

Diplomarbeit

**EINFLUSS EINES DIABETES MELLITUS AUF
KARDIOMYOZYTENGRÖSSE UND FIBROSE
IM MENSCHLICHEN HERZ**

eingereicht von

Moritz Seel

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. Heiko Bugger

Univ. FA Dr. med. Johannes Gollmer

Graz, 28.07.2025

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, 28.07.2025

Moritz Seel eh.

Danksagung

Ich möchte meinem Erstbetreuer Prof. Dr. Heiko Bugger für die Möglichkeit danken, mein Diplomarbeitsprojekt in der „Cardiac Energetics and Immunology“ Forschungsgruppe durchzuführen und unter seinem Mentoring umfassende Einblicke in die kardiovaskuläre Grundlagenforschung zu bekommen.

Auch meinem Zweitbetreuer Dr. Johannes Gollmer gilt großer Dank für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Projektumsetzung.

Besonderer Dank ergeht an Dipl.-Biol.ⁱⁿ Katharina Pfeil, meine erste Ansprechperson im Labor, die mir bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist, sowie Dr. Ivan Vosko, der mich beim Erlernen der Arbeitstechniken und der Umsetzung des Projektes unterstützt hat. Dank gebührt auch Dr.ⁱⁿ Nikole Byrne für ihre konstruktiven Rückmeldungen und Dr. Thomas Rathner für den Erfahrungsaustausch.

Nicht zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meiner Familie und meinen Freund*innen für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt auf meinem bisherigen Lebensweg bedanken.

Zusammenfassung

Patient*innen mit Diabetes mellitus haben ein erhöhtes Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln und haben zudem bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz eine schlechtere Prognose als Patient*innen mit Herzinsuffizienz ohne Diabetes mellitus. Zahlreiche Mechanismen dieses als diabetische Herzerkrankung bezeichneten Phänomens wurden postuliert, von denen man annimmt, dass sie zu strukturellen Veränderungen im Herz führen. In dieser Arbeit wurde linksventrikuläres Myokard von drei Patient*innengruppen hinsichtlich der Merkmale Kardiomyozyten-Hypertrophie und myokardiale Fibrose untersucht. Eine Gruppe mit Diabetes mellitus Typ 2 und normaler Ejektionsfraktion (Db-pEF) soll einen milden Phänotyp der diabetischen Herzerkrankung repräsentieren und wurde mit einer Kontrollgruppe ohne Diabetes mellitus (Non-Db-pEF) und einer Gruppe mit Diabetes mellitus Typ 2, ischämischer Kardiomyopathie und reduzierter Ejektionsfraktion (Db-ICM) verglichen.

Die mittlere Kardiomyozyten-Querschnittsfläche betrug $620 \pm 141 \mu\text{m}^2$ in der Gruppe Non-Db-pEF, $602 \pm 88 \mu\text{m}^2$ in der Gruppe Db-pEF und $730 \pm 195 \mu\text{m}^2$ in der Gruppe Db-ICM, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden konnte (ANOVA, $F(2, 16) = 1,342$, $p = 0,289$).

Der Bindegewebsanteil war $0,67 \pm 0,45 \%$ in der Gruppe Non-Db-pEF, $1,83 \pm 0,86 \%$ in der Gruppe Db-pEF und $11,42 \pm 12,92 \%$ in der Gruppe Db-ICM. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen detektiert werden (Welch-ANOVA, $F(2, 7,899) = 5,845$, $p = 0,028$, $\eta^2 = 0,340$). Die Gruppe Db-pEF zeigte signifikante Fibrose gegenüber der Gruppe Non-Db-pEF (Games-Howell-Post-hoc-Test, $p = 0,048$, $+1,15$, 95 %-CI [0,01, 2,30]).

Die Veränderungen könnten Ausdruck einer diabetischen Herzerkrankung sein, wobei insbesondere die arterielle Hypertonie als möglicher Störfaktor berücksichtigt werden muss.

Abstract

Diabetes mellitus increases the risk of developing heart failure and diabetic patients with heart failure have poorer prognosis compared to non-diabetic patients. Numerous mechanisms of diabetic heart disease have been proposed, which are thought to cause structural changes in the heart. In this thesis, left ventricular myocardium of three patient groups was analyzed for cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis. A group of patients with type 2 diabetes and normal ejection fraction (Db-pEF) was designed to represent a mild phenotype of diabetic heart disease and was compared with a control group of non-diabetic patients (Non-Db-pEF) and a patient group with type 2 diabetes, ischemic cardiomyopathy and reduced ejection fraction (Db-ICM).

Mean cross-sectional area of cardiomyocytes was $620 \pm 141 \mu\text{m}^2$ in group Non-Db-pEF, $602 \pm 88 \mu\text{m}^2$ in group Db-pEF and $730 \pm 195 \mu\text{m}^2$ in group Db-ICM. There was no statistically significant difference in cardiomyocyte cross-sectional area between groups (one-way ANOVA, $F(2, 16) = 1.342$, $p = 0.289$).

Connective tissue portion was $0.67 \pm 0.45 \%$ in group Non-Db-pEF, $1.83 \pm 0.86 \%$ in group Db-pEF and $11.42 \pm 12.92 \%$ in group Db-ICM. A statistically significant difference between groups was revealed (Welch-ANOVA, $F(2, 7.899) = 5.845$, $p = 0.028$, $\eta^2 = 0.340$). Significant fibrosis was detected in group Db-pEF in contrast to group Non-Db-pEF (Games-Howell post-hoc test, $p = 0.048$, $+1.15$, 95 %-CI [0.01, 2.30]).

The alterations could be a result of diabetic heart disease, but confounding factors such as hypertension must be considered when interpreting the data.

Publikation

Zum Zeitpunkt der Einreichung wurde diese Arbeit noch nicht veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	9
2	Abbildungsverzeichnis	11
3	Tabellenverzeichnis	12
4	Einleitung	13
4.1	Hintergrund	13
4.2	Diabetische Kardiomyopathie	13
4.3	Diabetische Herzerkrankung.....	14
4.4	Phänotyp des diabetischen Herzens	14
4.4.1	Funktionelle Veränderungen.....	14
4.4.2	Strukturelle Veränderungen.....	15
4.5	Zugrundeliegende Mechanismen.....	18
4.6	Zielsetzung der Arbeit	19
4.7	Hypothese	19
5	Material und Methoden	20
5.1	Materialien	20
5.1.1	Laboraausstattung	20
5.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	20
5.1.3	Chemikalien	21
5.1.4	Mikroskop	22
5.1.5	Software.....	22
5.1.6	Probenmaterial	22
5.2	Methoden	23
5.2.1	Kryotomie.....	23
5.2.2	WGA-Färbung.....	23
5.2.3	MTC-Färbung	24
5.2.4	Quantifizierung.....	25
5.2.5	Statistik	25
6	Ergebnisse	26
6.1	Patient*innencharakteristika	26
6.2	Kardiomyozytengröße.....	27
6.3	Myokardiale Fibrose.....	29

7	Diskussion.....	31
8	Fazit	36
	Literaturverzeichnis	37

1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
AGE	Advanced glycation end product
ANOVA	Analysis of variance
AP-1	Aktivator-Protein-1
BMI	Body-Mass-Index
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Db	Diabetes
EF	Ejektionsfraktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESC	European Society of Cardiology
EZM	Extrazelluläre Matrix
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IL-6	Interleukin-6
KHK	Koronare Herzkrankheit
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTC	Masson-Trichrom
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
O-GlcNAc	O-linked β -N-acetylglucosamine
OCT	Optimal cutting temperature
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE-5	Phosphodiesterase-5
pEF	Erhaltene Ejektionsfraktion
PFA	Paraformaldehyd
PKG	Proteinkinase G
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE	Receptor for advanced glycation end products

RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
SGLT-2	Sodium glucose linked transporter-2
TCF21	Transkriptionsfaktor-21
TGF-β	Transforming growth factor- β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
WGA	Wheat germ agglutinin

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der kardialen Umbauprozesse bei diabetischer Herzerkrankung (adaptiert nach Tan et al., 2020 und erstellt mit BioRender.com)	17
Abbildung 2: Mediatoren der diabetischen Herzerkrankung (adaptiert nach Ritchie und Abel, 2020 und erstellt mit BioRender.com).....	18
Abbildung 3: Repräsentative Bilder der WGA-Färbung (Objektiv mit 40-facher Vergrößerung)	27
Abbildung 4: Streudiagramm der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche	27
Abbildung 5: Mittlere Kardiomyozyten-Querschnittsfläche (Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung)	28
Abbildung 6: Repräsentative Bilder der MTC-Färbung (Objektiv mit 20-facher Vergrößerung)	29
Abbildung 7: Streudiagramm des Bindegewebsanteils	29
Abbildung 8: Mittlerer Bindegewebsanteil im linksventrikulären Myokard (Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung, Post-hoc-Test: * $p < 0,05$)	30

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborausstattung	20
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	20
Tabelle 4: Chemikalien.....	21
Tabelle 5: Mikroskop	22
Tabelle 6: Software	22
Tabelle 7: Übersicht über die Charakteristika der drei Gruppen (unvollständige Daten: § n = 5/6, # n = 5/7)	26

4 Einleitung

4.1 Hintergrund

Die Prävalenz von Diabetes mellitus nimmt weltweit zu (Ong et al., 2023). Schätzungen zufolge litten 828 Millionen Menschen im Jahr 2022 an Diabetes mellitus (Zhou et al., 2024). Diabetes mellitus Typ 2 macht mit über 90 % der Fälle den Hauptanteil aus. Beta-Zell-Dysfunktion, Insulinresistenz und chronische Inflammation führen hierbei zu einer Störung der Glukose-Homöostase und Hyperglykämie. Hauptrisikofaktor für Diabetes mellitus Typ 2 ist ein hoher BMI (DeFronzo et al., 2015).

Diabetes mellitus beeinflusst das Herz auf vielfältige Weise. Zum einen ist Diabetes mellitus ein unabhängiger Risikofaktor für Atherosklerose und atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen (Fruchart et al., 2004). In Beobachtungsstudien konnte für Patient*innen mit Diabetes mellitus aber auch ein 2- bis 4-fach höheres Risiko für Herzinsuffizienz gegenüber Patient*innen ohne Diabetes mellitus gezeigt werden (Dunlay et al., 2019). Diabetes mellitus ist darüber hinaus mit einer schlechteren Prognose bei Herzinsuffizienz assoziiert (Marx et al., 2023).

4.2 Diabetische Kardiomyopathie

Die bidirektionale Assoziation von Diabetes mellitus und Herzinsuffizienz hat zum Konzept der diabetischen Kardiomyopathie geführt, bei dem direkte Effekte diabetesassoziierter Stoffwechselveränderung auf die myokardiale Funktion angenommen werden (Maack et al., 2018). Die Definition der diabetischen Kardiomyopathie ist in der Literatur nicht einheitlich, umfasst aber meist eine abnorme myokardiale Struktur und Funktion bei Diabetes mellitus, in Abwesenheit anderer kardialer Risikofaktoren wie koronarer Herzkrankheit, arterieller Hypertonie oder signifikanten Klappenerkrankungen (Ritchie und Abel, 2020, Gollmer et al., 2019, Jia et al., 2018, Rydén et al., 2013). Die ESC definierte die diabetische Kardiomyopathie im Jahr 2018 als myokardiale Dysfunktion bei Patient*innen mit langjährigem und/oder schlecht kontrolliertem Diabetes mellitus Typ 2 und Ausschluss einer signifikanten koronaren Herzkrankheit, arteriellen Hypertonie, Klappenerkrankungen, angeborenen Herzerkrankung sowie familiären, viralen, toxischen oder infiltrativen Kardiomyopathie (Maack et al., 2018).

