeschränkt möglich, in ausreichendem Maße Myokard von vollkommen gesunden humanen Probanden zu erhalten. In der HFrEF-Studie wies zwar kein Proband der humanen Kontroll-Kohorte eine HF auf, dennoch können die bereits herztransplantierten Patienten als Kontrollen nicht als vollkommen repräsentativ für die Gesamtbevölkerung und vollständig gesund angesehen werden. Bei beiden Kohorten der T2D-Studie wurde zwar Myokard aus dem gleichen Patienten-Kollektiv entnommen, beide Kohorten wurden aber auch hier von bereits herztransplantierten Patienten ausgemacht, die somit auch in dieser Studie nicht als vollkommen repräsentativ für die gesunde Gesamtbevölkerung oder Typ 2 Diabetiker in der Gesamtbevölkerung angesehen werden können. Außerdem zeigten sich jeweils zwischen den humanen Kohorten Unterschiede in der eingenommenen Medikation. Diese sind zwar klinisch nachvollziehbar und z.T. durch das Einteilungs-Kriterium der HFrEF und des T2D begründet, eine Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels ist jedoch nicht mit vollkommener Sicherheit auszuschließen.

Bezüglich der Vergleichbarkeit von humanen und murinen Gruppen in der HF-Studie wurde zwar bereits gezeigt, dass Veränderungen der mitochondrialen Funktion bei HF unabhängig der Genese bestehen [177], dennoch ist zu berücksichtigen, dass die in den

Mäusen induzierte HFrEF rein ischämischer Genese ist und bis zur Organentnahme kürzer als bei den pathogenetisch heterogeneren humanen Probanden bestand.

Zudem ist zwar, aufgrund generell der limitierten Verfügbarkeit von insbesondere humanem Myokard, in beiden Studien von eher großen humanen Kohorten zu sprechen, diese könnten aber dennoch mit  $n=35$  vs.  $22$  bzw.  $n=55$  vs.  $55$  bei den humanen Probanden und auch mit  $n=8$  vs.  $8$  bei den Mäusen nicht ausreichend groß sein, um alle Unterschiede sicher statistisch beurteilen zu können.

Auch die Methode der Untersuchung der mitochondrialen oxidativen Funktion mittels HRR geht mit Limitationen einher. So beeinflusst die Anzahl der Mitochondrien pro untersuchter Probe zwangsläufig den gemessenen Sauerstoff-Fluss [61]. Dem kann man versuchen, über die Messung der mitochondrialen Dichte einer Probe, z.B. mittels Messung der CSA zu begegnen und die Respirometrie-Ergebnisse darauf zu normalisieren [61]. Eine Messung der CSA oder andere über die HRR hinausgehende Analysen waren jedoch aufgrund der limitierten Menge an Probenmaterial im Rahmen der Biopsie-Entnahme in den humanen Kohorten beider Studien nicht möglich. Während zwar eine Messung der CSA in den murinen Gruppen erfolgte, ist die CSA jedoch generell im Skelettmuskel deutlich besser etabliert als im Myokard [61, 131]. Aufgrund des deutlich geringeren Aufwandes an Finanzen und Ressourcen, wurde die Bestimmung der CSA dennoch der nach wie vor den Goldstandard darstellenden Transmissions-Elektronen-Mikroskopie [61] vorgezogen. Auch wenn bereits gezeigt wurde, dass die mitochondriale Dichte in diabetischem Myokard unverändert [178] oder sogar erhöht ist [179], ist insofern eine Beeinflussung der Respirometrie durch Unterschiede der mitochondrialen Dichte der Proben nicht sicher auszuschließen und auch in den murinen Gruppen die Messung der CSA möglicherweise nicht vollkommen repräsentativ für die tatsächliche mitochondriale Dichte im Myokard.

Zudem werden HRR-Messungen mit gesättigten Konzentrationen von Sauerstoff, ADP und allen im Rahmen der SUT-Protokolle zugegebenen Substanzen durchgeführt, um die maximal mögliche Respiration zu messen und die Messung nicht durch zu geringes Substrat-Angebot fälschlich zu verringern [58, 81]. Dies stellt zwar den Goldstandard zur Quantifizierung der Respiration dar [57], dennoch sind alle HRR-Ergebnisse insofern als maximal mögliche, *in vitro* gemessene Respiration zu interpretieren. Sie spiegeln also

nicht in jedem Fall die tatsächliche *in vivo* Respiration wider, da hier auch teils geringere Konzentrationen an Sauerstoff, ADP oder Substraten vorliegen können.

Aufgrund von Limitation der Menge an möglichem Probenmaterial und der Anzahl an zur Verfügung stehenden Oxygraphen, konnte jedes HRR-Protokoll bei den EMB-Proben zudem nur in je einer Kammer und bei den humanen HTX-Proben und murinen Proben nur maximal in je zwei Kammern gleichzeitig gemessen werden. Mehr simultane Messungen von Proben eines Individuums hätten hier über die Bildung von Mittelwerten möglicherweise robustere Ergebnisse liefern können.

