

Aus dem Institut für Pharmakologie,
Center for Cardiovascular Research (CCR),
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die protektiven Effekte von Empagliflozin bei Myokardinfarkt
im Rattenmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Catherine Görg

aus Bad Honnef

Datum der Promotion: 4. März 2022

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht bei:
Clinical Science, 26. Oktober 2020.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Kurzzusammenfassung.....	1
Abstract	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Myokardinfarkt	3
1.1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen: die häufigste Todesursache in Deutschland.....	3
1.1.2 Definition des Myokardinfarktes	3
1.1.3 Das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt und aktuelle Forschungsansätze	4
1.1.4 Diabetes als Risikofaktor für ein schlechtes Outcome nach Myokardinfarkt.....	6
1.2 Elektromechanische Kopplung und pH Regulation.....	7
1.2.1 Die elektromechanische Kopplung und pH Regulation.....	7
1.2.2 Pathophysiologische Veränderung der Kontraktilität und pH Regulation bei Myokardinfarkt	8
1.2.3 Kardiale Pumpen und Transporter als Ansatzpunkt zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen.....	9
1.3 SGLT2 Inhibitoren.....	10
1.3.1 Die Familie der SGLT-Rezeptoren.....	10
1.3.2 SGLT2 Inhibitoren, die neue Gruppe der Antidiabetika.....	11
1.3.3 Die pharmakologischen Eigenschaften von Empagliflozin.....	11
1.3.4 Kardiovaskuläre Wirkungen von SGLT2 Inhibitoren	13
1.3.5 Der kardiale Wirkmechanismus von SGLT2 Inhibitoren.....	14
1.4 Zielsetzung und These	16
2 Methodik und Materialien.....	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Tierexperiment.....	17
2.1.2 Labormaterialien	19
2.1.3 Software	22
2.2 Methodik	22
2.2.1 Tierantrag.....	22
2.2.2 Tiere und Tierhaltung	22
2.2.3 Experimentaufbau	23
2.2.4 Transthorakale Echokardiographie	26
2.2.5 Invasive Blutdruckmessung	30
2.2.6 Molekular biologische Methoden	33
2.2.7 Statistische Analyse	35

3	Ergebnisse	36
3.1	Hämodynamische Evaluation eine Woche nach Myokardinfarkt.....	36
3.1.1	Echokardiographische Evaluation der kardialen Leistung.....	36
3.1.2	Auswertung der Herzkatheter-Messung und Bestimmung der Gefäßelastizität nach Myokardinfarkt	38
3.2	Akute hämodynamische Reaktion bei iv-Applikation von Empagliflozin	40
3.2.1	Ventrikuläre Messung der Drücke im Herzen nach Empagliflozin-Gabe	40
3.2.2	Messung der Druckdifferenzen in der Aorta und Evaluation der Gefäßelastizität nach Empagliflozin-Gabe	42
3.3	Gewichtsverlust bei mit Empagliflozin behandelten Tieren.....	44
3.4	Glucose-Konzentration im Serum und Urin bei Empagliflozin-Behandlung.....	46
3.5	Western Blot und Immunhistologie	47
3.5.1	Regulation der kardialen Pumpen und Transporter	47
3.5.2	Regulation der fibrotischen Umbauprozesse und Nekroptose.....	49
3.5.3	Regulation der MMPs Aktivität.....	51
3.5.4	Immunhistologie des linken Ventrikels	52
4	Diskussion.....	53
4.1	Direkte inotrope Wirkung von Empagliflozin	53
4.1.1	Verbesserung der Hämodynamik nach 7-tägiger oraler Empagliflozin-Gabe.....	53
4.1.2	Serum- bzw. Uringlucose und Gewichtsverlust nach Empagliflozin-Gabe	55
4.1.3	Inotrope kardiale Wirkung bei iv-Applikation von Empagliflozin.....	55
4.2	Anpassung der Kontraktilität und pH-Regulation nach Empagliflozin-Gabe	58
4.2.1	Beeinflussung der kardialen pH-regulierenden Transporter durch Empagliflozin..	58
4.2.2	Beeinflussung der kontraktilitätsbestimmenden Transporter durch Empagliflozin	59
4.3	Beeinflussung des kardialen Remodelings bei Empagliflozin-Gabe.....	61
4.3.1	Wirkung von Empagliflozin auf Fibrose und Nekroptose	61
4.3.2	Regulation der MMP-9 Aktivität durch Empagliflozin	62
4.4	Zusammenfassung: Neuerkenntnisse zu dem kardialen Wirkmechanismus von Empagliflozin.....	64
5	Quellen.....	66
	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	76
	Lebenslauf	78
	Publikationsliste	79
	Danksagung.....	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung und pH Regulation in Kardiomyozyten	8
Abbildung 2: Protokoll des Myokardinfarkt-Modells.....	24
Abbildung 3: Echokardiographie der Parasternale Längsachse, Herzkatheteruntersuchung.....	25
Abbildung 4: Echokardiographie der parasternalen Längsachse, LV Tracing	28
Abbildung 5: M-Mode der parasternalen Kurzsachse	28
Abbildung 6: 4 Kammerblick, Messung der Flussgeschwindigkeit über der Mitralklappe mittels Puls-Wave-Doppler	29
Abbildung 7: Vevo Strain, Erhebung des Global Longitudinal Strain aus der parasternalen Längsachse	29
Abbildung 8: Operationsfeld bei der Herzkatheteruntersuchung.....	31
Abbildung 9: Blutdruckkurve in der Aorta, Stiffness-Parameter.....	32
Tabelle 1: Echokardiographische Auswertung 7 Tage nach Myokardinfarkt.....	37
Grafik 1: Echokardiographische Parameter 7 Tage nach Myokardinfarkt.....	37
Tabelle 2: Auswertung der intrakardialen Drücke 7 Tage nach Myokardinfarktinduktion.....	38
Grafik 2: Stiffness-Parameter 7 Tage nach Myokardinfarkt	39
Grafik 3: Intrakardiale Druckmessung nach Applikation von Empagliflozin oder NaCl.....	41
Abbildung 10: Intraaortale und ventrikuläre Drücke nach iv-Applikation von Empagliflozin oder NaCl im Herzkatheter.....	42
Grafik 4: Stiffness-Parameter 35 min nach iv-Applikation von Empagliflozin oder NaCl.....	43
Grafik 5: Gewichtsentwicklung 7 Tage nach Myokardinfarkt.....	45
Grafik 6: Glucosekonzentration im Serum und Urin 7 Tage nach Myokardinfarkt	46
Abbildung 11: Western Blot der kardialen Pumpen und Transporter.....	47
Grafik 7: Regulation der pH und Kontraktilität bestimmenden Transporter und Pumpen	48
Abbildung 12: Western Blot der profibrotischen und nekroptotischen Proteine	49
Grafik 8: Regulation der fibrotischen und nekroptotischen Proteine.....	50
Grafik 9: Regulation von MMP9 und TIMP1	51
Abbildung 13: MMP9 Immunfluoreszenz-Färbung des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt	52
Abbildung 14: möglicher Wirkmechanismus von Empagliflozin bei Myokardinfarkt	65

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance
BNP	brain natriuretic peptide
Ca ²⁺	calcium
CO	cardiac output
CO ₂	carbon dioxide
EDV	end-diastolic volume
EF%	Ejektion Fraktion
EKG	Elektrokardiogramm
Empa	Empagliflozin
ESC	european society of cardiology
FS	fractional shortening
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomerular filtration rate
GLS	global longitudinal strain
GLUT	glucose transporter
HF	heart failure
HFpEF	heart failure with preserved ejection fraction
HF _r EF	heart failure with reduced ejection fraction
IL	Interleukin
iv.	intravenös
KHK	chronische ischämische Herzkrankheit
LV	left ventricle
LVID, d	end-diastolic left ventricular internal diameter
LVID, s	systole end-systolic left ventricular internal diameter
MI	myocardial infarction
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain-Like
mmHg	millimeter of mercury
MMP	matrix metalloprotease
NaCl	Natrium Chlorid
NBC	Natrium-Bicarbonat-Coransporter
NCX1	Natrium- Calcium- Austauscher
NHE1	Natrium-Protonen-Austauscher 1

NSTEMI	Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
O ₂	oxygen
p.o.	per os
PCI	perkutane Koronarintervention
PCR	polymerase chain reaction
RIP	Rezeptor Interacting Protein Kinase
s.c.	subcutaneous
SERCA 2a	Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium Transporting ATPase 2a
SGLT	sodium glucose cotransporter
SN	Standardabweichung
STEMI	ST-Streckenhebungsinfarkt
SV	stroke volume
TGF-β	transforming growth factor beta
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinasen

Kurzzusammenfassung

Ziel: Es wurden die Auswirkungen einer niedrig dosierten Behandlung des selektiven Natrium-Glucose-Cotransporter-2-Inhibitors (SGLT2), Empagliflozin, auf die Herzfunktion von normoglykämischen Ratten untersucht.

Methode: Zur Evaluation der akuten Effekte von Empagliflozin wurde nach iv.-Injektion des SGLT2-Inhibitors die Hämodynamik über 30 Minuten im intrakardialen Katheter gemessen. Die Induktion eines Myokardinfarktes erfolgte durch einen dauerhaften Verschluss der linken deszendierenden Koronararterie. Die Ratten wurden täglich mit 1 mg / kg Empagliflozin p.o. für 7 Tage behandelt. Echokardiographie und intrakardialer Katheter wurden eine Woche nach Myokardinfarkt durchgeführt. Es fand eine Quantifizierung der kardialen Proteinexpression im Western Blot statt.

Ergebnisse: Die iv.-Injektion von Empagliflozin bei gesunden Kontrolltieren führte im linken Ventrikel zu einem Anstieg des maximalen ventrikulären Drucks ($110,20 \pm 14,11$ mmHg vs $86,14 \pm 15,84$ mmHg, $p < 0,05$), des mittleren Drucks ($53,79 \pm 12,45$ mmHg vs $35,96 \pm 10,62$ mmHg, $p < 0,05$) und des max dP / dt ($5685,57 \pm 1444,27$ mmHg / s vs $8445,968 \pm 1964,483$ mmHg / s, $p < 0,01$). 7 Tage nach Myokardinfarkt führte eine Behandlung mit Empagliflozin zu einer verbesserten systolischen Funktion, die durch einen Abfall des Global Longitudinal Strains dargestellt wurde ($-16,64 \pm 1,61\%$ vs $-20,99 \pm 3,21\%$, $p < 0,05$). Zusätzlich kam es bei behandelten Sham Tieren zu einer Zunahme des Fractional Shortenings ($16,01 \pm 3,54\%$ vs $21,21 \pm 1,58\%$, $p < 0,05$) und des Schlagvolumens ($209,51 \pm 22,77$ ul vs $274,78 \pm 27,57$ ul, $p < 0,01$). Empagliflozin beeinflusste die kardiale Proteinexpression, indem es die Metalloprotease 9 (MMP9) ($p < 0,001$), sowie den pH-regulierenden Natrium-Protonen Austauscher 1 (NHE1) runterregulierte ($p < 0,05$) und die kontraktilitätsbestimmende Ca²⁺-ATPase des Sarco(endo)plasmatischen-Retikulums (SERCA2a) hochregulierte ($p < 0,05$). Die diastolische Funktion und die Stiffness-Parameter blieben unbeeinflusst. Es kam zu keiner Änderung der Expression der Fibrose- (TGFβ1, Smad) oder Nekroptose- (MLKL) Proteine.

Diskussion: Die iv.-Applikation von Empagliflozin erhöhte die Herzkontraktilität. Bei der Behandlung mit einer niedrigen Dosierung in der frühen Phase des Myokardinfarkts kam es unabhängig vom Glukosestatus zusätzlich zu einem Erhalt der systolischen Funktion. Es bestand dabei ein Zusammenhang zwischen der Empagliflozin Behandlung und der Herunterregulation von NHE und MMP9 und der Hochregulation von SERCA2a.

Abstract

Aim: Aim of this thesis was to study the effects of a low dose treatment with Empagliflozin, a selective sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, on the cardiac function in normoglycemic rats.

Method: To study its short-term effects, Empagliflozin was administrated iv. and hemodynamics were measured by an intracardiac catheter after 30 minutes. Myocardial infarction was induced by a permanent ligation of the left descending coronary artery. Rats were treated daily with 1mg / kg Empagliflozin p.o. for 7 days. Echocardiography and intracardiac catheter were performed one week after myocardial infarction. Cardiac protein expression was quantified by Western Blot.

Results: Iv.-injection of Empagliflozin in healthy control animals increased the maximal ventricular pressure ($110,20 \pm 14,11$ mmHg vs $86,14 \pm 15,84$ mmHg, $p < 0,05$), mean pressure ($53,79 \pm 12,45$ mmHg vs $35,96 \pm 10,62$ mmHg, $p < 0,05$) and max dP/dt ($5685,57 \pm 1444,27$ mmHg/s vs $8445,968 \pm 1964,483$ mmHg/s, $p < 0,01$) in the left ventricle. 7 days after myocardial infarction, Empagliflozin treatment resulted in an improved systolic function as demonstrated by a decrease of the global longitudinal strain ($-16,64 \pm 1,61\%$ vs $-20,99 \pm 3,21\%$, $p < 0,05$). In addition, treated sham animals showed an increase in fractional shortening ($16,01 \pm 3,54\%$ vs $21,21 \pm 1,58\%$, $p < 0,05$) and stroke volume ($209,51 \pm 22,77$ uL vs $274,78 \pm 27,57$ uL, $p < 0,01$). Empagliflozin influenced the cardiac protein expression by down-regulating the metalloprotease 9 (MMP9) ($p < 0,001$), as well as the pH regulating sodium hydrogen exchanger 1 (NHE1) ($p < 0,05$) and up-regulating the contractility-determining sarco(endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) ($p < 0,05$). The diastolic function and the vascular stiffness were not affected. There were no changes in the fibrosis (TGF β 1, Smad) or necroptosis (MLKL) protein expression.

Discussion: The iv.-application of Empagliflozin increased cardiac contractility. A low dose treatment preserved the systolic function in the early phases of myocardial infarction independent of the glucose statuses. The Empagliflozin treatment is associated with the down-regulation of NHE and MMP9 and the up-regulation of SERCA2a.

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen: die häufigste Todesursache in Deutschland

Im Jahr 2016 waren in Deutschland Erkrankungen des Kreislaufsystems mit 38,4% die häufigste Todesursache (1). An erster Stelle stand die chronische ischämische Herzkrankheit (KHK) mit 72.062 Betroffenen, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt mit 48.669 Verstorbenen (1). Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten und zusätzlich an einem Diabetes mellitus erkrankt waren, hatten dabei eine höhere Wahrscheinlichkeit im Verlauf zu versterben (2).

1.1.2 Definition des Myokardinfarktes

Bei einem Myokardinfarkt kommt es zu einer Minderversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff, bei der eine Nekrose des Herzgewebes entsteht (3). Die häufigste Ursache für einen Myokardinfarkt ist die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques im Bereich der Koronararterien (4).

Nachgewiesen wird der ischämische Schaden durch eine Erhöhung des kardialen Troponins oberhalb der 99. Perzentile (3). Zusätzlich zu dem laborchemischen Nachweis eines Myokardschadens muss definitionsgemäß mindestens eines der folgenden Kriterien zutreffen: typisches klinisches Bild, ischämischer EKG Befund (ST-Veränderungen, neu aufgetretener Linksschenkelblock), pathologische Q-Zacke im EKG, neu nachgewiesener Verlust von Myokardgewebe bzw. regionalen Wandbewegungsstörungen in der Bildgebung oder durch Angiographie oder Autopsie gesicherter Thrombus, der das Herz versorgenden Arterien (3).

Mittels des EKG-Befundes lässt sich der Myokardinfarkt in einen ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI) oder einen Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) einteilen (5).

1.1.3 Das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt und aktuelle Forschungsansätze

Ein pathologisches postmyokardiales Remodeling steht im Zusammenhang mit einem Verlust der Kontraktilität und damit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Den meisten Todesfällen infolge eines Myokardinfarktes geht eine Herzinsuffizienz voraus (6). Daher ist die Behandlung eines akuten Myokardinfarktes und der damit verbundene Erhalt der kardialen Pumpleistung ein zentrales Thema der aktuellen Forschung.

Im Rahmen einer Ischämie kommt es zu einem Zelluntergang, der von einer Entzündungsreaktion und von einem Abbau der extrazellulären Matrix durch Metalloproteasen (MMP) akut gefolgt wird, was zu einer Ausdünnung der Ventrikelwand und Dilatation führt (7, 8). Im weiteren Verlauf folgt eine antiinflammatorische Reaktion, die ein kardiales Remodeling mit dem Ziel einer stabilen Narbenbildung und der Anpassung des linken Ventrikels an eine erhöhte Wandspannung bewirkt (7, 8). Hier bildet sich im Infarktbereich eine Kollagenarbe und es kommt zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten (8). An den Umbauprozessen sind verschiedene Zellen und Botenstoffe beteiligt, die je nachdem einen Ansatzpunkt für neue Behandlungsmethoden darstellen.

Innerhalb der ersten Stunden nach einem Myokardinfarkt kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion, die gekennzeichnet ist durch das Einwandern von Neutrophilen und Monozyten bzw. Makrophagen in den Infarktbereich (7). Neutrophile schütten dabei Stoffe aus, die die Überreste des toten Gewebes abbauen – unter anderem auch MMPs (7, 8). Nach ungefähr Tag 7 kommt es zu einer Reduktion der Neutrophilenanzahl (7). Makrophage vollziehen ebenfalls innerhalb der ersten 7 Tage nach einem stattgefundenen Myokardinfarkt einen Wechsel des Polarisationsprofils von proinflammatorisch zu antiinflammatorisch (7).