Gleichwohl fasste die ESC im Jahr 2023 zusammen, dass es trotz der Forschungsbestrebungen der letzten Jahrzehnte bis dato nicht gelungen ist, die Existenz der diabetischen Kardiomyopathie zu beweisen (Marx et al., 2023).

Der Nachweis einer eigenständigen diabetischen Kardiomyopathie gestaltet sich insofern schwierig, als oft Störfaktoren wie arterielle Hypertonie, mikrovaskuläre Dysfunktion und autonome Neuropathie vorliegen (Marwick et al., 2018).

4.3 Diabetische Herzerkrankung

Da Diabetes mellitus häufig mit Komorbiditäten wie arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit vergesellschaftet ist, wurde die Definition der diabetischen Kardiomyopathie in den letzten Jahren zunehmend hinterfragt. Es wurde unter anderem der Ausdruck „diabetic heart disease“ als alternative Bezeichnung für dieses Phänomen vorgeschlagen (Ritchie und Abel, 2020). Im Folgenden werden der Phänotyp des diabetischen Herzens sowie mögliche Mechanismen der diabetischen Herzerkrankung zusammengefasst.

4.4 Phänotyp des diabetischen Herzens

4.4.1 Funktionelle Veränderungen

Eine linksventrikuläre diastolische Dysfunktion wird als typisches Merkmal des diabetischen Herzens angesehen. Hierbei kommt es zu einer Störung der linksventrikulären Relaxation und Füllung, die unter anderem mittels Echokardiographie nachgewiesen werden kann (Ritchie und Abel, 2020, Negishi, 2018). Im Rahmen von echokardiographischen Untersuchungen bei 229 Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 konnten bei 72 % der Studienteilnehmer*innen Auffälligkeiten detektiert werden. Es konnte bei 48 % der Patient*innen eine diastolische und bei 16 % eine kombinierte systolisch-diastolische Dysfunktion nachgewiesen werden (Srivastava et al., 2008). Auf Basis einer Metaanalyse wurde die Häufigkeit der diastolischen Dysfunktion auf 47 % bei Patientinnen bzw. 46 % bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 geschätzt (Bouthoorn et al., 2018). Im Gegensatz dazu kann eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion oftmals erst im Verlauf nachgewiesen werden. Myokardiale Strain-Analyse kann dabei helfen, auch milde Veränderungen der systolischen Funktion zu detektieren (Marwick et al., 2018, Negishi, 2018).

Insgesamt bleibt die kardiale Dysfunktion bei Patient*innen mit Diabetes mellitus häufig lange asymptomatisch (Ritchie und Abel, 2020).

4.4.2 Strukturelle Veränderungen

Es wird angenommen, dass Diabetes mellitus über verschiedene Mechanismen zu kardialen Umbauprozessen führt, die in weiterer Folge zur funktionellen Beeinträchtigung des Herzens beitragen (Ritchie und Abel, 2020).

Diabetes mellitus führt im Tiermodell zu kardialer Fibrose (Bowden et al., 2015, Huynh et al., 2012, Huynh et al., 2010, Van Linthout et al., 2008, Mizushige et al., 2000). In humanen Autopsie- und Biopsie-Studien konnte bei Patient*innen mit Diabetes mellitus interstitielle und perivaskuläre Fibrose gezeigt werden (Shimizu et al., 1993, van Hoeven und Factor, 1990, Regan et al., 1977). Diffuse myokardiale Fibrose ist charakterisiert durch übermäßige interstitielle und perivaskuläre Ablagerung von quervernetzten Kollagenfasern und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix und kann bei Herzerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie beobachtet werden. Eine solche muss von fokalen fibrotischen Narben abgegrenzt werden, die als Folge einer ischämischen Myokardnekrose auftreten können (López et al., 2021). Diabetes mellitus war in cMRT-Untersuchungen mit einer erhöhten extrazellulären Volumenfraktion assoziiert, was auch auf eine Zunahme der extrazellulären Matrix im Myokard hindeutet (Wong et al., 2013).

Bei Patient*innen mit Diabetes mellitus konnte außerdem eine Zunahme der linksventrikulären Masse bzw. eine linksventrikuläre Hypertrophie gezeigt werden (Negishi, 2018, Srivastava et al., 2008, Dawson et al., 2005, Devereux et al., 2000, Lee et al., 1997). Eine kardiale Hypertrophie gilt als typisches Merkmal der diabetischen Herzerkrankung. Hierbei ist aber zu beachten, dass dies nicht mit einer Kardiomyozyten-Hypertrophie gleichzusetzen ist, da sich sowohl extrazelluläre Matrix als auch Anzahl der Kardiomyozyten auf die Masse des linken Ventrikels auswirken (Ritchie und Abel, 2020). Eine Kardiomyozyten-Hypertrophie ist auf zellulärer Ebene durch eine Zunahme der Zellgröße, verstärkte Proteinbiosynthese und sarkomere Veränderungen gekennzeichnet (Samak et al., 2016, Frey et al., 2004). Eine Kardiomyozyten-Hypertrophie konnte in verschiedenen Tiermodellen für Diabetes mellitus beobachtet werden (Bowden et al., 2015, Huynh et al., 2012,

Desrois et al., 2004). Ob Diabetes mellitus auch zu einer Hypertrophie humaner Kardiomyozyten führt, ist noch nicht hinreichend geklärt.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, führt die diabetische Stoffwechsellage zu oxidativem Stress. Es wird vermutet, dass reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies in den Endothelzellen zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid führen. Über Hemmung des sGC-cGMP-PKG-Pfads kommt es zu einer Aktivitätsminderung der vor Hypertrophie schützenden Proteinkinase G (Tan et al., 2020).

Es wird angenommen, dass Inflammation und Advanced-Glycation-End-Products wichtige Reize für Umbauprozesse der extrazellulären Matrix sind. Aktivierte Immunzellen sezernieren profibrotische Zytokine wie Transforming-Growth-Factor- β , wodurch Fibroblasten und Myofibroblasten aktiviert sowie deren Umwandlung gefördert wird. Eine ähnliche Wirkung hat auch die Interaktion von AGEs mit ihrem Rezeptor. In der Folge werden vermehrt Fibronectin und Kollagene gebildet, die in der extrazellulären Matrix akkumulieren. AGEs fördern außerdem die Quervernetzung von Fasern der extrazellulären Matrix und beeinträchtigen die Funktion der Matrix-Metalloproteinasen (Tan et al., 2020). Eine Dysregulation der Kollagen abbauenden Matrix-Metalloproteinasen und deren Gewebisinhibitoren begünstigt die Entwicklung einer myokardialen Fibrose zusätzlich (Westermann et al., 2007).

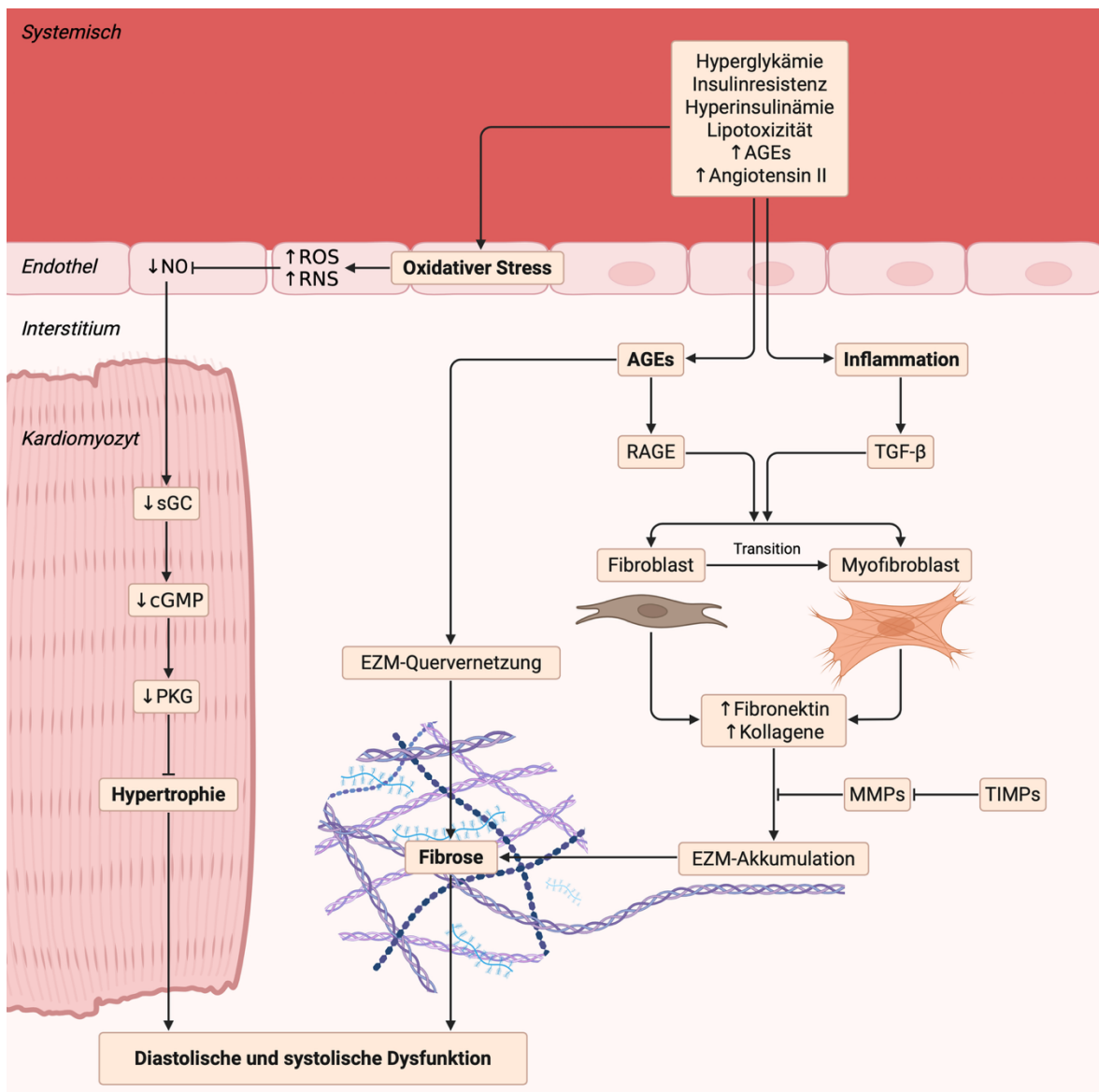


Abbildung 1: Schematische Darstellung der kardialen Umbauprozesse bei diabetischer Herzerkrankung (adaptiert nach Tan et al., 2020 und erstellt mit BioRender.com)

Ein wichtiges Bindeglied zwischen den funktionellen und strukturellen Veränderungen ist die myokardiale Steifigkeit. Die Verformbarkeit des Myokards durch äußere Kräfte ist eine zentrale Determinante der kardialen Funktion und wird insbesondere durch das Zytoskelett der Kardiomyozyten und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bestimmt (Villalobos Lizardi et al., 2022).

