

**Aus der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Rainer Leyh

**Einfluss des Diabetes mellitus II auf die kontraktile Eigenschaften humaner
geskinnter rechts- und linksaurikulärer Myofilamente**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Daniel Johannes Keller

aus Ingolstadt

Würzburg, April 2021

Referent: Prof. Dr. med. Ulrich Hofmann

Korreferent : Prof. Dr. med. Rainer Leyh

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2022

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung:	1
1.1 <i>Diagnostische Aspekte der diabetischen Kardiomyopathie:</i>	4
1.2 <i>Diabetische Stoffwechselveränderungen am Herzmuskel</i>	5
1.3 <i>Zellulärer Mechanismus der Auswirkungen von DM auf die kardiale Kontraktilität</i>	7
1.4 <i>Therapie der Diabetischen Kardiomyopathie</i>	8
1.5 <i>Anatomie der Herzmuskelzelle</i>	8
1.6 <i>Grundlagen der Herzmuskelkontraktion</i>	11
1.6.1 <i>Elektromechanische Kopplung</i>	11
1.6.2 <i>Der Querbrückenzyklus</i>	11
1.7 <i>Ziel der Arbeit</i>	12
2 Methoden	14
2.1 <i>Skinned Fibres Methode</i>	14
2.2 <i>Herkunft des verwendeten Myokards</i>	15
2.3 <i>Einschlusskriterien</i>	15
2.4 <i>Ausschlusskriterien</i>	15
2.5 <i>Rekrutierung der Probanden</i>	16
2.6 <i>Datenerhebung</i>	17
2.7 <i>Chirurgische Vorgehensweise der Herzohrmaterialgewinnung</i>	18
2.8 <i>Herzohraufarbeitung</i>	21
2.9 <i>Verarbeitung und Häutung der Muskelfasern</i>	23
2.10 <i>Versuchsaufbau</i>	27
2.11 <i>Aktivierung der gehäuteten Fasern</i>	31
2.12 <i>Aktivierung der Einzelansätze</i>	34
2.13 <i>Echokardiographie:</i>	37
2.14 <i>Intraoperative Daten</i>	38

2.15	<i>Statistische Analyse und Auswertung</i>	38
3	Ergebnisse:	40
3.1	<i>Demographische Ergebnisse</i>	40
3.2	<i>Intraoperative Ergebnisse</i>	41
3.3	<i>Ergebnisse Kraftwerte</i>	43
3.4	<i>Echokardiographische Auswertung</i>	46
4	Diskussion	48
4.1	<i>Diskussion der Methodik</i>	48
4.1.1	Methode der Gehäuteten Muskelfasern	48
4.1.2	Kritische Beurteilung der Methode der gehäuteten Fasern	49
4.1.3	Methodenkritische Beurteilung der Stufenaktivierung	52
4.1.4	Beurteilung des Vorhofes als Faserquelle	53
4.1.5	Einfluss der Temperatur in der skinned fiber Methode	54
4.2	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	56
4.2.1	Historie der Erforschung der Diabetischen Kardiomyopathie	56
4.2.2	Vergleich der Kraftwerte aus linkem und rechtem Vorhof	57
4.2.3	Einfluss des Diabetes	58
4.2.4	Vergleich der klinischen mit den experimentellen Ergebnissen	60
4.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
4.3	<i>Ausblick:</i>	62
5	Fazit	64
6	Abkürzungsverzeichnis	65
7	Literaturverzeichnis	67
8	Lebenslauf	
9	Danksagungen	

1 Einleitung:

Die Inzidenz des Diabetes Mellitus II (DM) in den Industrienationen unserer westlichen Welt ist weiter steigend. Schätzungen zufolge werden im Jahr 2025 weltweit ca. 300 Millionen Menschen von DM betroffen sein. Dies entspricht einer Prävalenz von 5,4 Prozent. Die steigende Anzahl von Diabetikern, den damit verbundenen kardiovaskulären Krankheitsmanifestationen und die sich ergebenden Therapiekosten werden global die Gesundheitssysteme herausfordern [1-4].

Die deutsche Gesellschaft für Diabetologie definiert den Diabetes Mellitus als eine Gruppe heterogener Stoffwechselstörungen, deren Leitbefund die chronische Hyperglykämie darstellt. Definitionsgemäß liegt ein DM vor, wenn der Gelegenheitsplasmaglukosewert über 200 mg/dl ($> 11,1$ mmol/l), der Nüchternblutzuckerspiegel über 126 mg/dl ($> 7,0$ mmol/l), der HBA1C über 6,5% (> 48 mmol/mol Hb) liegt oder im oralen-Glucose-Toleranz-Test-2-h-Wert (OGTT) im venösen Plasma ein Wert über 200 mg/dl ($> 11,1$ mmol/l) gemessen wird [5]. Die weitere Einteilung des Diabetes Mellitus erfolgt anhand der Ätiopathogenese in diverse Subtypen. Der Typ 1 Diabetes ist gekennzeichnet durch einen absoluten Insulinmangel, der durch Zelluntergang der Insulin produzierenden Beta-Zellen im Pankreas ausgelöst wird. Der Typ 2 Diabetes hingegen zeichnet sich durch eine vorwiegende Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel aus. Letzterer ist stark mit Dyslipoproteinämie, Adipositas und primär arteriellem Hypertonus assoziiert und wird deshalb unter dem Begriff des metabolischen Syndroms zusammengefasst [5].

Diese alte und im klinischen Alltag meist zu unpräzise Einteilung der DM-Typen wurde 2018 von Ahlqvist anhand pathophysiologischer und klinischer Kriterien überarbeitet und erweitert [5, 6]. Die neue Klassifikation berücksichtigt weitere krankheitsspezifische Parameter wie Manifestationsalter, Body Mass Index, Beta-Zellfunktion, Insulinresistenz, spezifische Autoantikörper sowie den HBA1C. Somit

lässt sich das komplexe Krankheitsbild des DM, besonders aber des DM Typ II, in fünf weitere Subtypen unterteilen [6]. Äußerst hilfreich zeigt sich diese Kategorisierung in der Therapie des DM Typ II [7].

Die möglichen Symptome eines DM Typ II umfassen zahlreiche Beschwerdebilder. Unspezifische Beschwerden wie vermehrte Müdigkeit, Polydypsie, Polyurie oder erhöhte Infektanfälligkeit können mögliche Frühsymptome eines DM Typ II sein. Meist bleibt ein DM Typ II jedoch lange Zeit klinisch inapparent und fällt nicht selten als Zufallsbefund bei Routine Check-Ups auf [5].

Therapeutisch sollte über alle Krankheitsstadien hinaus versucht werden durch Lifestyleänderungen und medikamentöse Maßnahmen kardiovaskuläre Risikofaktoren zu minimieren [5, 7, 8]. Hierbei sollte besonders auf eine strikte Nikotinkarenz, Gewichtsabnahme durch Bewegung und Ernährungsumstellung, Behandlung einer Hyperlipidämie, die Einstellung einer arteriellen Hypertonie und die Normalisierung des Glukosestoffwechsels geachtet werden [8]. Für die Einstellung des Blutglukosespiegels stehen für den DM Typ II diverse Antidiabetika zur Verfügung. Der angestrebte Glukose-Zielbereich richtet sich nach dem individuellen Risikoprofil sowie Lebenserwartung, Krankheitsdauer und etwaigen Komorbiditäten. Eine mehrfach Kombination richtet sich nach jeweiligen Nebenwirkungsprofil beziehungsweise HBA1C Zielbereich [5, 8]. Zu bevorzugen sind hierbei Metformin in Verbindung mit SGLT2-Inhibitoren sowie GLP-1-Rezeptoragonisten, da sich diese in kardiovaskulären Endpunktstudien als überlegen zeigten [5, 7, 9, 10]. Bei Nichterreichen des Zielbereichs kann die orale Therapie durch zu injizierendes Insulin intensiviert werden [5].

Zu den Hauptkomplikationen des DM zählen neben dem akut lebensbedrohlichen Coma Diabeticum besonders die chronischen Folgeerkrankungen, welche sich ubiquitär makro- und mikroangiopathisch manifestieren können. Besonders hervorzuheben ist der Einfluss des DM auf das kardiovaskuläre System [11]. Herz- und Gefäßerkrankungen sind bei Diabetikern Hauptursache für Behinderungen und rangieren noch vor malignen Tumoren auf Platz eins der Todesursachen [12, 13]. Progressive systolische und frühe diastolische Dysfunktion, pathologische ventrikuläre

Hypertrophie sowie die Zunahme von intestinaler Fibrosierung sind Folge eines chronischen Krankheitsverlaufs [4]. Neben den vaskulären Veränderungen an den Herzkranzgefäßen stellen die durch DM bedingten Modifikationen direkt am Herzmuskel ein eigenes schwerwiegendes Krankheitsbild dar. Sie treten unabhängig von ischämischen Herzerkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzerkrankung auf. Die sogenannte Diabetische Kardiomyopathie (DMC) ist eine schleichend entstehende und oft unterdiagnostizierte eigenständige Herzerkrankung [12]. Sie kann in vier Stadien eingeteilt werden, welche nach Maisch [14-17] in Tabelle 1 dargestellt sind.

Stadium	Stadium 1 (diastolische Dysfunktion, Hypertrophie)	Stadium 2 (systolische Dysfunktion, Dilatation)	Stadium 3 (systolische Dysfunktion, Dilatation, assoziierte arterielle Hypertonie)	Stadium 4 (enthält alle Cofounder, auch KHK)
Entsprechend in NYHA Stadium	Asymptomatisch	NYHA II	NYHA II-III	NYHA II-IV
Metabolischer Status	Beeinträchtigte Glucosetoleranz, metabolisches Syndrom	Chronische Hyperglykämie	Insulinresistenz, Diabetes mellitus mit mikroangiopathischen Komplikationen	Diabetes mellitus mit mikro- und makroangiopathischen Komplikationen
Echokardiographisches Korrelat	Normale EF, erhöhte LV Masse, diastolische Dysfunktion, verminderte Gewebsbeweglichkeit	Erhöhte LV Masse und Wanddicke, diastolische und systolische Dysfunktion (EF < 50%),	Diastolische und milde systolische Dysfunktion, Ventrikeldilatation	Moderate bis schwere systolische Dysfunktion, Ventrikeldilatation

		milde Ventrikel- dilatation		
zu kontrol- lierende sero- logische Marker	NTproBNP, MMP-3, Osteopontin, Glucose, Lipidprofil, HbA1C	NTproBNP, MMP-3, Osteopontin, Glucose, Lipidprofil, HbA1C, BNP	NTproBNP, MMP-3, Osteopontin, Glucose, Lipidprofil, HbA1C, BNP, Troponin T bei Ischämieverdacht	NTproBNP, MMP-3, Osteopontin, Glucose, Lipidprofil, HbA1C, BNP, Troponin T bei Ischämieverdacht

Tabelle 1: Stadieneinteilung der diabetischen Kardiomyopathie nach Maisch

1.1 Diagnostische Aspekte der diabetischen Kardiomyopathie:

Frühe Stadien sind besonders durch Herzmuskelhypertrophie mit beginnender diastolischer Dysfunktion gekennzeichnet. Diese Veränderungen bleiben jedoch nicht selten asymptomatisch und sind häufig nur in der Echokardiographie sichtbar. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu weiterer irreversibel symptomatisch werdender Verschlechterung der diastolischen und nun auch systolischen Pumpfunktion mit Dilatation der Ventrikel. Ursache dafür ist eine progrediente und für Diabetiker typische Verschlechterung der kontraktilen Funktion von rechtem und linkem Ventrikelmyokard [14, 15].

Somit kommt bezüglich der Diagnostik der DMC der Echokardiographie eine bedeutende Rolle zu. Hierbei gilt es, strukturelle und funktionelle Veränderungen besonders des linken Ventrikels nachzuweisen. Die genauen echokardiographischen Korrelate sind in Abb. 1 dargestellt. Um eventuelle kardiale Defizite schon vor Symptombeginn detektieren zu können, empfiehlt sich die Durchführung einer

Stressechokardiographie, da ein unauffälliger echokardiographischer Befund DMC nicht sicher ausschließen kann [16]. Das Cardio-MRT bietet darüber hinaus noch die Möglichkeit, den kardialen Metabolismus, wie z.B. den Triglyceridstoffwechsel, als weiteren Parameter der kardialen Funktion mit einzubeziehen [18]. Nach neuesten Erkenntnissen ist der Stoffwechsel des Kardiomyozyten bei Typ 2 Diabetikern auf mehreren Ebenen beeinträchtigt. Im Frühstadium der Erkrankung kommt es zu einer subklinischen diastolischen Relaxationsstörung. Eine progressive systolische Funktionsstörung etabliert sich meist erst im weiteren Verlauf des DM[15][18]. Große diagnostische Herausforderungen bestehen bei Abgrenzung zu anderen kardialen Erkrankungen, die mit einer reduzierten Herzleistung oder Herzinsuffizienz einhergehen. In diesem Zusammenhang sei besonders auf die ischämischen Krankheitsbilder, die bei Diabetikern häufig auch in Verbindung mit DMC einhergehen, hingewiesen [19]. Durchblutungsstörungen des Herzmuskels, infolge einer koronaren Herzerkrankung, führen bei chronischer Persistenz zu einer ähnlichen kardialen Funktionseinschränkung wie bei DMC. Aber auch ein dauerhaft pathologisch erhöhter Blutdruck kann zur progressiven Schädigung des Herzens führen. In Folge einer solchen hypertensiven Herzerkrankung kommt es zu konzentrischen Myokardhypertrophie mit verminderter Compliance und daraus resultierender diastolischen Funktionsstörung[20]. Eine Differenzierung ist klinisch sehr schwierig und in vielen Fällen gar unmöglich; hier bedarf es weiterer intensiver Forschung. Die Pathophysiologie, die dieser diabetischen strukturellen Herzmuskelveränderungen zugrunde liegt, ist noch weitestgehend unbekannt. Sicher ist jedoch, dass eine krankhaft veränderte Funktion der kontraktilen Myofilamente ein Schlüsselfaktor dafür darstellt [12].

1.2 Diabetische Stoffwechseleränderungen am Herzmuskel

Aufgrund der durch DM induzierten Stoffwechseleränderungen kommt es zu relevanten Umstellungen des Zellmetabolismus an der Herzmuskelzelle, was sich auch auf

die Kontraktionsfähigkeit des Herzens auswirkt und deshalb an dieser Stelle kurz dargestellt werden soll. Diese Veränderung kann mittels Biomarkern und der Betrachtung von deren Funktion und Einfluss im Organismus qualifiziert und teils quantifiziert werden [12, 21].

Pathophysiologisch relevant ist besonders der durch DM abgewandelte Metabolismus der freien Fettsäuren, welcher über lipotoxische Schädigung an der Herzmuskelzelle zu Lipoapoptose mit Verminderung der kardialen Kontraktilität führt [22].

Ein weiterer biochemischer Komplex, der zum pathophysiologischen Verständnis von DMC beitragen kann, ist das kardiale Ubiquitin-Proteasom-System. Dieser Systemkomplex führt über die Markierung von fehlgefalteten oder beschädigten Proteinen durch Ubiquitin und der anschließenden Aufspaltung im Proteasom zu einem geregelten Proteinhaushalt der Zelle. Studien konnten eine Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems und das daraus resultierende fibrosierende kardiale Remodeling als Frühfolge des DM zurückverfolgen [23-25]. Der aufgrund des immensen Anfalls an fehlgefalteten Proteinen und der Proteasom Dysfunktion resultierende proteolytische Stress führt weiterhin zu kontraktile Dysfunktion im Tiermodell [26].

Neuesten Erkenntnissen zufolge sind enzymatische Veränderungen des kontraktile Apparates der Muskelzelle für die kontraktile Dysfunktion mitverantwortlich. Eine besondere Rolle scheint hierbei der sauerstoffabhängigen beta-N-Acetylglucosamin-Modifikation zuzukommen[27]. Darüber hinaus zeigen diverse Studien den Einfluss von DM auf eine verminderte myofilamentäre Funktion im Tiermodell[28, 29]. Dieser Zusammenhang konnte jedoch noch nicht ausreichend an menschlichem Gewebe nachgewiesen werden. Wesentliche Gründe für die dünne Datenlage zu Studien an menschlichem Gewebe ist die Bereitstellung und Beschaffung verwertbaren Materials, die zusätzlich hohen Fallzahlen und die Problematik einer ausreichend genauen und aussagekräftigen Versuchsmethode gestalten sich bis dato als äußerst schwierig [27, 30, 31].

1.3 Zellulärer Mechanismus der Auswirkungen von DM auf die kardiale Kontraktilität

Die Auswirkungen des DM auf das Kontraktionsverhalten des Myokards wurde in der Vergangenheit im Wesentlichen am Tiermodell untersucht [32]. Es konnte unter nahezu physiologischen Bedingungen eine reduzierte Kontraktionskraft mit verlängerter Kontraktions- und Relaxationsphase bei diabetischen Ratten mittels intakten Ventrikelfasern gezeigt werden [33, 34]. Anfangs wurde als Ursache hierfür die Änderung der intrazellulären Calciumhomöostase als pathophysiologisches Korrelat vermutet [35]. Neusten Studien zufolge ist diese Annahme jedoch falsch und konnte durch diverse Studien widerlegt werden [32]. Vielmehr können strukturelle Veränderungen am Myokard bei langanhaltender Hyperglykämie beobachtet werden. Von diesen strukturellen Umgestaltungen sind besonders die sarkoplasmatischen transversalen Tubuli (T-Tubuli) betroffen [32]. Diese nehmen in der durch Calcium induzierten Calcium-Ausschüttung zur Kontraktionseinleitung eine zentrale Rolle ein. Nachgewiesenermaßen verlieren T-Tubuli im Zuge des Herzversagens ihre funktionsfähige Struktur [36, 37]. Im Zuge dessen verändert und reduziert sich auch ihre Verteilung entlang der Z-Linie in den Sarkomeren der Herzmuskelzelle [38]. Die Umstrukturierung des T-Tubulus Systems führt demnach zu Veränderungen in der Erregungs-Kontraktionskopplung des Kardiomyozyten.

Nicht nur die intrazelluläre Calciumhomöostase hat Einfluss auf das kardiale Kontraktionsverhalten, auch die extrazelluläre Matrix und die Myofilamente determinieren die Kontraktilität der Myozyten [39]. Veränderungen im Kontraktions- und Relaxationsverhalten gehen mit einer Modulation der kontraktilen Proteine einher. So findet innerhalb der Myosinisoenzyme ein Klassenwechsel von schnellen alpha-Fasern zu langsamer arbeitenden beta-Ketten statt [40]. Diese Modifizierung bedingt eine reduzierte Kontraktilität und verlängerte Relaxation am Herzen. Auch die mit dem Myosin während der Kontraktion korrespondierenden Aktinfilamente werden bei chronischer diabetogener Stoffwechsellage in Konformation und Quantität reduziert

[41]. Sowohl im skinned [28, 42] als auch im intact [43] Fibermodell konnte eine verminderte Calciumsensitivität des diabetischen Myokards am Troponin-Tropomyosin-Komplex nachgewiesen werden. Dies führt zu verminderter Relaxation der Kardiomyozyten während der Diastole und somit zu diastolischer Dysfunktion. Die kardiale Compliance bei Diabetikern ist stark reduziert. Die erhöhte Steife der Herzhöhlen resultiert aus einer gesteigerten Expression von Typ 1 Kollagen [44]. Dadurch ist das geordnete Zusammenspiel von Myozyt und extrazellulärer Matrix gestört, wodurch die koordinierte Kontraktion und die damit verbundene Übertragung der entwickelten Kraft stark eingeschränkt wird.

1.4 Therapie der Diabetischen Kardiomyopathie

Die vielschichtige, komplizierte und nur teilweise verstandene Pathophysiologie in Verbindung mit den eingeschränkten diagnostischen Möglichkeiten erschweren die stadiengerechte und ursachenspezifische Therapie der diabetischen Kardiomyopathie [45]. Heutzutage wird versucht, symptomatisch der durch diabetische Kardiomyopathie verursachten Herzinsuffizienz entgegenzutreten. [46, 47]. Dies ist sowohl medikamentös als auch chirurgisch möglich. Darüber hinaus ist man bestrebt, weitere prognoseverschlechternde Komorbiditäten, wie ischämische Herzerkrankungen, arterieller Hypertonus und Dislipoproteinämie mitzubehandeln. [48]. Es existiert jedoch bis dato keine ursächliche Therapie.

1.5 Anatomie der Herzmuskelzelle

Bei Erforschung des Kontraktionsverhaltens der Herzmuskelzelle ist neben dem anatomisch histologischen Wissen die Kenntnis des funktionellen Aufbaus und das Bewusstsein der Uniformität der Herzmuskelfaser von fundamentaler Bedeutung. Strukturell histologisch ist die Herzmuskelzelle der quergestreiften Muskulatur

zuzuordnen. Sie hat somit starke morphologische Ähnlichkeiten zur quergestreiften Skelettmuskulatur, deren vorrangige Funktion in der willkürlichen Bewegung des Körpers besteht [49]. Hierbei wird grundsätzlich - durch die Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten - in ATP chemisch gespeicherte in mechanische Energie transformiert, um eine Kraftentfaltung zu ermöglichen. Die kleinste funktionelle kontraktile Einheit wird als Sarkomer bezeichnet. Beim Herzmuskel liegt die ideale Sarkomerlänge zwischen 1,8 und 2,2 μm . Aufgrund der regelmäßigen Anordnung von Aktin- und Myosinfilamenten zueinander erscheint der Muskel unter vergrößernder Betrachtung quergestreift [50]. Der Aufbau des Sarkomers ist in Abb. 2 dargestellt. Innerhalb der Myofibrille liegen dünne Aktin- und dicke Myosinfilamente benachbart vor. Dadurch entstehen lichtmikroskopisch sichtbare helle und dunkle Streifen. Durch elektrische Reizung verkürzen sich die Sarkomere um etwa die Hälfte. Die Gesamtheit der aufeinander folgenden Verkürzungen erzeugt die makroskopisch wahrnehmbare Kontraktion der Muskelfaser [49]. Für die Kraftamplitude der Muskelkontraktion ist es nun von großer Bedeutung, dass Aktin und Myosin optimal überlappen. Die Membran, die die einzelnen Myofibrillen umhüllt, wird als sarkoplasmatisches Retikulum bezeichnet. Einstülpungen in Längs- oder Horizontalrichtung werden jeweils L-Tubulus und T-Tubulus genannt. Ausgehend von diesen Strukturen können sich Aktionspotentiale ausbreiten und durch Konformationsänderungen von spannungsabhängigen Calciumkanälen zur Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren führen, was zu einer Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und somit zur Kontraktion führt [49]. Durch kontinuierliche Aneinanderreihung von mehreren hundert Sarkomeren werden die Myofibrillen gebildet, die wiederum zu Muskelfaserbündeln angeordnet sind [49].