Für die Einordnung der Ergebnisse der KB-abhängigen oxidativen Kapazität ist der Blick auf weitere Facetten des KB-Metabolismus zwingend erforderlich. Hier sind in der Literatur die Expression von ketolysierenden Enzymen, die kardiale KB-Aufnahme und die Serum-KB-Konzentrationen sowohl bei HF [17, 77, 105] als auch bei T2D [16, 98, 115-117, 171] bereits beschrieben. Da der klare Fokus unserer Studie hier auf der Quantifizierung der KB-abhängigen mitochondrialen Respiration lag, wurde in dieser Studie aus Gründen von Kosten und Praktikabilität die Serum-KB-Konzentrationen mittels *Point-of-Care* Ketonmeter bestimmt und so ausschließlich die HBA-Konzentration gemessen. Zwar nimmt HBA den mit Abstand größten Anteil der zirkulierenden KB ein [46] und kann somit durchaus als repräsentativ angesehen werden, dennoch erfolgte so keine Erfassung aller zirkulierenden KB.

## 6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf divergierende Veränderungen der KB-abhängigen mitochondrialen Kapazität zur oxidativen Phosphorylierung im Myokard bei HFrEF und im diabetischen Herzen im Vergleich zu jeweiligen Kontrollen hin.

Während in der HFrEF die maximale oxidative Kapazität vermindert ist, ist die Kapazität, KB zur oxidativen Phosphorylierung zu verwenden, erhalten. Die relative Kontribution der KB zur maximal möglichen oxidativen Phosphorylierung ist so erhöht. Gleichzeitig ist das Substratangebot durch erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden KB vermehrt. Erhöhte Serum-KB-Konzentrationen gehen innerhalb der HFrEF jedoch mit einer geringeren Kapazität der KB-Oxidation einher. Diese metabolische Maladaptation liefert einen möglichen Beitrag zur Erklärung des sogenannten Ketonkörper-Paradoxons. Generell unterstreichen die Ergebnisse unserer Studie die relevante Rolle von KB als Energiesubstrate in der HFrEF.

Bei T2D ist die maximale Kapazität der oxidativen Phosphorylierung tendenziell ebenfalls vermindert. Die Kapazität, KB zur oxidativen Phosphorylierung zu verwenden, ist hier jedoch auch verringert, wobei insbesondere spätere Schritte der Ketolyse und die Atmungskette an sich betroffen zu sein scheinen. Das Herz bei T2D kann das Angebot an KB also nur vermindert zur Energiegewinnung nutzen und ist metabolisch inflexibel.

Sowohl bei HFrEF als auch bei T2D stellt der KB-Metabolismus daher ein potenzielles therapeutisches Ziel dar. Der therapeutische Ansatz unterscheidet sich jedoch: In der HFrEF ist die Kapazität der myokardialen KB-Oxidation erhöht, weshalb insbesondere die Steigerung der Substratverfügbarkeit von KB pathogenetisch sinnvoll erscheint. Bei T2D ist hingegen die Fähigkeit der myokardialen KB-Oxidation vermindert. Hier könnte eine Optimierung dieser metabolischen Inflexibilität und verminderten Substratverarbeitung durch Interventionen im Bereich von Enzymen der Ketolyse oder der Atmungskette einen therapeutischen Ansatz darstellen.

Die hier vorliegenden primär assoziativen Daten bedürfen zukünftig jedoch noch weiterer prospektiver Studien, um die zugrundeliegenden Mechanismen und potenziellen therapeutischen Wirksamkeiten genauer zu untersuchen.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. McDonagh, T.A., et al., *2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. European Heart Journal, 2021. **42**(36): p. 3599-3726.
2. Heidenreich, P.A., et al., *2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines*. Circulation, 2022. **145**(18): p. e895-e1032.
3. Bozkurt, B., et al., *Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure: Endorsed by the Canadian Heart Failure Society, Heart Failure Association of India, Cardiac Society of Australia and New Zealand, and Chinese Heart Failure Association*. Eur J Heart Fail, 2021. **23**(3): p. 352-380.
4. Ziaeeian, B. and G.C. Fonarow, *Epidemiology and aetiology of heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(6): p. 368-78.
5. Dolgin, M. and New York Heart Association Criteria Committee, *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels*. 9th ed. A Little, Brown handbook. 1994, Boston: Little, Brown. 334.
6. Roger, V.L., *Epidemiology of Heart Failure: A Contemporary Perspective*. Circ Res, 2021. **128**(10): p. 1421-1434.
7. Savarese, G., et al., *Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology*. Cardiovasc Res, 2023. **118**(17): p. 3272-3287.
8. Störk, S., et al., *Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study*. Clin Res Cardiol, 2017. **106**(11): p. 913-922.
9. Emmons-Bell, S., C. Johnson, and G. Roth, *Prevalence, incidence and survival of heart failure: a systematic review*. Heart, 2022. **108**(17): p. 1351-1360.
10. Urbich, M., et al., *A Systematic Review of Medical Costs Associated with Heart Failure in the USA (2014-2020)*. Pharmacoeconomics, 2020. **38**(11): p. 1219-1236.
11. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
12. Triposkiadis, F., et al., *Pathogenesis of chronic heart failure: cardiovascular aging, risk factors, comorbidities, and disease modifiers*. Heart Fail Rev, 2022. **27**(1): p. 337-344.
13. Bui, A.L., T.B. Horwich, and G.C. Fonarow, *Epidemiology and risk profile of heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(1): p. 30-41.
14. Tanai, E. and S. Frantz, *Pathophysiology of Heart Failure*. Comprehensive Physiology, 2016. **6**(1): p. 187-214.
15. Jessup, M. and S. Brozena, *Heart failure*. N Engl J Med, 2003. **348**(20): p. 2007-18.