4.5 Zugrundeliegende Mechanismen

Diskutierte Pathomechanismen sind reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress, Entzündung, veränderte Insulin-Sensitivität und -Signaltransduktion, Beeinträchtigung des kardialen Fettsäure- und Glukose-Stoffwechsels, Lipotoxizität, Advanced-Glycation-End-Products, mitochondriale Dysfunktion, O-GlcNAcylierung, Zelltod, Autophagie, RAAS-Aktivierung, autonome Dysfunktion, beeinträchtigt Calcium-Handling, mikrovaskuläre Dysfunktion, ER-Stress, Micro-RNAs und epigenetische Phänomene (Ritchie und Abel, 2020, Gollmer et al., 2019, Jia et al., 2018, Bugger und Abel, 2014). Abbildung 2 gibt eine Übersicht über weithin anerkannte Mediatoren der diabetischen Herzerkrankung.

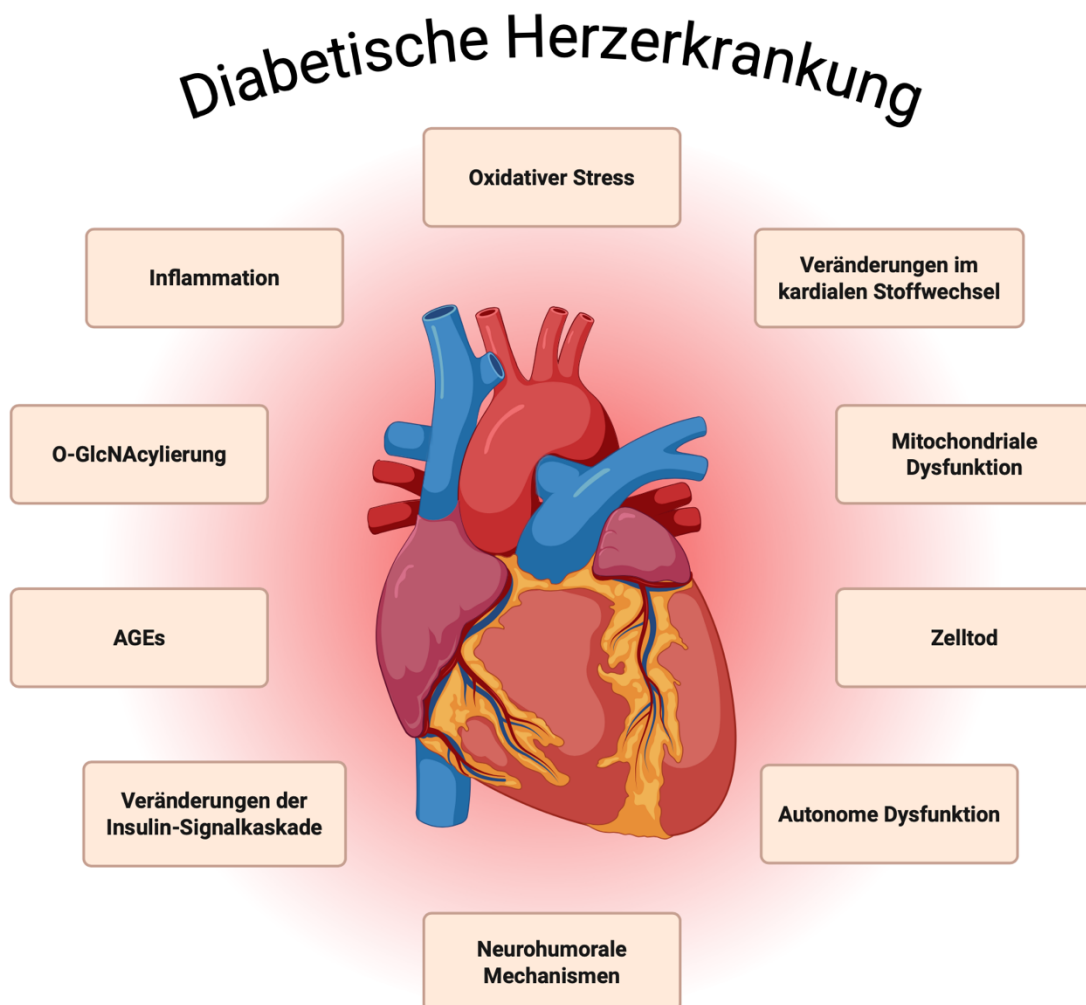


Abbildung 2: Mediatoren der diabetischen Herzerkrankung (adaptiert nach Ritchie und Abel, 2020 und erstellt mit BioRender.com)

4.6 Zielsetzung der Arbeit

Studien in Tiermodellen eines Diabetes mellitus Typ 2, die spontan keine Erkrankung der Herzkranzgefäße entwickeln können, weisen darauf hin, dass Diabetes mellitus auch ohne ischämische Komponente eine Kardiomyozyten-Hypertrophie und Fibrose im Herzmuskel induzieren kann. Ob dies auch beim Menschen der Fall ist, ist bislang unklar. Ziel dieser Arbeit ist es daher, Kardiomyozytengröße und myokardialen Bindegewebsanteil bei einer Patient*innengruppe mit Diabetes mellitus Typ 2 und erhaltener Ejektionsfraktion, aber ohne relevante koronare Herzkrankheit (Db-pEF, n = 6) zu untersuchen. Als Kontrolle dient eine Patient*innengruppe ohne Diabetes mellitus, ohne koronare Herzkrankheit mit erhaltener Ejektionsfraktion (Non-Db-pEF, n = 7). Um den relativen Anteil eines Diabetes mellitus bei Patient*innen mit gleichzeitig vorliegender ischämischer Kardiomyopathie beurteilen zu können, werden Kardiomyozytengröße und Bindegewebsanteil zusätzlich in einer dritten Patient*innengruppe mit Diabetes mellitus Typ 2, ischämischer Kardiomyopathie und reduzierter Ejektionsfraktion (Db-ICM, n = 6) untersucht.

4.7 Hypothese

Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 und erhaltener Ejektionsfraktion (Db-pEF), aber ohne ischämische Herzerkrankung, weisen bereits eine Kardiomyozyten-Hypertrophie und myokardiale Fibrose auf.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Laborausstattung

Bezeichnung	Hersteller
Microm HM 560 Cryostat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Färbekästen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Färbegestelle	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Färbekammer StainTray®, Deckel schwarz	Simport Scientific, Beloeil, QC Canada

Tabelle 1: Laborausstattung

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Objektträger Superfrost® WEISS geschnitten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser Stärke 1, 24 x 50 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Super Pap Pen	Biocare Medical, Pacheco, CA USA

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

5.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Tissue Plus® O.C.T. Compound	Scigen Scientific, Gardena, CA USA
PBS pH 7,2 - 7,3	Gatt-Koller, Absam, Österreich
Paraformaldehyd (PFA) 4 % in PBS pH 7,4	Morphisto, Offenbach am Main, Deutschland
Intvitrogen® Wheat Germ Agglutinin (WGA) Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA
Bouin'sche Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA
Weigert's Eisen-Hämatoxylin-Lösung Teil A	Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA
Weigert's Eisen-Hämatoxylin-Lösung Teil B	Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA
Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA
Phosphormolybdänsäure-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA
Phosphorwolframsäure-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA
Anilinblau-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA
Ethanol EMSURE® 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure ROTIPURAN® 100 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roticlear®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Mount	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: Chemikalien

5.1.4 Mikroskop

Bezeichnung	Hersteller
BX51 Systemmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
UPlanApo 4x/0,16 Objektiv	Olympus, Tokyo, Japan
UPlanApo 10x/0,40 Objektiv	Olympus, Tokyo, Japan
UPlanApo 20x/0,70 Objektiv	Olympus, Tokyo, Japan
UPlanApo 40x/0,85 Objektiv	Olympus, Tokyo, Japan
U-TV0.5XC-2 C-Mount-Adapter	Olympus, Tokyo, Japan
DP71 Digitalkamera	Olympus, Tokyo, Japan
U-RFL-T Mercury Burner	Olympus, Tokyo, Japan

Tabelle 4: Mikroskop

5.1.5 Software

Bezeichnung	Hersteller
cellSens Standard	Olympus, Tokyo, Japan
Fiji (ImageJ2)	Open Source
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, WA USA
SPSS Statistics	IBM, Armonk, NY USA

Tabelle 5: Software

5.1.6 Probenmaterial

Bei den Herzen handelt es sich entweder um Spenderorgane, die aufgrund unterschiedlicher Faktoren nicht transplantiert werden konnten, oder um die versagenden Herzen von Empfänger*innen einer Herztransplantation. Das Probenmaterial wurde zwischen 2008 und 2018 gesammelt und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Ein positives Votum durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz liegt vor (28-508 ex 15/16 1274-2016).

5.2 Methoden

Zur Vermeidung systematischer Fehler erfolgten Probenverarbeitung, Färbung und Quantifizierung in zufälliger Reihenfolge und ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

5.2.1 Kryotomie

Die gefrorenen Gewebestücke wurden auf einem Probenhalter in OCT-Compound eingebettet und so ausgerichtet, dass die Kardiomyozyten möglichst quer angeschnitten wurden. Als Objekttemperatur und Messertemperatur wurden jeweils $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ am Kryostaten gewählt. Nach dem Trimmen (Schnitte mit $30\text{ }\mu\text{m}$ Dicke bis zur gewünschten Ebene des Präparats) wurden unter Zuhilfenahme eines Schnittstreckers $10\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte angefertigt und jeweils 4 Schnitte auf einen Objektträger transferiert. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Objektträger bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die Weiterverwendung gelagert.

5.2.2 WGA-Färbung

Bei Wheat-Germ-Agglutinin handelt es sich um ein Lektin, das an die Zellmembranbestandteile N-Acetylglucosamin und Sialinsäure bindet. WGA ist an einen grünen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, der bei der folgenden Mikroskopie eine Darstellung der Zellmembranen und Vermessung der Kardiomyozyten erlaubt. WGA wurde als Aliquot zu $0,1\text{ mg}$ in $100\text{ }\mu\text{l}$ PBS bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Objektträger wurden aufgetaut und die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Zur Gewebefixierung wurden die Objektträger für 15 Minuten in eine Färbeküvette mit PFA 4 % in PBS gestellt. In der Zwischenzeit wurde ein WGA-Aliquot aufgetaut und mit PBS im Verhältnis 1:100 weiter verdünnt (4 ml WGA-Arbeitslösung entsprechen $3960\text{ }\mu\text{l}$ PBS und $40\text{ }\mu\text{l}$ WGA-Stammlösung). Die Vorbereitung der WGA-Lösung erfolgte wie die nachfolgenden Schritte vor Licht geschützt im abgedunkelten Raum. Nach der Fixierung wurden die Objektträger für 3 mal 3 Minuten in Färbeküvetten mit PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger in eine Färbekammer gelegt und WGA-Lösung auf die einzelnen Schnitte pipettiert ($800\text{ }\mu\text{l}$ Lösung pro Objektträger entsprechend $200\text{ }\mu\text{l}$ pro Schnitt). Die Färbekammer wurde mit einem schwarzen Deckel verschlossen. Nach 60 Minuten wurden die Objektträger herausgenommen und nochmals für 3 mal 3 Minuten in Färbeküvetten mit frischem PBS gewaschen. Die Objektträger wurden jeweils mit einem Tropfen Fluorescence-Mounting-Medium und einem

Deckglas eingedeckt und bis zur Mikroskopie lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

5.2.3 MTC-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung erlaubt durch die Kombination mehrerer Farbstoffe eine differenzierte Bindegewebsdarstellung. Durch Quantifizierung der mit Anilinblau gefärbten Kollagenfasern ist ein Rückschluss auf Fibrose im Gewebe möglich.