Charakteristisch für die Herzmuskelzelle ist die Verbindung untereinander durch sogenannte gap junctions, welche eine schnellere elektrische Aktionspotenzialausbreitung begünstigen. Die Ausstattung der Zellmembran mit weitaus mehr Isoformen an verschiedenen Kalium- und Natriumkanälen ist ebenfalls ein Alleinstellungsmerkmal von Kardiomyozyten. Die Größe einer Herzmuskelzelle beträgt zirka 100 μm , so

dass sie im Vergleich zur Skelettmuskelzelle deutlich kleiner ist. Die intakte Herzmuskelfaser ist elektrisch nicht tetanisierbar [49, 50].

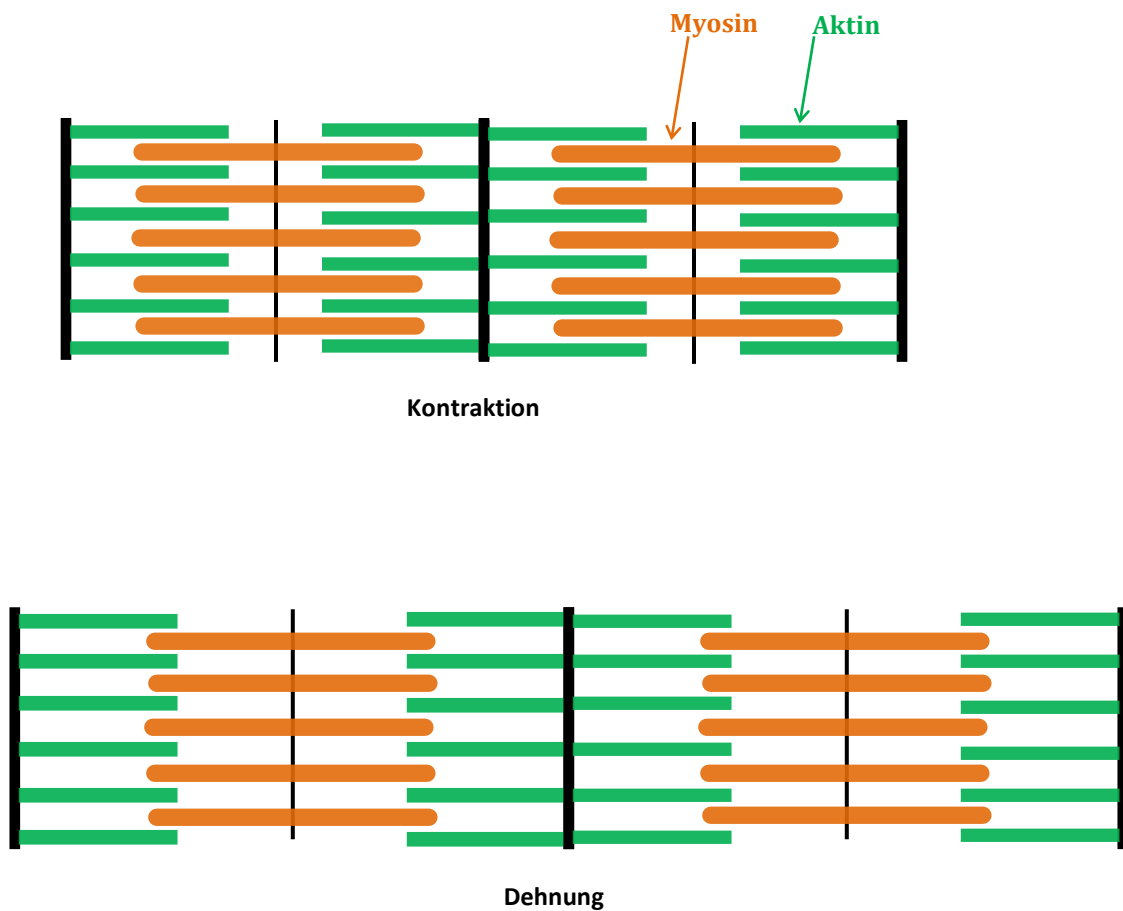


Abb. 1: schematische Darstellung des kontraktiven Apparates der Herzmuskelzelle

1.6 Grundlagen der Herzmuskelkontraktion

Da die Kontraktion des Herzmuskels einen komplexen Mechanismus darstellt, sei an dieser Stelle zu Verständniszwecken auf die Grundlagen der Herzmuskelkontraktion eingegangen.

1.6.1 Elektromechanische Kopplung

Erregungen über das Reizweiterleitungssystem im Herzen führen zu einer über das gesamte Sarkolemm erhöhten spannungsabhängigen Natriumleitfähigkeit, was einen schnellen, intrazellulär ausgerichteten Natriumeinstrom mit verzögerter Öffnung von Calciumkanälen ($Ca_{v1.2}$) und somit langsamen Calciumeinstrom bewirkt. Das dadurch entstandene myofibrilläre Aktionspotenzial hat die Öffnung von Ryanodinrezeptoren des Typs 2 (Calciumfreisetzungskanäle) zur Folge, wodurch es zur Freisetzung von großen Mengen Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum kommt. Dieser Prozess, der als calciuminduzierte Calciumfreisetzung bezeichnet (engl.: Calcium-induced calcium release: CIRS) wird, initiiert durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration um den Faktor 100 von 10^{-7} auf ca. 10^{-5} mol/l den eigentlichen Mechanismus der Muskelkontraktion. Die Transformation von elektrischer Erregung in mechanische Kontraktion wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet [49, 50].

1.6.2 Der Querbrückenzyklus

Die Herzmuskelkontraktion basiert auf dem sogenannten Filamentgleiten, das die ATP-verbrauchende Interaktion zwischen Aktin- und Myosinfilamenten beschreibt. Jeder Myosinkopf kann dabei während der Kontraktion angrenzende Aktin- und Myosinfilamente miteinander verbinden. Infolge einer durch eine Konformations-

änderung bewirkten Kippbewegung des Myosinköpfchens wird das fixierte Aktin-filament Richtung Sarkomermitte bewegt. Die Kraftgenerierung erfolgt aufgrund der spiegelbildlichen Anordnung der Myosinköpfchen zur Sarkomermitte, wodurch sichergestellt ist, dass die Aktinfilamente gegenseitig gleiten können [51-53].

Ist die intrazelluläre Calciumionenkonzentration nach erfolgter Erregung wieder auf den ursprünglichen Wert von ca. 10^{-7} mol/l gesunken, kommt es zur Lösung der Aktin-Myosin-Verbindung durch Kopplung eines ATP-Moleküls an das Myosinköpfchen. Sobald das ATP durch den als ATPase fungierenden Myosinkopf wieder in ADP und Phosphat überführt wurde, koppelt dieser wiederum an Aktin und führt durch Konformationsänderung abermals die kraftgenerierende Gleitbewegung durch, um anschließend erneut in den ATP gebundenen Ausgangszustand zurückzukehren [49, 50].

Das zyklische Koppeln und Lösen von Aktin und Myosin unter Verbrauch von ATP wird als Querbrückenzyklus bezeichnet und stellt die Grundlage der kontraktilen myofilamentären Funktion dar.

1.7 Ziel der Arbeit

Für die Erforschung der isolierten kontraktilen Funktion des Herzmuskels unter Ausschluss von Beeinflussungen und Verfälschungen der Membraneigenschaften der Muskelzelle, welche besonders mit den oben genannten enzymatischen Veränderungen einhergehen, eignet sich besonders die Methode der gehäuteten Muskelfasern. Da bei dem Häutungsprozess sämtliche Membranen chemisch und mechanisch abgelöst werden, können diese im Experiment keinen Einfluss auf die kontraktile Kinetik der Myofilamente ausüben. Unter der Annahme, dass die DM-abhängigen pathologischen Modifikationen am Ventrikel auch identischen Einfluss auf das Vorhofmyokard ausüben, konnte für die Versuche das leichter zugängliche Atrium als Messmaterial verwendet werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten so ebenfalls wieder auf die Ventrikelfunktion übertragbar sein. Vannier konnte diesbezüglich nachweisen,

dass die maximale Kraftentwicklung und die Kalziumsensitivität, die Kontraktionskinetik von geschnittenen Ventrikel- und Vorhoffasern nicht differieren [54]. Ein Unterschied wurde lediglich in den metabolischen Eigenschaften von Ventrikel und Vorhof festgestellt [54].

Die kontraktile Eigenschaften der Herzmuskelzelle können mithilfe der pCa-Kraft Kurve beschrieben werden. Hierbei stellt der pCa-Wert den negativ dekadischen Logarithmus der Kalziumkonzentration dar. Trägt man dementsprechend die durch die Muskelfaser entwickelte Kraft gegenüber der Calciumkonzentration auf, so ergibt sich eine sigmoidale Kurve mit asymptotischen Verlauf. Der pCa-Wert, bei dem die Hälfte der maximalen Kontraktionskraft erreicht wird, wird als pCa₅₀-Wert bezeichnet. Er lässt eine Aussage über die Calciumsensitivität der Muskelfaser zu. Weiterhin kann die maximal entwickelte Kontraktionskraft beurteilt werden.

Akella konnte bereits im Tiermodell eine verminderte Calciumsensitivität von diabetischen Tieren im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv nachweisen [28]. In Folge dessen kommt es zur verminderten Effektivität des Frank-Starling Mechanismus und somit zur myokardialen kontraktile Insuffizienz. Ob dieser beobachtete Effekt auch in humanen Herzmuskelfasern vorhanden ist, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Ziel der vorliegenden Dissertation war einen möglichen Einfluss des DM Typ II auf die links- und rechtsaurikuläre Kontraktionskraft im humanen Herzmuskelgewebe nachzuweisen. Darüber hinaus wurden klinische und patientenindividuelle Parameter zwischen Diabetiker und nicht-Diabetikern verglichen.

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimente an humanen Herzmuskelfasern wurden durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburgs am 15.04.2016 mit dem Identifikationszeichen 59/26-sc genehmigt.

2 Methoden

2.1 Skinned Fibres Methode

Das durchgeführte Verfahren der gehäuteten Muskelfasern (engl. skinned fibres) ermöglichte die spezifische Untersuchung des kontraktiven Apparates einer Muskelzelle, indem sämtliche vorhandene Membranen durch chemische oder mechanische Häutung zerstört werden. So konnte direkt und kontrolliert in das den kontraktiven Apparat umgebende Ionenmilieu eingegriffen werden [55, 56]. Von besonderer Bedeutung war hierbei die Zersetzung der Zellmembran und des sarkoplasmatischen Retikulums, wobei jedoch auch die Kompartiment bildenden Membranen der Zellorganellen (Mitochondrien, Zellkern, u.a) zersetzt wurden; somit haben die für den jeweiligen Muskulaturtyp charakteristischen Ionenkanäle, Carrier und Rezeptoren keinen weiteren Einfluss auf die im Versuch zu untersuchenden Messgrößen. Die „geskinnte“ Muskelfaser war somit aufgrund des Fehlens intakter Membranen nicht mehr in der Lage, einen aeroben oder anaeroben Stoffwechsel und das für die elektrische Erregbarkeit erforderliche Ruhemembranpotenzial aufrechtzuerhalten [57]; weiterhin war die Fähigkeit der Zelle, Homöostase und diverse Signaltransduktionswege auszubilden, nicht mehr gegeben. Die kontraktiven Muskelproteine Aktin, Myosin, Troponin und Tropomyosin wurden durch diese Methodik direkt zugänglich gemacht, und lagen daher frei vor. Somit kann das experimentelle Milieu, welches die Muskelfasern umgibt, exakt definiert und eingestellt werden. Nach dem Häutungsvorgang konnte somit durch Calciumelektrolytlösungen unterschiedlicher Konzentration und Adenosintriphosphat (ATP) als Energieträger eine calciumabhängige Kontraktion des myofibrillären Apparates ausgelöst werden. Faserpräparate ließen sich dafür sowohl aus glatter Muskulatur als auch aus quergestreifter Skelett- und Herzmuskulatur herstellen.

In dieser Dissertation wurde die maximale und stufenweise Kraftentwicklung am humanen Vorhofmyokard des rechten und linken Atriums in Abhängigkeit von der

Calciumionenkonzentration ermittelt.

2.2 Herkunft des verwendeten Myokards

Das gesamte untersuchte Vorhofmyokard stammt von 149 Patienten, welche sich in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg einer elektiven Aortokoronarer Bypass Operation (ACB) unter Verwendung der Herzlungenmaschine im Zeitraum vom 8/2016 bis zum 07/2017 unterzogen haben. Alle Probanden gaben zu der Studie ihr Einverständnis. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universitätsklinik Würzburg liegt ebenfalls vor.

2.3 Einschlusskriterien

Während der obligatorischen präoperativen Voruntersuchung bestand bei sämtlichen Patienten ein Sinusrhythmus oder ein permanentes beziehungsweise paroxysmales Vorhofflimmern.

Die Unterscheidung zwischen Diabetiker und Nicht-Diabetiker erfolgte in der vorliegenden Dissertation anhand des Nüchternblutzuckerwertes von >126 mg/dl, oder wenn ein DM in der Vorgeschichte dokumentiert, oder entsprechend mit Antidiabetika/Insulin therapiert wurde.

Alle Operationen zur Herzohrprobengewinnung wurden mit Hilfe der Herzlungenmaschine durchgeführt. Es wurden ausschließlich Patienten mit koronarer Bypass-Operation (CABG: Coronary Artery Bypass Grafting) zur chirurgischen Revaskularisation von ischämischen Myokardarealen inkludiert.

2.4 Ausschlusskriterien

In erster Linie galt das Nichterfüllen eines der oben beschriebenen Einschlusskriterien

als striktes Ausschlusskriterium; zusätzlich wurden für diese Dissertation weitere Ausschlussparameter definiert.

Bei strikter Ablehnung der Studie, der durchzuführenden Operation oder der diagnostischen Untersuchungen werden Probanden nicht in die Studie eingeschlossen. Gleiches galt für Patienten, welche einen herzchirurgischen Notfall darstellten, z.B. der akuten Myokardinfarkt die Aortendissektion nach Stanford Typ A, Patienten mit Endokarditis oder Patienten im kardiogenen Schock.

.
Befand sich der potenzielle Proband in einem dekompensierten Zustand seiner Herzinsuffizienz (nach New York Heart Association: NYHA 4), war seine Teilnahme an der Studie ebenfalls ausgeschlossen.

Um ein von der Operationsart unabhängiges Ergebnis sicherzustellen, wurden auch Patienten mit folgenden Operationsarten nicht eingeschlossen:

- Herzklappenoperationen: (Reparatur/Rekonstruktion körpereigener Herzklappen; Implantation von Kunst- oder Bioherzklappen)
- kombinierte Klappen- und Bypasschirurgie
- Aorten Chirurgie
- Korrektur von kongenitalen Fehlbildungen

2.5 Rekrutierung der Probanden

Die im Zuge dieser Dissertation durchgeführten muskelphysiologischen Experimente und die anonymisierte sowie pseudonymisierte Speicherung von klinisch sowie epidemiologischen Daten wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburgs mit dem Zeichen 59/16-sc vom 15.04.2016 geprüft. Dabei wurden keine ethischen oder rechtlichen Einwände erhoben.

Bei den Probanden handelte es sich um Patienten der Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Würzburgs, welche sich einer elektiven Bypass Operation

(CABG) unter Verwendung der Herzlungenmaschine im Zeitraum von 8/2016 bis 07/2017 unterzogen hatten.

Präoperativ erfolgte ein ausführliches Aufklärungsgespräch über Operation, Studie und Verwendung des entnommenen Myokards durch den zuständigen Stationsarzt. Dabei wurde explizit auf die Freiwilligkeit der Teilnahme an der Studie hingewiesen sowie auf die Möglichkeit, sein Einverständnis jederzeit widerrufen zu können. Bei der Aufklärung der potentiellen Teilnehmer war insbesondere auf das Verständnis folgender Punkte zu achten und ggf. durch Rückfragen sicherzustellen: Art der Untersuchungen, Widerrufbarkeit der Einwilligung ohne Nachteile für den Patienten und ohne Angaben von Gründen, das Recht, Fragen zu stellen, und das Auskunftsrecht über die gespeicherten Daten. Die Einwilligung wurde schriftlich dokumentiert.

2.6 Datenerhebung

In der vorgelegten Dissertation wurden sowohl experimentelle als auch klinische Daten erhoben, die einer klinikinternen Datenbank pseudonymisiert gespeichert wurden.

Die in der Klinikroutine standardmäßig erhobenen Basisdaten von körperlicher Untersuchung, allgemeine demographische Daten wie z. B. Geschlecht, Alter, Diagnosen, Medikamenteneinnahme, Familienanamnese hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen, präoperative Befunde aus Koronarangiographie und anderen Untersuchungen etc. sowie Vor- und Begleiterkrankungen wurden pseudonymisiert in die Studiendatenbank aufgenommen.

Die Herzfunktion wurde nach den aktuell Richtlinien der amerikanischen Gesellschaft für Echokardiographie auf der Basis der mittels präoperativer Echokardiographie ermittelten Datenwerte beurteilt [58]; die Untersuchung wurde standardisiert durchgeführt.

Alle im Rahmen der Studie ermittelten Daten wurden durch Codierung mit einer probandenspezifischen Identifikationsnummer („Studien-ID“) pseudonymisiert; somit

erfolgte die gesamte Datenerfassung/-verarbeitung und Biomaterialabnahme/-verarbeitung unter strikter Einhaltung der Datenschutzrichtlinien, die durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg geprüft und bestätigt wurde.

2.7 Chirurgische Vorgehensweise der Herzohrmaterialgewinnung

Nach Vollnarkoseeinleitung, Lagerung und sterilem Abdecken wurde ein Hautschnitt vom Jugulum zum Xiphoid durchgeführt. Anschließend wurde das Sternum freipräpariert. Es erfolgte eine mediane longitudinale Sternotomie mit anschließender Hämostase. Beide Brustwandarterien (Aa mamariae internae) wurden im nächsten Schritt mit Hilfe des Elektrokauters aus dem Gefäßbett freipräpariert. Um die Eignung als Bypassgraft sicherzustellen, wurde der Fluss über beiden Graftarterien geprüft; bevor das Perikard geöffnet und mit Hochnähten fixiert wurde, wurde der verbliebene Thymus teilreseziert. Es erfolgte die optische Inspektion der Zielgefäße; daraufhin wurde eine auf das Patientengewicht abgestimmte Dosis Heparin zur Vorbereitung auf den Anschluss an die Herzlungenmaschine (HLM) appliziert, und ein epiaortales Scanning der Aorta ascendens zum Ausschluss von großflächigen Verkalkungen durchgeführt. Im Anschluss an die Kanülierung der Aorta ascendens wurde die venöse Kanüle - unter vorsichtiger Resektion eines ca. 2 cm² großen Stückes des rechten Atriums, um die darin enthaltenen Muskeltrabekel mechanisch nicht zu beschädigen,- eingebracht, und die HLM angefahren. Während der Operation wurde der Patient in eine moderate Hypothermie von 32 °C versetzt; danach wurde bei vollem Fluss der extrakorporalen Zirkulation und vollständig entlastetem Herzen die Aorta ascendens abgeklemmt; die antegrade Wurzel-Kardioplegie nach Buckberg erfolgte für 4 Minuten, danach repetitiv alle 20 Minuten für 2 Minuten. Dann wurde zuerst das linke Vorhofrohr dargestellt und reseziert. Daraufhin erfolgte der Verschluss des linken Herzohres nach Blalock und ein Verkleben mit Fibrin. Anschließend wurden die stenosierten Kranzgefäße auf der Herzoberfläche inspiziert, distal der Stenose eröffnet und

anschließend mit einer 1,0 oder 1,5 mm dicken Sonde sondiert; danach erfolgte die Revaskularisation mit den vorher präparierten Aa mammae in fortlaufender Nahttechnik, und die Prüfung der Durchgängigkeit der Anastomose. Je nach Alter und Komorbidität wurden LAD (Ramus interventrikularis anterior oder RIVA) und RCX (Ramus circumflexus) leitliniengerecht mit beiden Aa mammae versorgt, Teilweise wurden auch die Vena saphena magna aus dem rechten oder linken Ober- bzw. Unterschenkel in Abhängigkeit von der Anzahl der zu versorgenden Gefäße verwendet. Wenn nötig wurden beide IMA Gefäße als T-Graft für die komplett arterielle Versorgung des Vorder- und Seitenwand anastomosiert. Je nach Stenosegrad wurde die RIMA auch in situ belassen und für die Revaskularisation der hochgradig verschlossenen RVA verwendet. Die Entscheidung hierzu erfolgte in Abhängigkeit der Morphologie der Gefäße im Herzkatheter. Bei höhergradigen RCA-Stenosen (Rechte Koronararterie) wurde aber auch die rechte Aa mammae in situ zur Revaskularisation der rechten Koronararterie verwendet, und die LAD dann ebenfalls mit der linken Aa mammae versorgt. Bevorzugt wurde eine überwiegend arterielle Koronarrevaskularisation. Nach Vervollständigung der Koronaranastomosen und Prüfen der Flüsse über den Anastomosen und nach ausreichendem Entlüften und Blähen beider Lungen wurde ein Hot Shot (warme Reperfusion) appliziert und die Aortenklemme gelöst; bei ausreichender Reperfusion wurde dann mit dem weaning der Herz-Lungen-Maschine begonnen. In der Zwischenzeit wurde der Patient routinemäßig mit einem RA (rechtes Atrium) und RV (rechter Ventrikel) Schrittmacherdraht versorgt, und die Drainagen wurden eingelegt. Die Die Abbildung 2 und 3 zeigen die oben beschriebende Blalock Naht.