Eine Reduktion der Entzündungsreaktion wurde in klinischen Studien mittels verschiedener Substanzen getestet, wobei es zu kontroversen Ergebnissen kam (9). Beispielsweise zeigte die Phase 2 Studie „VCU-ART3“ weniger Todesfälle und ein geringeres Auftreten von Herzinsuffizienz, jedoch ohne Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion bei Behandlung von STEMI Patienten mit einem IL-1 Inhibitor (10). Bei Patienten mit einem PCI behandelten NSTEMI kam es bei Gabe von einem P-Selectin-Antagonisten oder einem IL-6 Rezeptor Inhibitor zu einer Reduktion der Troponin Werte (9, 11, 12).

Für die stabile Narbenformation sind insbesondere die Gruppe der Metalloproteasen entscheidend (8). Allgemein vermitteln MMPs den Abbau der extrazellulären Membran und können zusätzlich

die nach Myokardinfarkt folgenden inflammatorischen Antworten beeinflussen (13, 14). Ihre natürlichen Gegenspieler stellen die Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen (TIMPs) dar (7). An den postmyokardialen Umbauprozessen sind verschiedene MMPs beteiligt, unter anderem die Gelatinasen, MMP9 und MMP2 (13-15).

MMP9 hat nach einem Myokardinfarkt seine Peak-Konzentration zwischen Tag 1 und 4 und ist noch eine Woche nach Myokardinfarkt hochreguliert (13, 16). Bei Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erlitten haben, korrelierte die Plasma-MMP9 Konzentration mit dem N-BNP-Spiegel, während die MMP2 Konzentration invers mit dem linksventrikulären Volumen im Zusammenhang steht (16). Auch fiel auf, dass Patienten, die 2 Jahre nach Myokardinfarkt eine Herzinsuffizienz entwickelt hatten, zum Zeitpunkt des Infarktes erhöhte MMP9 Spiegel aufwiesen (17). Im Tiermodell kommt es bei Beeinflussung der MMPs zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einerseits zeigt sich bei einer 3 Stunden nach Koronarligation begonnenen Behandlung mit einem MMP9 Inhibitor eine Verschlechterung der ventrikulären Funktion sowie eine Ausdünnung der Myokardwand (18). Andererseits kommt es bei MMP9 Knockout Mäusen nach Herzinfarkt zu einer geringeren linksventrikulären Dilatation und einem verringerten Kollagengehalt im Infarkt-bereich (19).

MMPs stehen außerdem in einer Wechselwirkung mit TGF- β (20). TGF- β beeinflusst die Regeneration und vor allem die kardiale Fibrosebildung nach Myokardinfarkt (21, 22). In verschiedenen Tiermodellen konnte eine postmyokardiale Hochregulation von TGF- β beobachtet werden, die zum Teil ihre Wirkung durch eine Aktivierung der Smad Signal Kaskade entfaltet (21, 22). Dabei kommt es zu einer verstärkten Aktivierung von Smad 2 und 3 und somit zu einer erhöhten Transkription verschiedener Gene, die im Zusammenhang mit der Produktion von extrazellulärer Matrix und fibrotischen Umbauprozessen stehen (21, 22).

Versuchstiere, die mit einem TGF- β Inhibitor behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Mortalität und ein verschlechtertes kardiales Remodeling nach Myokardinfarkt (23). Dagegen kam es in einem weiteren Experiment neben der erhöhten früheren Sterblichkeit 4 Wochen nach Ligation der linken Koronararterie außerhalb der Infarkt-narbe zu einer Verbesserung der Dilatation und Fibrose nach TGF- β Blockade (24).

Ein weiterer Gegenstand der aktuellen Forschung ist der Einfluss von Nekroptose auf kardiovaskuläre Erkrankungen (25). Bei Nekroptose handelt es sich um eine programmierte Nekrose, die Caspase unabhängig abläuft (25, 26). Hierbei kommt es zu einem Zusammenspiel aus der Rezeptor

Interacting Protein Kinase (RIP) 1, RIP 3 und Mixed Lineage Kinase Domain-Like (MLKL), die zu Porenbildung und Zelluntergang führen (26).

In Tiermodellen konnte 24 Stunden nach Myokardinfarkt eine Hochregulation von RIP3 gesehen werden, wobei RIP3 negative Mäuse ein verbessertes kardiales Outcome nach Infarkt aufwiesen (25, 27).

1.1.4 Diabetes als Risikofaktor für ein schlechtes Outcome nach Myokardinfarkt

Diabetes zählt zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose und damit der KHK (28). Das Risiko für Typ 2 Diabetiker an einer KHK bzw. deren Folgeerkrankungen zu leiden, ist im Vergleich zu der Normalbevölkerung erhöht (29). Dabei erkrankten Diabetikerinnen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an einer KHK als männliche Diabetiker (29).

Darüber hinaus haben Diabetiker ein erhöhtes Risiko, im Verlauf eines Myokardinfarktes an diesem zu versterben (2). Klinisch wichtig ist, dass Diabetiker häufiger an symptomarmen, sogenannten „stummen“ Infarkten leiden, die schwieriger zu diagnostizieren sind (30).

Auch bei dem klinischen Outcome nach Myokardinfarkt gibt es Unterschiede zwischen Patienten mit bzw. ohne Diabetes mellitus (31). 6 Monate nach initialem Ereignis konnte keine Differenz in Bezug auf die linksventrikuläre Pumpfunktion gesehen werden (31). Jedoch zeigte sich in der Langzeitbeobachtung, dass Diabetiker ein erhöhtes Auftreten von Herzinsuffizienz 5 Jahre nach erlittenem Infarkt aufwiesen (31). Dies spricht für einen schlechteren postmyokardialen Umbau des Herzens. In einer Studie, die das Remodeling nach Myokardinfarkt bei diabetischen Mäusen untersuchte, fiel eine erhöhte Aktivität an MMPs und eine unorganisierte Kollagenstruktur auf, die mit einer schlechteren kardialen Funktion korrelierte (32).

1.2 Elektromechanische Kopplung und pH Regulation

1.2.1 Die elektromechanische Kopplung und pH Regulation

Bei der elektromechanischen Kopplung handelt es sich um die Umwandlung eines elektrischen Signals in die mechanische Kontraktion einer Zelle (33). Sie erfolgt durch den Einstrom von Calcium durch L-Type-Calcium Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren, DHPR) in das Zytosol infolge einer Erregung der Kardiomyozyten-Membran, Sakrolemma (33). Der plötzliche Calcium-Anstieg führt zu einer weiteren Freisetzung von Calcium aus dem Sakroplasmatischen Retikulum durch die Ryanoidin-Rezeptoren (RyR2) (33). Die nun ausreichend große Calcium-Menge verursacht die Kontraktion des Kardiomyozyten durch Bindung des Calciums an das Troponin C des Kontraktionsapparats (33). Damit es daraufhin zu einer Erschlaffung der Herzmuskelzelle kommen kann, muss das Calcium abtransportiert werden (33). Dabei wird über eine Calcium-ATPase (sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium transporting ATPase 2a, SERCA 2a) ein großer Teil des Calciums zurück in das Sakroplasmatische Retikulum transportiert (33). Weiterhin wird Calcium im Austausch mit 3 Natrium mittels Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) vom Zytosol in den Extrazellulärraum gebracht (33, 34). Damit NCX arbeiten kann, muss ein ausreichend großer Natriumgradient vorliegen, der durch die Natrium-Kalium ATPase erschaffen wird (34). Ein kleiner Anteil des Calciums wird durch die im Sakrolemma befindliche Calcium-ATPase aus der Zelle gepumpt oder über einen Uniport in Mitochondrien aufgenommen (33).

Innerhalb der Kardiomyozyten herrscht unter normalen Bedingungen ein pH-Wert von ca. 7,2 (35). Der intrazelluläre pH wird vor allem durch den Natrium-Protonen-Austauscher (NHE), der Protonen im Austausch mit Natrium aus der Zelle heraustransportiert, und dem Natrium-Bicarbonat-Cotransporter (NBC), welcher Bicarbonat zusammen mit Natrium nach intrazellulär bringt, aufrechterhalten (35). NBC lässt sich dabei noch zusätzlich in zwei Unterformen unterteilen: NBCe1 und NBCn1 (35). NBCe1 schleust 2 Bicarbonat-Moleküle mit einem Natrium in das Zellinnere, wohingegen NBCn1 nur ein Bicarbonat zusammen mit einem Natrium transportiert (35).

Die pH Regulation der Kardiomyozyten ist mit der elektromechanischen Kopplung unter anderem über den intrazellulären Natriumgradienten verbunden (35, 36). Dieser wird durch die Expression von NHE und NBC beeinflusst (35, 36). Der Natriumgradient reguliert dabei die Aktivität der NCX und so indirekt die Konzentration des intrazellulären Calciums (34-36).

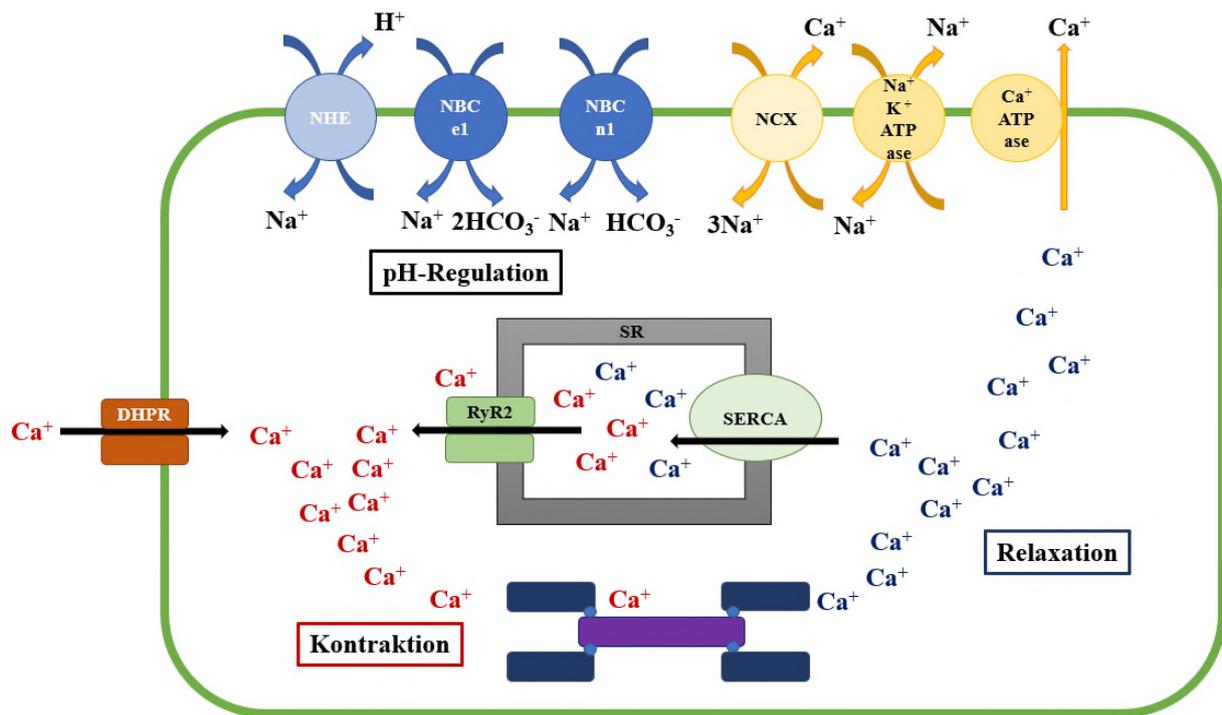


Abbildung 1: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung und pH Regulation in Kardiomyozyten

1.2.2 Pathophysiologische Veränderung der Kontraktilität und pH Regulation bei Myokardinfarkt

Ein starker Abfall des intrazellulären pHs der Kardiomyozyten kommt im Rahmen eines Myokardinfarktes vor. Dabei führt die Azidose zu einer Stimulation von NHE und NBC und einer Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase (35, 37, 38). Der Versuch, den intrazellulären pH-Wert anzuheben, geht mit einer gesteigerten Natrium-Aufnahme einher (35, 36). Ein ansteigender Natriumgradient kann NCX inaktivieren bzw. verlangsamen oder sogar den Ein- und Ausstrom der Moleküle über den Austauscher umkehren (34, 37, 39). Kommt es zu einer solchen umgekehrten Wirkung von NCX, kann dies unterschiedliche Auswirkungen haben. Dabei wird vermutet, dass ein vermehrter Calciumeinstrom in die Zelle die Kontraktilität verbessert, indem es zu einer gesteigerten Beladung des Sakroplasmatischen Retikulums mit Calcium und eine daraus folgende erhöhte Calcium-Amplitude bei dem nächsten Aktionspotential kommt, während ein Calciumüberschuss, wie er bei einer Ischämie existiert, zu Funktionsstörungen und Zelluntergang führt (34-37, 39).

Weiterhin konnte in Folge eines Myokardinfarkts und in einer daraus resultierenden Herzinsuffizienz im Tiermodell eine Herunterregulation der SERCA 2a beobachtet werden, die mit einem langsamer abnehmenden Calcium-Transienten im angrenzenden Infarktbereich einherging (40).

1.2.3 Kardiale Pumpen und Transporter als Ansatzpunkt zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen

Eine Veränderung in der Expression der Transporter und Pumpen des Sakrolemmas des Kardiomyozyten wird bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet. Die damit verbundenen Veränderungen der intrazellulären Ionengradienten sind oft ursächlich für die Pathophysiologie der Erkrankung (33). Die kardialen Transporter und Pumpen sind dabei Ansatzpunkte verschiedener Forschungsprojekte, die sich mit der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen befassen und auf die im Folgenden genauer eingegangen wird:

Die bei Herzinsuffizienz nachgewiesene Herunterregulation der SERCA 2a führt zu einem Verlust der kardialen Pumpleistung (33, 41). Dabei gibt es mehrere Studien, in denen die Modifikation von SERCA 2a als therapeutischer Ansatz genutzt wurde – wobei diese kontroverse Ergebnisse erzielten (42-45).

Zusätzlich zu der geringen SERCA 2a Aktivität konnte in einem Teil der Studien bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine Hochregulation von NCX beobachtet werden (41, 46). Dabei wurde vermutet, dass eine kompensatorische NCX Erhöhung als Ausgleich der erniedrigten SERCA 2a Aktivität dient (41).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Gewebe von Herzinsuffizienzpatienten, welches einen geringeren diastolischen Kraftanstieg nach Stimulation aufwies, eine erhöhte NCX Expression besaß (47). Piacentino et al. konnten bei Untersuchungen von menschlichen herzinsuffizienten Kardiomyozyten einen verringerten Calcium-Peak in der Systole, eine geringere Beladung des Sakroplasmatischen Retikulums mit Calcium sowie eine vermehrte Entfernung von Calcium durch NCX nachweisen (48).

Im Tierexperiment reduzierten NCX-Inhibitoren die Größe des Infarktgebietes im Langendorff-Modell bzw. bei perfundierten Mäuseherzen (49, 50). Transgene NCX Knockout Mäuse wiesen eine geringe Infarktgröße und eine verbesserte postischämische Kontraktilität auf (51). Jedoch hatten die NCX-Inhibitoren teilweise ein nicht sonderlich spezifisches Wirkspektrum (34, 37).

Szepesi et al. untersuchten die Wirkung von NHE- und NCX-Inhibition mittels Langendorff Experiment in einem Ischämie-Reperfusion-Modell (38). Gab man beide Inhibitoren zusammen, so zeigte sich eher ein schlechteres Outcome als bei der alleinigen Applikation von NHE Hemmern (38).

Im Tiermodell wurden NHE-Inhibitoren zur Behandlung von Myokardinfarkten bzw. Reperfusion-Verletzungen verwendet. Hierbei ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse. So zeigten einige Veröffentlichungen eine Verbesserung der Hämodynamik und des kardialen Remodelings sowie eine Verringerung der Infarktgröße (52-54). Andere tierexperimentelle Studien beobachteten jedoch keine Veränderung (55). Schlussendlich konnten die protektiven Effekte einer NHE-Blockade nicht in einer Phase 2 Studie an STEMI-Patienten nachgewiesen werden (56).

Weiterhin konnten kardioprotektive Effekte bei der selektiven Hemmung von NBCe1 bei Ischämie-Reperfusion-Verletzungen im Tiermodell gezeigt werden (57, 58). Dazu gehörten eine verbesserte Myokardfunktion und eine verringerte Infarktgröße (57, 58). NBCe1-überexprimierte transgene Mäusen zeigten dagegen nach Myokardinfarkt eine verringerte Pumpleistung, während NBCe1 Knockout-Mäuse keine Veränderung der Kontraktilität im Rahmen eines Ischämie Reperfusion-Modells aufwiesen (59, 60).

1.3 SGLT2 Inhibitoren

1.3.1 Die Familie der SGLT-Rezeptoren

Sodium dependent Glucose Cotransporter (SGLT) Rezeptoren gehören zu der Sodium Substrate Symporter Genfamilie (SSSF) (61). An der renalen Reabsorption von Glucose sind vor allem SGLT1 und SGLT2 Rezeptoren beteiligt (61). Im menschlichen Gewebe konnte SGLT2 vor allem in der Niere nachgewiesen werden, wobei SGLT1 neben seinem Vorkommen im renalen Gewebe auch in der Lunge, Leber, Dünndarm und Herz exprimiert ist (62).

Beide SGLT Rezeptoren kommen im proximalen Tubulus der Niere vor, wobei SGLT2 Rezeptoren im Segment 1 und SGLT1 Rezeptoren in den Segmenten 2 und 3 anzutreffen sind (63). Sie werden in der apikalen Membran exprimiert und transportieren ein Glucosemolekül zusammen mit einem (SGLT2) bzw. zwei Natriummolekülen (SGLT1) vom Lumen nach intrazellulär (63).