16. Bornstein, M.R., R. Tian, and Z. Arany, *Human cardiac metabolism*. Cell Metab, 2024. **36**(7): p. 1456-1481.
17. Ng, S.M., S. Neubauer, and O.J. Rider, *Myocardial Metabolism in Heart Failure*. Curr Heart Fail Rep, 2023. **20**(1): p. 63-75.
18. Borlaug, B.A., et al., *Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. JACC, 2023. **81**(18): p. 1810-1834.
19. Cannata, A., et al., *Heart failure with reduced ejection fraction*. The Lancet, 2026. **407**(10527): p. 529-542.
20. Campbell, P., et al., *Heart failure with preserved ejection fraction: everything the clinician needs to know*. The Lancet, 2024. **403**(10431): p. 1083-1092.
21. Paulus, W.J. and C. Tschöpe, *A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(4): p. 263-71.
22. Schiattarella, G.G., D. Rodolico, and J.A. Hill, *Metabolic inflammation in heart failure with preserved ejection fraction*. Cardiovasc Res, 2021. **117**(2): p. 423-434.
23. Sacks, D.B., et al., *Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2023. **46**(10): p. e151-e199.
24. American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2. *Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2025*. Diabetes Care, 2024. **48**(Supplement\_1): p. S27-S49.
25. GBD 2021 Diabetes Collaborators, *Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021*. Lancet, 2023. **402**(10397): p. 203-234.
26. Schmidt, C., et al., *Prevalence and incidence of documented diabetes based on health claims data-reference analysis for diabetes surveillance in Germany*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2020. **63**(1): p. 93-102.
27. Tamayo, T., et al., *The Prevalence and Incidence of Diabetes in Germany*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(11): p. 177-82.
28. Saeedi, P., et al., *Mortality attributable to diabetes in 20-79 years old adults, 2019 estimates: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition*. Diabetes Res Clin Pract, 2020. **162**: p. 108086.
29. Jacobs, E., et al., *Burden of Mortality Attributable to Diagnosed Diabetes: A Nationwide Analysis Based on Claims Data From 65 Million People in Germany*. Diabetes Care, 2017. **40**(12): p. 1703-1709.
30. Kontoteza, I.V., et al., *Investigating Diabetes Mellitus Impact on Various Aspects of Patients' Quality of Life*. Stud Health Technol Inform, 2022. **295**: p. 470-473.
31. Kähm, K., et al., *Assessment of excess medical costs for persons with type 2 diabetes according to age groups: an analysis of German health insurance claims data*. Diabet Med, 2020. **37**(10): p. 1752-1758.
32. Köster, I., et al., *Direct costs of diabetes mellitus in Germany - CoDiM 2000-2007*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2011. **119**(6): p. 377-85.

33. Herold, G. and Mitarbeiter, *Innere Medizin*. 2024, Köln: Gerd Herold. 1003.
34. Roden, M. and G.I. Shulman, *The integrative biology of type 2 diabetes*. Nature, 2019. **576**(7785): p. 51-60.
35. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. The Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-1346.
36. Lu, X., et al., *Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024. **9**(1): p. 262.
37. Chatterjee, S., K. Khunti, and M.J. Davies, *Type 2 diabetes*. The Lancet, 2017. **389**(10085): p. 2239-2251.
38. Taylor, R., *Understanding the cause of type 2 diabetes*. The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2024. **12**(9): p. 664-673.
39. Wong, N.D. and N. Sattar, *Cardiovascular risk in diabetes mellitus: epidemiology, assessment and prevention*. Nat Rev Cardiol, 2023. **20**(10): p. 685-695.
40. Jia, G., M.A. Hill, and J.R. Sowers, *Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity*. Circ Res, 2018. **122**(4): p. 624-638.
41. Zweck, E., et al., *Das diabetische Herz und Herzinsuffizienz – Aktuelles zu Entstehung und Therapie*. Dtsch Med Wochenschr, 2019. **144**(03): p. 175-179.
42. Rydén, L., et al., *ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: The Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. European Heart Journal, 2013. **34**(39): p. 3035-3087.
43. Yancy, C.W., et al., *2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure*. JACC, 2013. **62**(16): p. e147-e239.
44. Jia, G., A. Whaley-Connell, and J.R. Sowers, *Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease*. Diabetologia, 2018. **61**(1): p. 21-28.
45. Bugger, H. and E.D. Abel, *Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy*. Diabetologia, 2014. **57**(4): p. 660-71.
46. Heinrich, P.C., et al., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed. 2014, Berlin, Heidelberg: Springer.
47. Xiong, N., et al., *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models*. Crit Rev Toxicol, 2012. **42**(7): p. 613-32.
48. Kim, Y.S., *Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application*. J Biochem Mol Biol, 2002. **35**(5): p. 443-51.
49. Hytti, M., et al., *Antimycin A-Induced Mitochondrial Damage Causes Human RPE Cell Death despite Activation of Autophagy*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 1583656.
50. Jensen, P., et al., *Cyanide inhibition of cytochrome c oxidase. A rapid-freeze e.p.r. investigation*. Biochem J, 1984. **224**(3): p. 829-37.
51. Linnett, P.E. and R.B. Beechey, *Inhibitors of the ATP synthetase system*. Methods Enzymol, 1979. **55**: p. 472-518.