Die Objektträger wurden hierfür aufgetaut und die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Zur Gewebefixierung wurden die Objektträger zuerst für 60 Minuten in eine Färbeküvette mit PFA 4 % in PBS und danach über Nacht in einer Färbeküvette mit Bouin'scher Lösung behandelt. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für 1 bis 2 Minuten unter fließendem lauwarmem Leitungswasser und danach kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Als erster Färbeschritt wurde Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Arbeitslösung auf die Schnitte pipettiert, sodass diese vollständig bedeckt waren. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten wurden die Objektträger für 10 Minuten unter fließendem warmem Leitungswasser und für eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte ein zweiter Färbeschritt in einer Küvette mit Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung. Danach wurden die Objektträger 3 mal 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Als nächstes wurde für 10 Minuten mehrmals Phosphorwolfram-/Phosphormolybdän-Säure-Arbeitslösung auf die Objektträger pipettiert. Nach kurzem Abtropfen wurden die Objektträger für 5 Minuten in einer Küvette mit Anilinblau-Lösung gefärbt. Im Anschluss wurden die Objektträger 3 mal 1 Minute in destilliertem Wasser, danach 2 Minuten in Essigsäure 1 % und dann nochmals 2 mal 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Entwässerung wurden die Objektträger nacheinander jeweils für 3 Minuten in Färbeküvetten mit 70 %, 90 % und 100 % Ethanol gestellt. Im Anschluss folgten noch 5 Minuten in einer Küvette mit dem Intermedium Roticlear®. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Objektträger mit Roti®-Mount und Deckgläsern eingedeckt und für 10 Minuten gepresst. Die Trocknung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

5.2.4 Quantifizierung

Die Bestimmung der Kardiomyozytengröße erfolgte durch Vermessung der WGA gefärbten Kardiomyozyten. Zur Fluoreszenz-Mikroskopie wurden ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung und Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet. In 12 zufällig ausgewählten Arealen pro Patient*in (4 Gewebeschnitte mit 3 Arealen) wurde die Fläche von jeweils 20 möglichst quergeschnittenen Kardiomyozyten vermessen. Hierzu kam das Polygon-Werkzeug in cellSens Standard zur Anwendung, mit dem die Zellmembranen der Kardiomyozyten umfahren wurden. Die so ermittelte Kardiomyozyten-Querschnittsfläche wird in μm^2 angegeben.

Die Quantifizierung des Bindegewebes erfolgte mittels stereologischer Punktzählung. Hierfür wurden pro Patient*in 16 zufällig ausgewählte Areale (4 Gewebeschnitte mit 4 Arealen) untersucht. Die Mikroskopie erfolgte mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung. Mithilfe der Software Fiji wurde über jedes Areal ein Punktgitter mit 266 Kreuzen gelegt und die Anzahl der Punkt-Bindegewebe-Überschneidungen ermittelt. Hierfür wurde ein dimensionsloser Punkt auf dem Kreuz definiert und für die gesamte Auswertung beibehalten. Der Bindegewebsanteil ergibt sich aus der Anzahl der Punkt-Bindegewebe-Überschneidungen geteilt durch die Anzahl der Referenz-Punkte (Mouton, 2011). Die Ergebnisse werden als Prozentwerte angegeben.

5.2.5 Statistik

Die Daten wurden in Microsoft Excel erfasst. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics. Für die Überprüfung der Voraussetzungen kamen der Shapiro-Wilk-Test und der Levene-Test zur Anwendung. Als Testverfahren wurden eine ANOVA bzw. Welch-ANOVA gewählt. Als Post-hoc-Tests wurden Tukey HSD bzw. Games-Howell-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau bei allen Tests war $\alpha = 0,05$. Die Ergebnisse werden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

6 Ergebnisse

6.1 Patient*innencharakteristika

	Non-Db-pEF	Db-pEF	Db-ICM
n	7	6	6
Alter [Jahre]	63,3 ± 4,2	62,0 ± 10,5	62,2 ± 6,2
Weiblich [%]	28,6	33,3	0,0
BMI [kg/m ²]	28,8 ± 8,6	29,1 ± 2,8	28,0 ± 4,1 §
EF [%]	63,9 ± 4,0	65,3 ± 5,5	26,2 ± 9,2
Diabetes mellitus Typ 2 [%]	0,0	100,0	100,0
Relevante KHK [%]	0,0	0,0	100,0
Arterielle Hypertonie [%]	40,0 #	83,3	100,0
Signifikante Klappenerkrankung [%]	0,0	0,0	0,0

Tabelle 6: Übersicht über die Charakteristika der drei Gruppen (unvollständige Daten: § n = 5/6, # n = 5/7)

Die Gruppen Non-Db-pEF (n = 7), Db-pEF (n = 6) und Db-ICM (n = 6) sind annähernd gleich groß. Lebensalter und Body-Mass-Index sind zwischen den Gruppen vergleichbar. Frauen sind insbesondere in der Db-ICM Gruppe unterrepräsentiert. Ejektionsfraktion, Diabetes-Status und KHK-Status entsprechen den gewählten Definitionen der Gruppen. Der Anteil an arterieller Hypertonie als Komorbidität unterscheidet sich zwischen den drei Gruppen. Signifikante Klappenerkrankungen waren bei den Patient*innen nicht bekannt.

6.2 Kardiomyozytengröße

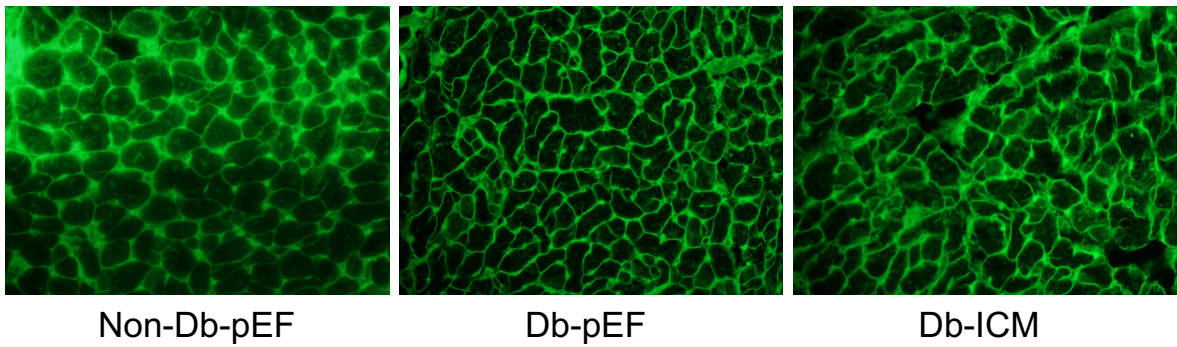


Abbildung 3: Repräsentative Bilder der WGA-Färbung (Objektiv mit 40-facher Vergrößerung)

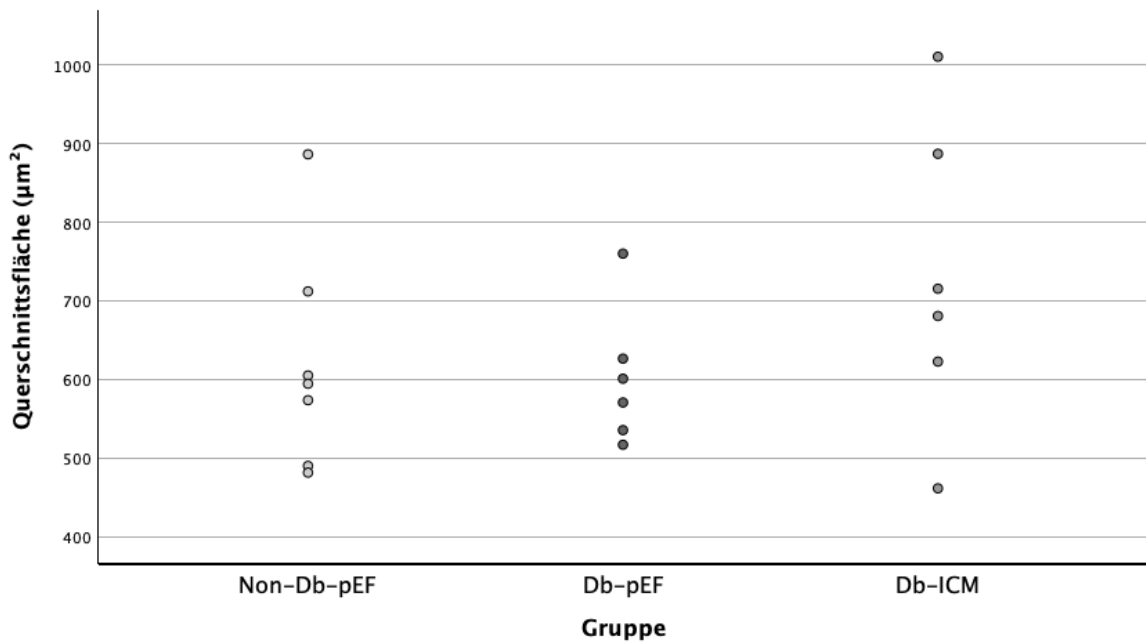


Abbildung 4: Streudiagramm der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche

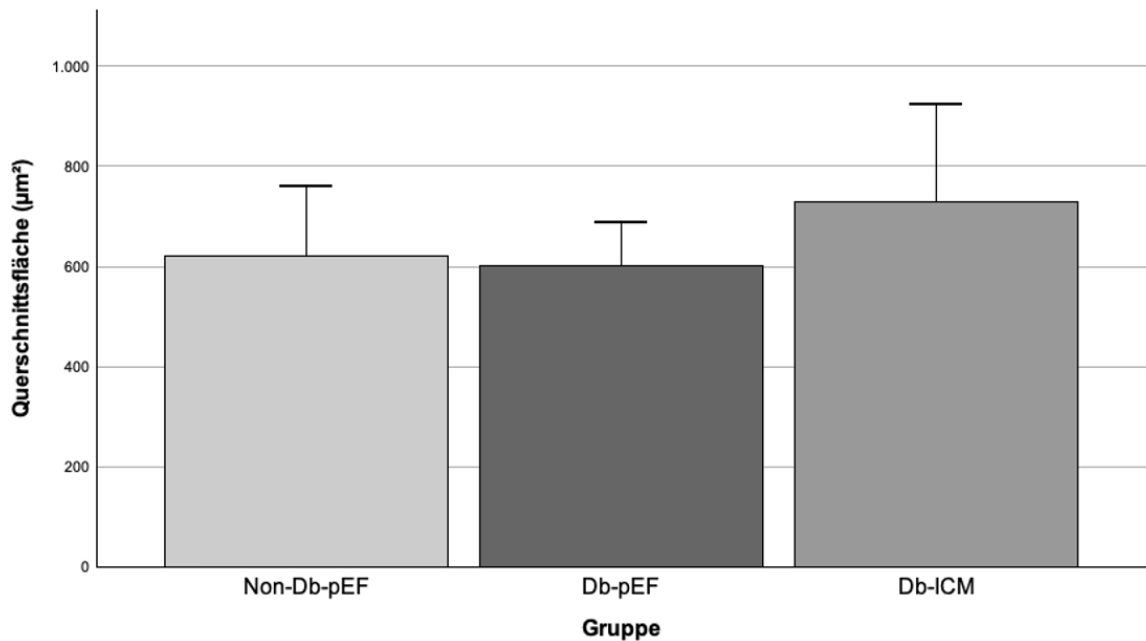


Abbildung 5: Mittlere Kardiomyozyten-Querschnittsfläche (Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung)

Die mittlere Kardiomyozyten-Querschnittsfläche beträgt $620 \pm 141 \mu\text{m}^2$ in der Gruppe Non-Db-pEF, $602 \pm 88 \mu\text{m}^2$ in der Gruppe Db-pEF und $730 \pm 195 \mu\text{m}^2$ in der Gruppe Db-ICM. Die Werte sind in allen drei Gruppen normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$) und Varianzhomogenität kann angenommen werden (Levene-Test, $p = 0,272$). Die ANOVA zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen $F(2, 16) = 1,342$, $p = 0,289$.