Es handelt sich dabei um einen sekundär aktiven Transport, der durch einen geringeren Natriumgradient intrazellulär getrieben wird (63). Der Natriumgradient wird durch eine basolaterale Na/K-ATPase aufrechterhalten, die drei Natriummoleküle zurück ins Blut im Tausch gegen 2 Kaliummoleküle transportiert (63). Die sich intrazellulär ansammelnde Glucose wird über GLUT1 und GLUT2 Transporter zurück in das Blut gebracht (63).

SGLT2 Rezeptoren haben dabei eine hohe Kapazität, jedoch eine geringere Affinität, während SGLT1 Rezeptoren umgekehrt eine niedrige Kapazität, aber eine hohe Affinität aufweisen. Unter physiologischen Bedingungen reabsorbieren SGLT2 Rezeptoren 90% der Glucose (61, 63). Bei gesunden Individuen wird dabei die Glucose vollständig aus dem Urin zurückresorbiert (63). Die Nierenschwelle für Glucose liegt dabei bei 180mg/dL (63).

1.3.2 SGLT2 Inhibitoren, die neue Gruppe der Antidiabetika

Bei Diabetikern konnte teilweise eine erhöhte Expression von SGLT2, SGLT1 und GLUT2 nachgewiesen werden, die mit einer gesteigerten Glucose-Reabsorption einhergeht (61, 63). SGLT2 Inhibitoren entfalten ihren antidiabetischen Effekt durch die Hemmung des renalen SGLT2 Cotransporters (64, 65). Dies verhindert eine Rückresorption von Glucose aus dem Primärharn und senkt so die Blutglucose (64).

Phlorizin war der erste unselektive SGLT2-Inhibitor, der aus der Rinde eines Apfelbaums extrahiert wurde (65). Wegen seiner Nebenwirkungen und der geringen Selektivität, kam es zu keiner klinischen Anwendung (65). Von dem aktiven Zentrum von Phlorizin wurden jedoch weitere SGLT2 Inhibitoren abgeleitet (61, 65).

Zu den ersten in Europa zugelassenen SGLT2 Inhibitoren gehörten Dapagliflozin, Canagliflozin und Empagliflozin (66). Sie unterscheiden sich zum Teil in ihrer Pharmakokinetik (63).

1.3.3 Die pharmakologischen Eigenschaften von Empagliflozin

Bei Empagliflozin handelt es sich um 1-Chlor-4-(β -D-glucopyranos-1-yl)-2-[4-((S)-Tetrahydrofuran-3-yl-oxy)-benzyl]-Benzol (64, 67). Es gehört zu der Gruppe der C-Glykoside mit der Strukturformel $C_{23}H_{27}ClO_7$ und einem Molekulargewicht von 450,9 g/mol (64, 67).

Empagliflozin erreicht nach 1,5 bis 3 Stunden seine maximale Konzentration und hat daraufhin eine biphasische Abnahme (63, 67, 68). Durch die lange Halbwertszeit von ca. 13 Stunden reicht eine einmalige tägliche Gabe aus (63). Das Steady-State wurde bei Typ 2 Diabetikern am Tag 5 erreicht (68). Die Bioverfügbarkeit von Empagliflozin liegt bei ungefähr 75%, wobei 86% des Medikamentes an Proteine gebunden werden (63). Es hat eine 2.500-mal stärkere Selektivität zu SGLT2 als zu SGLT1 (63, 64). Bei einer Gabe von bis zu 100mg Empagliflozin konnte ein dosisabhängiger Anstieg der renalen Glucoseausscheidung bei gesunden Studienteilnehmern nachgewiesen werden (63, 69). Es zeigt sich eine lineare Pharmakokinetik in Bezug zur Zeit (67, 70). Die Inaktivierung von Empagliflozin erfolgt durch Glucuronidation innerhalb der Leber (67, 70). Die Metabolite werden zu 55% renal und zu ca. 40% fäkal eliminiert (67, 70).

Bei der Behandlung mit SGLT2 Inhibitoren kommt es zu einer Glucoseausscheidung, die jedoch nicht unter 80g pro Tag absinkt (63, 71). Ursächlich sind hierfür die im späteren Tubulussegment exprimierten SGLT1 Rezeptoren, die bei Inhibition des SGLT2 Rezeptors ihr volles Potential ausschöpfen können und bis zu 40% der Glucose bzw. mindestens 80g pro Tag, zurückresorbieren (63, 71). Dies erklärt auch, warum es bei alleiniger SGLT2 Inhibitor Gabe unwahrscheinlich ist, dass es zu Hypoglykämien kommt (71).

Empagliflozin ist in Deutschland als Mono- oder Kombinationstherapie für Typ 2 Diabetiker zugelassen (63). Im klinischen Alltag stehen Patienten Dosen von 10mg, die bis auf 25mg Empagliflozin hochdosiert werden können, zur Verfügung (63).

Es sind zu dem jetzigen Zeitpunkt keine relevanten Medikamenteninteraktionen bekannt (66). Einschränkungen bei der Gabe von Empagliflozin bestehen bei chronischer Niereninsuffizienz mit stark eingeschränktem GFR und ist ebenfalls kritisch zu sehen bei schweren Leberschäden (63, 67). Bei Schwangeren und Stillenden sind SGLT2 Inhibitoren kontraindiziert (63).

Zu den unerwünschten Nebenwirkungen zählen vor allem Urogenitalinfektionen (61, 63). Durch die osmotische Diurese und den damit verbundenen Wasserverlust kann es zu Dehydration, Schwindel und Hypotonie kommen (61, 63). Hypoglykämien wurden bei der Kombination von SGLT2 Inhibitoren mit anderen Antidiabetika beobachtet (63).

Bei Patienten, die mit SGLT2 Inhibitoren behandelt wurden, konnte ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von diabetischen Ketoazidosen beobachtet werden (61, 63). Bei Canagliflozin wurde zusätzlich eine erhöhte Rate an Amputationen der unteren Extremitäten in der CANVAS Studie beschrieben (63, 72). Auch wurde ein vermehrtes Auftreten von Fournier Gangränen im Zusammenhang mit einer SGLT2 Inhibitoren-Behandlung gesehen (73).

1.3.4 Kardiovaskuläre Wirkungen von SGLT2 Inhibitoren

Seit Oktober 2019 werden nach der Diabetes-Leitlinie der ESC bei der Behandlung von Typ 2 Diabetikern mit kardiovaskulären Vorerkrankungen oder mit einem hohen kardiovaskulären Risiko SGLT 2-Inhibitoren empfohlen (74). In der Empa-Reg-Outcome Studie wurde unter der Gabe von Empagliflozin bei Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen eine verringerte Mortalität nachgewiesen, unter anderem durch eine Reduktion der kardiovaskulären Todesfälle (75). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Gabe von SGLT2 Inhibitoren zu einer signifikanten Reduktion der nicht tödlichen Myokardinfarkte, wie auch Herzinsuffizienzen führte (75, 76). All diese Ergebnisse bezogen sich auf Typ 2 Diabetiker.

Allgemein wirken SGLT2 Inhibitoren bei Typ 2 Diabetikern, dadurch, dass sie nach Einnahme die Blutglucose senken, wobei sie bei langfristiger Therapie eine positive Auswirkung auf den HbA1c haben (61). Es konnte dabei eine verbesserte Betazellfunktion und Blutzuckerkontrolle beobachtet werden (61, 63). Auch schien der Einsatz von SGLT2 Inhibitoren bei Typ 2 Diabetikern eine nephroprotektive Wirkung zu haben, sodass unter anderem in einer Metaanalyse sich das Risiko für die Progression von renalen Erkrankungen reduzierte (61, 77).

Positive kardiovaskuläre Effekte von SGLT2 Inhibitoren sind neben der Reduktion des Blutzuckers, ein Gewichtsverlust und eine Senkung des Blutdrucks ohne Beeinträchtigung der Herzfrequenz (75, 78). Ein Grund für die Reduktion des Blutdrucks ist der diuretische Effekt von SGLT2 Inhibitoren (79). Dieser führt zusätzlich zu einer reduzierten Vorlast und einer geringeren Volumenbelastung des Herzens und beeinflusst dadurch das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz positiv (76, 79). Aufgrund einer SGLT2-Inhibition vermittelten Reduktion der arteriellen Steifigkeit wird die Nachlast verringert (79-82).

Momentan laufen verschiedene klinische Studien, die die Wirkung von Empagliflozin bei Herzinsuffizienz erforschen. Dabei werden in der EMPEROR-reduced und EMPEROR-preserved Studie, Typ 2 Diabetiker und Nicht-Diabetiker ohne und mit erhaltener Ejektionsfraktion untersucht (83, 84). Bei EMPA-TROPISM wird die Wirkung von Empagliflozin auf Herzinsuffizienz bei Patienten ohne eine Diabeteserkrankung erforscht (85).

1.3.5 Der kardiale Wirkmechanismus von SGLT2 Inhibitoren

Die in der Empa-Reg-Outcome Studie beobachtete Reduktion der kardiovaskulären Todesfälle unter Empagliflozin-Gabe wirft Fragen nach dem exakten kardialen Wirkmechanismus von SGLT2 Inhibitoren auf (75). Dabei stellt die Reduktion der Vor- und Nachlast nur teilweise einen Erklärungsansatz dar (79). Momentan werden dazu verschiedene Hypothesen aufgestellt, wobei der genaue Mechanismus noch Gegenstand aktueller Forschung ist (62, 86).

In Tierexperimenten konnten die kardioprotektiven Effekte von SGLT2 Inhibitoren unabhängig vom Glucosestatus gezeigt werden (82, 87-90). Zusätzlich konnten in Modellen verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen die Wirkungen von SGLT2 Inhibitoren evaluiert werden. Beispielsweise kam es bei Herzinsuffizienz mit erhaltener, wie auch reduzierter Ejektionsfraktion zu einer Verbesserung der kardialen Pumpfunktion und zum Teil des Remodelings (81, 82, 87, 89). Auch bei Myokardinfarkt- bzw. Ischämie / Reperfusion-Verletzungs-Modellen konnte eine erhöhte Überlebensrate, eine verbesserte linksventrikuläre Kontraktilität und eine erhöhte körperliche Belastungstoleranz dargestellt werden (88, 90-92). Die Infarktgröße blieb jedoch unverändert, unabhängig von der Gabe von SGLT2-Inhibitoren (88, 91, 92). Die Studien widersprechen sich jedoch darin, ob SGLT2 Inhibitoren vornehmlich eine diastolische oder systolische Wirkung haben (81, 82, 87, 89, 92).

In der histologischen Auswertung verschiedener Tiermodelle mit unterschiedlichen kardialen Erkrankungen kam es zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der kardialen Fibrose nach Behandlung mit SGLT2 Inhibitoren. So konnte eine geringere Fibrose im Atrium und Ventrikel bzw. in einzelnen Schichten dieser beobachtet werden, währenddessen es teilweise auch zu keiner Veränderung der interstitiellen Fibrose nach Empagliflozin-Gabe kam (93-95). Nach 6-monatiger Empagliflozin Behandlung von Typ 2 Diabetikern konnte keine Verbesserung der kardialen Fibrose im MRT dargestellt werden (96, 97).

Es konnte gezeigt werden, dass SGLT2 Inhibitoren die Produktion von Ketonkörpern in der Leber fördern (98, 99). Ketonkörper stellen dabei eine Art „super fuel“ aufgrund ihrer hohen Stoffwechseleffizienz dar (100). Ob es zu einer vermehrten kardialen Verwendung von Ketonkörpern kommt, ist jedoch weiterhin widersprüchlich. Bei diabetischen wie auch nicht-diabetischen Tieren konnte nach Gabe von Empagliflozin ein erhöhtes Level an zirkulierenden Ketonkörpern und eine teilweise vermehrte Expression für deren myokardiale Enzyme dokumentiert werden (89, 92, 101).

Jedoch gab es auch Studien, bei denen keine bzw. nur teilweise eine Veränderung der Ketonkörper im Serum nachgewiesen werden konnte (102, 103). Die bei Empagliflozin-Gabe beobachtete vermehrte kardiale ATP Produktion wurde durch einen Anstieg der Oxidation von Glucose und Fettsäuren erklärt – ohne erhöhte Verwendung von Ketonkörpern (103, 104).

SGLT2 Inhibitoren beeinflussen die kardiale Kontraktilität und pH Regulation. In isolierten ventrikulären Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass Empagliflozin die NHE1-Aktivität hemmt (81, 105). Dies verursacht eine Senkung der Natrium- und Calciumkonzentration im Zytosol und einem Anstieg des mitochondrialen Calciums, unabhängig vom extrazellulären Glucosegehalt (105). Im Langendorff-Experiment wurde die NHE1 Aktivität nicht nur von Empagliflozin, sondern auch Dapagliflozin und Canagliflozin gehemmt (106). Es kam jedoch nur bei Empagliflozin und Canagliflozin zu einer koronaren Vasodilatation (106). Uthman et al. beschrieben dabei eine hohe Bindungsaffinität aller SGLT2 Inhibitoren im Bereich der extrazellulären Natrium-Bindungsstelle von NHE1 (106).

In menschlichen Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz konnte keine Veränderung in dem diastolischen Calciumlevel oder der Amplitude des Calcium Transientes bei Empagliflozin Behandlung nachgewiesen werden (81). Jedoch kam es in diesen Zellen zu einer Reduktion der passiven Steifheit des Myofilaments durch den SGLT2 Inhibitor, die mit einer Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus von Regulationsproteinen des Myofilament einherging (81).

Die in diabetischen Mäusen gesehene Herunterregulation der Proteinexpression von SERCA 2a und RyR2 konnte bei Empagliflozin-Gabe normalisiert werden (107). Auch kam es zu einem Erhalt der Calcium Beladung der SERCA 2a wie auch des Calcium Transienten bei Applikation des SGLT2 Inhibitors (107). Im Vergleich zur Kontrollgruppe gab es jedoch keine signifikanten Veränderungen (107). Auch bei Empagliflozin behandelten Myokardinfarkten blieb die SERCA 2a Proteinexpression im Tiermodell unbeeinflusst (95).

1.4 Zielsetzung und These

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde die Wirkung des SGLT2 Inhibitors, Empagliflozin, auf das Herz erforscht. Ein spezifischer Fokus lag auf der kurzfristigen kardialen Wirkung von Empagliflozin nach intravenöser (iv.) Applikation und der Auswirkung der niedrig dosierten Behandlung in der Frühphase nach Myokardinfarkt. Die Experimente wurden an normoglykämischen Wistar Ratten durchgeführt, um die kardiale Wirkung unabhängig von dem antidiabetischen Effekt des Medikamentes darzustellen.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war: Welche kardiale Wirkung hat Empagliflozin? Dabei ist von besonderer Bedeutung, ob ein kardialer Effekt auch bei einer niedrig dosierten Behandlung beobachtet werden kann.

Eine weitere noch nicht geklärte Frage ist, wie genau der Wirkmechanismus von Empagliflozin am Herzen funktioniert. Ein besonderes Augenmerk liegt hier auf den kardialen Pumpen und Transportern, die eine kardioprotektive Eigenschaft erklären könnten. Insbesondere für die frühe Phase nach Myokardinfarkt ist noch nicht bekannt wie Empagliflozin die Proteolyse und Fibrolyse und damit das Remodeling beeinflusst.

Die These dieser Doktorarbeit lautet wie folgt:

Die niedrig dosierte Behandlung mit Empagliflozin hat einen direkten kardialen, protektiven Effekt nach Myokardinfarkt und beeinflusst dabei die Hämodynamik bei nicht-diabetischen Ratten.

2 Methodik und Materialien

2.1 Materialien

2.1.1 Tierexperiment

2.1.1.1 Tiere und Tierhaltung

Tiere und Tierhaltung	Herkunft
Wistar Ratten	Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland
Sartorius CP4201	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

2.1.1.2 Echokardiographie

Equipment	Herkunft
Aquasonic 100 Ultrasound Transmission Gel	Parker Laboratories Inc., New Jersey, U.S.A.
Favorita II - Aesculap Schermaschinen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Isoflurane Forene	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Parker Spectra 360 Elektrodengel	Parker Laboratories Inc., New Jersey, U.S.A.
Therma Sonic Gel Warmer	Parker Laboratories Inc., New Jersey, U.S.A.
Veet Haarentfernungscreme	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vevo 3100 Imaging System mit einem MX 250 Schallkopf	FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanda
Vevo Anesthesia System	FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanda
Vevo Imaging Station	FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanda

2.1.1.3 Myokardinfarkt-Induktion

Equipment	Herkunft
Ethibond 3.5 Ph (polyester)	Ethicon, Somerville, New Jersey, U.S.A.
Ethibond Excel 13mm (polyester)	Ethicon, Somerville, New Jersey, U.S.A.
Ketamin / Xylazin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Kleintier-Ventilator	Ideal Ventilator, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, U.S.A.
Nadelhalter (Mayo Hegar)	Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Kanada
Pinzette (Graef Forceps)	Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Kanada
Prolene 17mm (polypropylen)	Ethicon, Somerville, New Jersey, U.S.A.
Schere (Fine Scissors – Sharp)	Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Kanada
Terylene USP 4/0	Serag Wiessner, Deutschland

2.1.1.4 Herzkatheter und Kontraktilitäts-Modell

Equipment	Herkunft
ACCULAB VICON	Sartorius AG. Göttingen, Deutschland
Kanüle 25G orange	ICU Medical Germany GmbH, Deutschland
Microlance 3 BD	Becton Dickinton, Spanien
Pinzette (Dumont)	Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Kanada
PowerLab Modul 4/20	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Samba-Katheter	Samba Sensors, Västra Frölunda, Sweden
Schere (Vannas)	Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Kanada
Syringe BD	Franlin Lakes, U.S.A.