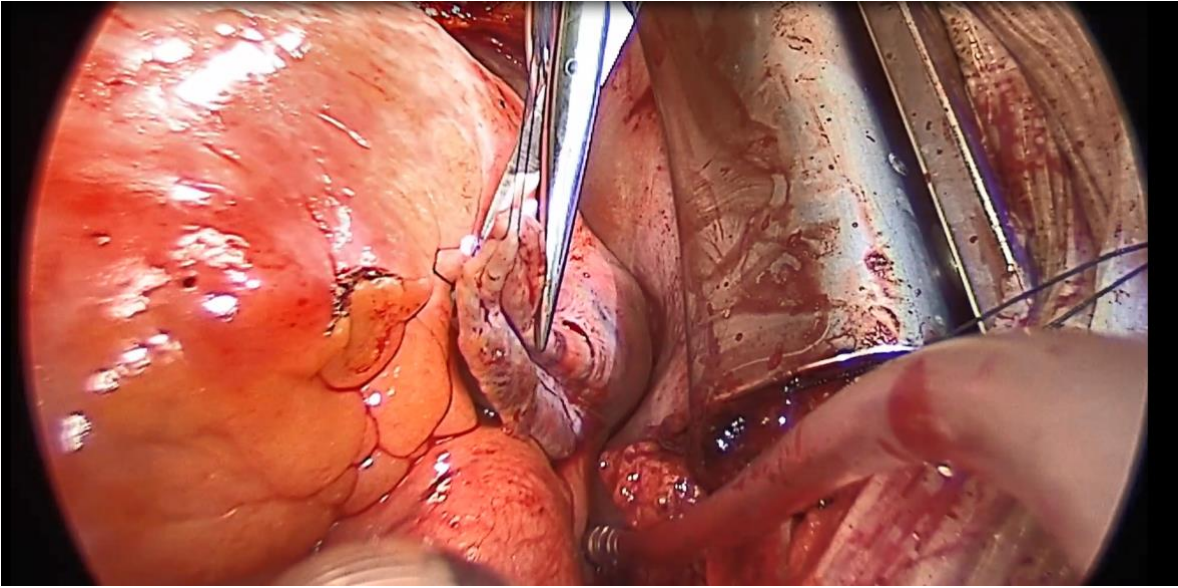


Abb. 2: Amputation des rechten Herzohres

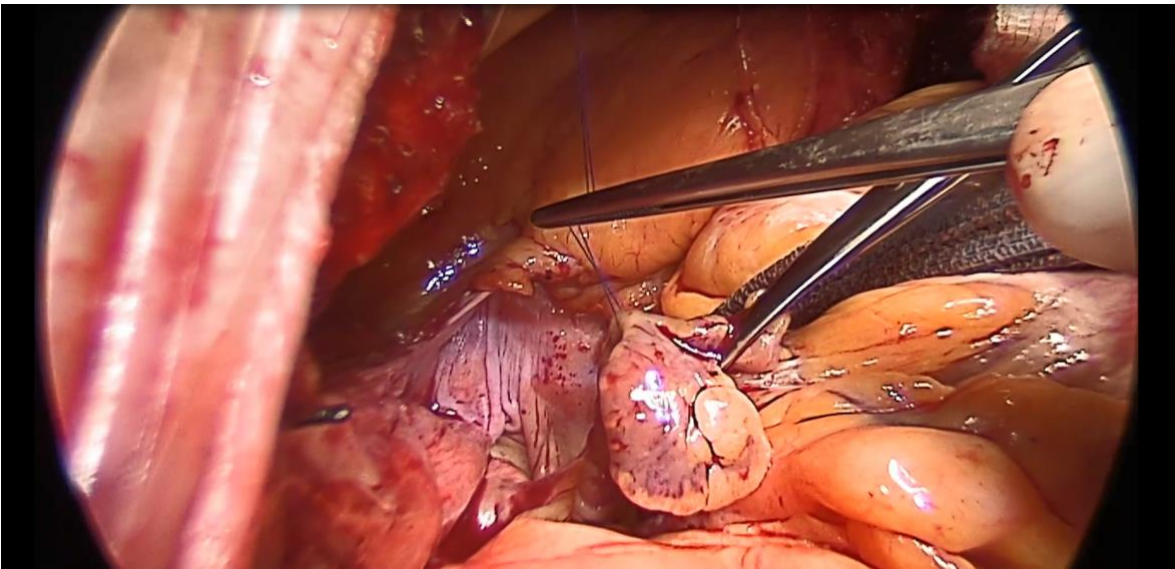


Abb. 3: Amputation des linken Herzohres

Nach Beendigung der Hämostase und Verschluss des Brustkorbes erfolgte die Verlegung des Patienten auf die hauseigene kardiochirurgische Intensivstation.

Ein bei einer derartigen Operation isoliertes linkes Herzohr ist in Abb. 5 dargestellt. Sowohl die trabekuläre Struktur des Vorhofinneren als auch eine signifikante kardiale Verfettung sind deutlich erkennbar.



Abb.4: Herzohr nach operativer Entfernung

2.8 Herzohraufarbeitung

Nach Explantation der Herzohren wurden diese direkt an der dafür vorgesehenen OP-Schleuse vom Laborpersonal abgeholt und umgehend in eine mit Carbogen (Gasgemisch aus 5 Vol.% CO₂ und 95 Vol.% O₂) begaste BDM (Butan-2,3-dion-Monoxim) - Lösung eingelegt, welche durch ihre konservierenden, myoprotektiven Eigenschaften weiteren mechanischen Stress aufgrund des Transports oder des Häutungsvorganges auf das Muskelgewebe minimiert [59, 60]; außerdem induziert BDM konzentrationsabhängig die Blockade der Faserkontraktilität samt der myofibrillären ATPase [61, 62].

Aus der folgenden Tabelle ist die Konzentration der verwendeten BDM-Pufferlösung ersichtlich.

g/ 100 ml	mmol/l	Substrat	Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	g/ 50 ml
----------------------	---------------	-----------------	---------------------	-------------------------------------	---------------------

0,3000	30	Butan-2,3-dion- Monoxim	$C_4H_7NO_2$	101.1	0,1500
--------	----	----------------------------	--------------	-------	--------

Tabelle 2: Zusammensetzung des BDM-Puffers

Besondere Vorsicht war bei der Herstellung des BDM-Puffers geboten. Da BDM toxisch für Atemwege und Haut ist, erfolgte die Herstellung nur mit Mund- und Nasenschutz und Handschuhen. Das auf einer Feinwaage portionierte BDM wurde in 50-ml einer Krebs- und Henseleit-Pufferlösung unter ständigem Rühren gelöst; zur Einstellung eines konstanten pH-Wertes von 7,0 wurde die Pufferlösung anschließend ca. 5 min mit Carbogen begast.

Die begrenzte Haltbarkeit des BDM-Puffers von nur ca. 8 h machte eine Frischansetzung an jedem neuen Versuchstag erforderlich.

Der Krebs-Henseleit Puffer (KHP) wurde in den frühen 1930er Jahren durch Hans Krebs und Kurt Henseleit entwickelt [63]; prinzipiell stellt der KHP eine Verbesserung der Ringer Lösung dar. Seine Zusammensetzung ermöglicht ein physiologisches Abpuffern von Versuchslösungen zur unverfälschten Untersuchung von biologischen Systemen. Aufgrund seiner myoprotektiven Eigenschaften kann der KHP sogar als Kardioplegielösung zur Protektion des Myokards vor Ischämie eingesetzt werden [64]. Im vorliegenden Experiment wurde der KHP mit dem BDM Puffer gemischt, um eine Konservierung und Fixierung der Kardiomyozyten zu gewährleisten.

g/ 500ml	mmol/l	Substrat	Summen- formel	Molekular- gewicht [g/mol]	g/l	g/2 l
3,450	118,07	Natriumchlorid	NaCl	58,44	6,90	13,80
1,100	11,10	Glucose Monohydrat	$C_6H_{12}O_6^*$ H ₂ O	198,17	2,20	4,40
0,175	4,70	Kaliumchlorid	KCl	74,56	0,35	0,70
1,050	25,00	Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	84,01	2,100	4,20

0,082	1,20	Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	136,09	0,164	0,328
0,148	1,20	Magnesiumsulfat-7-Hydrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,47	0,296	0,592
0,132	1,80	Calciumchlorid Dihydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,02	0,264	0,528

Tabelle 3: Zusammensetzung des KH-Puffers

Der KHP wurde bei 20°C im Labor angesetzt; exemplarisch wird die Synthese von 500 ml Puffer beschrieben. Zuerst wurden die abgewogenen Substanzen in ca. 300 ml destilliertem Wasser gelöst; die nach anschließendem Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 500 ml erhaltene Lösung wurde aliquotiert. Der Puffer wurde bei -30°C eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut, wodurch seine Haltbarkeitsdauer erhöht wurde. Eine titrimetrische Bestimmung des pH-Wertes war nicht erforderlich, da sich durch das Begasen mit Carbogen automatisch ein pH-Wert von 7,0 einstellte.

2.9 Verarbeitung und Häutung der Muskelfasern

Nach Fixierung der Herzohren in BDM wurde das Muskelgewebe im Präparationspuffer gewaschen, um das BDM vollständig zu entfernen. Die Zusammensetzung des Präparationspuffers zeigt die folgende Tabelle:

250,0 ml	Glycerin 100%			92,10	500 ml	1000 ml
g/ 0,50 l	mmol/l	Substrat	Summenformel	Molekular- gewicht [g/mol]	g/ l	g/ 2l
0,681	20,0	Imidazol	$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$	68,08	1,3616	2,7232
0,325	10,0	Natriumazid	NaN_3	65,01	0,6500	1,3000
0,760	4,0	EGTA	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	380,35	1,5214	3,0428
0,154	2,0	Dithioerythritol*	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	154,25	0,3086	0,6172

0,508	5,0	Magnesiumchlorid Hexahydrat	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	203,30	1,0166	2,0332
1,378	5,0	Adenosine-5'- triphosphate- Na_2 - salt**	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 \cdot \text{Na}_2$	551,10	2,7556	5,5112

Tabelle 4: Zusammensetzung des BDM-Puffers

Die Herstellung einer Menge von 500 ml des Puffers erfolgte unter Kühlung mittels einer Eismischung bei ca. -4°C. In einem Becherglas wurden nach Auflösung der abgewogenen Substanzen in 200 ml destilliertem Wasser unter ständigem Rühren 250 ml Glycerin hinzugeben, bis eine homogene Lösung erhalten wurde; mittels 1-m- KOH oder 1-m-HCl-Lösung erfolgte anschließend die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0; schließlich wurde die Lösung auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Verwendung des Präparationspuffers in der skinned-fibre-Methode ist vielfältig. Zum einen dient er als Umgebungsmedium bei der Präparation der Muskeltrabekel aus dem Vorhofrohr und beim Häutungsvorgang, zum anderen dient er als Lager- und Speichermedium der chemisch geskinnten Trabekel bei -30°C. Unter optischer Vergrößerung konnte aus dem Rohmaterial eine ca. 2 mm große Trabekel isoliert werden; ein derartiger abgetrennter Trabekel ist in Abb. 5 dargestellt.



Abb.5: isolierter nicht gehäuteter Trabekel

Anschließend wurde der Trabekel mittels einer Triton X100 enthaltenden Häutungs-
lösung chemisch gehäutet. Bei Triton X100 handelt es sich um ein zur Gruppe der
nichtionischen Tenside gehörendes p-tert.-octyl-Phenol-Derivat. Aufgrund seiner
amphiphilen Eigenschaft vermag Triton X100 die Doppellipidschicht von Zellmem-
branen zu zerstören, ohne die Membran oder intrazelluläre Proteine zu denaturieren
[57].

Die genaue Zusammensetzung des Häutungspuffers ist aus der folgenden Tabelle
ersichtlich.

µl/10 ml	Komponente
9900 µl	Präparationspuffer
100 µl	Triton-X100

Tabelle 5: Zusammensetzung der chemischen Häutungslösung

Die Herstellung von 10 ml des Häutungspuffers erfolgte jeweils direkt am Versuchstag durch Mischung von 9,90 ml Präparationspuffer mit 0,10 ml Triton X100.

Die Skinnlösung wirkte exakt 24 Stunden bei -20°C unter ständiger Durchmischung und Rotation auf das Muskelgewebe ein [65, 66]. Das gehäutete Muskelgewebe wurde vor der folgenden Aufbewahrung bei -20 °C durch Spülen mit glycerolhaltigem Präparationspuffer von der Triton X100-haltigen Skinnlösung befreit. Eine unzureichende Kühlung des Probenmaterials kann die Qualität der Muskelfasern und ihr kontraktiles Verhalten stark beeinträchtigen. Bei einer Aufbewahrungstemperatur von 0 °C verliert die Muskelfaser im Mittel bereits 50% ihrer Ursprungskraft. Dabei verhindert das im Präparationspuffer enthaltene Glycerol, dass die Muskelfasern während der Lagerung vollständig gefrieren, was der Degeneration des kontraktiles Apparates entgegenwirkt. Die so behandelten Trabekel haben eine Haltbarkeit von ca. einem Monat [67-69]. Die maximale Lagerungszeit der isolierten Präparate ist stark von den Anforderungen des jeweiligen Experiments abhängig. Je sensibler die Messergebnisse desto kürzer sollte die gekühlte Aufbewahrungszeit sein. Eine umgehende Verwendung der vorbehandelten Muskelfasern war somit anzustreben. Der Zweck der Lagerung bestand darin, weitestgehend unabhängig vom Tages-OP-Programm zu sein.

Die so chemisch vorbehandelten Muskeltrabekel benötigten jedoch weitere Vorbereitung, um im Skinned Fiber Versuchsmodell eingesetzt werden zu können. Unter dem Mikroskop wurden die Trabekel mit Hilfe zweier mikrochirurgischer Herz-OP-Pinzetten der Firma Aeskulap in einer Präparationspufferlösung mechanisch gehäutet. Dabei war es von größter Wichtigkeit, die Muskelfasern weder zu überdehnen noch zu sehr zu stauchen. Zuerst wurde daher durch vorsichtiges Längsstreifen mit den Präparationspinzetten das restliche Sarkolemm vom Muskelgewebe entfernt. Das so präparierte Muskelbündel erscheint unter Vergrößerung glatt begrenzt und homogen gelb bis orange gefärbt.

Mit einem scharfen Operationsskalpell wurden im Zuge des Präparationsvorgangs längs kleine Muskelstränge abgetrennt und schonend auf die benötigte Dicke von ca.

100-300 μm präpariert [70, 71]. Eine für den Versuch geeignete Muskelfaser weist eine durchgehende und nicht unterbrochene Struktur sowie eine Länge von 4 bis 5 mm auf. Beim gesamten Präparationsvorgang ist darauf zu achten, dass die Dehnung der Herzmuskelfasern nicht mehr als 30 Prozent ihrer Originallänge beträgt [72, 73]. Wichtig war, die so vorbereiteten Herzmuskelfasern bis zu Versuchsbeginn auf eine Temperatur von 20 °C zu temperieren, um vorzeitigem degenerativem Abbau durch Proteindenaturierung vorzubeugen.

2.10 Versuchsaufbau

Sämtliche in dieser Dissertation durchgeführten Experimente wurden mit der Kraftstation und dem Aufzeichnungsprogramm Myodat der Fa. Myotronic UG, Heidelberg, Germany realisiert. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 6 und Abb. 7 schemenhaft und realitätsgetreu dargestellt

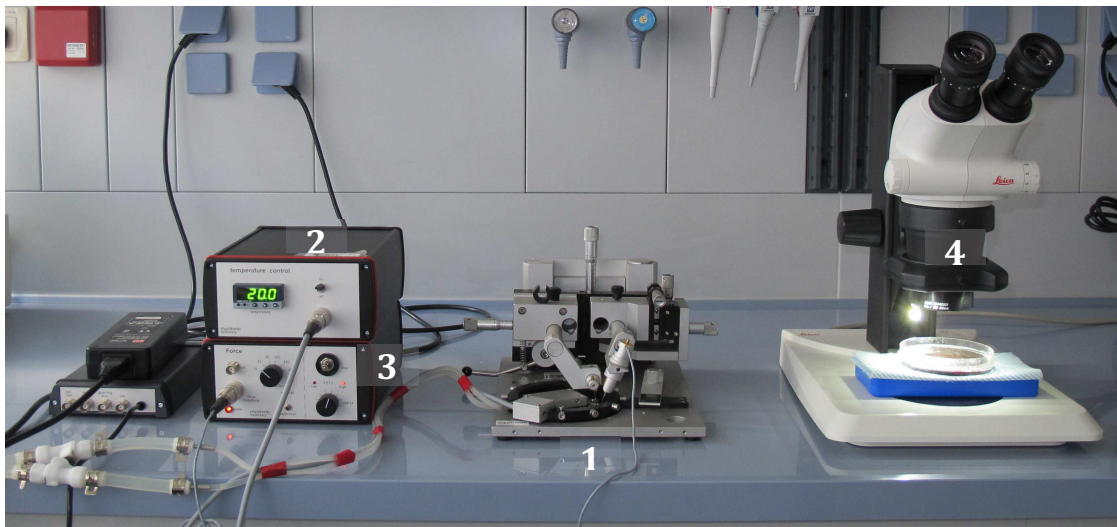


Abb. 6 : Darstellung des Versuchsaufbaus mit **1** Kraftstation ; **2** Kühlung ; **3** Kraftwandler ; **4** Mikroskop mit Arbeitsplatz

Damit die Faser konstant bei optimaler Temperatur während der gesamten Versuchsdurchführung arbeiten konnte, war die Messapparatur mit dem in Abb. 7 gezeigten Kühlungssystem der Firma Myotronic UG, Heidelberg, Germany verbunden. Die für das Experiment festgelegte Lösungstemperatur betrug 20 °C in Anlehnung an die in der Literatur etablierten Versuchsbedingungen [74, 75]. Die kontinuierliche und konstante Temperierung der Kraftansatzlösungen beugte einer Schädigung der geschnittenen Muskelfasern vor. Dennoch können in den Versuchslösungen enthaltene Enzyme noch suffizient arbeiten [76, 77]. Mit Hilfe zweier Pinzetten wurde die gehäutete und präparierte Herzmuskelfaser zwischen zwei Zangen des Gerätes eingespannt und umgehend in die RL eingetaucht, um eine Austrocknung des Muskels zu vermeiden. Eine so eingespannte Muskelfaser ist vergrößert in Abb. 7 dargestellt:

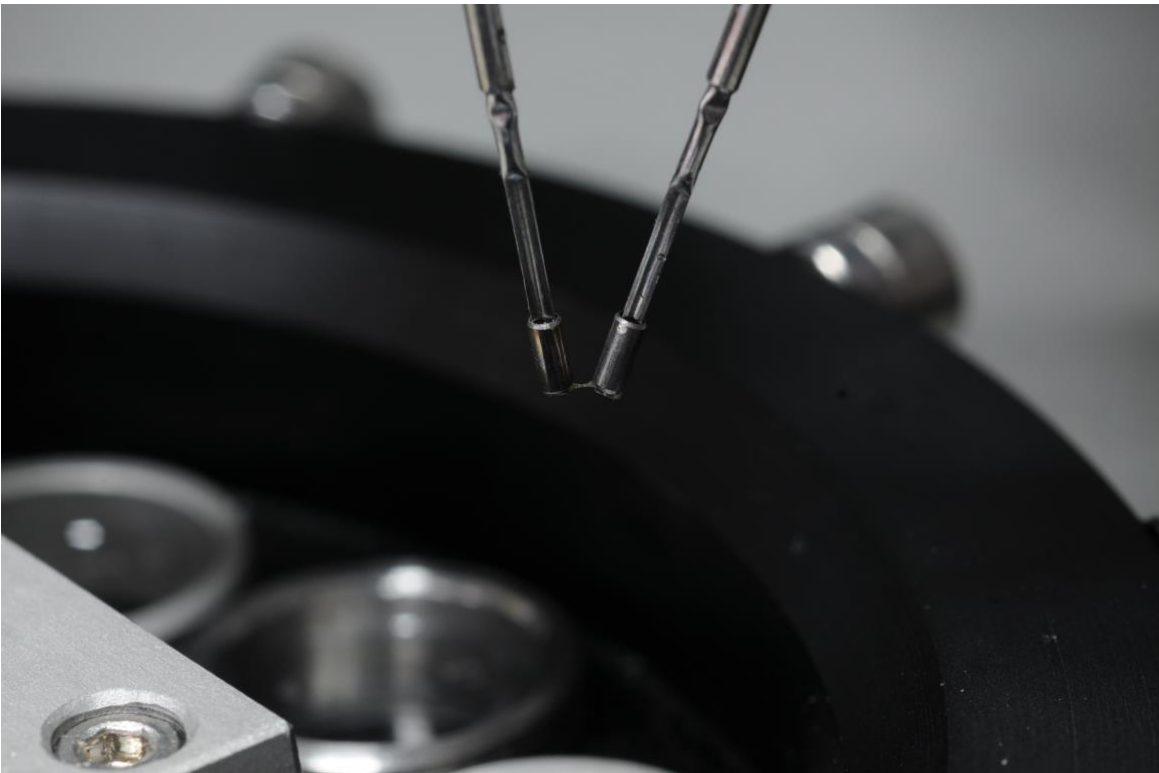
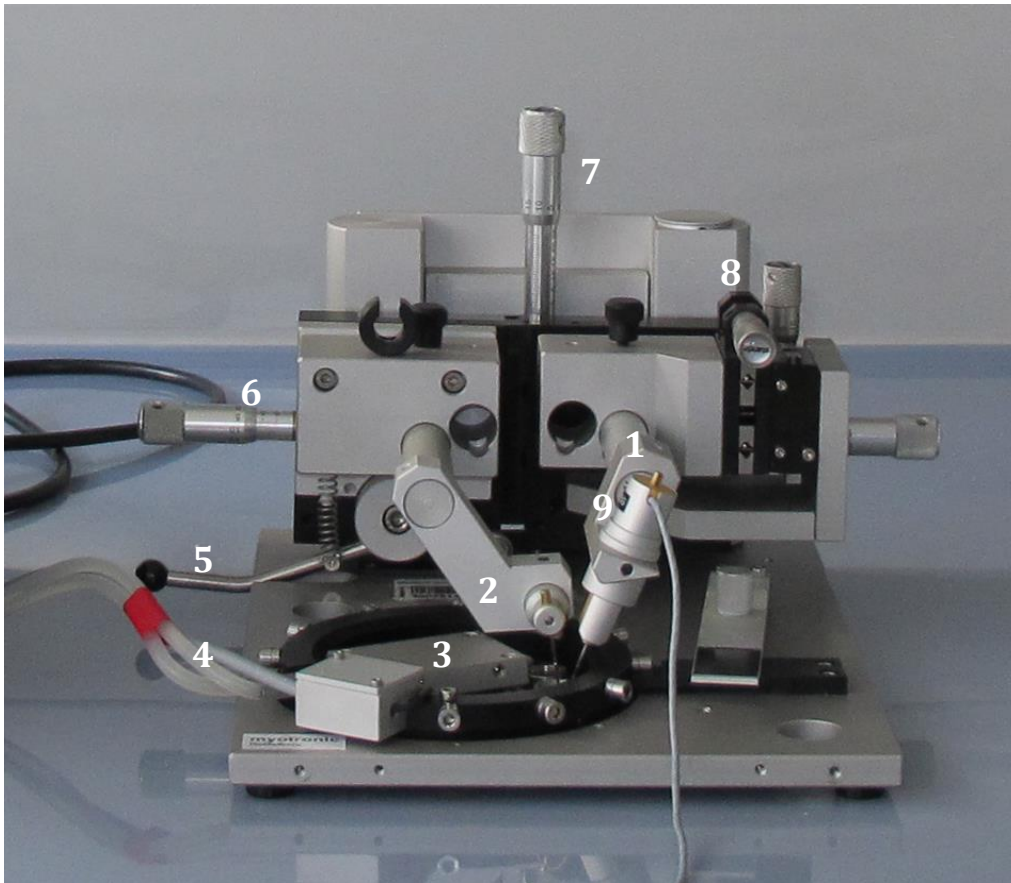