52. Hollenbeck, P.J., D. Bray, and R.J. Adams, *Effects of the uncoupling agents FCCP and CCCP on the saltatory movements of cytoplasmic organelles*. Cell Biol Int Rep, 1985. **9**(2): p. 193-9.
53. Sharma, E., et al., *Overview of methods that determine mitochondrial function in human disease*. Metabolism, 2025. **170**: p. 156300.
54. Nolfi-Donagan, D., A. Braganza, and S. Shiva, *Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement*. Redox Biol, 2020. **37**: p. 101674.
55. Simonnet, H., A. Vigneron, and J. Pouyssegur, *Chapter Eight - Conventional Techniques to Monitor Mitochondrial Oxygen Consumption*, in *Methods in Enzymology*, L. Galluzzi and G. Kroemer, Editors. 2014, Academic Press. p. 151-161.
56. Gnaiger, E., *Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function*, in *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*, J.A. Dykens and Y. Will, Editors. 2008: Wiley Online Books. p. 325-352.
57. Pesta, D. and E. Gnaiger, *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.
58. Gnaiger, E., *Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis*. 5th ed. 2020. **2020.2**: p. 112.
59. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state*. J Biol Chem, 1955. **217**(1): p. 409-27.
60. Larsen, S., et al., *Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects*. J Physiol, 2012. **590**(14): p. 3349-60.
61. Kuang, J., et al., *Assessing mitochondrial respiration in permeabilized fibres and biomarkers for mitochondrial content in human skeletal muscle*. Acta Physiol (Oxf), 2022. **234**(2): p. e13772.
62. Eigentler, A., et al., *Laboratory protocol: Citrate synthase. A mitochondrial marker enzyme*. MiPNet, 2012. **1704**: p. 1-11.
63. O'Brien, L.C., et al., *Mitochondrial mass and activity as a function of body composition in individuals with spinal cord injury*. Physiol Rep, 2017. **5**(3).
64. Puchalska, P. and P.A. Crawford, *Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics*. Cell Metab, 2017. **25**(2): p. 262-284.
65. Rich, A.J., *Ketone bodies as substrates*. Proceedings of the Nutrition Society, 1990. **49**(3): p. 361-373.
66. Nelson, A.B., et al., *Metabolic Messengers: ketone bodies*. Nature Metabolism, 2023. **5**(12): p. 2062-2074.
67. Newman, J.C. and E. Verdin, *Ketone bodies as signaling metabolites*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(1): p. 42-52.
68. Newman, J.C. and E. Verdin,  *$\beta$ -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite*. Annu Rev Nutr, 2017. **37**: p. 51-76.
69. Laffel, L., *Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 1999. **15**(6): p. 412-26.