2.1.2 Labormaterialien

2.1.2.1 Western Blot und Immunhistologie

Chemikalie / Substanz	Hersteller
Acryl- / Bisacrylamide	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aceton	J.T. Baker / Avantor, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
BCA	Bio-Rad Laboratories., Hercules, California, U.S.A.
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Complete Mini (Proteinase inhibitor cocktail)	Roche, Mannheim, Deutschland
Dry milk powder	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Avantor, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Formalin	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycine	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraffin (Typ 9)	Richard-Allan Scientific / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris-HCl	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Blot-Puffer	Tris-Base 25 mM (pH 8,3), Glycin 192 mM, Methanol 20%, SDS 10%
Citratpuffer	Citronsäure Monohydrat (pH 6,0), destilliertes H ₂ O
Probenpuffer (6x)	Tris-HCl 400 mM (pH 6,8), SDS 5%, Glycerol 20%, Bromphenolblau 0,1%
Protein-Lyse-Puffer (RIPA)	Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P40 1%, Glycerol 15%, 1 Tablette Complete Mini (Proteinaseinhibitor-Cocktail) auf 10ml
Sammelgel-Puffer	Tris-Base 0,5 M + HCl (pH 6,8), 10% SDS, Acrylamid – bis (30%), Ammoniumpersulfat, TEMED
SDS-Elektrophorese-Puffer	Tris-Base 25 mM (pH 8,3), Glycin 192 mM, SDS (10%)
Trenngel -Puffer	Tris-Base 1,5 M + HCl (pH 8,8), SDS 10%, Acrylamid - bis (30%) Ammoniumpersulfat (10%), TEMED, destilliertes H ₂ O
TTBS-Puffer	Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 140 mM, Tween 20 0,1%

Geräte	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, United Kingdom
Biorevo Bz 9000 Fluorescence Microscope	KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Curix 60	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Disposable pipettes	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer	Armin Baack, Schwerin, Deutschland
Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, U.S.A.
MICROM EC 350, Tissue Embedding Center	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, U.S.A.
MICROM HM 325, Rotationsmikrotom	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, U.S.A.
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen	Millipore, Schwalbach, Deutschland

2.1.2.2 Antikörper

Antikörper	Herkunft
Anti-Rabbit Immunoglobulins / HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotin	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
GAPDH	Abcam, Hiddenhausen, Deutschland
IL-1 β	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Deutschland
MLKL	Millipore, Merk, Darmstadt, Deutschland
MMP9	Abcam, Hiddenhausen, Deutschland
NCX1	Marly, Swant, Schweiz
NBC1	Cohesion Bioscience, London, Vereinigtes Königreich
NF κ B	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Deutschland
NHE-1	Abbiotec, San Diego, U.S.A.
Serca 2a	Dianova, Hamburg, Deutschland
Smad 2	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Deutschland
TGF-beta 1	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Deutschland
TIMP-1	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Deutschland

2.1.2.3 Glucosebestimmung

Kit / Equipment	Hersteller
GOD FS Kit	Diagnostic System GmbH, Holzheim, Deutschland
Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, U.S.A.
96 Well Platte	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, U.S.A.

2.1.3 Software

Software	Herkunft
BZ II Viewer	KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Chart 5	eDAQ Pty Ltd, Denistone East, Australien
Endnote	Thomson Reuters
Image J	Wayne Rasband, U. S. National Institutes of Health, Maryland, USA
Prism 6	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Pubmed	US National Library of Medicine National, Institutes of Health
Vevo LAB / Vevo Strain	FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanda
Word, Excel, Power Point 2016	Microsoft

2.2 Methodik

2.2.1 Tierantrag

Alle Experimente wurden mit der Genehmigung und gemäß den Auflagen und Richtlinien des „Landesamtes für Gesundheit und Soziales“ durchgeführt (Registriernummer G0128 / 17). Es wurde nach den „Charité Animal Welfare Guidelines“ gearbeitet.

2.2.2 Tiere und Tierhaltung

Für die Experimente wurden normotensive, männliche Wistar Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in einer spezifisch pathogenfreien Barrieren gewichtsbasiert zusammen in Käfigen gehalten. Im Tierstall herrschten standardisierte Umgebungsbedingungen unter anderem ein 12 / 12 Stunden Tag- / Nachtzyklus, gleichbleibende Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Freier Zugang zu Wasser und Nahrung war das ganze Experiment über gegeben.

Während des Zeitraums des Experimentes wurden alle Tiere regelmäßig gewogen. Zum Zeitpunkt der Lieferung der Tiere wogen sie ca. 100 Gramm und waren ungefähr 6 Wochen alt. Bei Beginn des Myokardinfarkt-Experimentes wogen die Tiere zwischen 170-230 Gramm. Bei einem Gewichtsverlust von mehr als 20% wäre es zum Abbruch des Experiments gekommen.

Die Tiere, denen Empagliflozin oder NaCl im Herzkatheter intravenös appliziert wurde, wogen zwischen 350-410 Gramm.

2.2.3 Experimentaufbau

Es erfolgten zwei getrennte Experimente.

Das „Myokardinfarkt-Modell“ untersuchte echokardiographisch und per invasiver Blutdruckmessung die Wirkung von Empagliflozin bei p.o. Gabe eine Woche nach Myokardinfarktinduktion.

Im „Kontraktilitäts-Modell“ wurden die akuten hämodynamischen Auswirkungen nach iv. Applikation von Empagliflozin während einer Herzkatheter Untersuchung bei gesunden Kontrolltieren beobachtet.

2.2.3.1 Myokardinfarkt-Modell

Die Versuchstiere wurden in folgende Gruppen unterteilt: mit Empagliflozin (1 mg / kg täglich p.o.) (n = 8) oder Vehicle (0,9% NaCl täglich per os) (n = 6) behandelte Myokardinfarkt-Gruppe, mit Vehicle (0,9% NaCl täglich per os) behandelte scheinoperierte Sham Kohorte (n = 7) und mit Empagliflozin (1 mg / kg täglich per os) behandelte Sham Tiere (n = 7).

Zu Beginn wurde bei jedem Tier eine Baseline-Echokardiographie durchgeführt.

Am Tag darauf erfolgte die Induktion des Myokardinfarktes unter Aufsicht von PD Dr. med. Elena Kaschina. Dabei wurde das Versuchstier mit Ketamin und Xylazin (80/12 mg/ml, 0,1 ml pro 100g Körpergewicht interperitoneal; Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) betäubt, intubiert und mithilfe eines Kleintier-Ventilators (Ideal Ventilator, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, U.S.A.) mit Raumluft (Volumen: 3 bis 3,5ml, Beatmungsfrequenz: 75 Zyklen pro Minute) beatmet. Der linke Brustkorb wurde mit einer lateralen Thorakotomie eröffnet, wobei mit einer Pinzette der Interkostalraum zwischen der 4. und 5. Rippe stumpf freipräpariert und durch-

stochen wurde. Die Aufdehnung des Interkostalraums ermöglichte eine freie Sicht auf das schlagende Herz. Im nächsten Schritt wurde das Perikard entfernt, um das Herz durch einen gerichteten Druck auf den Brustkorb außerhalb der Brust zu fixieren. Daraufhin wurde mit einem Faden kurz unterhalb des linken Herzohres eine Ligatur durchgeführt, um so permanent den Blutfluss der linken deszendierenden Koronararterie zu unterbrechen. Das Herz konnte nun zurück in den Brustkorb geleitet und der Interkostalraum durch eine doppelte Naht verschlossen werden. Zuletzt wurden die Muskelschichten zurück an ihren ursprünglichen Ort geschoben und die Haut vernäht (108, 109). Nach geglückter Extubation wurde das operierte Tier für eine Nacht isoliert, bevor am darauffolgenden Tag die Behandlung mit Empagliflozin (1mg / kg / Körpergewicht auf 1ml Flüssigkeit) oder 0,9% NaCl (1ml / kg / Körpergewicht) p.o. begonnen wurde. Die Medikamentengabe wurde täglich für einen Zeitraum von sieben Tagen durchgeführt. Allgemein kam es während der Myokardinfarkt-Induktion zu einer Sterblichkeit von ca. 40%, wobei das größte Problem Arrhythmien darstellten.

Am sechsten Tag erfolgte eine finale Echokardiographie, bevor am siebten Tag die Ratten nach einer invasiven Blutdruckmessung getötet wurden. Blut, Urin und Organe wurden daraufhin für die molekularbiologischen Untersuchungen entnommen.

Ein entscheidender Unterschied unseres Versuches im Vergleich zu anderen Studien war die Höhe der Dosierung. Bei dem Herzinfarkt-Modell verabreichten wir 1mg Empagliflozin pro kg Körpergewicht per Gavage, wohingegen die meisten anderen Studien an Ratten 20-30 mg pro kg Körpergewicht über verschiedene Applikationsformen gegeben haben (81, 92, 95, 110). Eine Ausnahme stellte die Studie von Krasnova et al. dar, die ebenfalls mit 1mg Empagliflozin pro kg Körpergewicht gearbeitet hat. Sie begründeten dies damit, dass 1mg die geringste Dosis sei, die in Ratten zu einer Glykosurie führte (90).

In einer Vorstudie konnte in der Zellkultur gezeigt werden, dass 1µM bis 5µM Empagliflozin auf Kardiomyozyten der Zelllinie H9C2 und Vascular Smooth Muscle Cells eine antiapoptotische Wirkung hatte, wobei eine Dosierung über 10µM proapoptotisch wirkte (Daten nicht gezeigt).

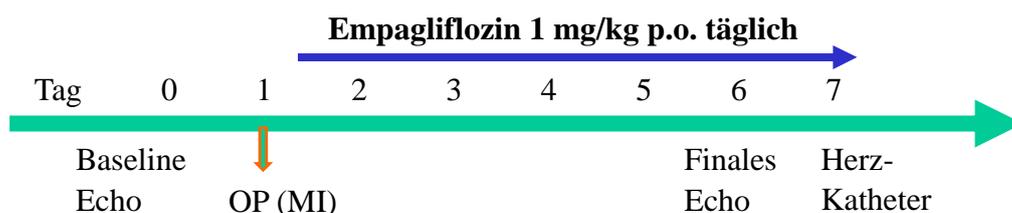


Abbildung 2: Protokoll des Myokardinfarkt-Modells

2.2.3.2 Kontraktilitäts-Modell

Beim Kontraktilitäts-Modell wurde bei gesunden, unbehandelten Ratten mittels Samba-Katheters der ventrikuläre und arterielle Blutdruck ermittelt. Gleichzeitig wurde über die Vena femoralis ein Zugang gelegt, über den intravenös Empagliflozin (1 mg / kg / Körpergewicht) (n = 7) oder NaCl (0,9% 1ml / kg / Körpergewicht) (n = 5) gespritzt wurde.

Die ventrikulären Druckveränderungen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten aufgezeichnet. Im Anschluss erfolgte eine arterielle Blutdruckmessung in der Aorta.

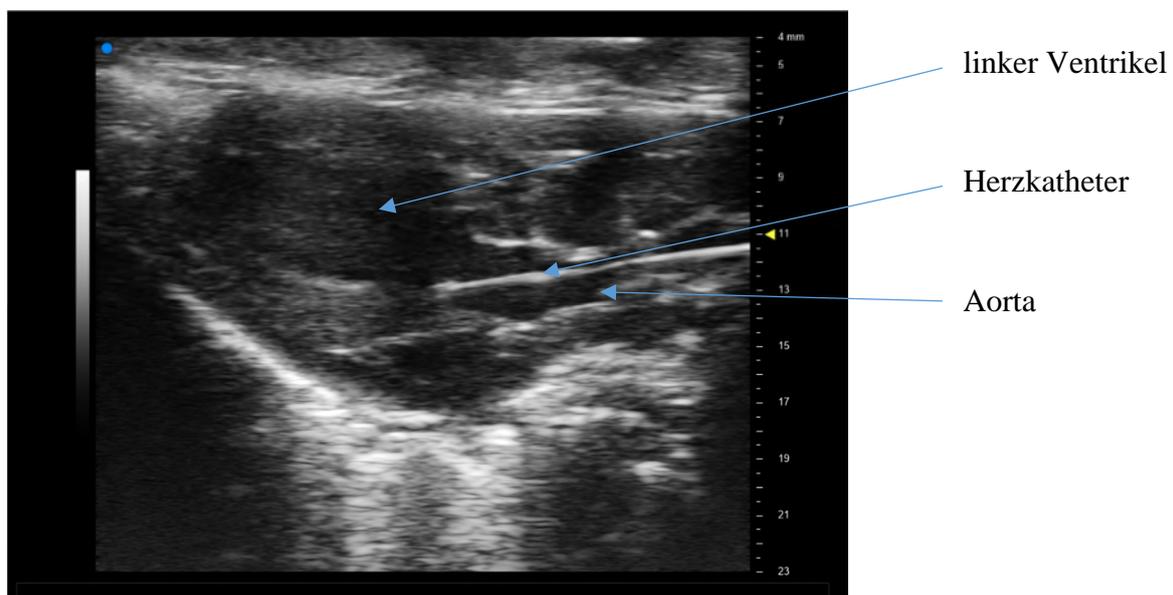


Abbildung 3: Echokardiographie der Parasternale Längsachse, Herzkatheteruntersuchung

2.2.4 Transthorakale Echokardiographie

2.2.4.1 Ablauf einer transthorakalen Echokardiographie

Zur Vorbereitung wurde das Tier in eine Kammer gesetzt, die daraufhin mit 5%igem-Isofluran (AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland) geflutet wurde und so eine initiale Betäubung ermöglichte. Um den anästhesierten Zustand des Tieres während der Echokardiographie aufrecht zu erhalten, wurde die Ratte über eine Nasenmaske mit einem Gemisch aus 0,8 ml/min Sauerstoff und 1,5-2,5% Isofluran per Vevo Anesthesia System (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) beatmet.

Der Tisch wurde auf 37° Grad erhitzt, um so die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten. Weiterhin wurde während der Echokardiographie ein EKG sowie die Herz- und Atemfrequenz abgeleitet. Die Narkose wurde je nach Herzfrequenz angepasst, wobei der Zielbereich bei ca. 400 Schlägen pro Minute lag.

Vor Beginn der Echokardiographie musste die Ratte im Thorax- und Oberbauchbereich rasiert und danach mittels Veet-Creme (Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland) enthaart werden. Nach Auftragen des angewärmten Ultraschallgels (Aquasonic 100, Parker Laboratories Inc., USA) und Einstellen des linear Schallkopfes MX250 in dem dazu verwendeten Stativ (VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) konnte mit der eigentlichen Akquirierung der Aufnahmen begonnen werden. Es wurde hierzu das Vevo 3100 Imaging System (VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) verwendet.

Die erste Einstellung erfolgte in der parasternalen Längsachse, bei dem der linke Ventrikel in seinem maximalen Längenausmaß dargestellt wurde. Hierfür wurde der Tisch um 30-45° Grad nach links und leicht nach oben gekippt. Als Qualitätskriterium für die Bilder galt hier die Einstellung der Aortenklappe und der Herzspitze. Neben der B-Mode Darstellung wurde noch ein M-Mode Bild im Bereich des maximalen Längs- und Querausmaßes gewonnen. An dieser Stelle wurde im nächsten Schritt der Schallkopf um 90 Grad gedreht, um so die Kurzachse zu generieren. Hier befand sich auf 3 und 6 Uhr die Papillarmuskeln. Auch in der Kurzachse wurden B-Mode und M-Mode Bilder aufgenommen. Zuletzt wurde das Tier in die Trendelen-Burg Position gekippt und der Schallkopf in einem spitzen Winkel zum Apex hin orientiert. Ziel war es, den Vier-Kammer-Blick darzustellen, um aus diesem Blickwinkel heraus die Flussgeschwindigkeit durch die Mitralklappe mittels Puls-Wave-Doppler bestimmen zu können (109, 111).

2.2.4.2 Auswertung einer transthorakalen Echokardiographie

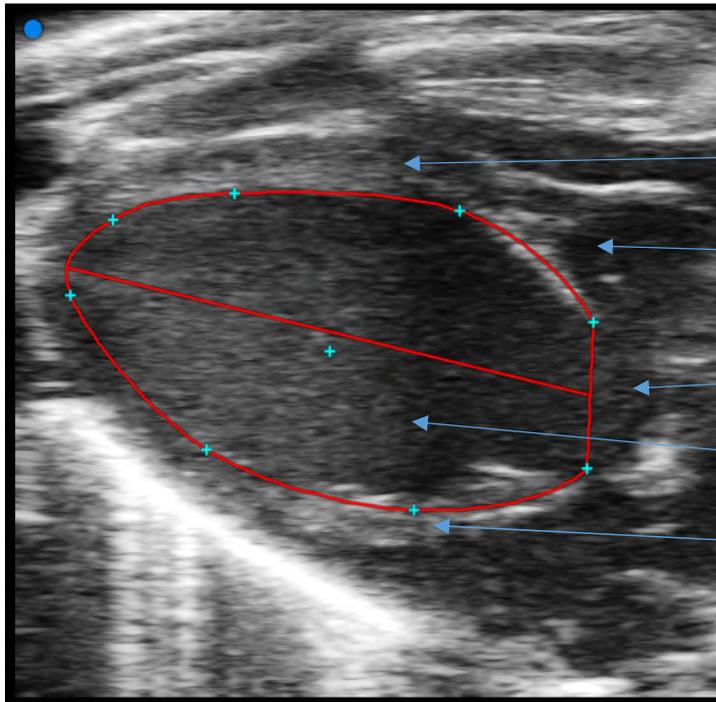
Die Auswertung der erhobenen Echokardiographie-Daten erfolgte mit dem Programm Vevo Lab (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada). Während der Echokardiographie wurden in jedem Modus mindestens drei Bilder aufgenommen. Für jeden Modus wurde ein Bild ausgewertet, wobei jeweils 3 Auswertungen erfolgten, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde.

Aus dem B-Modus der Längsachse des Herzens wurde die Ejektionsfraktion mittels eines LV-Traces bestimmt. Dabei wurden manuell die Endokardgrenzen in der maximalen Diastole und Systole mittels Punkte markiert. Das Vevo Lab berechnete daraus unter anderem die Ejektionsfraktion, das Fractional Shortening, das Schlagvolumen und den Cardiac Output. Tiere mit einer Ejektionsfraktion unter 35% sollten von dem Experiment ausgeschlossen werden ($n = 0$).