Abb. 7: eingespannte gehäutete Herzmuskelfaser

Dabei war darauf zu achten, die Faser weder zu gestaucht noch zu straff gespannt zu befestigen. Eine zu extreme Dehnung kann zu irreversibler mechanischer Zerstörung

des äußerst empfindlichen kontraktilen Apparates führen, während eine zu entspannte Fixierung des Muskels in der Muskelmaschine zum bogenförmigen Durchhängen führt, was eine deutliche Kraftminderung zur Folge hat. Dieses Phänomen geht auf den Frank Starling Mechanismus zurück [78]. Er beschreibt den Zusammenhang zwischen Füllung und Auswurfleistung des Herzens [79]. Die von der Herzmuskelzelle generierte Kraft in vivo hängt in erster Linie von der Vorlast ab. Diese erhöht im vitalen Herzmuskel die Vorspannung vor der Kontraktionsphase. Durch Erhöhung des enddiastolischen Volumens mit daraus resultierender Dehnung der Sarkomere tritt eine optimale Überlappung der Aktin und Myosinfilamente ein. Eine maximale Kraftentwicklung wird bei einer Sarkomerlänge von ca 2,3 μm erreicht [49, 50]. Wird diese Länge durch weitere Dehnung überschritten, kommt es zu einer Kraftabnahme. Ursächlich hierfür ist ein unzureichendes Überlappen der kontraktilen Filamente. Im optimalen Überlappungsbereich wird darüber hinaus auch eine Erhöhung der Calciumsensitivität beobachtet. Es resultiert eine gesteigerte Affinität der Calciumionen zur Myofibrille. Eine Steigerung der Vorlast wurde im hier untersuchten Versuchsaufbau durch mechanische Dehnung der fixierten Muskelfaser simuliert. Diejenige Muskellänge, bei der keine Muskelkraft generiert wird, ist als „slack length“ (SL) definiert. Mit Unterstützung der seitlich angebrachten Millimeterschrauben war die eingespannte Muskelfaser um ca. 20-30 % ihrer ursprünglichen Länge (SL) zu dehnen, da laut Literatur dadurch eine optimale Vordehnung für die maximale Kraftentwicklung erzeugt wird [80, 81]. Die in diesem Experiment gemessene Kontraktion lässt sich somit als isometrische Kraftentwicklung einordnen, da sich die Muskellänge nicht verändert, und die künstlichen Ansatz- und Ursprungspunkte (repräsentiert von den Haltepinzetten) sich nicht annähern [80-82]. Durch den in Abb. 8 gezeigten Hebemechanismus ließen sich die beiden Zangen samt eingespannter Faser aus dem die RL enthaltenden Gefäß herausheben und nach entsprechender Drehung des darunterliegenden Rotationsmagazins wieder in das nächste Töpfchen der Meßreihe absenken. Der Vorgang des Gefäßwechsels wurde so oft durchgeführt, bis der letzte pCa-Wert vom Programm erfasst war.



**1 Force Transducer ; 2 Pinzette 2 ; 3 Rotationsmagazin ; 4 Kühlungsschläuche ;
5 Hebemechanismus ; 6 Dehnungsschraube ; 7 Millimeterschraube (vertikal) ;
8 Millimeterschraube (horizontal) ; 9 Pinzette 1 .**

Abb. 8: Aufbau der Muskelmaschine

Der Kraftwandler (Force Transducer) an Pinzette 1 nahm die in den Einzelschritten erzeugte Kraftentwicklung elektronisch auf und leitete diese über einen Verstärker an den Computer und das Datenauswertungssystem Myodat weiter.

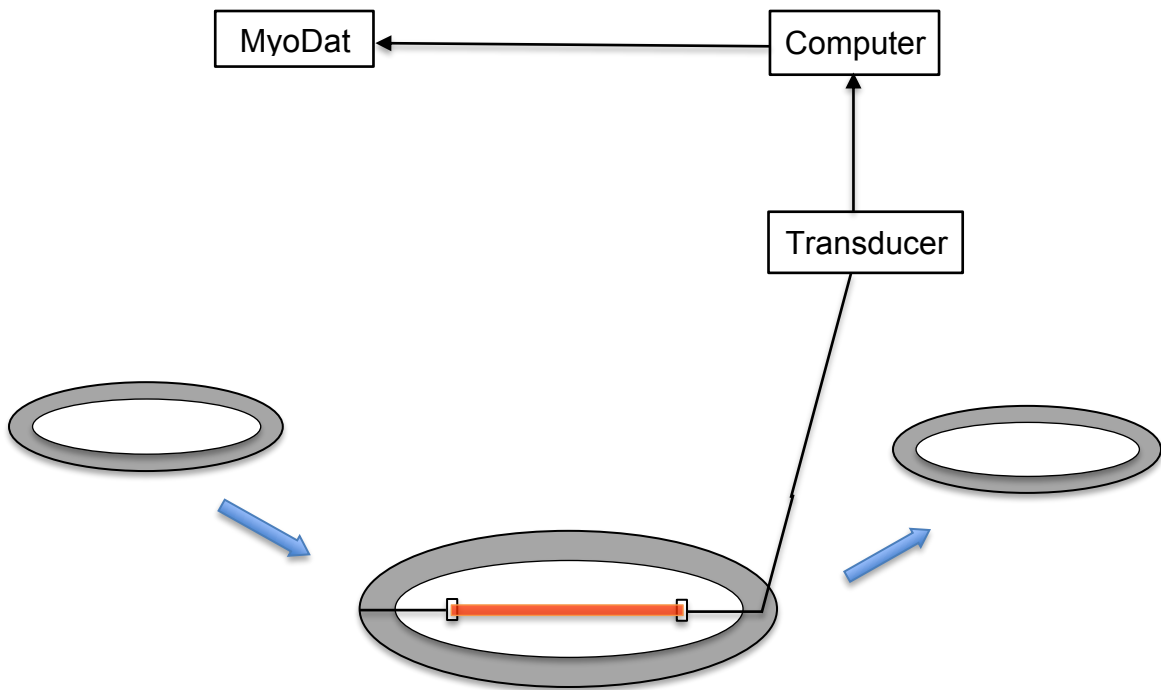


Abb. 9: schematische Darstellung der elektronischen Kraftdatenaufzeichnung

Sobald die vom Programm aufgezeichnete Meßkurve einen konstanten Kraftwert (steady state) anzeigte, wurde dieser in einem in der Software integrierten Modul gespeichert. Nach Abschluss der Messung erfolgte die Auswertung der für die einzelnen pCa-Punkte ermittelten und abgespeicherten Kraftwerte sowie deren graphische Darstellung; zusätzlich wurden auch die Werte für Standardabweichung, pCa₅₀ und Hill-Koeffizienten jeder Einzelmessung berechnet und in der Graphik visualisiert; schließlich wurden die gesamte Messkurve einschließlich der ihr zugrunde liegenden Meßdaten separat abgespeichert.

2.11 Aktivierung der gehäuteten Fasern

Die für die Herstellung der Aktivierungslösung verwendeten Salze und Flüssigkeiten sollten grundsätzlich in ihrer Konzentration der intrazellulären Matrix entsprechen; jedoch war darauf zu achten, diese so zu modifizieren, dass die für den Versuch

erforderlichen Zusätze in der entsprechenden Konzentration vorhanden waren. besonders relevant waren in diesem Zusammenhang die physiologisch höheren Konzentrationen der Puffersubstanzen, der Chelatbildner und des ATP-Regenerationssystems des Creatinase-Enzymkomplexes [83].

Wichtigste Voraussetzung für den optimalen Versuchsablauf war die Berechnung der Konzentration der freien Calciumionen für jede einzelne pCa-Stufe. Die Basis für die dazu durchgeführten Berechnungen stellten die von Fabiato [84] beschriebenen Methoden dar, mit deren Hilfe ein komplexes Ionen-Puffer-System quantitativ charakterisiert werden kann. Physiologisch liegt die Konzentration der Calciumionen im Sarkoplasmatischen Retikulum im Intervall von 0,1-1,0 mmol l⁻¹ ; die am Ionen-gleichgewicht beteiligten Mg²⁺-Kationen , die hauptsächlich an ATP gebunden als Mg-ATP-Komplex mit einer Konzentration von 3,0-5,0 mmol l⁻¹ vorliegen, und die jeweils in einer Konzentration von 0,1 - 3,0 mmol l⁻¹ frei intrazellulär vorhandenen K⁺ - und Na⁺-Kationen , deren Summe wiederum 170 mmol l⁻¹ beträgt, bestimmen die Ionenstärke in einem Bereich von ca. 0,15 - 0,25 mmol l⁻¹ ; dieser Konzentrationsbereich war ebenso wie ein pH-Intervall von 6,90 - 7,15 strikt einzuhalten, um die komplexe Interaktion der Ionen nicht zu beeinflussen [85, 86]. Während des Messvorganges war eine konstante Temperatur von 22 °C einzuhalten, um einer vorzeitigen Degeneration der Muskelfasern durch zu hohe Temperaturen vorzubeugen. Ebenso war auf eine genaue Einstellung des pH-Werts zu achten, da selbst geringfügige Abweichungen die Calciumsensitivität der Muskelfaser senken mit der Folge einer Verminderung der Kraftwerte [68, 85, 87]. Da Magnesium als Cofaktor für die Kontraktion des Muskels fungiert, konnte eine Erniedrigung seiner Konzentration zu einem Kraftabfall führen [88].

Die für die einzelnen pCa-Stufen benötigte Menge an Calciumchlorid (CaCl₂) wurde unter Zuhilfenahme des Programms „Maxchelator“ der Universität Stanford berechnet und ist in Tabelle 6 dargestellt [89-91]. Für die Berechnung der jeweiligen zur Aktivierung benötigten Konzentration an Ca²⁺-Kationen war die Verwendung der Gesamtkonzentration an Ca²⁺-Kationen sinnvoll [92-94].

pCa	C _{freies Ca²⁺} mmol/l	C _{gesamt Ca²⁺} mmol/l	C _{Aktivierungslösung} %
7,00	1,00 x 10 ⁻⁴	0,881	17,6
6,50	3,16 x 10 ⁻⁴	1,380	27,6
6,00	1,00 x 10 ⁻³	2,020	40,4
5,75	1,78 x 10 ⁻³	2,730	54,6
5,50	3,16 x 10 ⁻³	3,500	70,0
5,40	3,98 x 10 ⁻³	4,481	89,6
5,30	5,01 x 10 ⁻³	4,585	91,7
5,20	6,31 x 10 ⁻³	4,670	93,4
5,10	7,94 x 10 ⁻³	4,740	94,8
5,00	1,00 x 10 ⁻²	4,802	96,0
4,75	1,78 x 10 ⁻²	4,916	98,3
4,52	3,02 x 10 ⁻²	5,000	100,0

Tabelle 6: Berechnung der Calciumkonzentration

Der als negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Ca²⁺-Kationen definierte pCa-Wert ($pCa = -\lg C_{Ca^{2+}}$; $C_{Ca^{2+}} = 10^{-pCa}$) lag in dem durchgeführten Experiment im Intervall 7,00 - 4,52, wobei eine Änderung des pCa in Schritten von 0,1 bis 0,5 vorgenommen wurde ($0,1 < dpCa < 0,5$). Die variable Konzentration der freien Ca²⁺ -Kationen ergibt sich aus dem pH-abhängigen Gleichwicht zwischen den Ca²⁺ -Kationen und dem in der Aktivierungslösung vorhandenen EDTA⁴⁻ (**E**thylend**a**min**t**etra**a**ccet**a**t), das gemäß folgender Gleichung als Komplexbildner (Chelator) für die Ca²⁺ -Kationen unter Bildung des Chelatkomplexes [Ca (EDTA)]²⁻ fungiert [95, 96]:



Versuchslösungen mit einem pCa =7,0 gelten als calciumfrei, während Lösungen mit einem mittels CaCl₂ als Calciumquelle eingestellten pCa = 4,52 im menschlichen Körper

als supraphysiologisch angesehen werden. Diese hohe Calciumkonzentration ist jedoch für die Bestimmung der maximalen Kraftrekrutierung und der damit verbundenen Kraftkapazität der Muskelfaser notwendig. Die taxative Aktivierung des Muskels ist dann erreicht, wenn alle Bindungsstellen für Calcium auf den kontraktilen Proteinen besetzt sind, wobei dieser Bindungsprozess stufenweise abläuft. [97]. Da die benötigten Ca^{2+} -Kationen erst durch Dissoziation des $[\text{Ca}(\text{EDTA})]^{2-}$ -Komplexes gebildet werden müssen, stellte sich die Gleichgewichtskonzentration der freien Ca^{2+} -Kationen in der Versuchslösung leicht verzögert ein, so dass die Aktivierungsintervalle entsprechend groß waren.

Um einen Abbau des ATP in den vorbereiteten Lösungen zu verhindern, wurden den Aktivierungs- und Relaxationslösungen Natriumazid (NaN_3) zugesetzt, welches eine Zerstörung der beim Häutungsvorgang nicht restlos entfernten Membranenzyme bewirkt.

2.12 Aktivierung der Einzelansätze

Nach dem Absenken der in der Messvorrichtung eingespannten Faser in das erste Töpfchen mit dem calciumfreien Relaxationspuffer, in dem sie in einem vollständig relaxierten Zustand vorliegt, erfolgte dann die Aktivierung der Faser durch stufenweise Anhebung der Konzentration der freien Ca^{2+} -Kationen.

Für jeden einzelnen Aktivierungsschritt wurde der steady state der Kraftentwicklung abgewartet, der dann vorliegt, wenn die vom Messprogramm graphisch dargestellte Steigung der Kraftgerade den Wert Null hat.

Die für die Herstellung der jeweiligen Lösungen benötigten Chemikalien sowie deren Mengen sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Relaxations- und Aktivierungslösung und Imidazolpuffer wurden jeweils nach dem unten abgebildeten Schema bei einer konstanten Temperatur von 20°C unter ständigem Rühren angesetzt und anschließend bei -20°C aliquotiert aufbewahrt.

Imidazolpuffer:

g/ 0,5 l	mmol/l	Substrat	Summenformel	Molekulargewicht g/mol	g/l	g/2 l
0,681	20,0	Imidazol	C ₃ H ₄ N ₂	68,08	1,361	2,723

Tabelle 8: Zusammensetzung des Imidazolpuffers

Nach Auflösung der vorher abgewogenen Menge an Imidazol in ca. 500ml destilliertem Wasser, erfolgte mittels einer 1-m KOH- oder HCl-Lösung die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0. Der Imidazolpuffer ist für die Herstellung des Kontraktions- und Relaxationspuffers essentiell. Die wirksame Komponente des Puffersystems ist das Imidazol aufgrund seiner ampholytischen Eigenschaft; wegen der inhibierenden Wirkung des Imidazols auf diverse alkalische Phosphatasen wurde auch der Dephosphorylierung von wichtigen kontraktile Proteinen entgegengewirkt.

Relaxationspuffer:

g/ 0,50 l	mmol/l	Substrat	Summenformel	Molekular gewicht g/mol	g/l	g/2 l
1,3612	40,0	Imidazol	C ₃ H ₄ N ₂	68,08	2,723	5,446
3,272	20,0	Creatinphosphat	C ₄ H ₈ N ₃ O ₅ PNa ₂ + 4H ₂ O	327,2	6,544	13,088
0,325	10,0	Natriumazid	NaN ₃	65,01	0,650	1,300
1,902	10,0	EGTA	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	380,35	3,804	7,608
2,541	25,0	Magnesiumchlorid Hexahydrat	MgCl ₂ *6H ₂ O	203,30	5,083	10,166
0,154	2,0	Dithioerythritol	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	154,25	0,308	0,6167
5,511	20,0	Adenosine-5'- triphosphate·Na ₂ - salt	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₃ P ₃ ·Na ₂	551,10	11,022	22,044

Tabelle 9: Zusammensetzung des Relaxationspuffers

Nach Auflösung der abgewogenen Substanzmengen in ca. 300ml destilliertem Wasser und anschließender pH-Wert-Einstellung auf 7,0 mittels einer 1-m KOH- oder HCl-Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf 500ml aufgefüllt.

Kontraktionspuffer:

g/ 0,50 l	mmol/l	Substrat	Summenformel	Molekular- gewicht g/mol	g/l	g/2 l
1,361	40,0	Imidazol	$C_3H_4N_2$	68,08	2,723	5,446
3,272	20,0	Creatinphosphat	$C_4H_8N_3O_5PNa_2 \cdot 4H_2O$	327,2	6,544	13,08 8
0,320	10,0	Natriumazid	NaN_3	65,01	0,650	1,300
1,902	10,0	EGTA	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	380,35	3,804	7,608
2,542	25,0	Magnesiumchlorid Hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	203,30	5,083	10,16 6
0,154	2,0	Dithioerythritol	$C_4H_{10}O_2S_2$	154,25	0,308	0,617
0,735	10,0	Calciumchlorid Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147,02	1,470	2,940
5,511	20,0	Adenosine-5'- triphosphate·Na ₂ - salt	$C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3 \cdot Na_2$	551,10	11,02	22,04

Tabelle 10: Zusammensetzung des Kontraktionspuffers

Analog zum Relaxationspuffer wurden die abgewogenen Substanzmengen in ca. 300 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 0,1-m KOH- bzw. HCl-Lösung auf 7,0 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

Relaxations- und Aktivierungslösung wurden doppelt konzentriert angesetzt; durch Mischen dieser beiden Stammlösungen wurde ein pCa-Wert zwischen 8,0 und 4,52 eingestellt; die für die Calciumaktivierungsreihe benötigten Kontraktionslösungen mit einem pCa von 7,0 bis 4,52 wurden täglich frisch hergestellt. Zur Vermeidung von vor

der Aktivierung im Kern der Muskelfaser auftretendem Energiemangel (ATP-Mangel) wurde vor der Inkubation der Versuchslösungen Creatinkinase zugesetzt, welche gemeinsam mit Creatinphosphat ein ATP-Regenerationssystem bildet [98].

Um die Endkonzentrationen zu erreichen, wurden die Stammlösungen weiter gemäß Schema mit Imidazolpuffer verdünnt. Die folgende Tabelle zeigt exemplarisch das Mischverhältnis für einen jeweiligen Ansatz von 3 ml.

pCa	C_{Aktivierungslösung} %	KK-Puffer (Aktivierungslösung) µl	RR-Puffer µl
7,00	17,6	528	2472
6,50	40,4	1212	1788
6,00	70,0	2100	900
5,75	79,0	2370	630
5,50	87,2	2616	384
5,40	89,6	2688	312
5,30	91,7	2751	249
5,20	93,4	2802	198
5,10	94,8	2844	156
5,00	96,0	2880	120
4,75	98,3	2949	51
4,52	100,0	3000	0
	Gesamtmenge	28,74 ml	7,26 ml

Tabelle 11: Pipitierschema zur Anfertigung der jeweiligen pCa-Einzelansätze

2.13 Echokardiographie:

Die echokardiographische Untersuchung erfolgte anhand eines standardisierten Echoprotokolls durch eine erfahrene Echo-Assistentin. Die Untersuchung wurde verblindet durchgeführt und von einem zertifizierten Oberarzt der Klinik für Herz-

Thorax- und thorakale Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Würzburg im Anschluss überprüft und freigegeben. Die erhobenen Daten beinhalteten die Audehnungsmaße des rechten und linken Vorhofes sowie Werte, die die diastolische Funktion des linken Ventrikels abbilden. Hierzu zählen Mitralklappen E/A, Mitralklappenverzögerungszeit, E/Lat E' und E/Med E'

Die so ermittelten Daten wurden anschließend in der Studiendatenbank verschlüsselt abgespeichert.

2.14 Intraoperative Daten

Die intraoperative Datenerhebung beinhaltete die Erfassung aller Informationen bezüglich Operationsdauer, HLM-Zeit und Aortenklemmzeit.

2.15 Statistische Analyse und Auswertung

Die Software MyoDat für nichtlineare Regressionen errechnete den Hill-Koeffizienten für jede Einzelmessung und stellte mit dessen Hilfe die sigmoidalen pCa-Kurven dar.

$$F = \frac{[Ca^{2+}]^{HF}}{[Ca^{2+}]^{HF} + [Ca^{2+}]_{F50}^{HF}}$$

Dabei ist F die relative Kraft im Bereich von 0 bis 1 bei entsprechender Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]^{HF}$ und $[Ca^{2+}]_{F50}^{HF}$ die Calciumkonzentration bei halbmaximaler Kraftentwicklung.