70. Robinson, A.M. and D.H. Williamson, *Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues*. *Physiol Rev*, 1980. **60**(1): p. 143-87.
71. Cahill, G.F., Jr., *Fuel metabolism in starvation*. *Annu Rev Nutr*, 2006. **26**: p. 1-22.
72. Puchalska, P. and P.A. Crawford, *Metabolic and Signaling Roles of Ketone Bodies in Health and Disease*. *Annu Rev Nutr*, 2021. **41**: p. 49-77.
73. Tabatabaei Dakhili, S.A., et al., *The multifaceted roles of ketones in physiology*. *Exp Physiol*, 2025.
74. Luong, T.V., et al., *Ketogenic Diet and Cardiac Substrate Metabolism*. *Nutrients*, 2022. **14**(7).
75. O'Neill, B. and P. Raggi, *The ketogenic diet: Pros and cons*. *Atherosclerosis*, 2020. **292**: p. 119-126.
76. Dyńska, D., et al., *The Ketogenic Diet and Cardiovascular Diseases*. *Nutrients*, 2023. **15**(15).
77. Matsuura, T.R., et al., *Ketones and the Heart: Metabolic Principles and Therapeutic Implications*. *Circ Res*, 2023. **132**(7): p. 882-898.
78. Lopaschuk, G.D. and S. Verma, *Mechanisms of Cardiovascular Benefits of Sodium Glucose Co-Transporter 2 (SGLT2) Inhibitors: A State-of-the-Art Review*. *JACC Basic Transl Sci*, 2020. **5**(6): p. 632-644.
79. Kolb, H., et al., *Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel*. *BMC Med*, 2021. **19**(1): p. 313.
80. Halestrap, A.P. and M.C. Wilson, *The monocarboxylate transporter family--role and regulation*. *IUBMB Life*, 2012. **64**(2): p. 109-19.
81. Zwick, E., et al., *Impaired mitochondrial ketone body oxidation in insulin resistant states*. *eBioMedicine*, 2025. **122**.
82. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
83. Ashrafian, H. and S. Neubauer, *Metabolomic Profiling of Cardiac Substrate Utilization*. *Circulation*, 2009. **119**(13): p. 1700-1702.
84. Lopaschuk, G.D., et al., *Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure*. *Circ Res*, 2021. **128**(10): p. 1487-1513.
85. Näveri, L., H. Näveri, and M. Härkönen, *Myocardial energy metabolism*. *Ann Chir Gynaecol*, 1987. **76**(1): p. 3-11.
86. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
87. Lloyd, D.F., R. Vara, and S. Mathur, *Cardiac manifestations of inherited metabolic disease in children*. *Pediatr Int*, 2017. **59**(5): p. 525-529.
88. Behjati, M., et al., *Cardiac complications in inherited mitochondrial diseases*. *Heart Fail Rev*, 2021. **26**(2): p. 391-403.
89. Yun, H.R., et al., *Biomarkers of Cardiac Metabolic Flexibility in Health, HFrEF and HFpEF*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2026. **27**(2): p. 879.

90. Lopaschuk, G.D., *Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future*. Can J Cardiol, 2017. **33**(7): p. 838-849.
91. De Jong, K.A. and G.D. Lopaschuk, *Complex Energy Metabolic Changes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Heart Failure With Reduced Ejection Fraction*. Canadian Journal of Cardiology, 2017. **33**(7): p. 860-871.
92. Sun, Q., et al., *Mitochondrial fatty acid oxidation is the major source of cardiac adenosine triphosphate production in heart failure with preserved ejection fraction*. Cardiovasc Res, 2024. **120**(4): p. 360-371.
93. Lemieux, H. and C.L. Hoppel, *Mitochondria in the human heart*. J Bioenerg Biomembr, 2009. **41**(2): p. 99-106.
94. Mericskay, M., et al., *Cardiac intermediary metabolism in heart failure: substrate use, signalling roles and therapeutic targets*. Nature Reviews Cardiology, 2025. **22**(10): p. 704-727.
95. Varma, U., et al., *Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes - Experimental insights*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. **1864**(5 Pt B): p. 1949-1959.
96. Nirengi, S., C. Peres Valgas da Silva, and K.I. Stanford, *Disruption of energy utilization in diabetic cardiomyopathy; a mini review*. Curr Opin Pharmacol, 2020. **54**: p. 82-90.
97. Ho, K.L., et al., *Metabolic, structural and biochemical changes in diabetes and the development of heart failure*. Diabetologia, 2022. **65**(3): p. 411-423.
98. Chan, J.S.F., L. Dong, and J.R. Ussher, *Metabolic Modulation of Pyruvate Dehydrogenase and Glucose Oxidation in Diabetic Cardiomyopathy: Pathways, Perspectives, and Potentials*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2025.
99. Federico, M., et al., *The role of mitochondria in metabolic disease: a special emphasis on heart dysfunction*. J Physiol, 2021. **599**(14): p. 3477-3493.
100. Makrecka-Kuka, M., et al., *Altered mitochondrial metabolism in the insulin-resistant heart*. Acta Physiol (Oxf), 2020. **228**(3): p. e13430.
101. Gambardella, J., A. Lombardi, and G. Santulli, *Metabolic Flexibility of Mitochondria Plays a Key Role in Balancing Glucose and Fatty Acid Metabolism in the Diabetic Heart*. Diabetes, 2020. **69**(10): p. 2054-2057.
102. Glatz, J.F.C., et al., *Regulation of Sarcolemmal Transport of Substrates in the Healthy and Diseased Heart*. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2006. **20**(6): p. 471-476.
103. 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. 554-564.
104. 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.
105. Abdul Kadir, A., K. Clarke, and R.D. Evans, *Cardiac ketone body metabolism*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020. **1866**(6): p. 165739.
106. Aubert, G., et al., *The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel*. Circulation, 2016. **133**(8): p. 698-705.
107. Capone, F., et al., *Cardiac metabolism in HFpEF: from fuel to signalling*. Cardiovascular Research, 2022. **118**(18): p. 3556-3575.