Im M-Mode wurde mit der Einstellung „LV Trace“ die Endo- und Epikardgrenzen manuell in drei aufeinander folgende Herzzyklen markiert. Wichtig bei der Auswahl der Herzzyklen war, dass der größtmögliche Querschnitt des linken Ventrikels getroffen wurde und die Ableitung genau mittig erfolgte, um den maximalen endsystolischen und enddiastolischen Diameter zu erhalten.

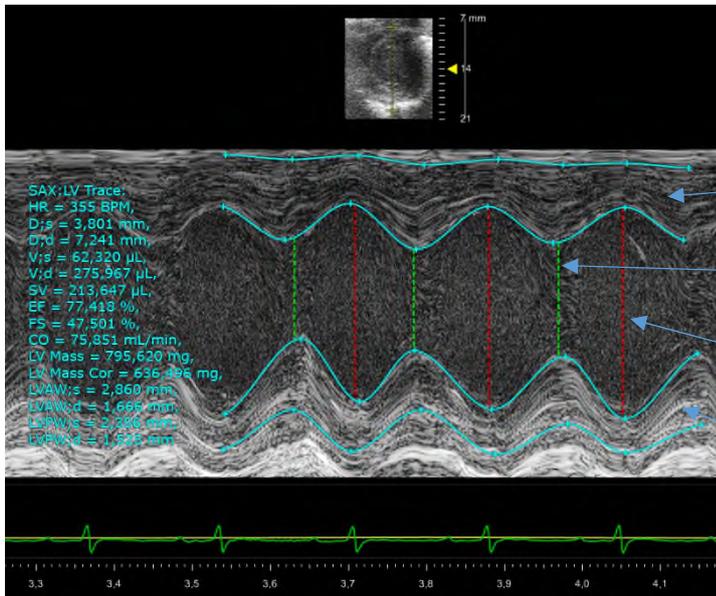
Der Globale Longitudinal Strain beschreibt die Verformung des Myokards während einer Kontraktion in der Längsrichtung und besitzt einen höheren prognostischen Wert für die Vorhersage verschiedener kardialer Erkrankungen als die Ejektionsfraktion (112, 113). Er wurde aus der Längsachse abgeleitet, indem die Endo- und Epikardgrenzen mittels Vevo Strain getraced wurden.

Die diastolische Funktion des Herzens wurde mittels der aus den 4 Kammerblicken erhaltenen Dopplerableitungen bestimmt. Dabei wurde mit Hilfe des Puls-Wave-Dopplers die Flussgeschwindigkeit über der Mitralklappe gemessen. Das entstehende klassische 2-gipflige Bild konnte dann manuell mit Vevo Lab ausgewertet werden. Hier wurde die frühe diastolische Füllungsphase bzw. E-Welle und die späte diastolische Füllungsphase bzw. A-Welle ausgemessen (114). Weiterhin wurde noch die isovolumetrische Relaxations- und Kontraktionszeit bestimmt, die jedoch zur Bewertung der Parameter in Bezug zur Herzfrequenz gesetzt werden musste.



- Septale Ventrikelwand
- rechtsventrikulärer Ausflusstrakt
- Aortenwurzel mit Aortenklappe
- Linker Ventrikel
- Posteriore Ventrikelwand

Abbildung 4: Echokardiographie der parasternalen Längsachse, LV Tracing



- Interventrikuläres Septum
- Linksventrikulärer systolischer Diameter
- Linksventrikulärer diastolischer Diameter
- Posteriore Ventrikelwand

Abbildung 5: M-Mode der parasternalen Kurzachse

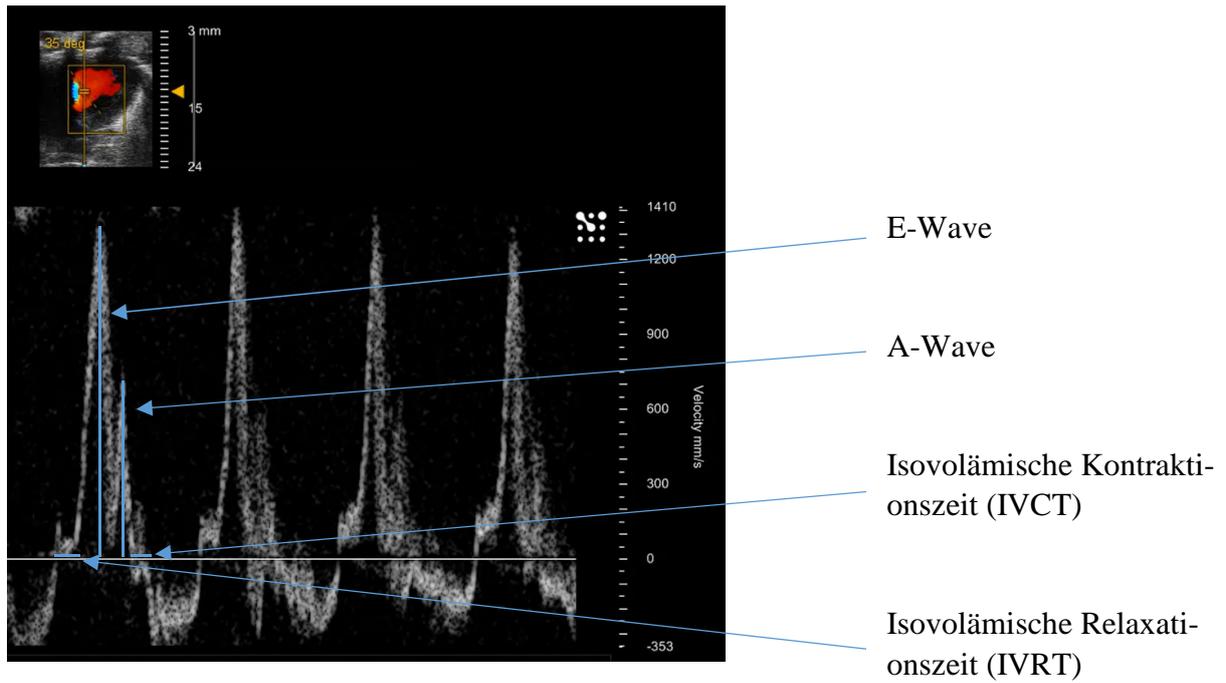


Abbildung 6: 4 Kammerblick, Messung der Flussgeschwindigkeit über der Mitralklappe mittels Puls-Wave-Doppler



Abbildung 7: Vevo Strain, Erhebung des Global Longitudinal Strain aus der parasternalen Längsachse

2.2.5 Invasive Blutdruckmessung

2.2.5.1 Ablauf der invasiven Blutdruckmessung

Für die Erhebung der invasive Blutdruckmessung wurde ein faseroptischer Samba-Katheter (Samba Sensors, Västra Frölunda, Sweden) verwendet, der über ein PowerLab 4/20 Modul (ADInstruments, Oxford, Großbritannien) mit einem Computer verbunden wurde. Zur Aufnahme und später auch Auswertung der Daten wurde die „Chart 5“ Software (ADInstruments, Oxford, Großbritannien) benutzt. Vor Einsatz des Samba-Katheters musste ein 0 Abgleich in einer mit Wasser gefüllten Spritze vorgenommen werden.

Das ganze Experiment wurde unter einer 3%igen Isofluran-Narkose durchgeführt. Die Tiere wurden mit Metamizol analgesiert (i.p. 50mg/kg). Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose lief wie bei der transthorakialen Echokardiographie ab.

Die invasive Blutdruckmessung wurde unter Superversion von PD Dr. med. Elena Kaschina durchgeführt. Zu Beginn der Operation wurde im Halsbereich der Ratte ein Längsschnitt eröffnet. Daraufhin wurden rechtsseitig stumpf Muskelschichten gelöst und sich vorsichtig bis zum Erreichen eines großen Gefäßbündels voroperiert. Bei dem Gefäßbündel handelte es sich um die Arteria carotis communis, die Vena jugularis interna und den Nervus vagus, welche im nächsten Schritt voneinander getrennt werden mussten.

War eine Trennung gelungen, so wurde unter die Arteria carotis eine Pinzette gelegt, um eine leichte Spannung aufzubauen und drei Fäden um die Arterie zu legen. Einer der Fäden verschloss das Gefäß im oberen Halsbereich. Die anderen Fäden lagen mit einer lockeren Schleife im unteren Bereich des OP-Feldes um das Gefäß. Sollte es zu unvorhergesehenen Blutungen kommen, konnte dieses so schnell geschlossen werden.

Mithilfe einer Mikroschere wurde die Arteria carotis eröffnet, ohne diese jedoch komplett durchzuschneiden. Nun wurde der Katheter mittels einer Mikropinzette in das Gefäß eingeführt und langsam vorgeschoben, bis es zu einer stabilen ersten Blutdruckmessung innerhalb der Aorta kam, die als Ausgangswert diente.

War dies geschehen, wurde der Katheter weiter bis vor die Aortenklappe bewegt, wobei es teilweise schwierig war, diese zu passieren. Befand man sich im Ventrikel, so kam es zu einer Veränderung der Blutdruckkurve, wobei Artefakte, die durch die Berührung der Katheterspitze an der Ventrikelwand entstanden, vermieden werden mussten (108, 109, 111).

Bei dem Myokardinfarkt-Modell wurde nach Aufnahme der arteriellen und ventrikulären Blutdruckdaten das Experiment beendet und das Tier mittels Herzstich entblutet. Es erfolgte im Anschluss die Organ-, Blut- und Urinentnahme.

Bei dem Kontraktilitäts-Modell wurde zusätzlich vor dem Einführen des Samba-Katheters am Hinterbein des Tieres die Vena femoralis freipräpariert und mit einem durchgespülten Butterfly vorsichtig ein Zugang gelegt. Nun erfolgte, wie oben beschrieben, die Anlage des Samba-Katheters. In dem Moment, in dem sich der Katheter im Ventrikel befand, wurde über den venösen Zugang entweder Empagliflozin (1 mg / kg / Körpergewicht) oder in der Vergleichsgruppe 0,9%iges NaCl basierend auf dem Körpergewicht (0,1ml pro 100g/ Körpergewicht) gespritzt. Der Samba-Katheter verblieb danach noch 30 Minuten im Ventrikel des Tieres und zeichnete die hämodynamischen Veränderungen auf. Danach wurde der Katheter in die Aorta zurückgezogen, um dort noch einmal den arteriellen Blutdruck zu erheben, bevor das Experiment endete (109).

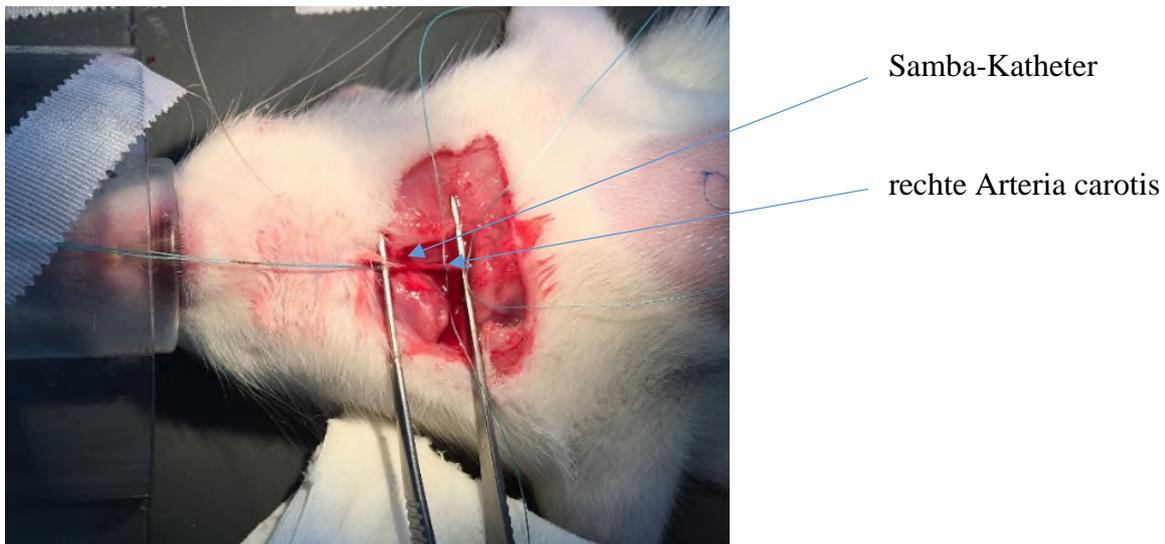


Abbildung 8: Operationsfeld bei der Herzkatheteruntersuchung

2.2.5.2 Auswertung der invasiven Blutdruckmessung

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm „Chart 5“ (ADInstruments, Oxford, Großbritannien) verwendet. Es wurden alle Blutdruckamplituden, die sich innerhalb von mindestens 3 Atemzyklen befanden, genutzt.

Die Analyse der Stiffness-Parameter erfolgte durch manuelle Bestimmung der arteriellen Werte. Es wurden jeweils drei aufeinanderfolgende Blutdruckamplituden ausgewertet. Dabei wurden die folgenden Parameter bestimmt:

Die höchste Spitze innerhalb der Blutdruckwelle stellt bei gesunden jungen Patienten den systolischen Peak Druck dar (P2), während der tiefste Punkt innerhalb der Kurve der diastolischen Peak Druck (Tf) ist (115). Der Punkt, an dem sich die einfallende Druckwelle und die von den Gefäßen reflektierte Druckwelle treffen, heißt „Incident“-Point (P1) und ist von der Gefäßelastizität abhängig (115). Die Zeit bis zum Erreichen des Incident Point wird Incident Time (IT) oder „Time to reflection“ genannt. Der diastolische minimale Druck wird als Tf bezeichnet. Der Puls Druck (PP) stellt die Differenz zwischen dem diastolischen und systolischen Peak Druck da, während sich der Augmentation Druck (ΔP) aus der Differenz zwischen systolischem Druck und dem Incident Point berechnet (115). Weiterhin beschreibt der Augmentation-Index, das Verhältnis zwischen dem Augmentation Druck zu dem Puls Druck (109, 115).

PP	Differenz zwischen P2 und Tf
ΔP	Differenz zwischen P2 und P1
Stiffness Index	$(\Delta P/PP):100$

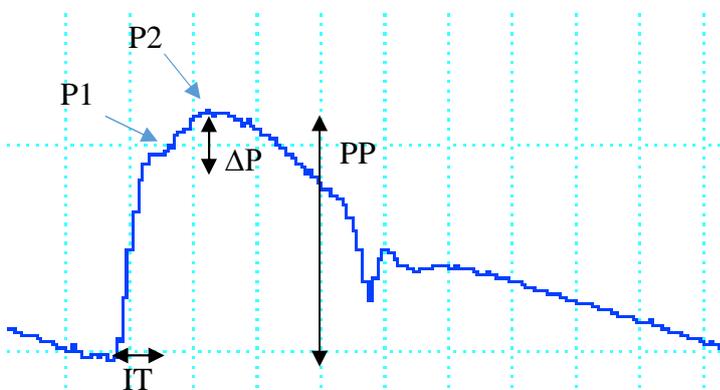


Abbildung 9: Blutdruckkurve in der Aorta, Stiffness-Parameter

2.2.6 Molekular biologische Methoden

Die molekular biologischen Daten wurden in Kooperation mit Manuela Sommerfeld erhoben.

2.2.6.1 Western Blot

Die Gewebe wurden direkt nach dem Tod der Versuchstiere mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -82 Grad gelagert. Nach einem Auftauprozess wurden die Proteine aus dem linken Ventrikel extrahiert. Hierfür wurde der Homogenisierungspuffer, RIPA, verwendet und im Anschluss die Zellen lysiert. Der nach Zentrifugieren gewonnene Überstand wurde daraufhin mittels BCA (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, U.S.A.) auf seine Proteinkonzentration untersucht. Je nach Proteinkonzentration der einzelnen Proben mussten diese noch mit RIPA-Puffer verdünnt werden, um eine gleichmäßige Konzentration in allen Proben zu gewährleisten.

Für die Western Blot Gele wurden 10% Trenngel verwendet und die Proteine bei 120 V über eine Stunde aufgetrennt. Pro Gel wurden jeweils 3 Tiere aus jeder Kohorte dargestellt. Die Übertragung der Proteinbanden von dem Western Blot Gel auf die Amersham Hybond PVDF Membran (GE Healthcare, Chicago, Illinois, U.S.A.) geschah im Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, U.S.A.) bei 100 V und einer Stunde Laufzeit. Die Membranen wurden daraufhin mit Milchpulver geblockt und mit einem primären Antikörper über Nacht bei 4 Grad inkubiert. Folgende primären Antikörper wurden verwendet: NCX1, NBC1, NHE1, SERCA2a, MMP-9, TIMP-1, TGF- β 1, Smad2, MLKL und Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH).

Im letzten Schritt wurden die sekundären Antikörper (Anti-Rabbit Immunoglobulins / HRP, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) dazugegeben und der Western Blot mit einer CURIX 60 Entwicklungsmaschine (Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien) abgelichtet. Als Hauskeeper diente die Proteinexpression der GAPDH (Abcam, Hiddenhausen, Deutschland). Die immunreaktiven Banden wurden mittels ImageJ Software (Wayne Rasband, U. S. National Institutes of Health, Maryland, USA) ausgewertet und zur genauen Proteinbestimmung im Verhältnis zu GAPDH gesetzt.

2.2.6.2 Immunhistologie

Zum Vorbereiten der histologischen Schnitte wurden die entnommenen Herzen in Paraffin eingebettet. Das Gewebe wurde dafür in Formalin eingelegt und daraufhin in einer aufsteigenden Ethanol Reihe entwässert. Zum Fixieren wurde Aceton verwendet und im nächsten Schritt der linke Ventrikel in Paraffin (Richard-Allan Scientific / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, U.S.A) eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden nun mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (MICROM HM 325, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, U.S.A.) geschnitten (5µm) und auf Glasträger gelegt.