Der Hill-Koeffizient (HF) gibt die Steigung des sigmoiden verlaufenden Graphen am jeweils aufgezeichneten Kraftpunkt an und ist aussagekräftiger Parameter für die Kooperativität der Ca^{2+} -Bindung an die einzelnen Troponin-Bindungsstellen des Muskels [99-101].

Der pCa₅₀-Wert und Hill-Koeffizient wurden vom Messprogramm MyoDat selbstständig errechnet und mit Standardabweichung angegeben. Die Kurvengraphiken und Tabellen wurden mit Microsoft Excel und SPSS Graph erstellt.

Die erhaltenen verschiedenen Messergebnisse, klinische Daten und persönliche Patientenattribute wurden innerhalb einer Access-Datenbank anonymisiert gesammelt und anschließend in die für die statistische Auswertung erforderliche Statistik und Analysesoftware SPSS importiert. In SPSS wurden die Datensätze mit Hilfe der Varianzanalyse ANOVA (engl. Analysis of variance) analysiert und die jeweiligen Auswertungsgrößen ermittelt. Die somit errechnete Analyse wurde jeweils für rechtes und linkes Vorhofohr aufgeteilt. Den Hauptinhalt der Arbeit stellen die den operativen Eingriffen unterzogenen Patienten dar, wobei die Calciumkonzentration, welche in den oben beschriebenen acht Abstufungen vorliegt, als primärer Einflussfaktor festgelegt wurde; dieser wiederum wurde jeweils in die Kategorien Geschlecht und Diabetesstatus eingeteilt.

Durch die Berechnung der Abhängigkeit der repetitiv absolvierten Messungen konnten innerhalb des durchgeführten Versuches die populationsgemittelten Effekte abgeschätzt werden. Die Probanden in der vorliegenden Dissertation und der Hauptgruppe (subject) in der ANOVA sind die Patienten, die variable Calciumkonzentration stellt den gruppeninternen Faktor (within subject factor) dar.

Demographische, echokardiographische und intraoperative Datenunterschiede wurden statistisch mit dem Kruskal - Wallis - Test, χ^2 -Fischer Test kalkuliert und ausgewertet.

Für Prävalenzen und Inzidenzen wurden Schätzungen mit Standardfehler und 95%-CI jeweils für jede demographische Gruppe berechnet. Die Datenauswertung umfasste detaillierte deskriptive und multivariante Analysen.

Die Auswertungen fanden nach Rekrutierung, experimenteller und klinischer Untersuchung aller 149 Probanden statt.

3 Ergebnisse:

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Dissertation veranschaulicht. Die Experimente wurden wie oben bereits dargestellt mit der Methode der gehäuteten Muskelfasern und einem Einzelansatztöpfchensystem durchgeführt.

Die folgenden Tabellen wurden mit Microsoft Word erstellt. Diese wurden thematisch in demographische, echokardiographische, intraoperative und experimentell ermittelte Kraftergebnisse aufgeteilt, wobei entsprechend der Thematik dieser Dissertation zwischen Nicht-Diabetiker (Gruppe 1) und Diabetiker (Gruppe 2) unterschieden wurde. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung oder als Häufigkeiten in % dargestellt. Der zugehörige p-Wert wurde in einer separaten Spalte angegeben. Die Daten wurden mittels in Microsoft Excel erstellten Diagrammen visualisiert, in denen die in den Versuchen gemessenen und gemittelten Kraftwerte in Abhängigkeit vom pCa-Wert der einzelnen Aktivierungsstufen dargestellt sind.

3.1 Demographische Ergebnisse

Demographische Patientendaten

	Gruppe 1 Nicht- Diabetiker) N=106	Gruppe 2 (Diabetiker) N=43	p- Wert
Alter [Jahre]	75 ± 3,13	67 ± 2,84	n.s.
BMI [kg/m ²]	29,13 (23,51-29,82)	29,71 (26,13-27,54)	n.s.
KOF [m ²]	2,01 ± 0,13	2,0 ± 0,18	n.s.
Weibliches Geschlecht [%]	10,43 (11)	25,52 (11)	n.s.
Arterielle Hypertonie	80 (85)	100 (43)	<0,04
Diabetes Mellitus	0 (0)	100 (43)	<0,01

Creatinin	[mg/dl]	1,21 (0,81-1,32)	1,22 (0,74-1,43)	n.s.
Chronisches Vorhofflimmern		26 (28)	23 (10)	n.s.
Nikotinabusus		42 (45)	34 (15)	n.s.
HbA1c	[%]	7,12 ± 0,61	5,5 ± 0,32	n.s.
Hyperlipoproteinämie		65 (69)	81 (35)	<0,03
Stattgehabter Myokardinfarkt		33 (35)	30 (13)	n.s.
sPAP	[mm Hg]	33 ± 12	36 ± 11,51	n.s.
LVEF	[%]	56 ± 11	54 ± 15	n.s.
EuroScore		2,95 ± 0,43	2,71 ± 0,72	n.s.

Tabelle 11: Darstellung der demographischen Patientendaten; Die Daten wurden als einfach gemittelte Standardabweichungen n(%) oder Median (IQR) dargestellt.

P-Werte wurden übernommen aus Mann-Whitney Test. BMI: Body-Mass-Index; KOF: Körperoberfläche; LVEF: links ventrikuläre Ejektionsfraktion; sPAP: systolischer Pulmonalarteriendruck; n.s. : nicht signifikant

Signifikante Differenzen zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern konnten einzig und allein in einer leichten Erhöhung von arteriellem Blutdruck und der Lipoproteine auf Seiten der an Diabetes erkrankten Patienten exploriert werden. Der arterielle Hypertonus differiert dabei deutlich im Mittel bei nicht Diabetikern mit 80 und bei Diabetikern mit 100. Im Vergleich zu Diabetikern zeigte sich bei Nicht-Diabetikern ein signifikant erniedrigter Anteil von lediglich 65% zu 81% Probanden mit Hyperproteinämie. Unterschiede in den anderen untersuchten Parametern stellten sich in der Analyse als nicht signifikant dar.

3.2 Intraoperative Ergebnisse

Intraoperative Auswertung

	Gruppe 1 (Nicht-Diabetiker) N=106	Gruppe 2 (Diabetiker) N=43	p- Wert
Aortenklemmzeit [min]	82 ± 23	89 ± 32	n.s.
Kardiopulmonale Bypasszeit [min]	116 ± 39	123 ± 45	n.s.
Schnitt-Naht-Zeit [min]	254 ± 54	246 ± 59	n.s.

Tabelle 12: Darstellung der intraoperativen Daten; Die Daten wurden als einfach gemittelte Standardabweichung dargestellt. Die p-Werte wurden übernommen aus Mann-Whitney-Test. LA: linkes Atrium; RA: rechtes Atrium; MV: Mitralklappe; TAPSE: tricuspid annular plane systolic excursion; n.s. : nicht signifikant

Ein Vergleich der intraoperativ erhobenen Daten ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der gemessenen Operationszeiten. In den chirurgisch erfassbaren Parametern sind beide Versuchsgruppen als gleich einzuordnen.

3.3 Ergebnisse Kraftwerte

pCa	5,50	5,40	5,30	5,20	5,10	5,0	4,75	4,52
LAA Diabetiker	0,39 ± 0,12	0,52 ± 0,12	0,61 ± 0,13	0,70 ± 0,13	0,78 ± 0,12	0,81 ± 0,13	0,88 ± 0,13	0,88 ± 0,13
LAA Nicht- Diabetiker	0,32 ± 0,12	0,47 ± 0,11	0,62 ± 0,15	0,76 ± 0,15	0,87 ± 0,13	0,91 ± 0,15	1,00 ± 0,16	1,00 ± 0,16
p-Wert	n.s.	0,025	0,022	0,045	0,029	0,018	0,013	0,013
RAA Diabetiker	0,30 ± 0,045	0,39 ± 0,041	0,45 ± 0,040	0,51 ± 0,039	0,56 ± 0,04	0,58 ± 0,041	0,65 ± 0,039	0,64 ± 0,039
RAA Nicht- Diabetiker	0,33 ± 0,051	0,45 ± 0,055	0,54 ± 0,053	0,63 ± 0,054	0,70 ± 0,053	0,74 ± 0,054	0,81 ± 0,053	0,80 ± 0,53
P-Wert	0,023	0,027	0,034	0,005	0,017	0,01	n.s.	n.s.

Tabelle 13: Darstellung der pCa-Werte und der ermittelten Kraftwerte in mN mit Standardabweichung; n.s.: nicht signifikant; p-Werte wurden aus repetitiv durchgeführter ANOVA errechnet.

Als Ergebnis der Auswertung der Messergebnisse der calciuminduzierten Kraftmessung wurden sowohl beim LAA als auch beim RAA signifikant erniedrigte Kraftwerte der links- und rechtsatrialen Myofilamente bei Diabetikern beobachtet. Dies zeigte sich für LAA bei allen Calciumkonzentrationsstufen außer der niedrigsten gemessenen Stufe bei pCa 5,5. Darüber hinaus zeigte sich bei schrittweiser Gegenüberstellung der calciuminduzierten Kraft aus dem LAA eine signifikant verminderte Kraftentwicklung bei Diabetikern besonders bei physiologisch ähnlichen Kalziumkonzentrationen (pCa=5,4 bis pCa=5,0).

Ähnliche Ergebnisse konnten bei Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern am

rechten Herzohr beobachtet werden. Hier zeigte sich ebenfalls über alle Konzentrationsstufen hinweg signifikant erniedrigte Kraftwerte bei Diabetikern, wobei dieser Effekt im physiologischen Calciumkonzentrationsbereich bei RAA-Fasern nicht ganz so ausgeprägt ist wie bei LAA-Fasern. Bei extrem unphysiologisch hohen Calciumkonzentrationen von pCa 4,75 und 4,52 konnte hingegen beim RAA keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Der Verdeutlichung der beschriebenen Zusammenhänge dient die graphische Darstellung der ermittelten Daten anhand der beiden folgenden Diagramme:

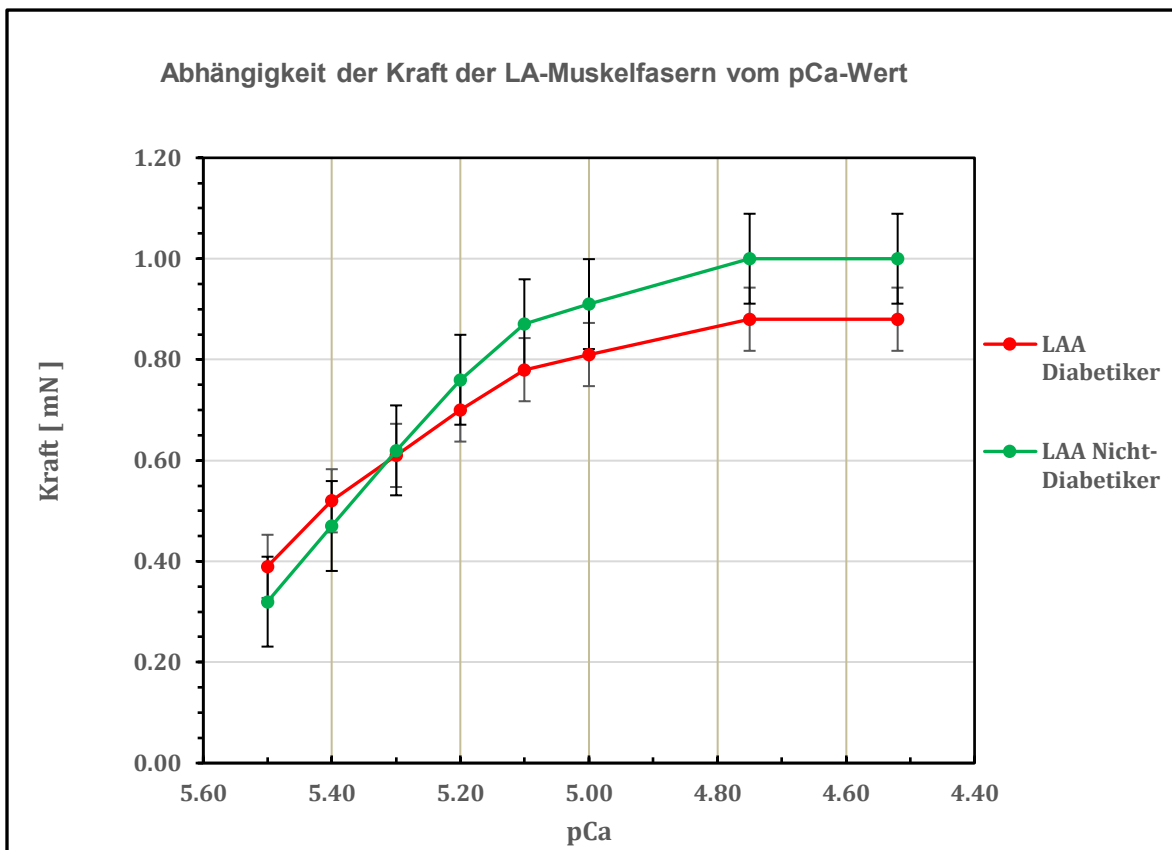


Abb. 10: Darstellung der entwickelten Kraftwerte verglichen zwischen Diabetikern und nicht Diabetikern in Abhängigkeit von der jeweiligen Calciumkonzentration für den linken Vorhof

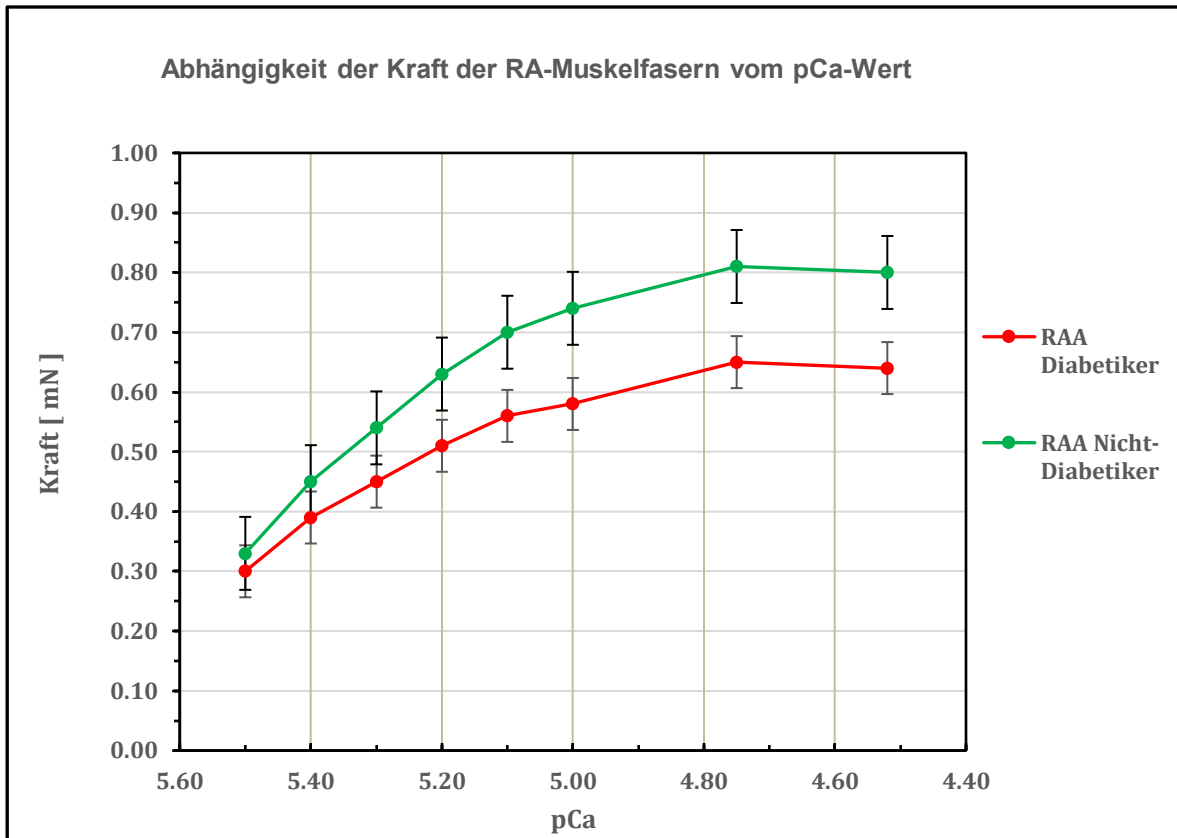


Abb. 11: Darstellung der entwickelten Kraftwerte verglichen zwischen Diabetikern und nicht Diabetikern in Abhängigkeit von der jeweiligen Calciumkonzentration für den rechten Vorhof

3.4 Echokardiographische Auswertung

Echokardiographisch konnten ausschließlich signifikante Unterschiede in der Größe des linken Vorhofs hinsichtlich einer Vergrößerung bei Diabetikern ermittelt werden.

Echokardiographische Auswertung

	Gruppe 1 (Nicht-Diabetiker) N=106	Gruppe 2 (Diabetiker) N=43	p-Wert
LA Fläche [cm ²]	20,4 ± 5,3	24,3 ± 6,3	<0,04
RA Fläche [cm ²]	16,2 ± 4,3	19,0 ± 0,18	n.s.
MV Verzögerungszeit [ms]	228 ± 88,7	243 ± 77,3	n.s.
MV E/A	0,99 ± 0,4	1,14 ± 0,2	n.s.
E/Lat E	8 ± 3,6	9,6 ± 3,5	n.s.
E/Med E	10 ± 2,3	15 ± 3,8	n.s.
TAPSE	23 ± 3,8	21 ± 2,9	n.s.

Tabelle 14: Darstellung der mittels Echokardiographie ermittelten Unterschiede zwischen Diabetikern und nicht Diabetikern. Die Daten sind als einfach gemittelte Standardabweichungen dargestellt. p-Werte wurden übernommen aus dem Mann-Whitney-Test. LA: linkes Atrium; RA: rechtes Atrium; MV: Mitralklappe; TAPSE: tricuspid annular plane systolic excursion; n.s. : nicht signifikant

Ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen zeigte sich nur in einer vergrößerten Fläche des linken Vorhofes. Bei Diabetikern konnte eine vergrößerte Fläche von 24,3cm² im Vergleich zu 20,4cm² der gesunden Probandengruppe bestimmt werden.

Der rechte Vorhof von Diabetikern zeigte sich zwar mit $19,0\text{cm}^2$ zu $16,2\text{cm}^2$ ebenfalls vergrößert, jedoch stellte sich diese Größenzunahme als nicht signifikant dar. Ebenfalls als nicht signifikant wurden die Unterschiede beider Versuchsgruppen bei der Bestimmung der TAPSE-Werte, der MV-Verzögerungszeit, E/Lat E und E/MEd E analysiert .

4 Diskussion

Der folgende Abschnitt befasst sich mit dem Vergleich der in dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse mit den in der Fachliteratur bereits gezogenen Schlussfolgerungen und Beobachtungen hinsichtlich des Einflusses relevanter Faktoren auf die myofilamentäre Funktion des Kardiomyozyten bei Diabetikern.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Methode der Gehäuteten Muskelfasern

Für die Erforschung des Zusammenhangs zwischen aktiv entwickelter Kraft und der Konzentration der freien Ca^{2+} -Ionen ist die Methode der gehäuteten Fasern [67, 102] bevorzugt aufgrund der Tatsache geeignet, dass nur bei diesem Verfahren der kontraktile Apparat vollständig frei von Membranresten vorliegt. Der aus Aktin- und Myosinfilamenten mit ihren diversen Hilfsproteinen bestehende kontraktile Apparat wird durch die chemische und mechanische Häutung direkt zugänglich. Somit ist eine direkte Manipulation der kontraktile Elemente möglich. Dieses Verfahren wurde in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert und geht auf eine bereits Ende der 50er Jahre etabliert Methodik zurück. Für den eigentlichen Häutungsprozess, also der Entfernung des semipermeablen Sarkolemm, stehen heutzutage diverse chemische und mechanische Verfahrenstechniken zu Verfügung [103, 104]. In der Literatur zeigt sich die Kombination aus beiden Techniken von Vorteil [104, 105]. Darüber hinaus hat das in dieser Arbeit verwendete Detergenz Triton X100 gegenüber anderen chemischen Häutungsmedien deutliche Vorteile bezüglich der Erhaltung der Integrität des myofilamentären Apparates [104].

Bei der Präparation der Muskelfaser aus dem Vorhoftrabekel wurde in der vorliegenden Arbeit eine einheitliche Länge von 3mm und einen Durchmesser von 0,3mm der Faser angestrebt. Grund hierfür ist die proportionale Beziehung von

entwickelter Kraft und Länge. In der Literatur wird eine Länge von 1mm empfohlen [106]. Um eine adäquate Fixierung der Faser innerhalb der Muskelmaschine zu gewährleisten, wurde eine Präparationslänge von 3mm gewählt, sodass der Messbereich zwischen den Pinzetten genau auf 1mm eingestellt werden konnte.

Die Aktivierung der Herzmuskelfasern erfolgte mit Calcium in den oben erwähnten Konzentrationsschritten. Die Kalkulation sowie die Wahl der Calciumkonzentrationsaktivierungsschritte fundieren darauf, dass geschnittene Muskelfasern bei einem pCa-Wert $< 6,0$ kontrahieren und die maximale Kraftentwicklung bei pCa-Werten von ca. 5,0 erreichen [106]. Eine Stimulierung der Muskelfasern im supraphysiologischen Bereich wurde in dieser Arbeit durchgeführt, um einerseits die maximale Kraftkapazität einer Faser zu analysieren und um die sigmoidale Calcium-Kraftkurve durch Hinzufügen der minimalen und maximalen Calciumkonzentrationen optimal zu visualisieren. Die Verweildauer der Fasern in den jeweiligen Einzeltopfansätzen wurde auf 10 bis 15 Minuten festgelegt [106]. In genau diesem Zeitintervall erreicht die Kontraktion der Muskelfaser jeweils ihr Maximum und bleibt dabei auf konstanten Kraftniveau. Dieser „steady state“- Zustand kann bei längerer Verweildauer nicht aufrechterhalten werden, sodass die entwickelte Kraft der Faser einbricht. Ähnliche Krafteinbrüche konnten bei Mehrfachmessung bei unphysiologisch hohen Calciumkonzentrationen beobachtet werden [106]. Aus diesem Grund wurde für jede neue Aktivierungsreihe auch eine „frische“ Faser verwendet.