6.3 Myokardiale Fibrose

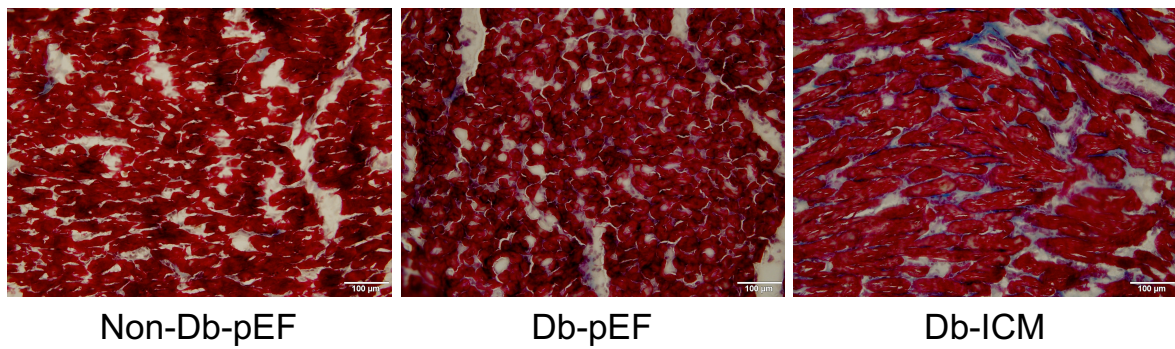


Abbildung 6: Repräsentative Bilder der MTC-Färbung (Objektiv mit 20-facher Vergrößerung)

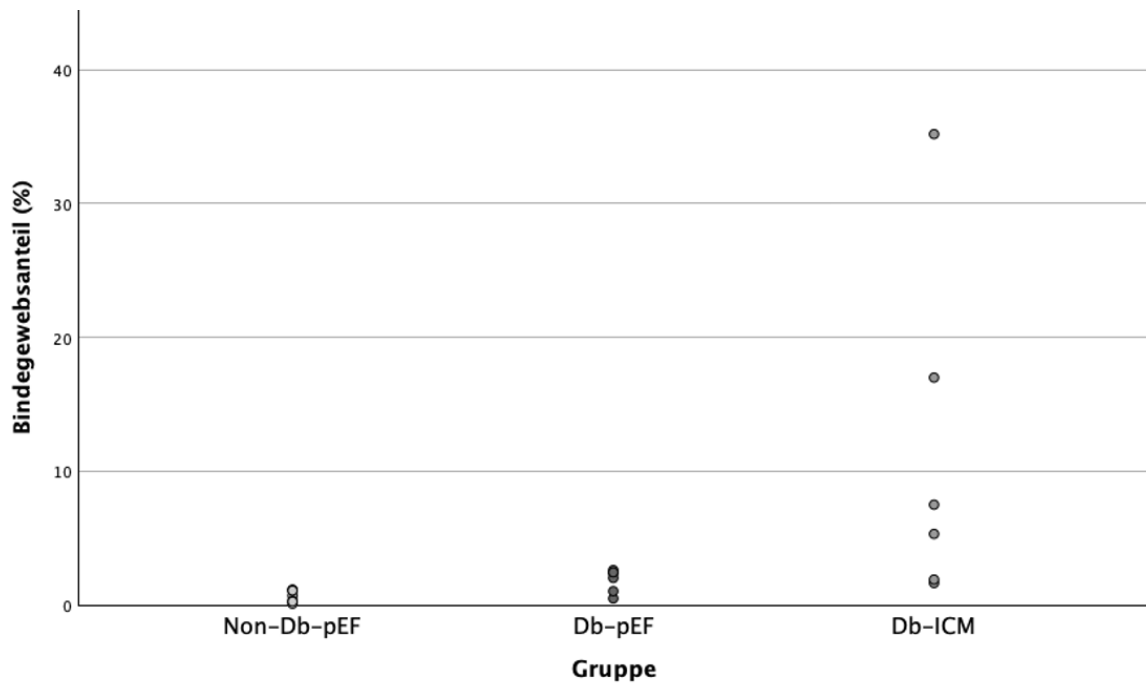


Abbildung 7: Streudiagramm des Bindegewebsanteils

In der explorativen Datenanalyse mit SPSS sind keine Ausreißer identifizierbar.

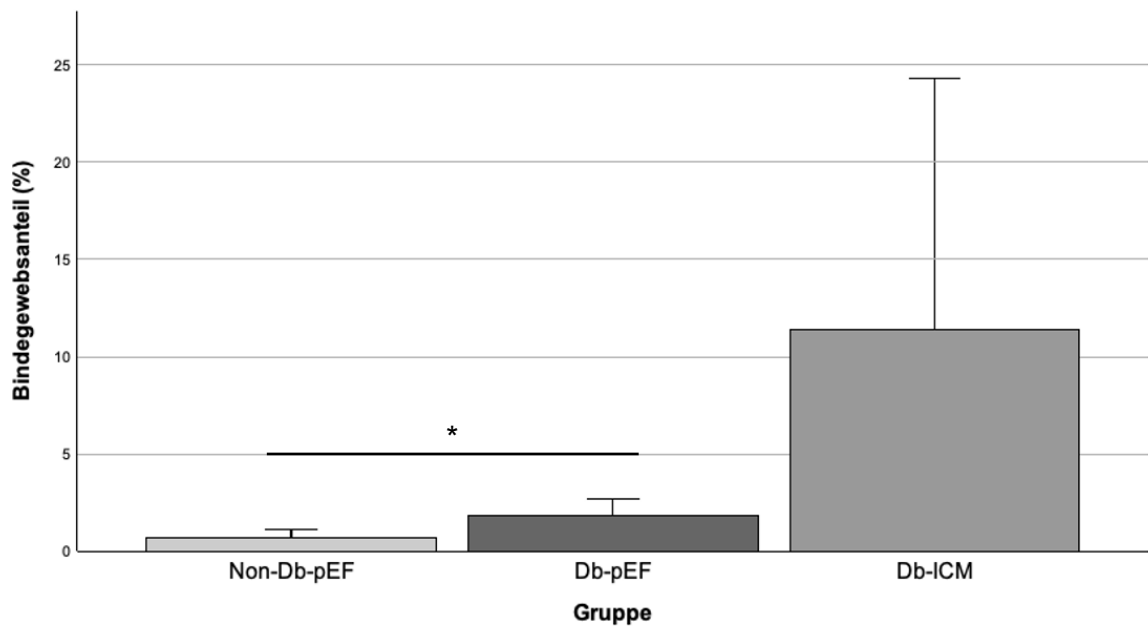


Abbildung 8: Mittlerer Bindegewebsanteil im linksventrikulären Myokard (Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung, Post-hoc-Test: * $p < 0,05$)

Der mittlere Bindegewebsanteil beträgt $0,67 \pm 0,45$ % in der Gruppe Non-Db-pEF, $1,83 \pm 0,86$ % in der Gruppe Db-pEF und $11,42 \pm 12,92$ % in der Gruppe Db-ICM. Die Werte sind in allen drei Gruppen normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$) und Varianzhomogenität kann angenommen werden (Levene-Test, $p = 0,001$). Die Welch-ANOVA zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen $F(2, 7,899) = 5,845$, $p = 0,028$, $\eta^2 = 0,340$. Die Gruppe Db-pEF zeigt signifikante Fibrose im Vergleich zur Gruppe Non-Db-pEF (Games-Howell-Post-hoc-Test, $p = 0,048$, $+1,15$, 95 %-CI [0,01, 2,30]).

7 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die histologischen Veränderungen im humanen diabetischen Myokard nachzuweisen, die anhand von Tiermodellen postuliert wurden.

Das Myokard von Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 und erhaltener Ejektionsfraktion zeigte auch ohne begleitende ischämische Herzerkrankung signifikante Fibrose gegenüber dem Myokard von Patient*innen ohne Diabetes mellitus. Der mittlere Bindegewebsanteil war in der Gruppe Db-pEF mit $1,83 \pm 0,86$ % signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit $0,67 \pm 0,45$ %.

Im Vergleich dazu wurde der Bindegewebsanteil in Tiermodellen der diabetischen Kardiomyopathie mit 0,6 bis 1,5 % quantifiziert. In den Kontrollgruppen betrug der Bindegewebsanteil in der Regel zwischen 0,3 und 0,5 % (Bowden et al., 2015, Huynh et al., 2012, Huynh et al., 2010, Van Linthout et al., 2008). In der Literatur finden sich nur vereinzelt quantitative Angaben zu Fibrose im humanen diabetischen Myokard. In einer Autopsiestudie an Patient*innen mit hypertensiver, diabetischer bzw. hypertensiv-diabetischer Herzerkrankung wurde der Grad an Fibrose nur semiquantitativ beurteilt. Außerdem waren die Patient*innen nicht selektioniert und es konnte in der Hälfte der Fälle bei der Obduktion eine Koronarstenose ≥ 70 % festgestellt werden (van Hoeven und Factor, 1990). Durch histologische Untersuchung von Endomyokardbiopsien einer Patient*innengruppe mit Diabetes mellitus, aber ohne arterielle Hypertonie und ohne Koronarstenose, konnte ein mittlerer Anteil an Fibrose von 17,0 % gegenüber 7,2 % in der Kontrollgruppe gezeigt werden. Mögliche Erklärungen für den deutlich höheren Bindegewebsanteil im Vergleich zur vorliegenden Arbeit sind die Probengewinnung aus dem rechtsventrikulären Septum und die Färbung mit Mallory-Azan anstelle von Masson-Trichrom (Shimizu et al., 1993).

Auch in einer HFpEF-Kohorte, in welcher immerhin 63 % der Patient*innen an Diabetes mellitus litten, war der mittlere Anteil an Fibrose mit 7 % deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit (Hahn et al., 2021). Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass eine kardiometabolische HFpEF, trotz vieler Gemeinsamkeiten, nicht mit der diabetischen Herzerkrankung gleichgesetzt werden kann. So umfasst das Spektrum der diabetischen Herzerkrankung unter anderem

auch asymptomatische Patient*innen mit milden myokardialen Funktionsstörungen. Darüber hinaus handelte es sich beim Probenmaterial wiederum um Endomyokardbiopsien aus dem rechtsventrikulären Septum.