Für die Immunhistologie mussten die Schnitte nun entparaffinisiert werden, indem sie in einer absteigenden Ethanol Reihe gelöst wurden. Danach musste das Gewebe mittels eines Citratpuffers, einer H₂O₂-Methanol-Lösung und einem Blocking Serum behandelt werden, bevor der erste Antikörper auf den Schnitt gegeben werden konnte. Zur Kontrolle inkubierte man zusätzlich einen Schnitt, der lediglich mit PBS behandelt worden war. Nach mehrfachem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotin, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark). In der Immunhistologie wurden vor allem die Expression von MMP9 (Abcam, Hiddenhausen, Deutschland) und NHE 1 (Abbiotec, San Diego, U.S.A.) im Myokard des linken Ventrikels untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels eines Biorevo Bz 9000 Fluorescence Mikroskops (KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) (109, 111).

2.2.6.3 Glucosebestimmung im Serum und im Urin

Nach Ende des Myokardinfarkt-Experimentes wurde die Harnblase punktiert und der Urin aufgefangen. Das Blut der Versuchstiere wurde in Heparin-Monovetten gesammelt, über Nacht gekühlt stehen gelassen und am Tag darauf das Plasma abpipettiert. Der Urin und das Plasma wurden bei -82 Grad gelagert.

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte mit Hilfe des GOD FS Kits (Diagnostic System GmbH, Holzheim, Deutschland). Dabei wurden die Serum- bzw. Urinproben nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet, in eine 96 Well Platte (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, U.S.A.) umgefüllt und photometrisch (Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, U.S.A.) untersucht.

2.2.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Californien, USA). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert und Standardabweichung (mean \pm SD) dargestellt. Eine Signifikanz lag bei einem p-Wert von <0.05 vor.

Mehrere Kohorten wurden untereinander mit einem two-way Analysis of Variance (ANOVA) Test und einer Bonferroni-Korrektur verglichen. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurden unpaarige two tailed t-Tests verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Häodynamische Evaluation eine Woche nach Myokardinfarkt

3.1.1 Echokardiographische Evaluation der kardialen Leistung

Vergleicht man die Sham-operierten Tiere mit der Myokardinfarkt Kohorte fällt eine signifikante Reduktion des Global Longitudinal Strains (MI $-16,64 \pm 1,61\%$ vs Sham $-24,07 \pm 2,82\%$, $p < 0,01$) und eine Verringerung der Ejektionsfraktion (MI $53,02 \pm 2,72\%$ vs Sham $59,85 \pm 7,26\%$) auf.

Ebenfalls kam es zu einer tendenziellen Verlängerung der isovolämischen Relaxationszeit (MI $0,05715 \pm 0,00841\text{mm/s}$ vs Sham $0,05120 \pm 0,00743\text{mm/s}$), während die isolovämische Kontraktionszeit (MI $0,04616 \pm 0,00893\text{mm/s}$ vs Sham $0,04754 \pm 0,01319\text{mm/s}$) und der E/A Ratio (MI $1,84 \pm 0,31$ vs Sham $1,71 \pm 0,24$) unverändert blieben.

Die mit Empagliflozin behandelte Kohorte hatte 6 Tage nach Myokardinfarkt-Induktion eine erhaltene Global Longitudinal Strain (MI + Empa $-20,99 \pm 3,21\%$ vs MI $-16,64 \pm 1,61\%$, $p < 0,05$), während die Ejektionsfraktion nur tendenzielle verbessert war (MI+ Empa $58,07 \pm 5,11\%$ vs MI $53,02 \pm 2,72\%$). Insgesamt kam es weiterhin zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den mit Empagliflozin behandelten und unbehandelten Myokardinfarkttieren. Neben den systolischen Parametern, gab es bei erhaltenem E/A Ratio (MI + Empa $1,69 \pm 0,25$ vs MI $1,84 \pm 0,31$) und normaler isovolämischen Relaxationszeit (MI + Empa $0,04585 \pm 0,00810\text{mm/s}$ vs MI $0,05715 \pm 0,00841\text{mm/s}$), kein Anzeichen für eine diastolische Dysfunktion.

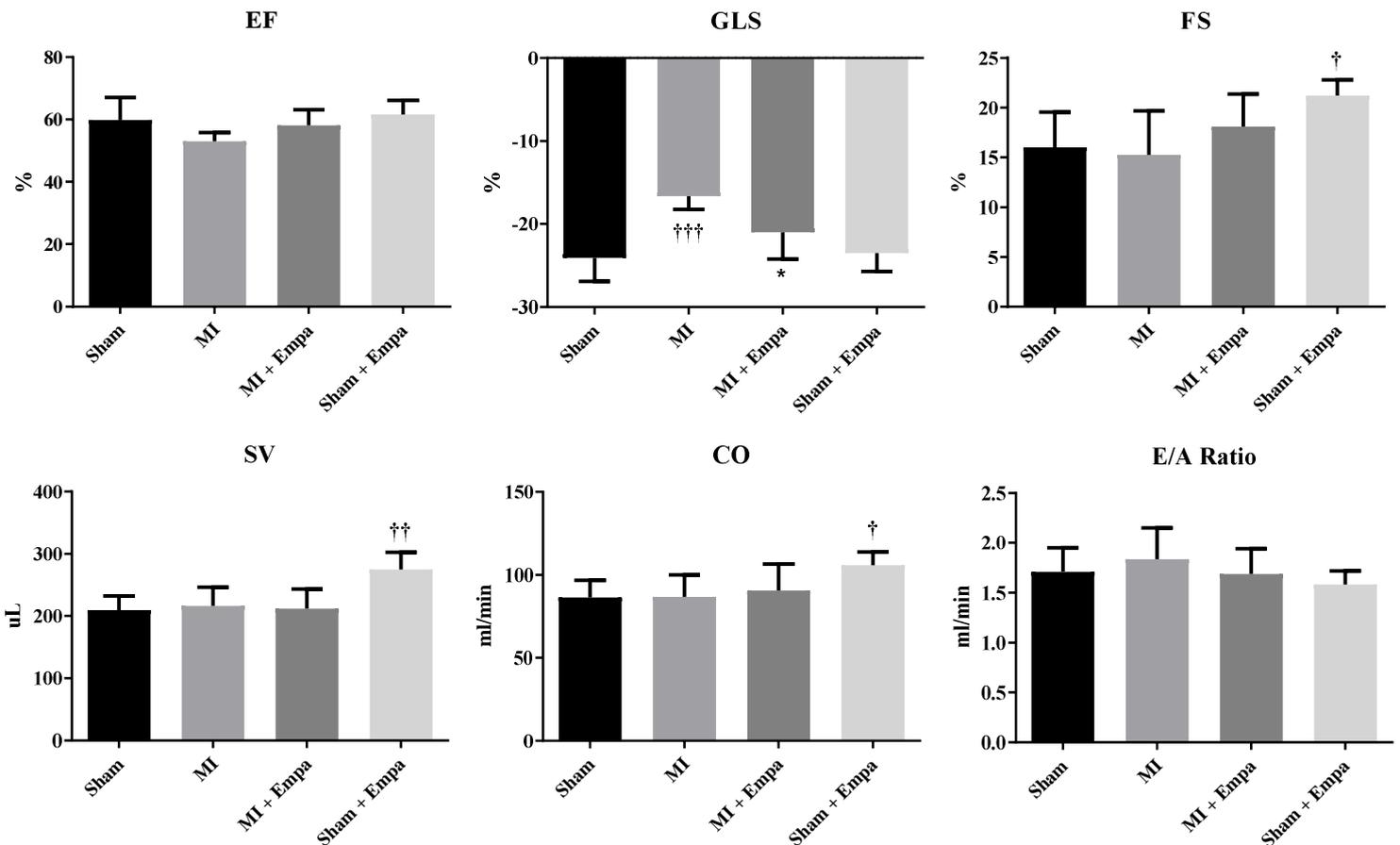
In der mit Empagliflozin behandelte Sham Gruppe zeigte sich im Gegensatz zu den Vehicle Tieren eine signifikante Erhöhung des Schlagvolumens (Sham $209,51 \pm 22,77\text{uL}$ vs Sham + Empa $274,78 \pm 27,57\text{uL}$, $p < 0,01$), des Cardiac Outputs (Sham $86,48 \pm 10,16\text{ mL/min}$ vs Sham + Empa $105,82 \pm 7,9\text{mL/min}$, $p < 0,05$) und des Fractional Shortening (Sham $16,01 \pm 3,54\%$ vs Sham + Empa $21,21 \pm 1,58\%$, $p < 0,05$). All diese Parameter stehen für eine erhöhte systolische Kontraktilität. Es konnte jedoch auch in dieser Gruppe keiner Änderung der diastolischen Funktion gezeigt werden.

Die aus dem M-Mode entnommene Herzrate zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

	Sham	Sham + Empa	MI	MI + Empa
Herzrate (bpm)	412,97 ± 21,43	386,04 ± 13,58	400,50 ± 19,08	426,25 ± 33,90
EF (%)	59,85 ± 7,26	61,58 ± 4,52	53,02 ± 2,72	58,07 ± 5,11
GLS (%)	-24,07 ± 2,82	-23,49 ± 2,21	-16,64 ± 1,61†††	-20,99 ± 3,21*
FS (%)	16,01 ± 3,54	21,21 ± 1,58†	15,25 ± 4,42	18,12 ± 3,24
SV (uL)	209,51 ± 22,77	274,78 ± 27,57††	216,38 ± 30,23	211,74 ± 31,55
CO (ml/min)	86,48 ± 10,16	105,82 ± 7,94†	86,77 ± 13,26	90,57 ± 15,98
LVIDd (mm)	6,59 ± 0,33	7,25 ± 0,18	6,94 ± 0,55	6,92 ± 0,57
LVIDs (mm)	3,77 ± 0,58	3,84 ± 0,64	3,63 ± 0,67	3,71 ± 0,94
E/A Ratio	1,71 ± 0,24	1,58 ± 0,14	1,84 ± 0,31	1,69 ± 0,25
IVRT (mm/s)	0,05120 ± 0,00743	0,05123 ± 0,00508	0,05715 ± 0,00841	0,04585 ± 0,00810
IVCT (mm/s)	0,04754 ± 0,01319	0,04417 ± 0,01057	0,04616 ± 0,00893	0,03804 ± 0,00965

Tabelle 1: Echokardiographische Auswertung 7 Tage nach Myokardinfarkt

* $p < 0,05$ vs MI, † $p < 0,05$ vs Sham, †† $p < 0,01$ vs Sham, ††† $p < 0,001$ vs Sham



Grafik 1: Echokardiographische Parameter 7 Tage nach Myokardinfarkt

Ejektionsfraktion (EF), Global Longitudinal Strain (GLS), Fractional Shortening (FS), Schlagvolumen (SV), Cardiac Output (CO), E/A Ratio

* $p < 0,05$ vs MI, † $p < 0,05$ vs Sham, †† $p < 0,01$ vs Sham, ††† $p < 0,001$ vs Sham

3.1.2 Auswertung der Herzkatheter-Messung und Bestimmung der Gefäßelastizität nach Myokardinfarkt

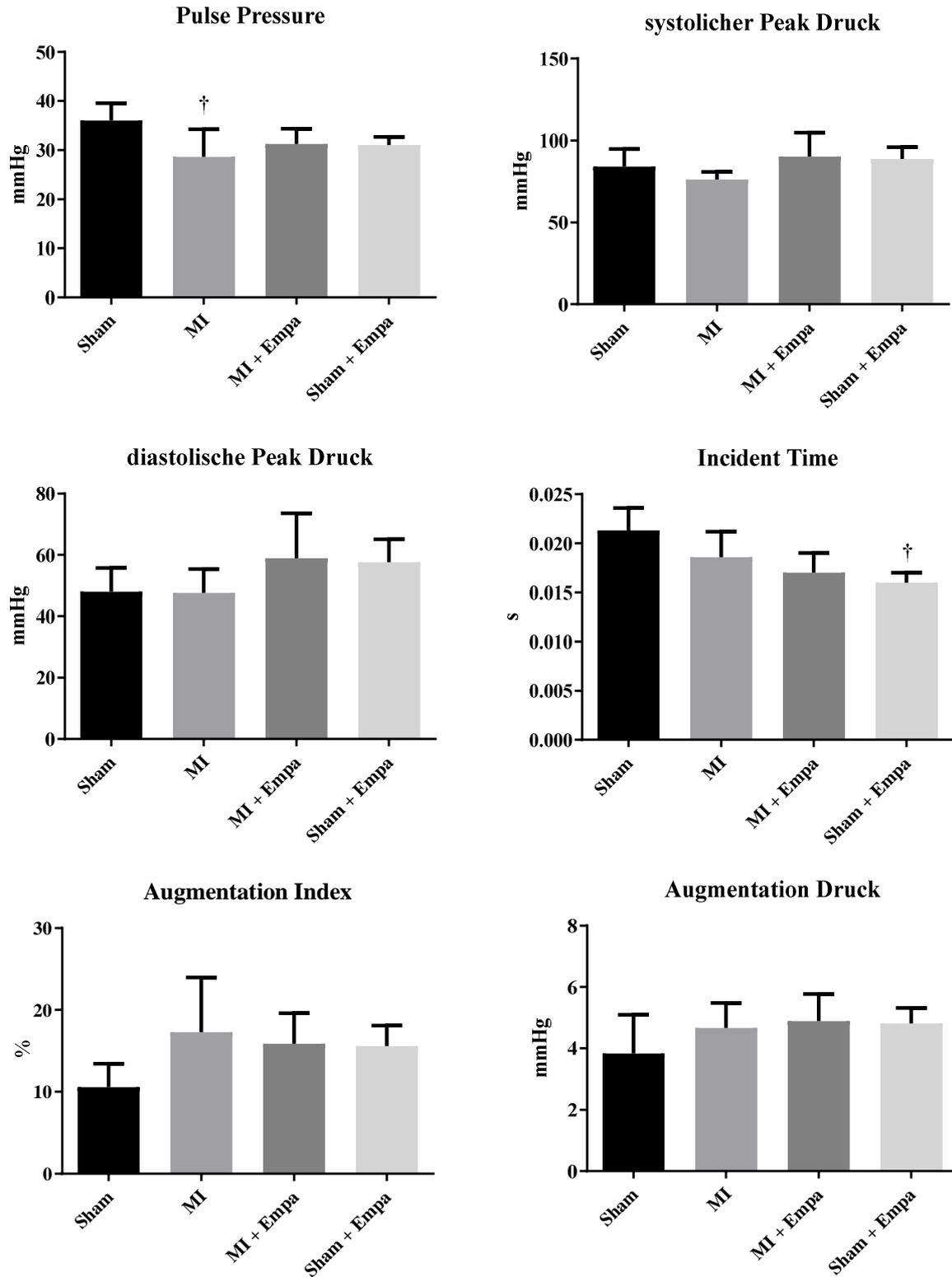
7 Tage nach Myokardinfarkt kam es im Herzkatheter zu einem Anstieg des minimalen intraventrikulären Drucks (MI $2,55 \pm 5,83$ mmHg vs Sham $-0,453 \pm 4,23$ mmHg) und einem leichten Abfall des intraventrikulären systolischen Drucks (MI $77,30 \pm 8,09$ mmHg vs Sham $85,81 \pm 8,81$ mmHg). Auch der max dp/dt (MI $4933,88 \pm 1496,27$ mmHg/s vs Sham $5880,48 \pm 1573,00$ mmHg/s), der min dp/dt (MI -4907 ± 1581 mmHg/s vs Sham -5247 ± 1032 mmHg/s) und der enddiastolische Druck (MI $11,52 \pm 4,77$ mmHg vs Sham $9,28 \pm 4,21$ mmHg) war nach Myokardinfarkt leicht eingeschränkt. Eine Behandlung mit Empagliflozin hatte jedoch weder in der Myokardinfarkt-Kohorte noch in der behandelten Sham-Gruppe Auswirkungen auf diese Parameter.

Eine Woche nach Empagliflozin-Gabe zeigten sich kaum Veränderung innerhalb der Gefäßelastizität. Während der Messung innerhalb der Aorta fielen ein verringerter Pulse Pressure zwischen den Myokardinfarkt-Tieren und der Sham Kohorte auf (MI $29,2 \pm 4,47$ mmHg vs Sham $36,0 \pm 3,55$ mmHg, $p < 0,05$). Die Vehicle behandelte Sham Kohorte hatte im Vergleich zu den Empagliflozin behandelten Sham- und Myokardinfarkt Tieren eine verlängerte „Time to reflection“ (Sham $0,0213 \pm 0,0023$ s vs Sham + Empa $0,016 \pm 0,001$ s, $p < 0,05$). Der systolische maximale Druck war bei den mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkt Tieren im Vergleich zu der Vehicle behandelten Myokardinfarkt Gruppe unverändert, wobei der diastolische minimale Druck bei Empagliflozin-Gabe tendenziell leicht erhöht (MI + Empa $58,89 \pm 14,69$ mmHg vs MI $47,07 \pm 6,80$ mmHg), jedoch nicht signifikant verändert war. Der Augmentation Index blieb unbeeinflusst.