4.1.2 Kritische Beurteilung der Methode der gehäuteten Fasern

Selbstverständlich beeinflusst das Entfernen von Muskelmembranen das intakte Vorhofmyokard, so dass neben den Vorteilen auch methodische Einschränkungen berücksichtigt und diskutiert werden mussten.

Nach Amputation des Vorhofohres im OP wurde dieses auf Eis ins Forschungslabor

transportiert. Trotz der kurzen Transportzeiten vom OP ins Labor, die im Durchschnitt ca. 2 min betrug, war nicht mit Sicherheit auszuschließen, dass bereits in diesem Zeitraum Zersetzungsprozesse am Muskelgewebe stattgefunden hatten [107].

BDM wirkt darüber hinaus auch als Phosphatase auf die kontraktilen Proteine des Myokards, was veränderte Phosphorylierungsgrade der Myofilamente zur Folge haben kann [62, 108]. Ob über diesen molekularen Mechanismus eine direkte Wirkung auf die Kontraktilität der Muskelfaser ausgeübt wird, ist bisher nicht beschrieben.

Da eine optimale Oxygenierung des Präparates während des Transports nicht vollständig gewährleistet werden konnte, war eine vorübergehende Hypoxie nicht auszuschließen; jedoch erwies sich der kontraktile Apparat im Gegensatz zu für intakte Muskelexperimente verwendete Präparate als hypoxieresistent [62].

Ein weiteres Problem stellte das Phänomen des „lattice spacing“ dar, das durch das Auseinanderweichen des Myofilamentverbundes in wässriger Lösung bei fehlender Zellmembran charakterisiert ist [109, 110]. Lichtmikroskopisch ist ein deutliches Anschwellen der Fasern zu beobachten. In der Literatur ist man sich hinsichtlich des Einflusses des „lattice spacing“ auf die Kontraktionskraftentwicklung nicht einig. [111, 112]. Einen negativen Effekt beschreibt z.B. de Beer [113], der eine Beeinflussung der Calciumsensitivität durch eine Zunahme der Filamentabstände und den damit verursachten Funktionsabfall von Troponin C infolge veränderter Bindungseigenschaften nachwies. Troponin C reguliert mitunter die Calciumbindung an die Aktinfilamente. Durch eine Gitterabstandszunahme kann es zur Abnahme der Calciumsensitivität kommen [114], was 1982 durch ein von Godt [77] durchgeführtes Experiment gezeigt werden konnte. Mit Dextran konnten angeschwollene Muskelfasern durch Osmose dekomprimiert werden; bei Häutungsverfahren mit dem im Versuch verwendeten Triton X 100 war der Effekt des „lattice spacings“ geringer einzuschätzen als bei anderen Membrandivergenzen [111, 113]. Da alle Fasern diesen Prozess durchlaufen haben, ist die Vergleichbarkeit der Messwerte jedoch vorhanden und als bekannte Limitation von experimentellen Untersuchungsansätzen und Methoden nicht zu eliminieren.

Eine verminderte Calciumsensitivität kann auch durch den Verlust von physiologisch vorkommenden Calciumsensitizern wie Carnosin und Taurin [115] verursacht werden. Durch die Fixierung der Faserpräparate zwischen den starren Einspannpinzetten der Muskelmaschine und die im Versuch stattfindende isometrische Kraftentwicklung könnte es zu Verkürzungen des Sarkomers kommen. Dieses als innere Verkürzung oder „internal shortening“ bezeichnete Phänomen beschreibt eine Abnahme der Faserlänge um 2 bis 20% [70, 113, 114]. Durch servokontrollierte Sarkomerlängenmessung ist das „internal shortening“ prinzipiell mess- und die Längenreduzierung berechenbar, was jedoch in der vorliegenden Dissertation methodenbedingt nicht möglich war.

Der Zangen-Zylinger-Einspannmechanismus im durchgeführten Experiment bedingte an den zangennahen Enden der Herzmuskelfaser Quetschungen, welche das Gewebe schädigen konnten. Daher konnten die so fixierten Bereiche nicht mehr aktiv an der Kontraktion teilnehmen. Jedoch könnten diese als serienelastische Elemente das „internal shortening“ verstärken, und ein Effekt auf die Muskelfaser konnte daher nicht komplett ausgeschlossen werden. Um einen signifikanten Einfluss des Pinzettengriffs auf die Kontraktionskraft weitestgehend auszuschließen wurde die einzuspannende Muskelfaser länger präpariert und lediglich an den Enden mit den Pinzetten bearbeitet. Bei der Kalkulation und Anfertigung der Versuchslösungen mussten zusätzliche Einschränkungen berücksichtigt werden. Kleinste Rechenfehler bei der Kalkulation der freien Calciumionenkonzentration, Verunreinigungen oder unsauberes Arbeiten können zu Beeinflussungen des Magnesium- und Calciumverhältnisses führen, was eine veränderte Sensitivität der Muskelfilamente zur Folge haben kann [85, 86, 116]. Dies wurde versucht, mit einem hohen Maß an Standardisierung und Genauigkeit zu minimieren. Die zur Stimulation benötigten Aktivierungs- und Relaxationslösungen entsprechen nicht genau dem physiologischen intrazellulären Milieu. Da die zur Berechnung der einzelnen Ionenkonzentrationen benötigte Ionenstärke im intakten Muskelgewebe nicht ausreichend genau bestimmt werden konnte, wurde ein aus der Literatur näherungsweise gemittelter Wert angenommen [76, 89]. Zusätzlich mussten aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus nicht physiologisch vorkommende Stoffe

wie Natriumazid (NaN_3) zugesetzt werden;. Sicher ist jedoch, dass der kontraktile Apparat im physiologischen Calciumkonzentrationsbereich ($5,0 < \text{pCa} < 6,5$) besonders sensibel auf selbst kleinste Veränderungen der freien Calciumkonzentration reagiert [76, 89]. Somit kann der Verlauf der sigmoidalen Calcium-Kraft-Kurve untersucht werden.

Gerade bei unphysiologisch hohen Calciumkonzentrationen der Aktivierungsansätze mit $\text{pCa} < 4,5$ kann es nach Erreichen des „steady state“ zum schnellen Krafteinbruch kommen. McClellan und Hellam wiesen bereits den muskelzerstörenden Effekt im niederen pCa Bereich nach [106, 117]. Als Ursache wird die Aktivierung der natürlich vorkommenden Muskelprotease Calpin vermutet, die einen schädigenden Effekt auf Troponin ausübt. Aus diesem Grund wurde in dieser Dissertation der Maximalwert der Aktivierungslösungen auf $\text{pCa} = 4,52$ festgelegt. Eine Mehrfachaktivierung führt häufig zu deutlicher Kraftreduktion. Hellam konnte den Effekt des „sliding filaments“ als dafür ursächlich nachweisen [106]. Aus diesem Grund wurde jede Faser nur einmal gemessen, dafür aber mehrere Fasern von einem Patienten, um eine patientenindividuelle Streuung der Messwerte mit zu erfassen.

Auch das Präparieren einer Muskelfaser aus einem gehäuteten Trabekel ist mit großer Sorgfalt durchzuführen. Da sich die Kraftentwicklung proportional zum Muskelquerschnitt verhält, musste penibel auf eine gleichmäßige Faserdicke zwischen 100 bis maximal 300 μm geachtet werden. Nur so können untereinander vergleichbare Kraftwerte ermittelt werden. Um eine ausreichende Diffusion von ATP, Regenerationsenzymen und gelösten Ionen in den Muskel sicherzustellen, war die einzuspannende Versuchsfaser möglichst durchmessergering zu präparieren [118]. Die Fasern wurden daher vermessen um annähernd gleiche Dicken zu erreichen.

4.1.3 Methodenkritische Beurteilung der Stufenaktivierung

Die Versuche der vorliegenden Dissertation wurden mit der bereits unter Punkt 2 beschriebenen Muskelmaschine der Firma Myotronic UG, Heidelberg, Germany,

durchgeführt, welche speziell für Messungen an gehäuteten Muskelfasern konzipiert wurde. Durch die zunehmende Calciumionenkonzentration der Aktivierungslösungen in den einzelnen Versuchstöpfchen konnte eine stufenweise Muskelaktivierung beobachtet werden. Prinzipiell können hierbei zwei verschiedene Gradientensysteme unterschieden werden: die Aktivierung mittels eines automatischen, computer-gesteuerten Gradientenmixsystems oder die Aktivierung in Einzelansätzen in Versuchstöpfchen, welche in dieser Dissertation zur Anwendung gelangte.

Die Vorteile des Gradientenmixers bestehen besonders in der Möglichkeit, mehr Koordinatenpunkte auf der pCa-Kraft-Kurve einfügen zu können. Die einzelnen Schritte können präzise vom Computer berechnet werden und müssen nicht separat einzeln pipettiert werden. Desweiteren reduzieren sich die Fehler bei der Herstellung der einzelnen Aktivierungsansätze. Auch die Versuchsdauer kann durch das Wegfallen der Töpfchenwechsel deutlich verkürzt werden.

Die Einzelansätze hingegen zeichnen sich durch das Fehlen von Pumpabschnitten zwischen den „steady states“ aus. Signifikant hohe Kraftentwicklungen können hingegen infolge methodenbedingter Mischvolumina zwischen den Pumpabschnitten erreicht werden.

Somit lässt sich festhalten, dass bei Anwendung einer ausgefeilten Pipetier-technik und präzisem Arbeiten das Verfahren der Einzelansatzaktivierung gegenüber der Gradientenmixsystemmethode als mindestens gleichwertig einzustufen ist.

4.1.4 Beurteilung des Vorhofes als Faserquelle

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen signifikant niedrigere Kraftwerte sowohl im linken als auch im rechten Vorhof bei Patienten mit DM im Vergleich zur Kontrollgruppe. Erste Vergleiche der Kontraktilität von ventrikulären und atrialen Herzmuskelfasern wurden 1990 von Wankerl durchgeführt [119]. Unterschiede in der Calciumsensitivität sowie in den entwickelten Kraftwerten von atrialen und ventrikulären Myofilamenten von Patienten mit KHK, dilatativer Kardiomyopathie und

Mitralklappenvitien wurden hier im skinned fiber model analysiert. Für ventrikuläre Fasern konnte zwischen den Versuchsgruppen kein Unterschied in der Affinität zu Calcium nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich bei genauer Betrachtung, dass die atrialen Myofilamente der DCMP-Patienten deutlich sensitiver auf Calcium ansprachen [119] sodass vermutet werden kann, dass sich Pathologien sensitiver in Vorhof-Myofilamenten darstellen lassen. Desweiteren konnte im Zuge dieser Arbeit auch die Verteilung von Myosinleichtkettenisoformen im Ventrikel und Vorhof analysiert werden.. Ventrikelspezifische p-Leichtkettenisoformen konnten sowohl im Ventrikel als auch im Vorhof nachgewiesen werden. Vorhofspezifische Myosinleichtkettenformen waren dagegen nur auf atrialer Ebene detektierbar. Parallel zu Wankel verglich auch Morano die Calciumsensitivität und maximale Kraftentwicklung von atrialen und ventrikulären Fasern. Die Affinität zu Calcium war hier im Ventrikel signifikant höher als im Vorhof; die entwickelten Kraftwerte waren hingegen für die einzelnen Calciumaktivierungsstufen gleichartig [120] sodass sich auch aus dieser Arbeit eine Vergleichbarkeit der Daten aus Vorhof- und Ventrikelmyofilamenten ableiten lässt.. Vannier konnte in Bezug auf Kontraktilität und myofibrillärer Kinetik beider Herzhöhlen ebenfalls Gleichartigkeit nachweisen, indem er im skinned fiber Modell keinen Unterschied bezüglich Kontraktionskraft und Calciumsensitivität zwischen atrialen und ventrikulären Fasern beobachtete. Lediglich eine Abweichung in metabolischen Eigenschaften waren belgbar [54]. Somit besteht wissenschaftliche Evidenz dafür, dass im skinned fiber Versuch die in dieser Arbeit vorrangig untersuchte Kraftentwicklung des Vorhofmykards auf die Kraftentwicklung der Ventrikelmyofibrillen übertragbar ist.

4.1.5 Einfluss der Temperatur in der skinned fiber Methode

Die Temperatur der Versuchslösungen innerhalb des experimentellen Aufbaus der skinned fiber Methode beeinflusst wesentlich die in dieser Arbeit untersuchten Kraftparameter der Myofibrille. Ursächlich hierfür sind neben kinetischen

Eigenschaften der in den Versuchslösungen enthaltenen Enzyme und organischen Verbindungen auch direkte auf die Myofibrille einwirkende Phänomene. Diese Mechanismen wurden in zahlreichen Arbeiten analysiert. Die kinetischen Eigenschaften der Myofibrille wurden von de Clerck untersucht. Dieser beobachtete bei Verminderung der Versuchstemperatur auf 16 °C von der physiologisch nahen Temperatur von 35 °C eine Reduktion der Verkürzungsgeschwindigkeit der Muskelfasern [121]. Den direkten Einfluss der Temperatur auf die quantitativen Aspekte der Kraftentwicklung stellte de Tombe in den Mittelpunkt seiner Forschung. Er beobachtete eine maximale Kraftentwicklung der Muskelfaser bei Temperaturen um 25 °C [122]. Nach Erhöhen oder Absenken dieser „idealen“ Temperatur fiel der von der Faser entwickelte Kraftwert deutlich ab [65]. Da die Stimulation der Muskelfaser hier jedoch direkt durch Strom erfolgte, sind die Ergebnisse von de Tombes Experiment nicht vollständig auf den Versuchsaufbau der Experimente dieser Arbeit übertragbar. Die in dieser Dissertation eingestellte Versuchstemperatur geht hauptsächlich auf Vahl zurück. Der experimentelle Aufbau Vahls ist mit dem in dieser Arbeit verwendeten vergleichbar. Er konnte eine Erhöhung der Calciumsensitivität durch Linksverschiebung der Kraft-Calcium-Kurve bei Senkung der Temperatur von 33 auf 22 °C zeigen [123]. Hierfür wurde eine Erhöhung der Empfindlichkeit der myofilamentären Proteine gegenüber Calcium als ursächlich angenommen [123]. Die Ergebnisse Vahls konnten durch Bening bestätigt werden. In diversen Studien wurde der myofilamentäre Apparat der Herzmuskelzelle im skinned fiber Versuch bei verschiedenen Komorbiditäten untersucht [124-126]. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine optimale Kraftentwicklung bei Temperaturen zwischen 20 und 25 °C. Mit der in dieser Arbeit verwendeten Versuchstemperatur von 22 °C kann somit eine maximale Kraftgenerierung der atrialen Myofibrillen und gleichzeitig eine noch adäquate Kinetik der ATP-regenerierenden Enzyme sichergestellt werden [127, 128].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Dissertation wurde erstmalig das kontraktile Verhalten von beiden Vorhöfen bei Diabetikern und einer nicht diabetischen Kontrollgruppe analysiert. Es konnte eine signifikant erniedrigte calciumabhängige Kontraktionskraft im rechten als auch im linken Vorhof im Vergleich zu Nicht-Diabetikern aufgezeigt werden. Beide Versuchsgruppen unterzogen sich gleichermaßen einer Bypassoperation mit Herzlungenmaschine (On-pump ACB).

Da ein spezieindividueler Unterschied der Calciumsensitivität in der Literatur bereits ausführlich beschrieben ist [129, 130], fokussierten sich die Experimente in der vorliegenden Dissertation auf menschliches Myokard.

4.2.1 Historie der Erforschung der Diabetischen Kardiomyopathie

Bereits 1881 postulierte Leyden einen kausalen Zusammenhang zwischen DM und Herzerkrankungen. Die Herzinsuffizienz und das daraus resultierende Herzversagen bei Diabetikern war seiner Meinung nach eine „häufige und beachtenswerte Komplikation“ [131]. Mayer vermutete als erster einen „abnormalen Metabolismus“ als Ursache von Herzerkrankungen bei Diabetikern [132]. Erst circa 100 Jahre später führte Rubler erstmals den Begriff der Diabetischen Kardiomyopathie als eigenständiges Krankheitsbild ein [133]. Dazu führte er unter Ausschluss störender Cofaktoren wie Alkoholabhängigkeit, Hypertonie sowie ischämischen und anderen strukturellen Herzerkrankungen post-mortem-Studien an Diabetikern mit Herzversagen durch. Seitdem steht die diabetische Kardiomyopathie im Mittelpunkt diverser Studien und Kontroversen [134]. Eine eindeutige molekulare Ursachenfindung dieses Krankheitsbildes ist bis heute noch nicht ausreichend erfolgt [135].

4.2.2 Vergleich der Kraftwerte aus linkem und rechtem Vorhof

Um den möglichen Einfluss des DM auf das Niederdrucksystem (kleiner Kreislauf, Lungenkreislauf) und den Hochdruckkreislauf (großer Kreislauf, Körperkreislauf) evaluieren zu können, war es nötig, an beiden Herzvorhöfen muskelphysiologische Experimente durchzuführen. Aufgrund der früh auftretenden kardialen Fibrose und der pathologischen Linksherzhypertrophie mit systolischen und diastolischen Herzinsuffizienzzeichen (vergleiche Tab.1) wurde vor Experimentbeginn ein stärkerer Einfluss auf den linken Vorhof vermutet [15]. Aufgrund der geringen Druckverhältnisse im rechtsatrialen System waren geringere Kraftwerte der rechtsatrialen Herzmuskelfasern zu erwarten.

Cummins untersuchte 1982 mittels Gelelektrophorese die Isoenzyme der Myosinleichtketten rechter und linker humaner Vorhöfe bei durch Drucküberladung induzierter kardialer Hypertrophie [136]. Bei der gesunden Kontrollgruppe waren die Isoformen der Myosinleichtketten in beiden Vorhöfen identisch. Bei der Versuchsgruppe konnten gleichermaßen ventrikuläre Isoformen als Antwort auf die Hypertrophie in beiden Atria nachgewiesen wurden[136]. Wanklerl verglich 1990 erstmals Myofilamente aus dem rechten Vorhof mit denen aus dem linken Ventrikel hinsichtlich ihres kontraktiven Verhaltens bei diversen kardialen Erkrankungen [119]. Lediglich bei Patienten mit DMCP konnte eine verminderte Calciumsensitivität bei rechtsatrialen Fasern detektiert werden, wohingegen bei linksventrikulären Fasern kein Unterschied zur Kontrollgruppe bestand[119]. Ein direkter Vergleich der jeweils entwickelten Kräfte blieb jedoch aus. Ein direkter Vergleich von rechter und linker myofibrillärer Funktion auf atrialer Ebene ist in der Literatur bis dato jedoch nicht beschrieben.

4.2.3 Einfluss des Diabetes

Wie bereits unter 1 aufgezeigt wurde, ist die Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie sehr vielschichtig und bis heute noch nicht vollständig verstanden. Klinisch zeigt sich in erste Linie eine durch fehlerhafte Relaxation bedingte diastolische Dysfunktion, welche progressiv in eine systolische Dysfunktion übergehen kann [15]. Auch wenn momentan die Ursächlichkeit der diabetischen Kardiomyopathie nicht vollständig geklärt ist, so spielt nach neuesten Erkenntnissen die myofilamentäre Funktion der Herzmuskelfasern eine zentrale Rolle [137]. Diverse Autoren beschreiben den Zusammenhang zwischen verminderter kardialer Funktion und DM.

Akella konnte im Tiermodell eine verminderte Calciumsensitivität im skinned-fiber-Modell bei diabetischen Raten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachweisen [28]. Die Veränderung der Calciumsensitivität der Muskelfaser korrelierte darüber hinaus mit einem Klassenwechsel der Troponin T-Untereinheiten. So wurde die These aufgestellt, dass die strukturelle Veränderung von Troponin T bei DM die längenabhängige Calciumsensitivität modifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind jedoch nicht vollständig auf menschliches Herzmuskelgewebe übertragbar, da die Calciumsensitivität ein speziesspezifischer Parameter ist [138].

Malhotra vermutete ungefähr zeitgleich eine durch DM induzierte Beeinträchtigung von regulatorischen Proteinen. Im Focus stand der Einfluss des kardialen Troponin-Tropomyosin-Komplexes auf das kontraktile Aktin-Myosin-System [29]. Auch er konnte eine Regulierung und Minderexpression von bestimmten Troponin T Klassen bei DM-Gruppen nachweisen. Diese Beobachtung unterstützt die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse einer reduzierten Kraftentwicklung bei diabetischen Muskelfasern. In diesem Zusammenhang wurde eine verminderte Aktivität der Aktin-Myosin-ATPase beobachtet. Bereits 1983 beschrieb Malhotra im Tierexperiment eine signifikante Abnahme der die kardiale Kontraktilität beeinflussenden Proteine bei mit Streptozototoxin (STZ) diabetisierten Ratten [139]. Ähnliche Ergebnisse beobachtete er bei der Untersuchung der kontraktilen Proteine in Hamstern [140]. Jedoch wurde diese

Beobachtung bisher nur bei einer kleinen Fallzahl mit nicht humanem Gewebe publiziert. Kardiale Dysfunktion resultiert demnach aus dem Verlust der Calciumregulation verbunden mit Veränderungen der Myosinkettenisoformen.

Strang und Moss untersuchten die Kinetik am gehäuteten ventrikulären Ventrikelmyokard unter Einfluss von alpha-1-Rezeptor-Agonisten [141]. Es ergab sich im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar eine deutlich reduzierte Relaxationsgeschwindigkeit, ein signifikanter Effekt auf die Calciumsensitivität oder die isometrische Dehnung und Spannung war jedoch nicht nachweisbar. Dies könnte aber auch an der unterschiedlichen Myosin-light-chain Verteilung in Vorhof und Ventrikel liegen. Die Ergebnisse der Studie deuten auf eine verminderte Ausbildung von Querbrücken während des kontraktile Zyklus hin, was auf eine veränderte Phosphorylierung von Troponin T zurückgeführt werden kann. Für die in dieser Arbeit untersuchten Vorhoffilamente wäre dieser Mechanismus ebenfalls denkbar.