108. Hahn, V.S., et al., *Myocardial Metabolomics of Human Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. *Circulation*, 2023. **147**(15): p. 1147-1161.
109. Shemesh, E., et al., *Circulating ketone bodies and cardiovascular outcomes: the MESA study*. *Eur Heart J*, 2023. **44**(18): p. 1636-1646.
110. Monzo, L., et al., *Circulating beta-hydroxybutyrate levels in advanced heart failure with reduced ejection fraction: Determinants and prognostic impact*. *Eur J Heart Fail*, 2024. **26**(9): p. 1931-1940.
111. Liao, L.P., et al., *Effect of ketone supplementation, a low-carbohydrate diet and a ketogenic diet on heart failure measures and outcomes: a systematic review and meta-analysis*. *Heart*, 2025.
112. Ahola-Olli, A.V., et al., *Circulating metabolites and the risk of type 2 diabetes: a prospective study of 11,896 young adults from four Finnish cohorts*. *Diabetologia*, 2019. **62**(12): p. 2298-2309.
113. Mizuno, Y., et al., *The diabetic heart utilizes ketone bodies as an energy source*. *Metabolism*, 2017. **77**: p. 65-72.
114. Avogaro, A., et al., *Myocardial metabolism in insulin-deficient diabetic humans without coronary artery disease*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 1990. **258**(4): p. E606-E618.
115. Brahma, M.K., et al., *Increased Glucose Availability Attenuates Myocardial Ketone Body Utilization*. *J Am Heart Assoc*, 2020. **9**(15): p. e013039.
116. Cai, W., et al., *Empagliflozin improves mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy by modulating ketone body metabolism and oxidative stress*. *Redox Biol*, 2024. **69**: p. 103010.
117. Verma, S., et al., *Empagliflozin Increases Cardiac Energy Production in Diabetes: Novel Translational Insights Into the Heart Failure Benefits of SGLT2 Inhibitors*. *JACC Basic Transl Sci*, 2018. **3**(5): p. 575-587.
118. Petrick, H.L., et al., *In vitro ketone-supported mitochondrial respiration is minimal when other substrates are readily available in cardiac and skeletal muscle*. *J Physiol*, 2020. **598**(21): p. 4869-4885.
119. Polzin, A., et al., *METAB-HTX: prospective, longitudinal cohort study evaluating cardiac and systemic metabolism after heart transplantation*. *ESC Heart Fail*, 2025. **12**(4): p. 3152-3162.
120. Pilz, P.M., et al., *Large and Small Animal Models of Heart Failure With Reduced Ejection Fraction*. *Circ Res*, 2022. **130**(12): p. 1888-1905.
121. Polzin, A., et al., *Sphingosine-1-phosphate improves outcome of no-reflow acute myocardial infarction via sphingosine-1-phosphate receptor 1*. *ESC Heart Fail*, 2023. **10**(1): p. 334-341.
122. Scheiber, D., et al., *Reduced Myocardial Mitochondrial ROS Production in Mechanically Unloaded Hearts*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2019. **12**(2): p. 107-115.
123. Kunz, W.S., et al., *Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1144**(1): p. 46-53.
124. 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.

125. Divakaruni, A.S. and M. Jastroch, *A practical guide for the analysis, standardization and interpretation of oxygen consumption measurements*. Nat Metab, 2022. **4**(8): p. 978-994.
126. Benjamini, Y., A.M. Krieger, and D. Yekutieli, *Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate*. Biometrika, 2006. **93**(3): p. 491-507.
127. Davidson, S.M., et al., *Opportunities and challenges for the use of human samples in translational cardiovascular research: a scientific statement of the ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart, the ESC Working Group on Cardiovascular Surgery, the ESC Council on Basic Cardiovascular Science, the ESC Scientists of Tomorrow, the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions of the ESC, and the Heart Failure Association of the ESC*. Cardiovasc Res, 2025. **121**(5): p. 702-729.
128. Pierscionek, B.K., *The current limitations on tissue banking from an academic perspective*. Cell Tissue Bank, 2011. **12**(1): p. 23-4.
129. Singh, R., M. Gholipourmalekabadi, and S.H. Shafikhani, *Animal models for type 1 and type 2 diabetes: advantages and limitations*. Front Endocrinol (Lausanne), 2024. **15**: p. 1359685.
130. Lai, M., P.C. Chandrasekera, and N.D. Barnard, *You are what you eat, or are you? The challenges of translating high-fat-fed rodents to human obesity and diabetes*. Nutr Diabetes, 2014. **4**(9): p. e135.
131. 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.
132. Cooper, L.T., et al., *The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology*. Circulation, 2007. **116**(19): p. 2216-33.
133. Zhang, H., et al., *The Human Explanted Heart Program: A translational bridge for cardiovascular medicine*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021. **1867**(1): p. 165995.
134. Abouna, G.M., *Organ shortage crisis: problems and possible solutions*. Transplant Proc, 2008. **40**(1): p. 34-8.
135. 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.
136. Zweck, E., et al., *Impaired Myocardial Mitochondrial Respiration in Humans With Prediabetes: A Footprint of Prediabetic Cardiomyopathy*. Circulation, 2022. **146**(15): p. 1189-1191.
137. Velleca, A., et al., *The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines for the care of heart transplant recipients*. J Heart Lung Transplant, 2023. **42**(5): p. e1-e141.
138. Vrints, C., et al., *2024 ESC Guidelines for the management of chronic coronary syndromes*. Eur Heart J, 2024. **45**(36): p. 3415-3537.
139. Liamis, G., et al., *Diabetes mellitus and electrolyte disorders*. World J Clin Cases, 2014. **2**(10): p. 488-96.
140. Knowlton, A.A., L. Chen, and Z.A. Malik, *Heart failure and mitochondrial dysfunction: the role of mitochondrial fission/fusion abnormalities and new therapeutic strategies*. J Cardiovasc Pharmacol, 2014. **63**(3): p. 196-206.