	Sham	Sham + Empa	MI	MI + Empa
Herzrate (bpm)	$330,49 \pm 12,01$	$340,20 \pm 26,32$	$360,37 \pm 11,43$	$337,92 \pm 9,86$
max Pressure (mmHg)	$85,81 \pm 8,81$	$83,06 \pm 7,92$	$77,30 \pm 8,09$	$78,51 \pm 7,89$
min Pressure (mmHg)	$-0,453 \pm 4,23$	$-0,937 \pm 2,63$	$2,55 \pm 5,83$	$3,07 \pm 7,35$
EDP (mmHg)	$9,28 \pm 4,21$	$5,36 \pm 3,47$	$11,52 \pm 4,77$	$11,99 \pm 6,70$
max dP/dt (mmHg/s)	5880 ± 1573	5992 ± 942	4934 ± 1496	4877 ± 758
min dP/dt (mmHg/s)	-5247 ± 1032	-5801 ± 599	-4907 ± 1581	-4741 ± 860
TAU (s)	$0,0148 \pm 0,0047$	$0,0133 \pm 0,0025$	$0,0117 \pm 0,0038$	$0,0139 \pm 0,0014$

Tabelle 2: Auswertung der intrakardialen Drücke 7 Tage nach Myokardinfarktinduktion

maximaler intrakardialer Druck (max Pressure), minimaler intrakardialer Druck (min Pressure), Enddiastolischer Druck (EDP), Maximum der intraventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit (max dp/dt), Minimum der intraventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit (min dp/dt), Zeitkonstante der aktiven Relaxation (TAU)



Grafik 2: Stiffness-Parameter 7 Tage nach Myokardinfarkt

[†] $p < 0,05$ vs Sham

3.2 Akute hämodynamische Reaktion bei iv-Applikation von Empagliflozin

3.2.1 Ventrikuläre Messung der Drücke im Herzen nach Empagliflozin-Gabe

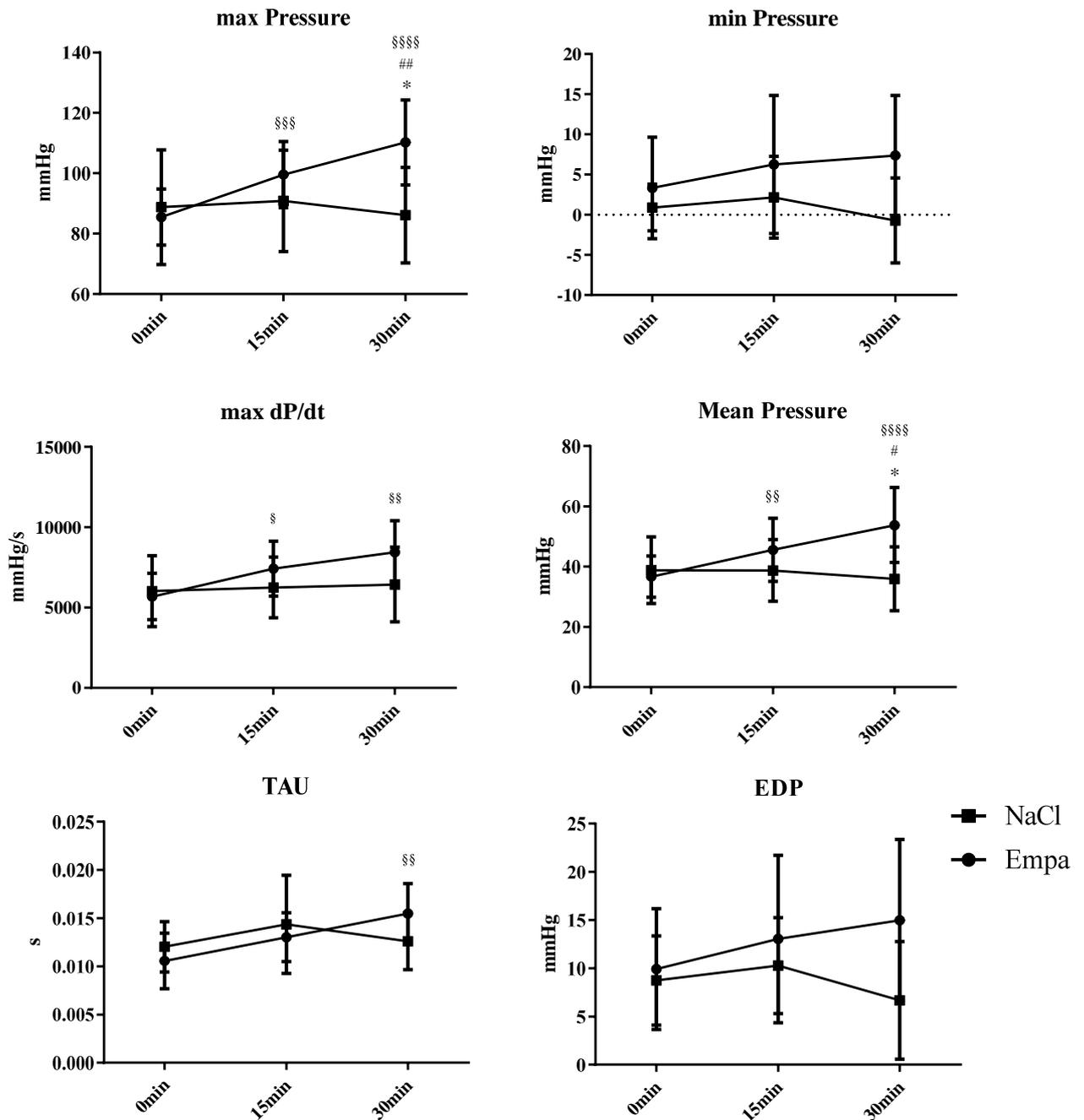
Eine halbe Stunde nach iv-Applikation von Empagliflozin kam es im linken Ventrikel zu einem signifikanten Anstieg des maximalen intrakardialen Drucks (30min Empa $110,20 \pm 14,11$ mmHg vs 30min NaCl $86,14 \pm 15,84$ mmHg, $p < 0,05$) und des mittleren intrakardialen Drucks (30min Empa $53,79 \pm 12,45$ mmHg vs 30min NaCl $35,96 \pm 10,62$ mmHg, $p < 0,05$) im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe. Es gab keine Unterschiede bei den vor NaCl bzw. Empagliflozin-Applikation gemessenen intraventrikulär Ausgangswerten (0min).

Weiterhin stieg in der Empagliflozin-Gruppe das Maximum der intraventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit, max dP/dt (0min Empa $5685,57 \pm 1444,27$ mmHg/s vs 30min Empa $8445,968 \pm 1964,483$ mmHg/s, $p < 0,01$), und die Zeitkonstante der aktiven Relaxation, Tau (0min Empa $0,01056 \pm 0,00289$ s vs 30min Empa $0,01549 \pm 0,00311$ s, $p < 0,01$), vom Ausgangswert zu 30 Minuten nach Gabe signifikant an.

Die für die diastolische Funktion entscheidenden Parameter veränderten sich nur geringfügig. Dabei sank das Minimum der intraventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit, min dp/dt (0min Empa $-5608,33 \pm 1002,59$ mmHg/s vs 30min Empa $-6655,27 \pm 1956,73$ mmHg/s), eher ab, im Gegensatz dazu stieg der enddiastolische Druck (0min Empa $9,93 \pm 6,26$ mmHg vs 30min Empa $14,99 \pm 8,37$ mmHg) und der minimale intrakardialer Druck (0min Empa $3,34 \pm 6,32$ mmHg vs 30min Empa $7,39 \pm 7,47$ mmHg) innerhalb der 30 Minuten tendenziell an.

Bei mit NaCl behandelten Ratten kam es zu keinen Veränderungen der intrakardialen Werte. Auch gab es in keiner der Gruppen Veränderung in der Systolen- oder Diastolen Länge. Die Herzrate fiel in beiden Gruppen über den Zeitraum von 30 Minuten leicht ab (0min Empa 330 ± 28 bpm vs 30min Empa 321 ± 26 bpm; 0min NaCl 347 ± 51 bpm vs 30min NaCl 329 ± 40 bpm).

Insgesamt zeigte sich ein akuter inotroper Effekt von Empagliflozin bei gesunden Versuchstieren, der mit einem Anstieg der intrakardialen Drücke einherging. Es konnte jedoch keine signifikante Auswirkung auf die diastolische Herzfunktion beobachtet werden.



Grafik 3: Intrakardiale Druckmessung nach Applikation von Empagliflozin ● oder NaCl ■ maximaler intrakardialer Druck (max Pressure), minimaler intrakardialer Druck (min Pressure), Maximum der intraventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit (max dp/dt), mittleren intrakardialen Druck (Mean Pressure), Zeitkonstante der aktiven Relaxation (TAU), Enddiastolischen Druck (EDP)

*p < 0,05 Empa 30 min vs. NaCl 30min, # p < 0,05 Empa 30min vs 15 min Empa, ## p < 0,01 Empa 30min vs 15min Empa, § p < 0,05 Empa 15min vs 0min Empa, §§ p < 0,01 Empa 30min vs 0min Empa, §§§ p < 0,001 15min Empa vs 0min Empa, §§§§ p < 0,0001 30min Empa vs 0min Empa

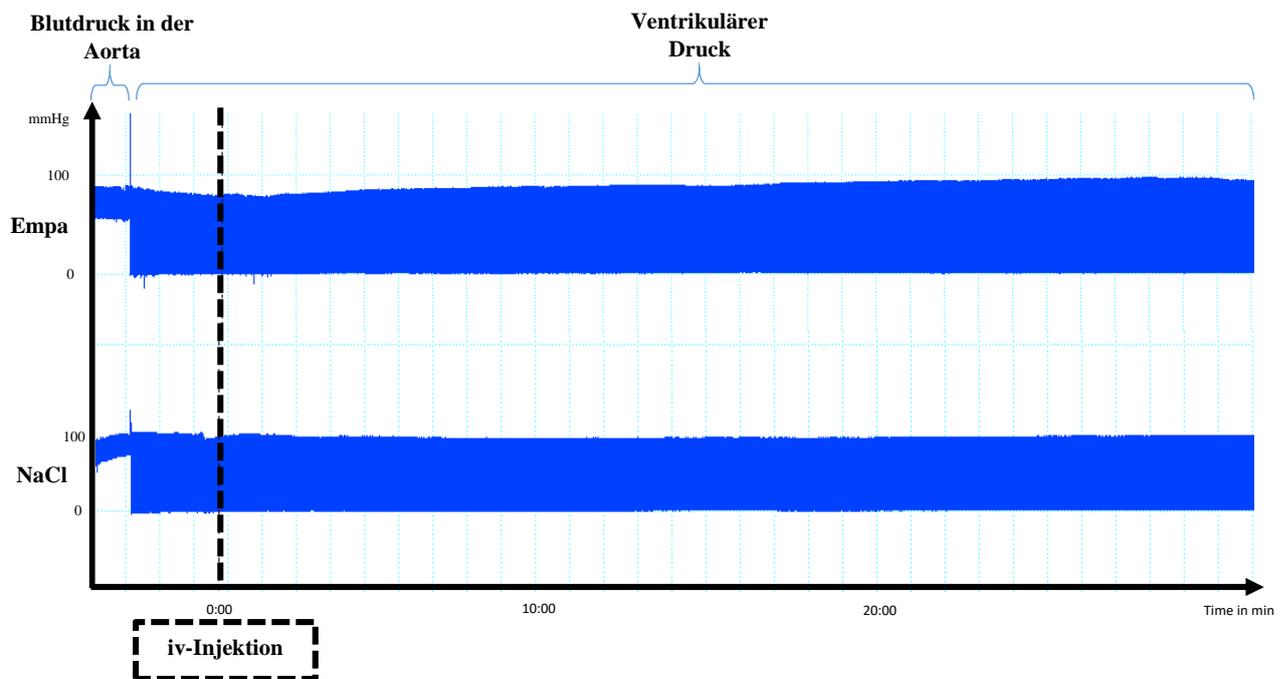


Abbildung 10: Intraaortale und ventrikuläre Drücke nach iv-Applikation von Empagliflozin (Empa) oder NaCl im Herzkatheter

3.2.2 Messung der Druckdifferenzen in der Aorta und Evaluation der Gefäßelastizität nach Empagliflozin-Gabe

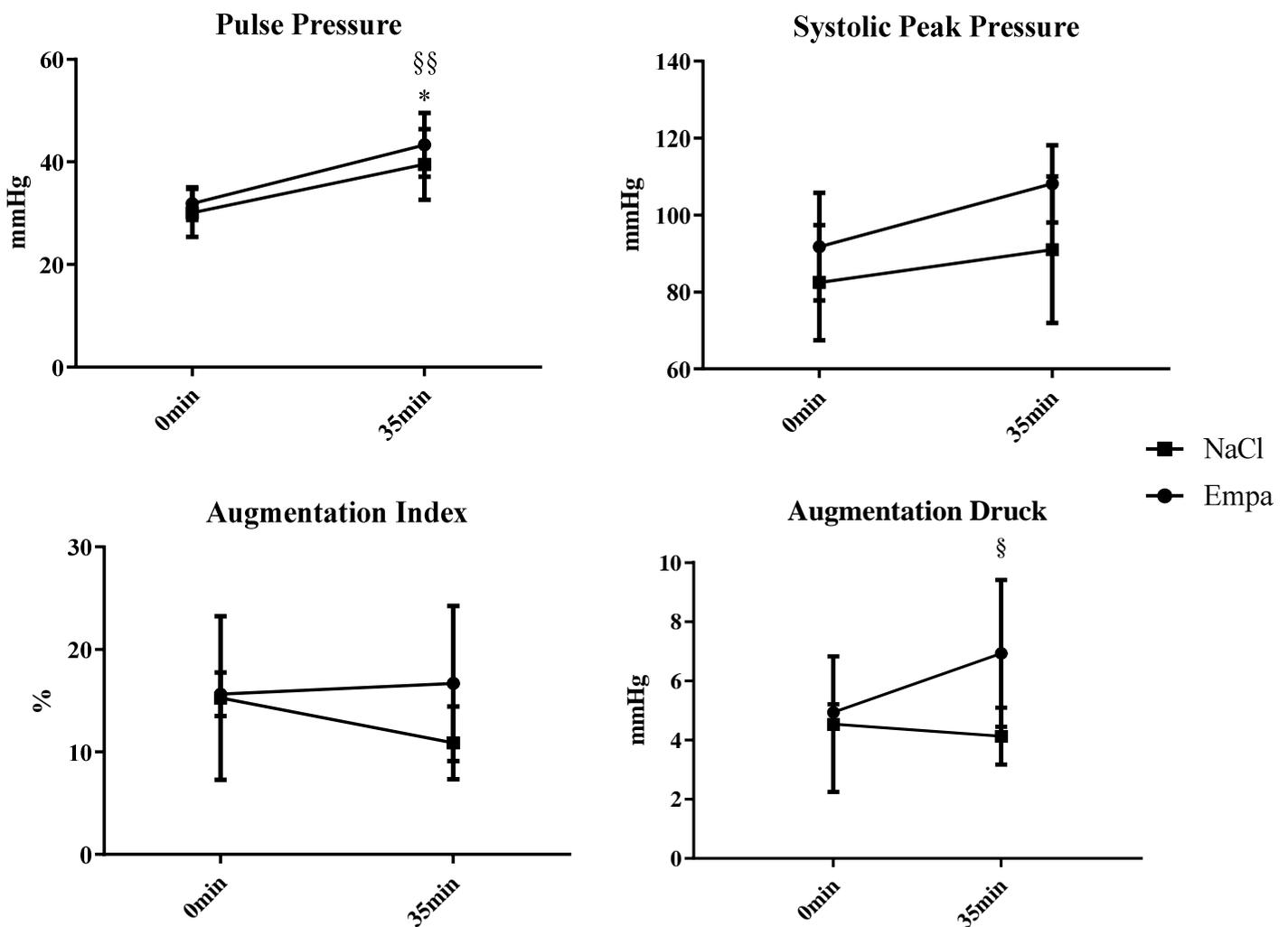
Beim Vergleich der Druckverhältnisse und Pulswellen in der Aorta vor Empagliflozin- bzw. NaCl-Gabe und 35 Minuten nach Applikation, kam es zu einer Erhöhung des Pulse Pressures (0min Empa $31,87 \pm 3,17\text{mmHg}$ vs 35min Empa $43,33 \pm 6,19\text{mmHg}$, $p < 0,01$; 0min NaCl $30,07 \pm 4,70\text{mmHg}$ vs 35min NaCl $39,53 \pm 6,90\text{mmHg}$, $p < 0,05$) in beiden Gruppen. Der Anstieg war jedoch stärker in der Empagliflozin Gruppe ausgeprägt.

Die Erhöhung des Pulse Pressures kam vor allem durch einen Anstieg des systolischen Blutdrucks zustande, der jedoch nicht signifikant verändert war (0min Empa $91,80 \pm 13,97\text{mmHg}$ vs 35min Empa $108,13 \pm 10,03\text{mmHg}$, 0min NaCl $82,47 \pm 14,97\text{mmHg}$ vs 35min NaCl $91,00 \pm 19,01\text{mmHg}$).

Der erhöhte systolische Druck erklärt außerdem den signifikanten Anstieg des Augmentation Drucks (ΔP) bei Empagliflozin-Gabe im Vergleich zu NaCl nach 35 Minuten (35min Empa $6,93 \pm 2,48\text{mmHg}$ vs 35min NaCl $4,13 \pm 0,96$, $p < 0,05$). Dieser hatte keine statistisch relevanten Auswirkungen auf den Augmentation Index (35min Empa $16,68 \pm 7,56\%$ vs 35min NaCl $10,88 \pm 3,55\%$).

Der diastolische Druck blieb bei NaCl-, wie auch bei Empagliflozin-Applikation unverändert (35min Empa $64,80 \pm 13,17$ mmHg vs 35min NaCl $51,47 \pm 22,80$ mmHg).

Zusammenfassend deuten diese Parameter daraufhin, dass die akute Gabe von Empagliflozin zu keiner Einschränkung der Gefäßelastizität führt. Es kommt jedoch zu einem leichten, wenn auch nicht signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks und damit des Pulse Pressures, der etwas stärker nach Empagliflozin-Gabe ausgeprägt ist, jedoch auch nach NaCl Applikation auftritt.