Bei der quantitativen Untersuchung der mRNA der Calcium freisetzenden kardialen Ryanodin-Rezeptoren bei Diabetikern konnte Guner eine verminderte Expression derselben feststellen [142]. Guner schlussfolgerte aus den Ergebnissen einen negativen Effekt von DM auf Chronotropie und Inotropie. Ein direkter Rückschluss auf die myofilamentäre Funktion war hier jedoch nicht möglich da der kontraktile Apparat nicht direkt untersucht wurde.

Andere relevante molekulare Veränderungen bezüglich der kardialen Kontraktilität stellen beispielsweise pathologische intrazelluläre Lipidablagerungen, veränderte Calciumhomöostase oder verminderte systolische Calciumfreisetzung dar. Rückschlüsse auf die Kontraktilität sind in diesen Arbeiten allerdings nur indirekt möglich [22, 39]. Weiterhin ist die Mehrzahl dieser Studien in Tiermodellen mit reduzierter Fallzahl durchgeführt worden [28, 143, 144]. So konnte beispielsweise Jweided verminderte myofilamentäre Funktion am menschlichen Ventrikelmyokard beobachten [1]. Die Größe der Studienpopulation umfasste jedoch lediglich 13 Probanden, mit 7 Diabetikern und 5 Kontrollpersonen. Auch wurde der Einfluss des DM auf das rechte Herz nicht untersucht. Die Ergebnisse Jweideds stehen jedoch im

Einklang mit den in dieser Arbeit erzielten Schlussfolgerungen.

4.2.4 Vergleich der klinischen mit den experimentellen Ergebnissen

Von besonderem Interesse in dieser Dissertation war der Vergleich der klinisch durch Echokardiographie erhobenen Herzfunktionsparameter mit den experimentell ermittelten Kraftwerten..

Wie bereits oben beschrieben, konnte eine signifikant reduzierte Kraft im skinned-fiber- Versuch für den rechten als auch linken Vorhof gezeigt werden. Ein statistisch aussagekräftiger Unterschied der systolischen aber auch besonders der diastolischen Funktion war jedoch nicht zu beobachten. Wie Maisch [14, 15] bereits zeigen konnte (vergleiche Tabelle 1), ist diastolische Dysfunktion ein, bereits in frühen Krankheitsstadien der Diabetischen Kardiomyopathie zu beobachtendes Phänomen. Zwar waren in dieser Arbeit die LVEF von Diabetikern und Kontrollgruppe in der Echokardiographie vergleichbar, doch zeigten sich experimentell ermittelte erniedrigte Kraftwerte bei Diabetikern. So kann bereits auf Schädigungen auf Ebene des kontraktilen Apparates geschlossen werden, obwohl echokardiographisch noch keine pathologischen Veränderungen feststellbar waren. Auch der Zusammenhang zwischen diastolischer Dysfunktion und Herzversagen beim Diabetiker sind bekannt [134, 145, 146]. Übereinstimmend mit der in der Literatur vorherrschenden Theorie zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Abnahme der myofilamentären Funktion bereits in frühen Stadien der Diabetischen Kardiomyopathie anzutreffen ist, wobei eindeutige klinische Anzeichen meist fehlen [12]. Studien, die wie diese Dissertation klinische und experimentelle Parameter miteinander vergleichen, sind jedoch in der Literatur nicht zu finden.

Eine weitere im Rahmen dieser Dissertation gemachte Beobachtung war die signifikant erhöhte Größe des linken Vorhofes bei der diabetischen Untersuchungsgruppe. Markman beschrieb 2017 die Relevanz der Größe und Funktion des linken Atriums als unabhängiger Prädiktor für Mortalität bei Patienten mit DM [31]. Darüber hinaus gilt

die pathologische Vergrößerung des linken Vorhofes auch als einer der ersten Anzeichen für kardiales Remodeling bei Diabetikern und stützt die in dieser Dissertation gemachten Beobachtungen eines größeren Vorhofes bei Diabetikern bei gleichzeitig reduzierten Kraftwerten [147-149]. Erwähnenswert ist jedoch die Tatsache, dass auch Vorhofflimmern ein Grund für einen vergrößerten LA sein und somit auch direkten Einfluss auf die Kraftentwicklung nehmen kann [150, 151]. Der rechte Vorhof zeigt sich dagegen trotz erniedrigter Kraftwerte bei Diabetikern nicht vergrößert. Da die Kraftwerte für die rechtsatrialen Myofilamente ohne Vergrößerung des rechten Vorhofes bereits reduziert waren, kann vermutet werden, dass der Diabetes den entscheidenden kontraktionskraftmindernden Faktor darstellt. Dennoch kann aus der verminderten Kraftentwicklung auf durch DM induzierte Veränderungen geschlossen werden. Die Vergrößerung des linken Vorhofs kann jedoch auch als koexistierende Entität, die eine sekundäre Volumenüberladung oder pathologische links ventrikuläre Druckerhöhungen bewirkt, angesehen werden [148]. Zudem kann die beobachtete Dilatation des linken Atriums darüber hinaus auch die erniedrigten Kraftwerte bei Diabetikern weiter aggravieren. Grund hierfür kann die Überdehnung der linksatrialen Myofilamente sein. Eine optimale Überlappung der kontraktilen Proteine und eine damit verbundene maximale Kontraktionskraftentwicklung befindet sich bei einer Sarkomerausdehnung von 2,0-2,1 μm vor. Bei zu starker Dehnung verschlechtert sich gemäß des Frank Starling Mechanismus die Kongruenz von Aktin- und Myosinfilamenten der Muskelfaser, was in einer reduzierten Kraft resultiert [78, 79]. Die jedoch im rechten Vorhof ermittelten verminderten Kraftwerte bei Diabetikern sind unabhängig von den nicht signifikant ermittelten Unterschieden in der Größe des rechten Vorhofs zwischen beiden Versuchsgruppen. Im Gegensatz zum linken Atrium ist die Rolle des rechten Atriums als Prädiktor für erhöhte Mortalität bei Diabetikern nicht bekannt oder nachgewiesen. Die in dieser Dissertation nachgewiesenen verminderten Kraftwerte in diabetischen rechten Vorhöfen geben einen Hinweis auf die Wichtigkeit der Rolle der myofilamentären Funktion rechter Atria für Diabetiker mit zusätzlichen kardialen Erkrankungen und eine zukünftige

mögliche klinische Relevanz dieser Ergebnisse für die jeweiligen Patienten. Weiterhin scheint bei diabetischen Patienten auf Ebene des kontraktilen Apparates bereits Schädigungen vorzuliegen, auch wenn echokardiographisch noch keine Funktionseinschränkung nachzuweisen ist.

4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Diabetes Mellitus auf die Kontraktionskraft von humanem Herzmuskelgewebe zu beurteilen. Zu diesem Zweck wurde die calciuminduzierte Kraftentwicklung an links- sowie rechtsatrialen Myofilamenten von Diabetikern und nicht Diabetikern mit Hilfe der skinned fiber Methode untersucht.

Die dabei beobachteten Ergebnisse zeigten eine über sämtliche Calciumaktivierungsstufen signifikant erniedrigte Kontraktionskraft im linken Vorhof von Diabetikern. Ein ähnlicher aber nicht ganz so deutlich ausgeprägter Effekt offenbarte sich bei den Messungen am rechten Vorhof. Diabetische Herzmuskelfasern zeigten auch hier mit Ausnahme der beiden höchsten Calciumkonzentrationen von pCa 4,52 und 4,75 signifikant niedrigere Kraftwerte als Herzmuskelfasern der Kontrollgruppe.

4.3 Ausblick:

Angesichts der unterschiedlichen Druck- und Volumenverhältnisse in rechtem und linkem Vorhof ist es naheliegend, die kontraktile myofilamentäre Funktion bei Diabetikern auch auf Ebene des kontraktilen Apparates zu untersuchen. Möglicherweise könnte dies Einblicke geben, ob DM mit niedrigeren Kraftwerten assoziiert ist oder doch lediglich prädikativen Wert besitzt. Im Zuge dessen sollten die in dieser Arbeit beobachteten Beeinträchtigungen des kontraktilen Verhaltens beider Vorhöfe auch auf zellulärer Ebene untersucht werden. Nach neusten Studien ist bei diabetischen

Patienten ein erhöhtes Risiko von Herzversagen und intrahospitalem kardialem Tod nach einer Bypassoperation bekannt [152]. Die genaue Kenntnis der durch DM am Kardiomyozyten und am kontraktilen Apparat verursachten Veränderungen könnten klinisch zur deutlichen Verbesserung der Therapie von diabetischen Bypasspatienten genutzt werden. Ein besseres Verständnis der kontraktilen Pathophysiologie eröffnet diverse präoperativ therapeutische Möglichkeiten: eine optimal auf den diabetischen Patienten zugeschnittene Herzinsuffizienztherapie inklusive medikamentöser Optimierung mittels Simdaxgabe sind möglich. Ein weiterer Ansatz wäre beispielsweise die Optimierung der frühpostoperativen Katecholamintherapie oder die Prävention von kardialen Ereignissen oder akutem Herzversagen innerhalb der diabetischen Untersuchungsgruppe.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen deutlich, dass Diabetiker eines höheren Maßes an Überwachung bedürfen, um bereits frühzeitig Einschränkungen der kardialen Funktion zu erfassen. Dabei kommt der medikamentösen Einstellung des DM eine zentrale Rolle zu. Besonders die neu entwickelte Medikamentengruppe der SGLT2-Inhibitoren zeigt neusten Studien zufolge einen deutlich höheren kardiovaskulären Nutzen gegenüber herkömmlichen oralen Antidiabetika und sollten deshalb schon deutlich früher und öfter in die pharmakologische Therapie miteinbezogen werden [9, 153]. Der kardioprotektive Effekt konnte durch hochrangige Publikationen für die Leitsubstanzen Dapagliflozin in der DECLARE –Studie [10, 154], für Canagliflozin in der CANVAS-Studie [155, 156] und für Empagliflozin in der EMPAREG-Studie [157] nachgewiesen werden. Selbst ein Einsatz der SGLT2-Inhibitoren bei nicht Diabetikern mit Herzinsuffizienz und reduzierter Ejektionsfraktion ist Gegenstand aktueller Forschung [158, 159].

5 Fazit

Erstmals konnten in der vorliegenden Dissertation an einem großen Patientenkollektiv experimentell signifikant reduzierte Kraftwerte bei Diabetikern im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dieser Unterschied in den Untersuchungsgruppen war präoperativ echokardiographisch nicht nachweisbar gewesen und lässt vermuten, dass Veränderungen auf Ebene des kontraktilen Apparates -sowohl rechts als auch linksatrikulär-bereits subklinisch vorhanden sind. Im Zuge dessen könnte die Therapie von Diabetikern im Sinne einer engmaschigeren Überwachung sowie frühzeitig eingeleiteten Herzinsuffizienztherapie optimiert werden. Eine weitere präoperative medikamentöse Therapieoption stellt beispielsweise die Gabe des Calciumsensitizers Simdax zur Steigerung der kardialen Inotropie dar.

6 Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
ACB	Aortokoronarer Bypass
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3 Butanedione monoxime
BMI	Body-Mass-Index
CABG	Coronary Artery Bypass Grafting
CIRS	Calcium induced calcium release
DM	Diabetes Mellitus
DMC	Diabetische Kardiomyopathie
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N,N-tetraessigsäure
GLP1	glucagon like peptide
Hb	Hämoglobin
HbA1C	Glykohämoglobin
HLM	Herz-Lungen-Maschine
KFO	Körperoberfläche
KHP	Krebs Henseleit-Puffer
LA	linkes Herzohr
LAA	Amputation linkes Herzohr
LV	Linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MMP-3	Matrix-Metalloproteinase-3
MRT	Magnetresonanztomographie
MV	mitral valve
NTproBNP	N-terminal pro-B-typ natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association

OGTT	Oraler Glucosetoleranztest
RA	rechtes Herzohr
RAA	Amputation rechtes Herzohr
RCX	Ramus circumfelxus
RIVA	Ramus intraventricularis anterior
RV	rechter Ventrikel
SGLT2	sodium dependent glucose transporter 2
SPAP	systolic pulmonal arterial pressure
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion

7 Literaturverzeichnis:

1. Jweied EE, McKinney RD, Walker LA, Brodsky I, Geha AS, Massad MG, Buttrick PM, de Tombe PP: **Depressed cardiac myofilament function in human diabetes mellitus.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, **289**(6):H2478-2483.
2. Galderisi M, Anderson KM, Wilson PW, Levy D: **Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study).** *Am J Cardiol* 1991, **68**(1):85-89.
3. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP: **The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States.** *JAMA* 2001, **286**(10):1195-1200.
4. Lorenzo-Almoros A, Tunon J, Orejas M, Cortes M, Egido J, Lorenzo O: **Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy.** *Cardiovasc Diabetol* 2017, **16**(1):28.
5. Nauck M: **Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus** *Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft, S2 Leitlinie* 2018.
6. Ahlqvist E, Storm P, Karajamaki A, Martinell M, Dorkhan M, Carlsson A, Vikman P, Prasad RB, Aly DM, Almgren P *et al*: **Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables.** *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018, **6**(5):361-369.
7. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR: **Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.** *Diabetes Care* 2015, **38**(1):140-149.
8. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, Rossing P, Tsapas A, Wexler DJ, Buse JB: **Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes**

- Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2018, 41(12):2669-2701.**
9. d'Emden M, Amerena J, Deed G, Pollock C, Cooper ME: **SGLT2 inhibitors with cardiovascular benefits: Transforming clinical care in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2018, 136:23-31.**
 10. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Silverman MG, Zelniker TA, Kuder JF, Murphy SA *et al*: **Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2019, 380(4):347-357.**
 11. Rao Kondapally Seshasai S, Kaptoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, Whincup PH, Mukamal KJ, Gillum RF, Holme I *et al*: **Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med* 2011, 364(9):829-841.**
 12. Gilca GE, Stefanescu G, Badulescu O, Tanase DM, Bararu I, Ciocoiu M: **Diabetic Cardiomyopathy: Current Approach and Potential Diagnostic and Therapeutic Targets. *J Diabetes Res* 2017, 2017:1310265.**
 13. Services USDoHaH: **National Estimates and General Information on Diabetes and Prediabetes in the United States. *National Diabetes Fact Sheet* 2011.**
 14. Loncarevic B, Trifunovic D, Soldatovic I, Vujisic-Tesic B: **Silent diabetic cardiomyopathy in everyday practice: a clinical and echocardiographic study. *BMC Cardiovasc Disord* 2016, 16(1):242.**
 15. Maisch B, Alter P, Pankuweit S: **Diabetic cardiomyopathy--fact or fiction? *Herz* 2011, 36(2):102-115.**
 16. Ng AC, Delgado V, Bertini M, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Hooi Ewe S, Siebelink HM, Smit JW, Diamant M, Romijn JA *et al*: **Myocardial steatosis and biventricular strain and strain rate imaging in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2010, 122(24):2538-2544.**

17. Chaudhary AK, Aneja GK, Shukla S, Razi SM: **Study on Diastolic Dysfunction in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus and its Correlation with Glycosylated Haemoglobin (HbA1C).** *J Clin Diagn Res* 2015, **9**(8):OC20-22.
18. Ernande L, Bergerot C, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Thibault H, Pignonblanc PG, Croisille P, Ovize M, Groisne L, Moulin P *et al*: **Diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: is it really the first marker of diabetic cardiomyopathy?** *J Am Soc Echocardiogr* 2011, **24**(11):1268-1275 e1261.
19. Bayeva M, Sawicki KT, Ardehali H: **Taking diabetes to heart--deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy.** *J Am Heart Assoc* 2013, **2**(6):e000433.
20. Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, Greenland P, Van Horn L, Tracy RP, Lloyd-Jones DM: **Lifetime risks of cardiovascular disease.** *N Engl J Med* 2012, **366**(4):321-329.
21. van der Leeuw J, Beulens JW, van Dieren S, Schalkwijk CG, Glatz JF, Hofker MH, Verschuren WM, Boer JM, van der Graaf Y, Visseren FL *et al*: **Novel Biomarkers to Improve the Prediction of Cardiovascular Event Risk in Type 2 Diabetes Mellitus.** *J Am Heart Assoc* 2016, **5**(6).
22. Pappachan JM, Varughese GI, Sriraman R, Arunagirinathan G: **Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management.** *World J Diabetes* 2013, **4**(5):177-189.
23. Tang M, Li J, Huang W, Su H, Liang Q, Tian Z, Horak KM, Molkentin JD, Wang X: **Proteasome functional insufficiency activates the calcineurin-NFAT pathway in cardiomyocytes and promotes maladaptive remodelling of stressed mouse hearts.** *Cardiovasc Res* 2010, **88**(3):424-433.
24. Hu J, Klein JD, Du J, Wang XH: **Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitin-proteasome system by insulin deficiency.** *Endocrinology* 2008, **149**(11):5384-5390.

25. Li J, Ma W, Yue G, Tang Y, Kim IM, Weintraub NL, Wang X, Su H: **Cardiac proteasome functional insufficiency plays a pathogenic role in diabetic cardiomyopathy.** *J Mol Cell Cardiol* 2017, **102**:53-60.
26. Guo R, Zhang Y, Turdi S, Ren J: **Adiponectin knockout accentuates high fat diet-induced obesity and cardiac dysfunction: role of autophagy.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1832**(8):1136-1148.
27. Leung MC, Hitchen PG, Ward DG, Messer AE, Marston SB: **Z-band alternatively spliced PDZ motif protein (ZASP) is the major O-linked beta-N-acetylglucosamine-substituted protein in human heart myofibrils.** *J Biol Chem* 2013, **288**(7):4891-4898.
28. Akella AB, Ding XL, Cheng R, Gulati J: **Diminished Ca²⁺ sensitivity of skinned cardiac muscle contractility coincident with troponin T-band shifts in the diabetic rat.** *Circ Res* 1995, **76**(4):600-606.
29. Malhotra A, Lopez MC, Nakouzi A: **Troponin subunits contribute to altered myosin ATPase activity in diabetic cardiomyopathy.** *Mol Cell Biochem* 1995, **151**(2):165-172.
30. Ramirez-Correa GA, Ma J, Slawson C, Zeidan Q, Lugo-Fagundo NS, Xu M, Shen X, Gao WD, Caceres V, Chakir K *et al*: **Removal of Abnormal Myofilament O-GlcNAcylation Restores Ca²⁺ Sensitivity in Diabetic Cardiac Muscle.** *Diabetes* 2015, **64**(10):3573-3587.
31. Markman TM, Habibi M, Venkatesh BA, Zareian M, Wu C, Heckbert SR, Bluemke DA, Lima JAC: **Association of left atrial structure and function and incident cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus: results from multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA).** *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2017, **18**(10):1138-1144.
32. Ward ML, Crossman DJ: **Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy.** *World J Cardiol* 2014, **6**(7):577-584.
33. Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Lederer WJ, Matlib MA: **Defective intracellular Ca(2+) signaling contributes to**

- cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, **283**(4):H1398-1408.
34. Ren J, Davidoff AJ: **Diabetes rapidly induces contractile dysfunctions in isolated ventricular myocytes.** *Am J Physiol* 1997, **272**(1 Pt 2):H148-158.
35. Pierce GN, Russell JC: **Regulation of intracellular Ca²⁺ in the heart during diabetes.** *Cardiovasc Res* 1997, **34**(1):41-47.
36. Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kanda GK, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J: **Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(16):6854-6859.
37. Crossman DJ, Ruygrok PN, Soeller C, Cannell MB: **Changes in the organization of excitation-contraction coupling structures in failing human heart.** *PLoS One* 2011, **6**(3):e17901.
38. Wei S, Guo A, Chen B, Kutschke W, Xie YP, Zimmerman K, Weiss RM, Anderson ME, Cheng H, Song LS: **T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure.** *Circ Res* 2010, **107**(4):520-531.
39. Kobayashi T, Jin L, de Tombe PP: **Cardiac thin filament regulation.** *Pflugers Arch* 2008, **457**(1):37-46.
40. Pierce GN, Dhalla NS: **Cardiac myofibrillar ATPase activity in diabetic rats.** *J Mol Cell Cardiol* 1981, **13**(12):1063-1069.
41. Cooper GJ, Phillips AR, Choong SY, Leonard BL, Crossman DJ, Brunton DH, Saafi L, Dissanayake AM, Cowan BR, Young AA *et al*: **Regeneration of the heart in diabetes by selective copper chelation.** *Diabetes* 2004, **53**(9):2501-2508.
42. Hofmann PA, Menon V, Gannaway KF: **Effects of diabetes on isometric tension as a function of [Ca²⁺] and pH in rat skinned cardiac myocytes.** *Am J Physiol* 1995, **269**(5 Pt 2):H1656-1663.
43. Zhang L, Ward ML, Phillips AR, Zhang S, Kennedy J, Barry B, Cannell MB, Cooper GJ: **Protection of the heart by treatment with a divalent-copper-selective**

- chelator reveals a novel mechanism underlying cardiomyopathy in diabetic rats.** *Cardiovasc Diabetol* 2013, **12**:123.
44. Zhang L, Cannell MB, Phillips AR, Cooper GJ, Ward ML: **Altered calcium homeostasis does not explain the contractile deficit of diabetic cardiomyopathy.** *Diabetes* 2008, **57**(8):2158-2166.
45. Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T: **Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features.** *Heart Fail Rev* 2013, **18**(2):149-166.
46. Shindler DM, Kostis JB, Yusuf S, Quinones MA, Pitt B, Stewart D, Pinkett T, Ghali JK, Wilson AC: **Diabetes mellitus, a predictor of morbidity and mortality in the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Trials and Registry.** *Am J Cardiol* 1996, **77**(11):1017-1020.
47. Ryden L, Armstrong PW, Cleland JG, Horowitz JD, Massie BM, Packer M, Poole-Wilson PA: **Efficacy and safety of high-dose lisinopril in chronic heart failure patients at high cardiovascular risk, including those with diabetes mellitus. Results from the ATLAS trial.** *Eur Heart J* 2000, **21**(23):1967-1978.
48. Borlaug BA, Paulus WJ: **Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment.** *Eur Heart J* 2011, **32**(6):670-679.
49. Gekle M WE, Schwab A: **Taschenbuch Physiologie.** 2010.
50. Silbernagl S DA: **Taschenatlas physiologie.** *Thieme* 2012.
51. Huxley AF: **Muscular contraction.** *J Physiol* 1974, **243**(1):1-43.
52. Huxley AF, Niedergerke R: **Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres.** *Nature* 1954, **173**(4412):971-973.
53. Huxley HE: **Structural changes during muscle contraction.** *Biochem J* 1971, **125**(4):85P.
54. Vannier C, Veksler V, Mekhfi H, Mateo P, Ventura-Clapier R: **Functional tissue and developmental specificities of myofibrils and mitochondria in cardiac muscle.** *Can J Physiol Pharmacol* 1996, **74**(1):23-31.