141. Brown, D.A., et al., *Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure*. Nature Reviews Cardiology, 2017. **14**(4): p. 238-250.
142. Holzem, K.M., et al., *Mitochondrial structure and function are not different between nonfailing donor and end-stage failing human hearts*. Faseb j, 2016. **30**(8): p. 2698-707.
143. Chatfield, K.C., et al., *Elamipretide Improves Mitochondrial Function in the Failing Human Heart*. JACC Basic Transl Sci, 2019. **4**(2): p. 147-157.
144. 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.
145. Sharov, V.G., et al., *Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(12): p. 2361-7.
146. Jarreta, D., et al., *Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 860-5.
147. Buchwald, A., et al., *Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy*. Eur Heart J, 1990. **11**(6): p. 509-16.
148. Pietka, T.A. and R.T. Brookheart, *Measurement of Mitochondrial Respiration in Human and Mouse Skeletal Muscle Fibers by High-Resolution Respirometry*. J Vis Exp, 2024(212).
149. Manolis, A.S., T.A. Manolis, and A.A. Manolis, *Ketone Bodies and Cardiovascular Disease: An Alternate Fuel Source to the Rescue*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(4).
150. 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.
151. Rudolph, W., et al., *Über die Bedeutung von Acetacetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat im Stoffwechsel des menschlichen Herzens*. Klinische Wochenschrift, 1965. **43**(8): p. 445-451.
152. Bhullar, S.K. and N.S. Dhalla, *Status of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation during the Development of Heart Failure*. Antioxidants (Basel), 2023. **12**(11).
153. Zhou, B. and R. Tian, *Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure*. J Clin Invest, 2018. **128**(9): p. 3716-3726.
154. Shirakawa, R., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species generation in blood cells is associated with disease severity and exercise intolerance in heart failure patients*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 14709.
155. Lopaschuk, G.D., et al., *Ketone metabolism in the failing heart*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2020. **1865**(12): p. 158813.
156. Lv, T., et al., *Targeting Ketone Body Metabolism Improves Cardiac Function and Hemodynamics in Patients With Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Nutr Rev, 2025. **83**(7): p. e1521-e1532.
157. Horton, J.L., et al., *The failing heart utilizes 3-hydroxybutyrate as a metabolic stress defense*. JCI Insight, 2019. **4**(4).
158. Nielsen, R., et al., *Cardiovascular Effects of Treatment With the Ketone Body 3-Hydroxybutyrate in Chronic Heart Failure Patients*. Circulation, 2019. **139**(18): p. 2129-2141.