Aufgrund des Designs dieser Diplomarbeit ist keine Aussage darüber möglich, ob der Effekt durch den Diabetes mellitus oder die arterielle Hypertonie als Störfaktor bedingt ist. Myokardiale Fibrose ist neben der linksventrikulären Hypertrophie wahrscheinlich auch eine entscheidende strukturelle Veränderung bei der hypertensiven Herzkrankheit (Díez und Butler, 2023). Dieses Dilemma ergibt sich zwangsläufig, wenn man die enge Definition der diabetischen Kardiomyopathie verlässt und die diabetische Herzerkrankung betrachtet. Die Häufigkeit der arteriellen Hypertonie betrug in dieser Arbeit 40 % in der Gruppe Non-Db-pEF und 83,3 % in Gruppe Db-pEF. Im Vergleich dazu betrug 2019 die weltweite altersstandardisierte Prävalenz der arteriellen Hypertonie im Alter von 30 bis 79 Jahren 32 % bei Frauen und 34 % bei Männern (Mancia et al., 2023). Dem gegenüber steht eine Prävalenz der arteriellen Hypertonie von 87 % bei Patientinnen und 80 % bei Patienten mit Diabetes mellitus (Marx et al., 2023). Das Vorkommen einer arteriellen Hypertonie ist bei Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 somit eher die Regel als die Ausnahme. In Anbetracht dessen spiegelt die Merkmalsverteilung in dieser Arbeit in etwa die Prävalenzen in der Grundgesamtheit wider. Eine Untersuchung von Patient*innen mit isoliertem Diabetes mellitus Typ 2 ist dementsprechend schwierig, könnte in Zukunft aber durch einen entsprechend großen Stichprobenumfang ermöglicht werden. Weiters könnte durch Vergleich mit einer Gruppe mit isolierter arterieller Hypertonie der relative Effekt des Diabetes mellitus abgeschätzt werden.

Der unmittelbare Zusammenhang dieser Krankheitsbilder wird auch dadurch deutlich, dass die arterielle Hypertonie ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 ist. Die Wechselwirkungen zwischen Insulinresistenz, Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie werden unter anderem auf unangemessene RAAS- und Sympathikus-Aktivierung, mitochondriale Dysfunktion, oxidativen Stress und systemische Inflammation zurückgeführt (Jia und Sowers, 2021).

Der Bindegewebsanteil in der Gruppe Db-ICM war sehr unterschiedlich und zeigte dadurch eine große Streuung. Der Variabilität könnte unter anderem Narbengewebe als Folge ischämischer Myokardnekrosen zugrunde liegen.

In einer Arbeit wurden linksventrikulären Endomyokardbiopsien aus Patient*innen mit Herzinsuffizienz analysiert und unter anderem die Kollagen-Volumenfraktionen bestimmt. In der Gruppe mit Diabetes mellitus und reduzierter Ejektionsfraktion (LVEF < 45 %) wurde diese mit $22,4 \pm 2,2$ % angegeben. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde bei den Patient*innen allerdings eine koronare Herzkrankheit mittels Koronarangiographie ausgeschlossen und eine nicht-ischämische Ursache für die Herzinsuffizienz vermutet (van Heerebeek et al., 2008).

Zusammenfassend spricht viel dafür, dass Diabetes mellitus eine Fibrose im menschlichen Herz induzieren kann. Aufgrund der nahezu regelhaft auftretenden arteriellen Hypertonie stellt sich allerdings die Frage, inwieweit der isolierte Effekt von Diabetes mellitus auf das Herz überhaupt von klinischer Relevanz ist.

Mit der angewandten Methode konnte keine signifikante Hypertrophie der Herzmuskelzellen nachgewiesen werden. In den bereits erwähnten Studien mit humanem Gewebe erfolgten keine Untersuchungen in Hinblick auf Kardiomyozyten-Hypertrophie. Im Gegensatz dazu konnte in der bereits diskutierten HFpEF-Kohorte neben myokardialer Fibrose auch eine Kardiomyozyten-Hypertrophie gezeigt werden (Hahn et al., 2021). Hierbei gilt es aber wiederum die bereits erwähnten Einschränkungen zu beachten.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Messung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche unter Zuhilfenahme von WGA handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zur Größenbeurteilung von Herzmuskelzellen (Dorn et al., 2003). Die Methode hat aber insofern eine gewichtige Einschränkung, als es sich bei Hypertrophie um eine Zunahme des Zellvolumens handelt, mit den Querschnittsflächen aber nur 2 Dimensionen abgebildet werden. Die Länge der Herzmuskelzellen konnte aufgrund des wenigen zur Verfügung stehenden Probenmaterials nicht bestimmt werden. Die kleinen Gewebeproben konnten meist nur für eine Serie von Querschnitten ausgerichtet werden.

Weitere Einschränkungen ergeben sich durch Ursprung und Beschaffenheit des Probenmaterials. Alle Proben stammen aus dem linken Ventrikel. Es war jedoch nicht nachvollziehbar, ob die Probenentnahme immer einer bestimmten Systematik folgte und wie viel Zeit bis zum Einfrieren vergangen ist. Durch die langjährige Lagerung bei -80 °C ist es teilweise zu Gefrierartefakten gekommen.

Außerdem stammt der überwiegende Teil der Herzen von Männern. Frauen waren in dieser Arbeit also unterrepräsentiert. Dies ist insofern von Relevanz, als es geschlechtsspezifische Unterschiede gibt und Frauen mit Diabetes mellitus ein signifikant höheres Risiko für Herzinsuffizienz haben als Männer (Ohkuma et al., 2019). Ein weiteres Problem waren teilweise unvollständige Patient*innendaten, die zur Charakterisierung der Gruppen benötigt wurden.

Neben den bereits diskutierten Komorbiditäten könnte Fibrose auch durch die Dauermedikation der Patient*innen beeinflusst worden sein. So wurde zum Beispiel für ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptorblocker und Mineralkortikoid-Rezeptor-Antagonisten ein antifibrotischer Effekt gezeigt (López et al., 2021).

Eine günstige Beeinflussung von Fibrose wurde auch für SGLT-2-Inhibitoren beschrieben, die somit eine vielversprechende Wirkstoffklasse zur Therapie der diabetischen Herzerkrankung darstellen. Für Empagliflozin konnte im Mausmodell ein antifibrotischer Effekt gezeigt werden, der von den Autor*innen unter anderem auf eine Beeinflussung des sGC-cGMP-PKG-Pfads zurückgeführt wurde. Db/Db-Mäuse hatten im Vergleich zu Db/m-Mäusen eine höhere relative mRNA- und Proteinexpression von TGF- β , Kollagen I und Kollagen III. Diese konnte durch eine 8-wöchige Therapie mit Empagliflozin abgeschwächt werden (Xue et al., 2019). Auch Dapagliflozin führte im Tiermodell zu einer Reduktion von myokardialer interstitieller und perivaskulärer Fibrose, Kardiomyozyten-Hypertrophie und Apoptose (Shi et al., 2019). Als weitere Mechanismen der Kardioprotektion werden eine günstige Beeinflussung von kardialen Metabolismus und Inflammation sowie indirekte Effekte durch Verbesserung von Nierenfunktion und Erythropoese angenommen (Lopaschuk und Verma, 2020).

Für Empagliflozin und Canagliflozin konnte in Studien bei Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 und atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankung eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse belegt werden (Marx et al., 2023). In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass Therapien mit SGLT-2-Inhibitoren bei Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 unabhängig von atherosklerotischen kardiovaskulären Vorerkrankungen zu einer signifikanten Reduktion der Hospitalisierungen wegen Herzinsuffizienz führen (Zelniker et al., 2019). Empagliflozin und Dapagliflozin werden neben der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 mittlerweile auch bei HFrEF, HFmrEF und HFpEF unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes mellitus eingesetzt (McDonagh et al., 2023).

Eine günstige Beeinflussung des sGC-cGMP-PKG-Pfads konnte auch für PDE-5-Hemmer gezeigt werden. In diabetischen Zucker-Ratten führte Vardenafil über eine Erhöhung der cGMP-Verfügbarkeit und PKG-Aktivität zu einem Erhalt der diastolischen Funktion sowie Verhinderung von Hypertrophie und Fibrose (Mátyás et al., 2017).

Eine weitere vielversprechende Wirkstoffgruppe zur Behandlung der diabetischen Herzerkrankung ist jene der Inkretin-Mimetika. In mehreren Studien konnte unter einer Therapie mit GLP-1-Rezeptor-Agonisten eine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse bei Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 gezeigt werden (Marx et al., 2023). In der STEP-HFpEF-DM-Studie führte eine Therapie mit Semaglutid bei Patient*innen mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und HFpEF zu einer Reduktion von Symptomlast, körperlichen Einschränkungen und Körpergewicht (Kosiborod et al., 2024). Unter Therapie mit dem ersten Dual-Agonisten Tirzepatid konnte bei Patient*innen mit Adipositas und HFpEF eine Risikoreduktion für den kombinierten Endpunkt aus kardiovaskulärem Tod und Verschlechterung der Herzinsuffizienz gezeigt werden. 48 % der Studienteilnehmer*innen litten an Diabetes mellitus Typ 2, und der Effekt war auch in dieser Subgruppe nachweisbar (Packer et al., 2025).

In Zukunft könnten Analysen von Zytokinen wie TGF- β , TNF und IL-6 und Transkriptions-Faktoren wie NF- κ B, TCF21 und AP-1 zu einem besseren

Verständnis der diabetischen Herzerkrankung und zur Entwicklung zielgerichteter Therapien beitragen. Neben den bereits genannten Wirkstoffgruppen mit antifibrotischen Effekten könnte gezielt mit Small-Molecules oder Biologika in die Fibrogenese eingegriffen werden, um die Entstehung von Fibrose zu verhindern oder rückgängig zu machen (López et al., 2021).

8 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das linksventrikuläre Myokard von Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 und erhaltener Ejektionsfraktion im Vergleich zum Myokard von Patient*innen ohne Diabetes mellitus signifikante Fibrose aufweist. Die Veränderungen könnten Ausdruck einer diabetischen Herzerkrankung sein, wobei insbesondere die arterielle Hypertonie als möglicher Störfaktor berücksichtigt werden muss. Mit der angewandten Methode konnte keine signifikante Hypertrophie der Kardiomyozyten nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

- BOUTHOORN, S., VALSTAR, G. B., GOHAR, A., DEN RUIJTER, H. M., REITSMA, H. B., HOES, A. W. & RUTTEN, F. H. 2018. The prevalence of left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction in men and women with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 15, 477-493.
- BOWDEN, M. A., TESCH, G. H., JULIUS, T. L., ROSLI, S., LOVE, J. E. & RITCHIE, R. H. 2015. Earlier onset of diabetes-induced adverse cardiac remodeling in female compared to male mice. *Obesity (Silver Spring)*, 23, 1166-77.
- BUGGER, H. & ABEL, E. D. 2014. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, 57, 660-71.
- DAWSON, A., MORRIS, A. D. & STRUTHERS, A. D. 2005. The epidemiology of left ventricular hypertrophy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 48, 1971-1979.
- DEFRONZO, R. A., FERRANNINI, E., GROOP, L., HENRY, R. R., HERMAN, W. H., HOLST, J. J., HU, F. B., KAHN, C. R., RAZ, I., SHULMAN, G. I., SIMONSON, D. C., TESTA, M. A. & WEISS, R. 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15019.
- DESROIS, M., SIDELL, R. J., GAUGUIER, D., DAVEY, C. L., RADDA, G. K. & CLARKE, K. 2004. Gender differences in hypertrophy, insulin resistance and ischemic injury in the aging type 2 diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 37, 547-55.
- DEVEREUX, R. B., ROMAN, M. J., PARANICAS, M., O'GRADY, M. J., LEE, E. T., WELTY, T. K., FABSITZ, R. R., ROBBINS, D., RHOADES, E. R. & HOWARD, B. V. 2000. Impact of Diabetes on Cardiac Structure and Function. *Circulation*, 101, 2271-2276.
- DÍEZ, J. & BUTLER, J. 2023. Growing Heart Failure Burden of Hypertensive Heart Disease: A Call to Action. *Hypertension*, 80, 13-21.
- DORN, G. W., ROBBINS, J. & SUGDEN, P. H. 2003. Phenotyping Hypertrophy. *Circulation Research*, 92, 1171-1175.
- DUNLAY, S. M., GIVERTZ, M. M., AGUILAR, D., ALLEN, L. A., CHAN, M., DESAI, A. S., DESWAL, A., DICKSON, V. V., KOSIBOROD, M. N., LEKAVICH, C. L., MCCOY, R. G., MENTZ, R. J., PIÑA, I. L., FAILURE, O. B. O. T. A. H. A. H., CARDIOLOGY, T. C. O. T. C. O. C., CARDIOVASCULAR, C. O., NURSING, S. & AMERICA, T. H. F. S. O. 2019. Type 2 Diabetes Mellitus and Heart Failure: A Scientific Statement

From the American Heart Association and the Heart Failure Society of America: This statement does not represent an update of the 2017 ACC/AHA/HFSA heart failure guideline update. *Circulation*, 140, e294-e324.