55. Ruegg JC, Morano I: **Calcium-sensitivity modulation of cardiac myofibrillar proteins.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1989, **14 Suppl 3**:S20-23.
56. Ruegg JC: **Effects of new inotropic agents on Ca⁺⁺ sensitivity of contractile proteins.** *Circulation* 1986, **73**(3 Pt 2):III78-84.
57. Solaro RJ, Pang DC, Briggs FN: **The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100.** *Biochim Biophys Acta* 1971, **245**(1):259-262.
58. Mitchell C, Rahko PS, Blauwet LA, Canaday B, Finstuen JA, Foster MC, Horton K, Ogunyankin KO, Palma RA, Velazquez EJ: **Guidelines for Performing a Comprehensive Transthoracic Echocardiographic Examination in Adults: Recommendations from the American Society of Echocardiography.** *J Am Soc Echocardiogr* 2019, **32**(1):1-64.
59. Gwathmey JK, Hajjar RJ, Solaro RJ: **Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium.** *Circ Res* 1991, **69**(5):1280-1292.
60. Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR: **Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime.** *Circ Res* 1989, **65**(5):1441-1449.
61. Khandoudi N, Guo AC, Chesnais M, Feuvray D: **Skinned cardiac fibres of diabetic rats: contractile activation and effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) and caffeine.** *Cardiovasc Res* 1993, **27**(3):447-452.
62. McKillop DF, Fortune NS, Ranatunga KW, Geeves MA: **The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibres.** *J Muscle Res Cell Motil* 1994, **15**(3):309-318.
63. Bailey LEO, Seok D, et al.: **Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations.** *Journal of Pharmacological Methods* 1978.

64. Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriev YV, Kurapeev DI, Vlasov TD: **Myocardial protection against global ischemia with Krebs-Henseleit buffer-based cardioplegic solution.** *J Cardiothorac Surg* 2013, **8**:60.
65. de Tombe PP, Stienen GJ: **Protein kinase A does not alter economy of force maintenance in skinned rat cardiac trabeculae.** *Circ Res* 1995, **76**(5):734-741.
66. Morano I, Hofmann F, Zimmer M, Ruegg JC: **The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres.** *FEBS Lett* 1985, **189**(2):221-224.
67. Morano I, Bachle-Stolz C, Katus A, Ruegg JC: **Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase.** *Basic Res Cardiol* 1988, **83**(4):350-359.
68. Blanchard EM, Solaro RJ: **Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH.** *Circ Res* 1984, **55**(3):382-391.
69. Leijendekker WJ, Herzig JW: **Reduction of myocardial cross-bridge turnover rate in presence of EMD 53998, a novel Ca(2+)-sensitizing agent.** *Pflugers Arch* 1992, **421**(4):388-390.
70. Gordon AM, Pollack GH: **Effects of calcium on the sarcomere length-tension relation in rat cardiac muscle. Implications for the Frank-Starling mechanism.** *Circ Res* 1980, **47**(4):610-619.
71. Herzig JW, Kohler G, Pfitzer G, Ruegg JC, Wolffle G: **Cyclic AMP inhibits contractility of detergent treated glycerol extracted cardiac muscle.** *Pflugers Arch* 1981, **391**(3):208-212.
72. Hasenfuss G, Mulieri LA, Leavitt BJ, Allen PD, Holubarsch C, Just H, Alpert NR: **Contractile protein function in failing and nonfailing human myocardium.** *Basic Res Cardiol* 1992, **87 Suppl 1**:107-116.
73. Fabiato A, Fabiato F: **Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs.** *Eur J Cardiol* 1973, **1**(2):143-155.

74. Bening C, Mehlhorn U, Conzelmann LO, Stumpf N, Sikand A, Vahl CF: **Contractile properties of the right atrial myofilaments in patients with myxomatous mitral valve degeneration.** *BMC Cardiovasc Disord* 2014, **14**:119.
75. Bening C, Weiler H, Vahl CF: **Effects of gender, ejection fraction and weight on cardiac force development in patients undergoing cardiac surgery--an experimental examination.** *J Cardiothorac Surg* 2013, **8**:214.
76. Hibberd MG, Jewell BR: **Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle.** *J Physiol* 1982, **329**:527-540.
77. Godt RE, Lindley BD: **Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog.** *J Gen Physiol* 1982, **80**(2):279-297.
78. Katz AM: **Ernest Henry Starling, his predecessors, and the "Law of the Heart".** *Circulation* 2002, **106**(23):2986-2992.
79. Holubarsch C, Ruf T, Goldstein DJ, Ashton RC, Nickl W, Pieske B, Pioch K, Ludemann J, Wiesner S, Hasenfuss G *et al*: **Existence of the Frank-Starling mechanism in the failing human heart. Investigations on the organ, tissue, and sarcomere levels.** *Circulation* 1996, **94**(4):683-689.
80. Curtin NA, Diack RA, West TG, Wilson AM, Woledge RC: **Skinned fibres produce the same power and force as intact fibre bundles from muscle of wild rabbits.** *J Exp Biol* 2015, **218**(Pt 18):2856-2863.
81. Joumaa V, Fitzowich A, Herzog W: **Energy cost of isometric force production after active shortening in skinned muscle fibres.** *J Exp Biol* 2017, **220**(Pt 8):1509-1515.
82. Joumaa V, Herzog W: **Energy cost of force production is reduced after active stretch in skinned muscle fibres.** *J Biomech* 2013, **46**(6):1135-1139.
83. Kitada Y, Narimatsu A, Matsumura N, Endo M: **Increase in Ca⁺⁺ sensitivity of the contractile system by MCI-154, a novel cardiotonic agent, in**

- chemically skinned fibers from the guinea pig papillary muscles.** *J Pharmacol Exp Ther* 1987, **243**(2):633-638.
84. Fabiato A: **Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands.** *Methods Enzymol* 1988, **157**:378-417.
85. Seow CY, Ford LE: **High ionic strength and low pH detain activated skinned rabbit skeletal muscle crossbridges in a low force state.** *J Gen Physiol* 1993, **101**(4):487-511.
86. Solaro RJ, el-Saleh SC, Kentish JC: **Ca²⁺, pH and the regulation of cardiac myofilament force and ATPase activity.** *Mol Cell Biochem* 1989, **89**(2):163-167.
87. Fabiato A, Fabiato F: **Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles.** *J Physiol* 1978, **276**:233-255.
88. Fabiato A, Fabiato F: **Effects of magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells.** *J Physiol* 1975, **249**(3):497-517.
89. Bers DM, Patton CW, Nuccitelli R: **A practical guide to the preparation of Ca(2+) buffers.** *Methods Cell Biol* 2010, **99**:1-26.
90. Bers DM, Patton CW, Nuccitelli R: **A practical guide to the preparation of Ca²⁺ buffers.** *Methods Cell Biol* 1994, **40**:3-29.
91. Patton C, Thompson S, Epel D: **Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions.** *Cell Calcium* 2004, **35**(5):427-431.
92. Brandt PW, Cox RN, Kawai M, Robinson T: **Effect of cross-bridge kinetics on apparent Ca²⁺ sensitivity.** *J Gen Physiol* 1982, **79**(6):997-1016.
93. Lee J, Allen, P.: **Modulation of Cardiac Calcium Sensitivity. A new approach to Increasing the Strength of the Hearth.** 1992 1992.
94. Thames MD, Teichholz LE, Podolsky RJ: **Ionic strength and the contraction kinetics of skinned muscle fibers.** *J Gen Physiol* 1974, **63**(4):509-530.

95. Allen DG, Kentish JC: **The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle.** *J Mol Cell Cardiol* 1985, **17**(9):821-840.
96. Gross T, Lues I, Daut J: **A new cardiotonic drug reduces the energy cost of active tension in cardiac muscle.** *J Mol Cell Cardiol* 1993, **25**(3):239-244.
97. Solaro RJ, Wise RM, Shiner JS, Briggs FN: **Calcium requirements for cardiac myofibrillar activation.** *Circ Res* 1974, **34**(4):525-530.
98. Ventura-Clapier R, Mekhfi H, Vassort G: **Role of creatine kinase in force development in chemically skinned rat cardiac muscle.** *J Gen Physiol* 1987, **89**(5):815-837.
99. Shiner JS, Solaro RJ: **Activation of thin-filament-regulated muscle by calcium ion: considerations based on nearest-neighbor lattice statistics.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982, **79**(15):4637-4641.
100. Shiner JS, Solaro RJ: **The hill coefficient for the Ca²⁺-activation of striated muscle contraction.** *Biophys J* 1984, **46**(4):541-543.
101. Morano I, Bletz C, Wojciechowski R, Ruegg JC: **Modulation of crossbridge kinetics by myosin isoenzymes in skinned human heart fibers.** *Circ Res* 1991, **68**(2):614-618.
102. Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E: **Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis?** *Circ Res* 1996, **78**(3):455-465.
103. Best PM: **Cardiac muscle function: results from skinned fiber preparations.** *Am J Physiol* 1983, **244**(2):H167-177.
104. Gordon AR: **Contraction of detergent-treated smooth muscle.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, **75**(7):3527-3530.
105. Fabiato A, Fabiato F: **Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. Calcium-dependent cyclic and tonic contractions.** *Circ Res* 1972, **31**(3):293-307.
106. Hellam DC, Podolsky RJ: **Force measurements in skinned muscle fibres.** *J Physiol* 1969, **200**(3):807-819.

107. Hebisch S, Bischoff E, Soboll S: **Influence of 2,3-butanedione monoxime on heart energy metabolism.** *Basic Res Cardiol* 1993, **88**(6):566-575.
108. Perreault CL, Mulieri LA, Alpert NR, Ransil BJ, Allen PD, Morgan JP: **Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium.** *Am J Physiol* 1992, **263**(2 Pt 2):H503-510.
109. Andrews MA, Maughan DW, Nosek TM, Godt RE: **Ion-specific and general ionic effects on contraction of skinned fast-twitch skeletal muscle from the rabbit.** *J Gen Physiol* 1991, **98**(6):1105-1125.
110. Godt RE, Maughan DW: **Swelling of skinned muscle fibers of the frog. Experimental observations.** *Biophys J* 1977, **19**(2):103-116.
111. April EW, Brandt PW: **The myofilament lattice: studies on isolated fibers. 3. The effect of myofilament spacing upon tension.** *J Gen Physiol* 1973, **61**(4):490-508.
112. April EW: **The myofilament lattice: studies on isolated fibers. IV. Lattice equilibria in striated muscle.** *J Mechanochem Cell Motil* 1975, **3**(2):111-121.
113. de Beer EL, Grundeman RL, Wilhelm AJ, van den Berg C, Caljouw CJ, Klepper D, Schiereck P: **Effect of sarcomere length and filament lattice spacing on force development in skinned cardiac and skeletal muscle preparations from the rabbit.** *Basic Res Cardiol* 1988, **83**(4):410-423.
114. Jewell BR: **A reexamination of the influence of muscle length on myocardial performance.** *Circ Res* 1977, **40**(3):221-230.
115. Gao WD, Backx PH, Azan-Backx M, Marban E: **Myofilament Ca²⁺ sensitivity in intact versus skinned rat ventricular muscle.** *Circ Res* 1994, **74**(3):408-415.
116. Miller DJ, Smith GL: **The contractile behaviour of EGTA- and detergent-treated heart muscle.** *J Muscle Res Cell Motil* 1985, **6**(5):541-567.
117. McClellan GB, Winegrad S: **The regulation of the calcium sensitivity of the contractile system in mammalian cardiac muscle.** *J Gen Physiol* 1978, **72**(6):737-764.

118. Guth K, Wojciechowski R: **Perfusion cuvette for the simultaneous measurement of mechanical, optical and energetic parameters of skinned muscle fibres.** *Pflugers Arch* 1986, **407**(5):552-557.
119. Wanklerl M, Bohm M, Morano I, Ruegg JC, Eichhorn M, Erdmann E: **Calcium sensitivity and myosin light chain pattern of atrial and ventricular skinned cardiac fibers from patients with various kinds of cardiac disease.** *J Mol Cell Cardiol* 1990, **22**(12):1425-1438.
120. Morano I, Arndt H, Gartner C, Ruegg JC: **Skinned fibers of human atrium and ventricle: myosin isoenzymes and contractility.** *Circ Res* 1988, **62**(3):632-639.
121. De Clerck NM, Claes VA, Brutsaert DL: **Effect of temperature on the mechanical behaviour of single skinned cardiac cells.** *J Muscle Res Cell Motil* 1981, **2**(2):183-191.
122. de Tombe PP, ter Keurs HE: **Force and velocity of sarcomere shortening in trabeculae from rat heart. Effects of temperature.** *Circ Res* 1990, **66**(5):1239-1254.
123. Vahl CF, Lange R, Bauernschmitt R, Herold U, Tischmeyer K, Hagl S: **Analyzing contractile responses in demembranized pig papillary muscle fibres: the influence of calcium, resting force, and temperature.** *Thorac Cardiovasc Surg* 1991, **39**(6):329-337.
124. Bening C, Hamouda K, Leyh R: **Sex differences in volume overload in skinned fibers.** *BMC Cardiovasc Disord* 2016, **16**(1):197.
125. Bening C, Hamouda K, Schimmer C, Leyh R: **Myofilament function and body mass index.** *Biomed Rep* 2017, **6**(3):291-294.
126. Bening C, Leyh R: **Right atrial contractile dynamics are impaired in patients with postcapillary pulmonary hypertension.** *Exp Ther Med* 2016, **12**(2):792-798.

127. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T: **Mitochondrial creatine kinase in human health and disease.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1762**(2):164-180.
128. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM: **Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis.** *Biochem J* 1992, **281 (Pt 1)**:21-40.
129. Miyamoto S, Hori M, Izumi M, Ozaki H, Karaki H: **Species- and temperature-dependency of the decrease in myofilament Ca²⁺ sensitivity induced by beta-adrenergic stimulation.** *Jpn J Pharmacol* 2001, **85**(1):75-83.
130. Brixius K, Savvidou-Zaroti P, Mehlhorn U, Bloch W, Kranias EG, Schwinger RH: **Increased Ca²⁺-sensitivity of myofibrillar tension in heart failure and its functional implication.** *Basic Res Cardiol* 2002, **97 Suppl 1**:1111-1117.
131. Leyden: **Asthma and diabetes mellitus.** *Zeitschr Klin Med* 1881;**3**:358-364 1881.
132. Mayer: **Über den Zusammenhang des Diabetes Mellitus mit Erkrankungen des herzens.** *Zeitschr Klin Med* 1888;**14**:212-239 1888.
133. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A: **New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis.** *Am J Cardiol* 1972, **30**(6):595-602.
134. Asghar O, Al-Sunni A, Khavandi K, Khavandi A, Withers S, Greenstein A, Heagerty AM, Malik RA: **Diabetic cardiomyopathy.** *Clin Sci (Lond)* 2009, **116**(10):741-760.
135. Williams LJ, Nye BG, Wende AR: **Diabetes-Related Cardiac Dysfunction.** *Endocrinol Metab (Seoul)* 2017, **32**(2):171-179.
136. Cummins P: **Transitions in human atrial and ventricular myosin light-chain isoenzymes in response to cardiac-pressure-overload-induced hypertrophy.** *Biochem J* 1982, **205**(1):195-204.

137. Mytas DZ, Stougiannos PN, Zairis MN, Foussas SG, Pyrgakis VN, Kyriazis IA: **Diabetic myocardial disease: pathophysiology, early diagnosis and therapeutic options.** *J Diabetes Complications* 2009, **23**(4):273-282.
138. Gardner JD, Murray DB, Voloshenyuk TG, Brower GL, Bradley JM, Janicki JS: **Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, **298**(2):H497-504.
139. Malhotra A, Penpargkul S, Fein FS, Sonnenblick EH, Scheuer J: **The effect of streptozotocin-induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins.** *Circ Res* 1981, **49**(6):1243-1250.
140. Malhotra A: **Regulatory proteins in hamster cardiomyopathy.** *Circ Res* 1990, **66**(5):1302-1309.
141. Strang KT, Moss RL: **Alpha 1-adrenergic receptor stimulation decreases maximum shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats.** *Circ Res* 1995, **77**(1):114-120.
142. Guner S, Arioglu E, Tay A, Tasdelen A, Aslamaci S, Bidasee KR, Dincer UD: **Diabetes decreases mRNA levels of calcium-release channels in human atrial appendage.** *Mol Cell Biochem* 2004, **263**(1-2):143-150.
143. Miao Y, Zhang W, Zhong Y, Ma X: **Diastolic function of the right ventricle is impaired in experimental type 2 diabetic rat models.** *Turk J Med Sci* 2014, **44**(3):448-453.
144. Morano M, Boels P, Haworth SG, Haase H, Morano I: **Expression and function of atrial myosin light chain 1 in the porcine right ventricle of normal and pulmonary hypertensive animals.** *Adv Exp Med Biol* 1998, **453**:481-488; discussion 488-489.
145. Karamitsos TD, Karvounis HI, Dalamanga EG, Papadopoulos CE, Didangelos TP, Karamitsos DT, Parharidis GE, Louridas GE: **Early diastolic impairment of diabetic heart: the significance of right ventricle.** *Int J Cardiol* 2007, **114**(2):218-223.

146. Khavandi K, Khavandi A, Asghar O, Greenstein A, Withers S, Heagerty AM, Malik RA: **Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease?** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009, **23**(3):347-360.
147. Roelandt J: **The increasing importance of left atrial size assessment.** *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2011, **12**(2):147.
148. Hoit BD: **Left atrial size and function: role in prognosis.** *J Am Coll Cardiol* 2014, **63**(6):493-505.
149. Meris A, Amigoni M, Uno H, Thune JJ, Verma A, Kober L, Bourgoun M, McMurray JJ, Velazquez EJ, Maggioni AP *et al*: **Left atrial remodelling in patients with myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both: the VALIANT Echo study.** *Eur Heart J* 2009, **30**(1):56-65.
150. Pellman J, Sheikh F: **Atrial fibrillation: mechanisms, therapeutics, and future directions.** *Compr Physiol* 2015, **5**(2):649-665.
151. Heywood TJ, Seethala S, Khan T, Johnson A, Smith M, Rubenson D, Reynolds E: **Left Atrial Diastolic Dysfunction And Pulmonary Venous Hypertension In Atrial Fibrillation: Clinical, Hemodynamic And Echocardiographic Characteristics.** *J Atr Fibrillation* 2014, **7**(3):1117.
152. Gao HY, Zhang EL, Liu QR, Gu HQ, Zhang H, Zheng Z, Yang YJ, Gao RL, Wu YJ: **Impact of diabetes duration on 3-year clinical outcomes following coronary revascularization.** *Coron Artery Dis* 2017, **28**(2):151-158.
153. Butler J, Hamo CE, Filippatos G, Pocock SJ, Bernstein RA, Brueckmann M, Cheung AK, George JT, Green JB, Januzzi JL *et al*: **The potential role and rationale for treatment of heart failure with sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors.** *Eur J Heart Fail* 2017, **19**(11):1390-1400.
154. Wiviott SD, Raz I, Sabatine MS: **Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. Reply.** *N Engl J Med* 2019, **380**(19):1881-1882.
155. Neal B, Perkovic V, Matthews DR: **Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes.** *N Engl J Med* 2017, **377**(21):2099.

156. Neal B, Perkovic V, Matthews DR, Mahaffey KW, Fulcher G, Meininger G, Erondou N, Desai M, Shaw W, Vercruyse F *et al*: **Rationale, design and baseline characteristics of the CANagliflozin cardioVascular Assessment Study-Renal (CANVAS-R): A randomized, placebo-controlled trial.** *Diabetes Obes Metab* 2017, **19**(3):387-393.
157. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ *et al*: **Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes.** *N Engl J Med* 2015, **373**(22):2117-2128.
158. McMurray JJV, DeMets DL, Inzucchi SE, Kober L, Kosiborod MN, Langkilde AM, Martinez FA, Bengtsson O, Ponikowski P, Sabatine MS *et al*: **A trial to evaluate the effect of the sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor dapagliflozin on morbidity and mortality in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction (DAPA-HF).** *Eur J Heart Fail* 2019, **21**(5):665-675.
159. McMurray JJV, DeMets DL, Inzucchi SE, Kober L, Kosiborod MN, Langkilde AM, Martinez FA, Bengtsson O, Ponikowski P, Sabatine MS *et al*: **The Dapagliflozin And Prevention of Adverse-outcomes in Heart Failure (DAPA-HF) trial: baseline characteristics.** *Eur J Heart Fail* 2019, **21**(11):1402-1411.

9 Danksagungen

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. Rainer Leyh für die Vergabe dieses äußerst interessanten, spannenden und wissenschaftlich anspruchsvollen Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Constanze Bening für die exzellente Betreuung während der gesamten Dissertation, sowie für die in höchstem Maße wertvollen Anregungen und Diskussionen, ohne die die Erstellungen dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Konrad Güth und Herrn Dr. Jan Eckhardt für die Zusammenarbeit zur Etablierung der skinned-fiber-Methode und die wissenschaftlich hoch qualitativen Denkanstöße.

Herrn Khaled Alhussini danke ich für die herausragende Kooperation im Bereich der Erhebung der klinischen Daten.

Nicht zuletzt möchte ich Frau Renate Wahn und Frau Johanna Lesch für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Arbeiten im Labor und die vertrauensvolle Zusammenarbeit danken.