159. Foulks, Z., et al., *Ketone Body Metabolism is Not Required for Improvement of Heart Failure by Ketogenic Diet in Mice*. bioRxiv, 2024.
160. Bugger, H. and E.D. Abel, *Mitochondria in the diabetic heart*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(2): p. 229-40.
161. Verma, S.K., V.N.S. Garikipati, and R. Kishore, *Mitochondrial dysfunction and its impact on diabetic heart*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(5): p. 1098-1105.
162. Boudina, S. and E.D. Abel, *Diabetic Cardiomyopathy Revisited*. Circulation, 2007. **115**(25): p. 3213-3223.
163. Kuo, T.H., et al., *Defective oxidative metabolism of heart mitochondria from genetically diabetic mice*. Diabetes, 1983. **32**(9): p. 781-7.
164. Marciniak, C., et al., *Cardiac contractile function and mitochondrial respiration in diabetes-related mouse models*. Cardiovasc Diabetol, 2014. **13**: p. 118.
165. Bombicino, S.S., et al., *Diabetes impairs heart mitochondrial function without changes in resting cardiac performance*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2016. **81**: p. 335-345.
166. Dabravolski, S.A., et al., *Mitochondria-Mediated Cardiovascular Benefits of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(10).
167. Avram, V.F., et al., *Impairment of Mitochondrial Respiration in Metabolic Diseases: An Overview*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(16).
168. Ruegsegger, G.N., et al., *Altered mitochondrial function in insulin-deficient and insulin-resistant states*. J Clin Invest, 2018. **128**(9): p. 3671-3681.
169. Cong, W., et al., *Metallothionein prevents cardiac pathological changes in diabetes by modulating nitration and inactivation of cardiac ATP synthase*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2014. **25**(4): p. 463-474.
170. Kanazawa, A., et al., *Reduced activity of mtTFA decreases the transcription in mitochondria isolated from diabetic rat heart*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2002. **282**(4): p. E778-E785.
171. Hall, S.E., et al., *Ketone body kinetics in humans: the effects of insulin-dependent diabetes, obesity, and starvation*. J Lipid Res, 1984. **25**(11): p. 1184-94.
172. Blomqvist, G., et al., *Effect of acute hyperketonemia on the cerebral uptake of ketone bodies in nondiabetic subjects and IDDM patients*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(1): p. E20-8.
173. Bouteldja, N., et al., *Using positron emission tomography to study human ketone body metabolism: a review*. Metabolism, 2014. **63**(11): p. 1375-84.
174. Tan, Y., et al., *Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(9): p. 585-607.
175. Giraldo-Gonzalez, G.C., et al., *Molecular Mechanisms of Type 2 Diabetes-Related Heart Disease and Therapeutic Insights*. Int J Mol Sci, 2025. **26**(10).
176. Chen, D., et al., *Diabetic cardiomyopathy: insights into pathophysiology, diagnosis and clinical management*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2025. **206**: p. 55-69.
177. Park, S.Y., et al., *Mitochondrial function in heart failure: The impact of ischemic and non-ischemic etiology*. Int J Cardiol, 2016. **220**: p. 711-7.

178. Pham, T., et al., *Mitochondrial inefficiencies and anoxic ATP hydrolysis capacities in diabetic rat heart*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2014. **307**(6): p. C499-C507.
179. Bombicino, S.S., et al., *Hydrogen peroxide, nitric oxide and ATP are molecules involved in cardiac mitochondrial biogenesis in Diabetes*. Free Radical Biology and Medicine, 2017. **112**: p. 267-276.

# Danksagungen

Ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater, Amin Polzin, für seine Betreuung und Unterstützung, die für meine Promotion und meinen bisherigen Karriereweg entscheidend waren. Christian Buchbender danke ich für seine Co-Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinem Arbeitsgruppenleiter, Elric Zweck, für dessen hervorragende wissenschaftliche Betreuung und konstruktive Kritik, die diese Arbeit entscheidend geprägt haben. Seine wissenschaftliche Expertise und Bereitschaft, jederzeit für Fragen zur Verfügung zu stehen, haben mir den Weg durch die Herausforderungen dieser Dissertation erheblich erleichtert. Zudem möchte ich mich bei Sarah Piel für ihre fortwährende konzeptuelle und praktische Unterstützung bei Methodik und Diskussion der Ergebnisse bedanken.

Mein Dank gilt auch Roberto Sansone für die Einführung in die Welt der Kardiologie und seine Unterstützung bei der Vermittlung dieser Promotionsarbeit.

Den Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie und des kardiologischen Forschungslabors danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, praktische Unterstützung und ihr offenes Ohr bei jedweder Frage. Nur einige von Ihnen kann ich hier namentlich nennen: Norbert Gerdes, Susanne Pfeiler und Alexander Lang für die Unterstützung im kardiologischen Labor. Daniel Scheiber, Mareike Cramer, Patrick Horn, Florian Bönner, Ralf Westenfeld, Fabian Voß, David Naguib und Tobias Zeus, sowie dem gesamten Team des Herzkatheterlabors und der Stationen ME06, ME08 und ME09 für die Hilfsbereitschaft. Auch der Klinik für Herzchirurgie, ihrem Direktor Artur Lichtenberg und dem gesamten OP-Team gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Akquisition herzchirurgischer Proben.

Insbesondere möchte ich mich zudem beim Direktor der Klinik, Malte Kelm, für die Möglichkeit des Forschungsprojektes und die Überlassung der Infrastruktur bedanken.

Zudem danke ich den Doktorandinnen und Doktoranden unserer Arbeitsgruppe für die Einarbeitung, Unterstützung und Fortführung des Projektes: Sina Kaufmann, Ricarda Remus, Jana Lübbers, Rosalie Eckl, Minh Do Trong, Philipp Gabert, Leonita Qoraj und Luzi Weichert.

Mein Dank gilt außerdem den Patientinnen und Patienten, die bereit waren, an dieser Studie teilzunehmen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Freundinnen und Freunden und meiner Familie bedanken, die mich während der gesamten Zeit des Studiums und der Promotion begleitet und bestärkt haben. Insbesondere gilt mein größtmöglicher Dank meinen Eltern, Annette und Klaus, die mich mein gesamtes bisheriges Leben gefördert und in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben. Euer Rückhalt war mir stets eine wichtige Stütze.