FREY, N., KATUS, H. A., OLSON, E. N. & HILL, J. A. 2004. Hypertrophy of the Heart. *Circulation*, 109, 1580-1589.

FRUCHART, J.-C., NIERMAN, M. C., STROES, E. S. G., KASTELEIN, J. J. P. & DURIEZ, P. 2004. New Risk Factors for Atherosclerosis and Patient Risk Assessment. *Circulation*, 109, III-15-III-19.

GOLLMER, J., ZIRLIK, A. & BUGGER, H. 2019. Established and Emerging Mechanisms of Diabetic Cardiomyopathy. *J Lipid Atheroscler*, 8, 26-47.

HAHN, V. S., KNUTSDOTTIR, H., LUO, X., BEDI, K., MARGULIES, K. B., HALDAR, S. M., STOLINA, M., YIN, J., KHAKOO, A. Y., VAISHNAV, J., BADER, J. S., KASS, D. A. & SHARMA, K. 2021. Myocardial Gene Expression Signatures in Human Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*, 143, 120-134.

HUYNH, K., KIRIAZIS, H., DU, X. J., LOVE, J. E., JANDELEIT-DAHME, K. A., FORBES, J. M., MCMULLEN, J. R. & RITCHIE, R. H. 2012. Coenzyme Q10 attenuates diastolic dysfunction, cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis in the db/db mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 55, 1544-53.

HUYNH, K., MCMULLEN, J. R., JULIUS, T. L., TAN, J. W., LOVE, J. E., CEMERLANG, N., KIRIAZIS, H., DU, X. J. & RITCHIE, R. H. 2010. Cardiac-specific IGF-1 receptor transgenic expression protects against cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, 59, 1512-20.

JIA, G., HILL, M. A. & SOWERS, J. R. 2018. Diabetic Cardiomyopathy. *Circulation Research*, 122, 624-638.

JIA, G. & SOWERS, J. R. 2021. Hypertension in Diabetes: An Update of Basic Mechanisms and Clinical Disease. *Hypertension*, 78, 1197-1205.

KOSIBOROD, M. N., PETRIE, M. C., BORLAUG, B. A., BUTLER, J., DAVIES, M. J., HOVINGH, G. K., KITZMAN, D. W., MØLLER, D. V., TREPPENDAHL, M. B., VERMA, S., JENSEN, T. J., LIISBERG, K., LINDEGAARD, M. L., ABHAYARATNA, W., AHMED, F. Z., BEN-GAL, T., CHOPRA, V., EZEKOWITZ, J. A., FU, M., ITO, H., LELONEK, M., MELENOVSKÝ, V., MERKELY, B., NÚÑEZ, J., PERNA, E., SCHOU, M., SENNI, M., SHARMA, K., MEER, P. V. D., LEWINSKI, D. V., WOLF, D. & SHAH, S. J. 2024.

Semaglutide in Patients with Obesity-Related Heart Failure and Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 390, 1394-1407.

LEE, M., GARDIN, J. M., LYNCH, J. C., SMITH, V.-E., TRACY, R. P., SAVAGE, P. J., SZKLO, M. & WARD, B. J. 1997. Diabetes mellitus and echocardiographic left ventricular function in free-living elderly men and women: The Cardiovascular Health Study. *American Heart Journal*, 133, 36-43.

LOPASCHUK, G. D. & VERMA, S. 2020. Mechanisms of Cardiovascular Benefits of Sodium Glucose Co-Transporter 2 (SGLT2) Inhibitors: A State-of-the-Art Review. *JACC: Basic to Translational Science*, 5, 632-644.

LÓPEZ, B., RAVASSA, S., MORENO, M. U., JOSÉ, G. S., BEAUMONT, J., GONZÁLEZ, A. & DÍEZ, J. 2021. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches. *Nature Reviews Cardiology*, 18, 479-498.

MAACK, C., LEHRKE, M., BACKS, J., HEINZEL, F. R., HULOT, J. S., MARX, N., PAULUS, W. J., ROSSIGNOL, P., TAEGTMEYER, H., BAUERSACHS, J., BAYES-GENIS, A., BRUTSAERT, D., BUGGER, H., CLARKE, K., COSENTINO, F., DE KEULENAER, G., DEI CAS, A., GONZALEZ, A., HUELSMANN, M., IACCARINO, G., LUNDE, I. G., LYON, A. R., POLLESELLO, P., RENA, G., RIKSEN, N. P., ROSANO, G., STAELS, B., VAN LAAKE, L. W., WANNER, C., FARMAKIS, D., FILIPPATOS, G., RUSCHITZKA, F., SEFEROVIC, P., DE BOER, R. A. & HEYMANS, S. 2018. Heart failure and diabetes: metabolic alterations and therapeutic interventions: a state-of-the-art review from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association-European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 39, 4243-4254.

MANCIA, G., KREUTZ, R., BRUNSTRÖM, M., BURNIER, M., GRASSI, G., JANUSZEWICZ, A., MUIESAN, M. L., TSIOUFIS, K., AGABITI-ROSEI, E., ALGHARABLY, E. A. E., AZIZI, M., BENETOS, A., BORGHI, C., HITIJ, J. B., CIFKOVA, R., COCA, A., CORNELISSEN, V., CRUICKSHANK, J. K., CUNHA, P. G., DANSER, A. H. J., PINHO, R. M., DELLES, C., DOMINICZAK, A. F., DOROBANTU, M., DOUMAS, M., FERNÁNDEZ-ALFONSO, M. S., HALIMI, J. M., JÁRAI, Z., JELAKOVIĆ, B., JORDAN, J., KUZNETSOVA, T., LAURENT, S., LOVIC, D., LURBE, E., MAHFOUD, F., MANOLIS, A., MIGLINAS, M., NARKIEWICZ, K., NIIRANEN, T., PALATINI, P., PARATI, G., PATHAK, A., PERSU, A., POLONIA, J., REDON, J., SARAFIDIS, P., SCHMIEDER, R., SPRONCK, B., STABOULI, S., STERGIOU, G., TADDEI, S., THOMOPOULOS, C., TOMASZEWSKI, M., VAN DE BORNE, P., WANNER, C., WEBER, T., WILLIAMS, B., ZHANG, Z. Y. & KJELDSEN, S. E. 2023. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the

International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). *J Hypertens*, 41, 1874-2071.

MARWICK, T. H., RITCHIE, R., SHAW, J. E. & KAYE, D. 2018. Implications of Underlying Mechanisms for the Recognition and Management of Diabetic Cardiomyopathy. *JACC*, 71, 339-351.

MARX, N., FEDERICI, M., SCHÜTT, K., MÜLLER-WIELAND, D., AJJAN, R. A., ANTUNES, M. J., CHRISTODORESCU, R. M., CRAWFORD, C., DI ANGELANTONIO, E., ELIASSON, B., ESPINOLA-KLEIN, C., FAUCHIER, L., HALLE, M., HERRINGTON, W. G., KAUTZKY-WILLER, A., LAMBRINOU, E., LESIAK, M., LETTINO, M., MCGUIRE, D. K., MULLENS, W., ROCCA, B., SATTAR, N. & GROUP, E. S. D. 2023. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes: Developed by the task force on the management of cardiovascular disease in patients with diabetes of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 44, 4043-4140.

MÁTYÁS, C., NÉMETH, B. T., OLÁH, A., TÖRÖK, M., RUPPERT, M., KELLERMAYER, D., BARTA, B. A., SZABÓ, G., KÖKÉNY, G., HORVÁTH, E. M., BÓDI, B., PAPP, Z., MERKELY, B. & RADOVITS, T. 2017. Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in rats with type 2 diabetes. *European Journal of Heart Failure*, 19, 326-336.

MCDONAGH, T. A., METRA, M., ADAMO, M., GARDNER, R. S., BAUMBACH, A., BÖHM, M., BURRI, H., BUTLER, J., ČELUTKIENĖ, J., CHIONCEL, O., CLELAND, J. G. F., CRESPO-LEIRO, M. G., FARMAKIS, D., GILARD, M., HEYMANS, S., HOES, A. W., JAARSMA, T., JANKOWSKA, E. A., LAINSCAK, M., LAM, C. S. P., LYON, A. R., MCMURRAY, J. J. V., MEBAZAA, A., MINDHAM, R., MUNERETTO, C., FRANCESCO PIEPOLI, M., PRICE, S., ROSANO, G. M. C., RUSCHITZKA, F., SKIBELUND, A. K. & GROUP, E. S. D. 2023. 2023 Focused Update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*, 44, 3627-3639.

MIZUSHIGE, K., YAO, L., NOMA, T., KIYOMOTO, H., YU, Y., HOSOMI, N., OHMORI, K. & MATSUO, H. 2000. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation*, 101, 899-907.

MOUTON, P. R. 2011. *Unbiased stereology : a concise guide*, Baltimore, Johns Hopkins University Press.

- NEGISHI, K. 2018. Echocardiographic feature of diabetic cardiomyopathy: where are we now? *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 8, 47-56.
- OHKUMA, T., KOMORITA, Y., PETERS, S. A. E. & WOODWARD, M. 2019. Diabetes as a risk factor for heart failure in women and men: a systematic review and meta-analysis of 47 cohorts including 12 million individuals. *Diabetologia*, 62, 1550-1560.
- ONG, K. L., STAFFORD, L. K., MCLAUGHLIN, S. A., BOYKO, E. J., VOLLSET, S. E., SMITH, A. E., DALTON, B. E., DUPREY, J., CRUZ, J. A., HAGINS, H., LINDSTEDT, P. A., AALI, A., ABATE, Y. H., ABATE, M. D., ABBASIAN, M., ABBASI-KANGEVARI, Z., ABBASI-KANGEVARI, M., ABD ELHAFEEZ, S., ABD-RABU, R., ABDULAH, D. M., ABDULLAH, A. Y. M., ABEDI, V., ABIDI, H., ABOAGYE, R. G., ABOLHASSANI, H., ABU-GHARBIEH, E., ABU-ZAID, A., ADANE, T. D., ADANE, D. E., ADDO, I. Y., ADEGBOYE, O. A., ADEKANMBI, V., ADEPOJU, A. V., ADNANI, Q. E. S., AFOLABI, R. F., AGARWAL, G., AGHDAM, Z. B., AGUDELO-BOTERO, M., AGUILERA ARRIAGADA, C. E., AGYEMANG-DUAH, W., AHINKORAH, B. O., AHMAD, D., AHMAD, R., AHMAD, S., AHMAD, A., AHMADI, A., AHMADI, K., AHMED, A., AHMED, A., AHMED, L. A., AHMED, S. A., AJAMI, M., AKINYEMI, R. O., AL HAMAD, H., AL HASAN, S. M., AL-AHDAL, T. M. A., ALALWAN, T. A., AL-ALY, Z., ALBATAINEH, M. T., ALCALDE-RABANAL, J. E., ALEMI, S., ALI, H., ALINIA, T., ALJUNID, S. M., ALMUSTANYIR, S., AL-RADDADI, R. M., ALVIS-GUZMAN, N., AMARE, F., AMEYAW, E. K., AMIRI, S., AMUSA, G. A., ANDREI, C. L., ANJANA, R. M., ANSAR, A., ANSARI, G., ANSARI-MOGHADDAM, A., ANYASODOR, A. E., ARABLOO, J., ARAVKIN, A. Y., AREDA, D., ARIFIN, H., ARKEW, M., ARMOCIDA, B., ÄRNLÖV, J., ARTAMONOV, A. A., ARULAPPAN, J., ARULEBA, R. T., ARUMUGAM, A., ARYAN, Z., ASEMU, M. T., ASGHARI-JAFARABADI, M., ASKARI, E., ASMELASH, D., ASTELL-BURT, T., ATHAR, M., ATHARI, S. S., ATOUT, M. M. D. W., AVILA-BURGOS, L., AWAISU, A., AZADNAJAFABAD, S., et al. 2023. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*, 402, 203-234.
- PACKER, M., ZILE, M. R., KRAMER, C. M., BAUM, S. J., LITWIN, S. E., MENON, V., GE, J., WEERAKKODY, G. J., OU, Y., BUNCK, M. C., HURT, K. C., MURAKAMI, M. & BORLAUG, B. A. 2025. Tirzepatide for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction and Obesity. *New England Journal of Medicine*, 392, 427-437.
- REGAN, T. J., LYONS, M. M., AHMED, S. S., LEVINSON, G. E., OLDEWURTEL, H. A., AHMAD, M. R. & HAIDER, B. 1977. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 60, 884-99.
- RITCHIE, R. H. & ABEL, E. D. 2020. Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease. *Circ Res*, 126, 1501-1525.

RYDÉN, L., GRANT, P. J., ANKER, S. D., BERNE, C., COSENTINO, F., DANCHIN, N., DEATON, C., ESCANED, J., HAMMES, H. P., HUIKURI, H., MARRE, M., MARX, N., MELLBIN, L., OSTERGREN, J., PATRONO, C., SEFEROVIC, P., UVA, M. S., TASKINEN, M. R., TENDERA, M., TUOMILEHTO, J., VALENSI, P., ZAMORANO, J. L., ZAMORANO, J. L., ACHENBACH, S., BAUMGARTNER, H., BAX, J. J., BUENO, H., DEAN, V., DEATON, C., EROL, C., FAGARD, R., FERRARI, R., HASDAI, D., HOES, A. W., KIRCHHOF, P., KNUUTI, J., KOLH, P., LANCELLOTTI, P., LINHART, A., NIHOYANNOPOULOS, P., PIEPOLI, M. F., PONIKOWSKI, P., SIRNES, P. A., TAMARGO, J. L., TENDERA, M., TORBICKI, A., WIJNS, W., WINDECKER, S., DE BACKER, G., SIRNES, P. A., EZQUERRA, E. A., AVOGARO, A., BADIMON, L., BARANOVA, E., BAUMGARTNER, H., BETTERIDGE, J., CERIELLO, A., FAGARD, R., FUNCK-BRENTANO, C., GULBA, D. C., HASDAI, D., HOES, A. W., KJEKSHUS, J. K., KNUUTI, J., KOLH, P., LEV, E., MUELLER, C., NEYSES, L., NILSSON, P. M., PERK, J., PONIKOWSKI, P., REINER, Z., SATTAR, N., SCHÄCHINGER, V., SCHEEN, A., SCHIRMER, H., STRÖMBERG, A., SUDZHAEVA, S., TAMARGO, J. L., VIIGIMAA, M., VLACHOPOULOS, C. & XUEREB, R. G. 2013. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*, 34, 3035-87.

SAMAK, M., FATULLAYEV, J., SABASHNIKOV, A., ZERIOUH, M., SCHMACK, B., FARAG, M., POPOV, A. F., DOHMEN, P. M., CHOI, Y. H., WAHLERS, T. & WEYMANN, A. 2016. Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic Res*, 22, 75-9.

SHI, L., ZHU, D., WANG, S., JIANG, A. & LI, F. 2019. Dapagliflozin Attenuates Cardiac Remodeling in Mice Model of Cardiac Pressure Overload. *American Journal of Hypertension*, 32, 452-459.

SHIMIZU, M., UMEDA, K., SUGIHARA, N., YOSHIO, H., INO, H., TAKEDA, R., OKADA, Y. & NAKANISHI, I. 1993. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. *J Clin Pathol*, 46, 32-6.

SRIVASTAVA, PIYUSH M., CALAFIORE, P., MACISAAC, RICHARD J., PATEL, SHEILA K., THOMAS, MERLIN C., JERUMS, G. & BURRELL, LOUISE M. 2008. Prevalence and predictors of cardiac hypertrophy and dysfunction in patients with Type 2 diabetes. *Clinical Science*, 114, 313-320.

TAN, Y., ZHANG, Z., ZHENG, C., WINTERGERST, K. A., KELLER, B. B. & CAI, L. 2020. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nature Reviews Cardiology*, 17, 585-607.

- VAN HOEVEN, K. H. & FACTOR, S. M. 1990. A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation*, 82, 848-55.
- VAN LINTHOUT, S., SEELAND, U., RIAD, A., ECKHARDT, O., HOHL, M., DHAYAT, N., RICHTER, U., FISCHER, J. W., BÖHM, M., PAUSCHINGER, M., SCHULTHEISS, H.-P. & TSCHÖPE, C. 2008. Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*, 103, 319-327.
- VILLALOBOS LIZARDI, J. C., BARANGER, J., NGUYEN, M. B., ASNACIOS, A., MALIK, A., LUMENS, J., MERTENS, L., FRIEDBERG, M. K., SIMMONS, C. A., PERNOT, M. & VILLEMMAIN, O. 2022. A guide for assessment of myocardial stiffness in health and disease. *Nat Cardiovasc Res*, 1, 8-22.
- WESTERMANN, D., RUTSCHOW, S., JÄGER, S., LINDERER, A., ANKER, S., RIAD, A., UNGER, T., SCHULTHEISS, H.-P., PAUSCHINGER, M. & TSCHÖPE, C. 2007. Contributions of Inflammation and Cardiac Matrix Metalloproteinase Activity to Cardiac Failure in Diabetic Cardiomyopathy: The Role of Angiotensin Type 1 Receptor Antagonism. *Diabetes*, 56, 641-646.
- WONG, T. C., PIEHLER, K. M., KANG, I. A., KADAKKAL, A., KELLMAN, P., SCHWARTZMAN, D. S., MULUKUTLA, S. R., SIMON, M. A., SHROFF, S. G., KULLER, L. H. & SCHELBERT, E. B. 2013. Myocardial extracellular volume fraction quantified by cardiovascular magnetic resonance is increased in diabetes and associated with mortality and incident heart failure admission. *European Heart Journal*, 35, 657-664.
- XUE, M., LI, T., WANG, Y., CHANG, Y., CHENG, Y., LU, Y., LIU, X., XU, L., LI, X., YU, X., SUN, B. & CHEN, L. 2019. Empagliflozin prevents cardiomyopathy via sGC-cGMP-PKG pathway in type 2 diabetes mice. *Clinical Science*, 133, 1705-1720.
- ZELNIKER, T. A., WIVIOTT, S. D., RAZ, I., IM, K., GOODRICH, E. L., BONACA, M. P., MOSENZON, O., KATO, E. T., CAHN, A., FURTADO, R. H. M., BHATT, D. L., LEITER, L. A., MCGUIRE, D. K., WILDING, J. P. H. & SABATINE, M. S. 2019. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *The Lancet*, 393, 31-39.
- ZHOU, B., RAYNER, A. W., GREGG, E. W., SHEFFER, K. E., CARRILLO-LARCO, R. M., BENNETT, J. E., SHAW, J. E., PACIOREK, C. J., SINGLETON, R. K., BARRADAS PIRES, A., STEVENS, G. A., DANAEI, G., LHOSTE, V. P. F., PHELPS, N. H., HEAP, R. A., JAIN, L., D'AILHAUD DE BRISIS, Y., GALEAZZI, A., KENGNE, A. P., MISHRA, A., IKEDA, N., LIN, H.-H., AGUILAR-SALINAS, C. A., ANJANA, R. M., BEN ROMDHANE,

H., DAVLETOV, K., GANAPATHY, S., HEIDEMANN, C., KHADER, Y. S., KHANG, Y.-H., LAXMAIAH, A., MBANYA, J. C. N., MOHAN, V., NARAYAN, K. M. V., PAVKOV, M. E., SOBNGWI, E., WADE, A. N., YOUNGER-COLEMAN, N. O., ZDROJEWSKI, T., ABARCA-GÓMEZ, L., ABBASI-KANGEVARI, M., ABDUL RAHIM, H. F., ABU-RMEILEH, N. M., ADAMBEKOV, S., ADAMS, R. J., AEKPLAKORN, W., AFZAL, S., AGDEPPA, I. A., AGHAZADEH-ATTARI, J., AGYEMANG, C., AHMAD, N. A., AHMADI, A., AHMADI, N., AHMADI, N., AHMED, S. H., AHRENS, W., AJLOUNI, K., AL-HAMLI, S. F., AL-HINAI, H., AL-LAWATI, J. A., AL ASFOOR, D., ALAROUJ, M., ALBUHAIRAN, F., ALDHUKAIR, S., ALI, M. M., ALI, M. K., ALIEVA, A. V., ALINEZHAD, F., ALKANDARI, A., ALKERWI, A. A., ALY, E., AMARAPURKAR, D. N., ANDERSEN, L. B., ANDERSSSEN, S. A., ANDRADE, D. S., ANSARI-MOGHADDAM, A., AOUNALLAH-SKHIRI, H., ARAÚJO, J., ARIS, T., ARKU, R. E., ARLAPPA, N., ARYAL, K. K., ASPELUND, T., ASSAH, F. K., ASSEMBEKOV, B., AU YEUNG, S. L., AUVINEN, J., AVDIČOVÁ, M., AZAD, K., AZEVEDO, A., AZIMI-NEZHAD, M., AZIZI, F., BACOPOULOU, F., BALAKRISHNA, N., BALANOVA, Y., BAMOSHMOOSH, M., BANACH, M., BANDOSZ, P., BANEGAS, J. R., BARBAGALLO, C. M., et al. 2024. Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants. *The Lancet*, 404, 2077-2093.