Grafik 4: Stiffness-Parameter 35 min nach iv-Applikation von Empagliflozin oder NaCl

§ $p < 0,05$ Empa 0 min vs Empa 35 min, §§ $p < 0,01$ Empa 0min vs Empa 35 min, * $p < 0,05$ NaCl 35min vs NaCl 0 min

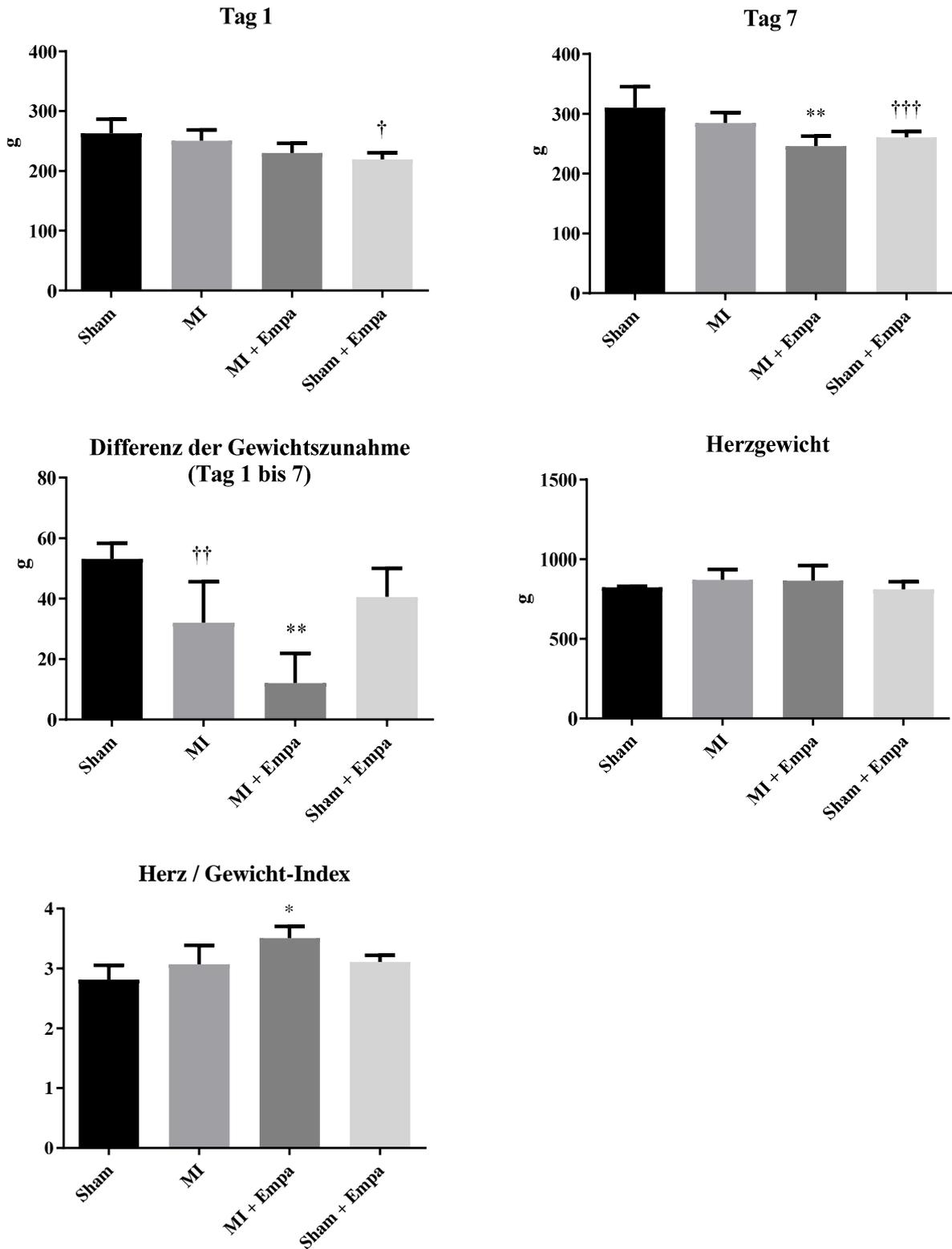
3.3 Gewichtsverlust bei mit Empagliflozin behandelten Tieren

Am Tag 1 konnte eine geringfügige Differenz zwischen den unterschiedlichen Kohorten gesehen werden. Dabei wogen die mit Empagliflozin behandelten Gruppen eher weniger als die Sham-Tiere (Sham + Empa $219,33 \pm 11,02\text{g}$ vs Sham $263 \pm 23,64\text{g}$, $p < 0,05$). Im Verlauf des Experimentes kam es zu einer geringen Gewichtszunahme bei mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkt-Tieren im Vergleich zu den Vehicle behandelten Myokardinfarkt Tieren (MI + Empa $12 \pm 9,91\text{g}$ vs MI $32 \pm 13,62\text{g}$, $p < 0,01$). Bei der mit Empagliflozin behandelten Sham Gruppe kam es zu keinem Gewichtsverlust – jedoch konnte auch in dieser Kohorte eine nicht signifikante, geringere Gewichtszunahme im Vergleich zu der Vehicle behandelten Sham Gruppe beobachtet werden (Sham + Empa $40,57 \pm 9,40\text{g}$ vs Sham $53,14 \pm 5,18\text{g}$).

Der Herz-Gewicht-Index war bei den mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkt Tiere verglichen mit den Vehicle behandelten Myokardinfarkt Tieren erhöht (MI + Empa $3,51 \pm 0,19\text{g}$ vs MI $3,07 \pm 0,32\text{g}$, $p < 0,05$). Dies lässt sich durch das geringere Gewicht am Tag des Herzkatheters erklären (MI + Empa $242,13 \pm 19,26\text{g}$ vs MI $284,83 \pm 17,22\text{g}$, $p < 0,01$).

Es kam zu keinem Unterschied des Herzgewichtes zwischen den Gruppen.

Bei dem Kontraktilität-Modell gab es zwischen den Gruppen keinerlei Unterschiede beim Gewicht, dem Herzgewicht oder dem Herz-Gewicht-Index.

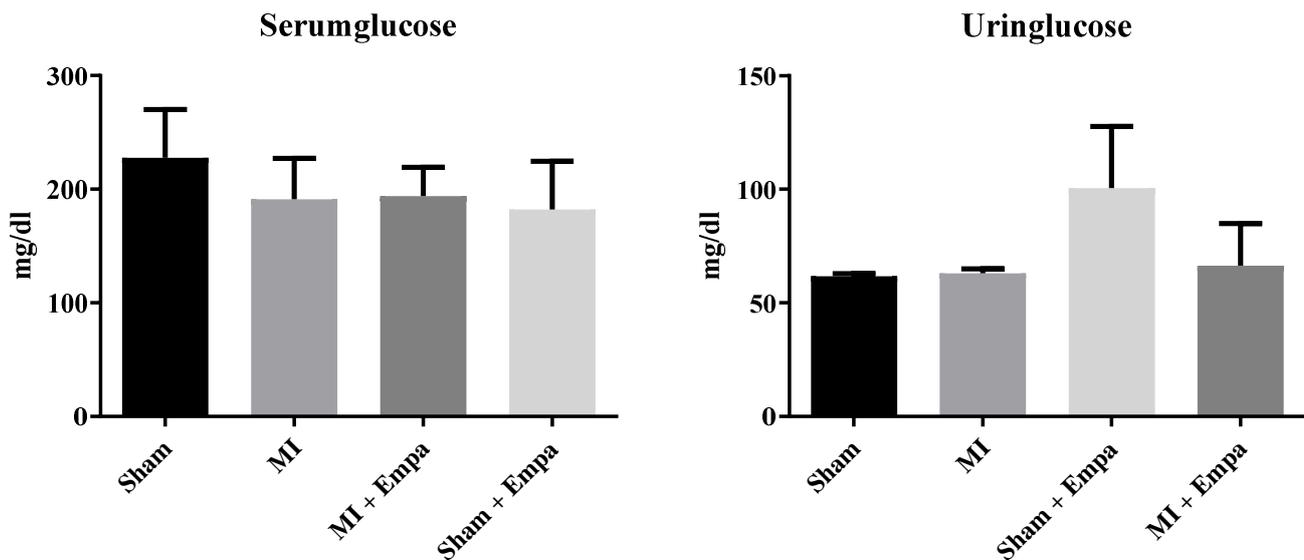


Grafik 5: Gewichtsentwicklung 7 Tage nach Myokardinfarkt

† $p < 0,05$ vs Sham, †† $p < 0,01$ vs Sham, ††† $p < 0,001$ vs Sham, * $p < 0,05$ vs MI, ** $p < 0,01$ vs MI

3.4 Glucose-Konzentration im Serum und Urin bei Empagliflozin-Behandlung

Innerhalb der verschiedenen Kohorten kam es zu keinem signifikanten Unterschied innerhalb der Serumglucose-Konzentration. Die tendenziell etwas erhöhte Uringlucose innerhalb der mit Empagliflozin behandelten Gruppen erklärt sich durch den antidiabetischen Effekt von SGLT2 Inhibitoren, wobei es zu einer vermehrten Glucoseausscheidung über den Urin kommt (61, 63, 79).



Grafik 6: Glucosekonzentration im Serum und Urin 7 Tage nach Myokardinfarkt

3.5 Western Blot und Immunhistologie

3.5.1 Regulation der kardialen Pumpen und Transporter

Bei Empagliflozin-Gabe nach Myokardinfarkt kam es im Vergleich zu den Vehicle behandelten Myokardinfarkt Tieren zu einer Hochregulation der SERCA 2a Expression (MI + Empa $0,423 \pm 0,035$ vs MI $0,25 \pm 0,09$, $p < 0,05$) im linken Ventrikel. Im Rahmen des Kontraktilitäts-Modells kam es im Gewebe des linken Ventrikels nach Empagliflozin-Gabe zu einer 1,2 fachen Hochregulation von SERCA2a im Vergleich zu der mit NaCl behandelten Kohorte (Daten nicht gezeigt). Die NCX1 Expression blieb nach Empagliflozin-Gabe unbeeinflusst. Beide Transporter beeinflussen über die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration die Kontraktilität von Kardiomyozyten (33, 34). Bei den für die pH Regulation verantwortlichen Transportern kam es zu einer Herunterregulation von NHE1 (MI + Empa $0,203 \pm 0,060$ vs MI $0,403 \pm 0,081$, $p < 0,05$) und kontroversen Ergebnissen der Proteinexpression von NBC. Die Herunterregulation von NHE1 konnte bei Empagliflozin-Gabe auch bei Sham Tieren im Vergleich zu der Vehicle behandelten Sham-Kohorte gesehen werden (Sham + Empa $0,367 \pm 0,0416$ vs Sham $0,507 \pm 0,072$, $p < 0,05$). Bei der Darstellung von NBC wurden im Western Blot zwei Banden sichtbar. Nach Angaben des Herstellers handelt es sich bei der 130 kDa um das eigentlichen NBC1 Protein. Fraglich ist, ob es sich bei der 60 kDa Bande um eine NBC Unterform handelt. Insgesamt kam es bei der 130 kDa Bande zu keiner Regulierung von NBC, wohingegen bei 60 kDa eine Hochregulation bei den mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkt-Tieren (MI + Empa $0,64 \pm 0,079$ vs MI $0,37 \pm 0,104$, $p < 0,05$) erkennbar war.

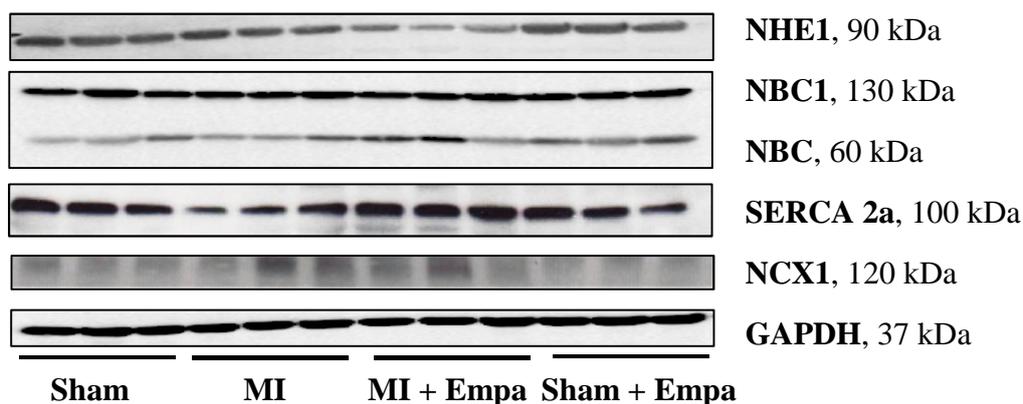
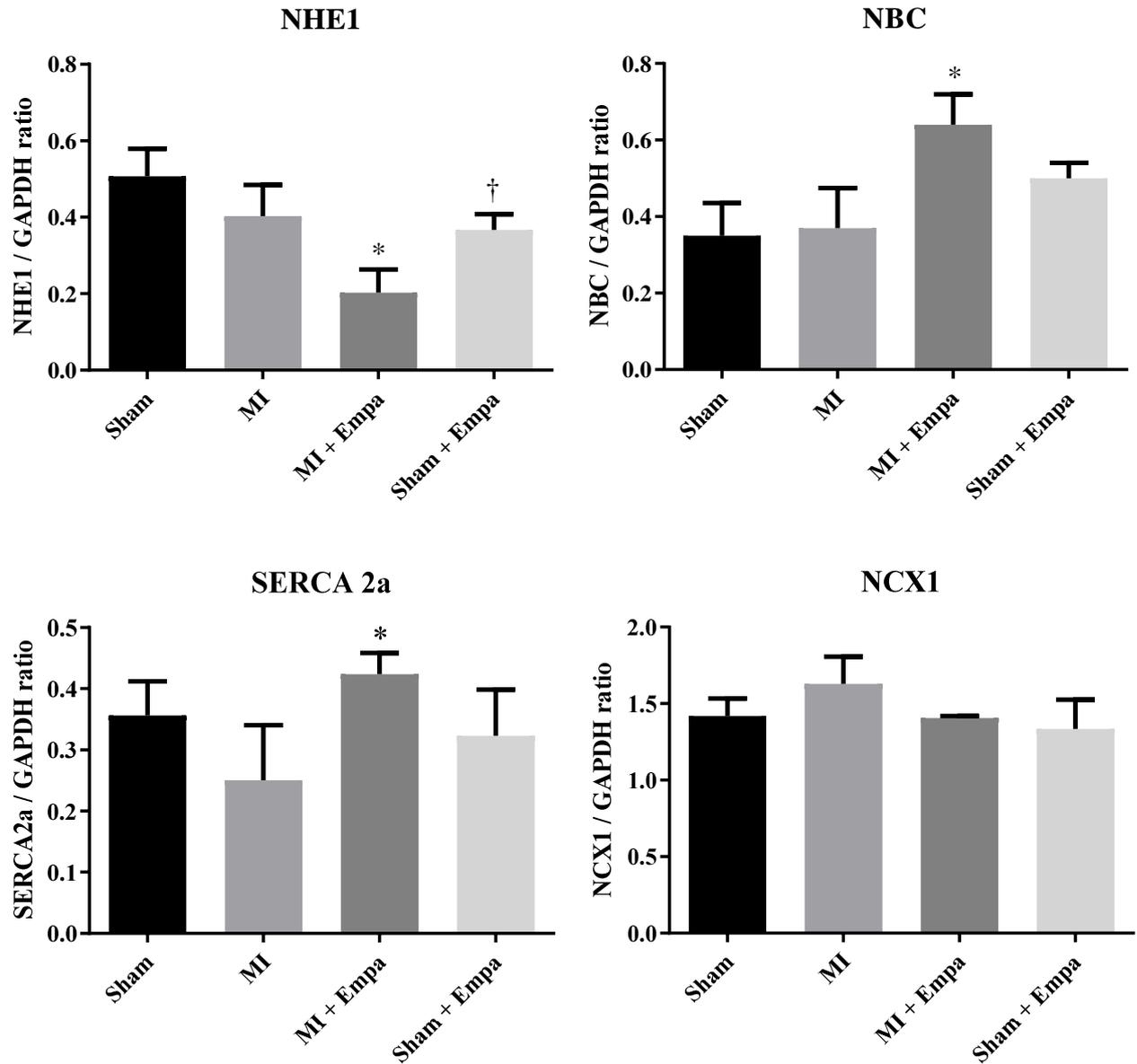


Abbildung 11: Western Blot der kardialen Pumpen und Transporter

Natrium-Protonen-Austauscher 1 (NHE1), Natrium-Bicarbonat-Coransporter (NBC), Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium Transporting ATPase 2a (SERCA 2a), Natrium- Calcium- Austrauscher (NCX1), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)



Grafik 7: Regulation der pH und Kontraktilität bestimmenden Transporter und Pumpen

Natrium-Protonen-Austauscher 1 (NHE1), Natrium-Bicarbonat-Coransporter (NBC), Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium Transporting ATPase 2a (SERCA 2a), Natrium- Calcium-Austrascher (NCX1)

† $p < 0,05$ vs Sham, * $p < 0,05$ vs MI

3.5.2 Regulation der fibrotischen Umbauprozesse und Nekroptose

Es kam bei den Myokardinfarkt Tieren im Vergleich mit der Sham-Gruppe zu einem Anstieg des für fibrotische Umbauprozesse sensitiven Parameters TGF β 1 (MI $0,453 \pm 0,032$ vs Sham $0,203 \pm 0,075$, $p < 0,01$). Innerhalb der mit Empagliflozin behandelten Gruppen kam es zu leicht erhöhten, jedoch nicht signifikant veränderten Werten.

Die Smad2 Expression war nach Myokardinfarkt nur tendenziell hochreguliert (MI $0,277 \pm 0,040$ vs Sham $0,213 \pm 0,0351$) und wurde ebenfalls nicht durch Empagliflozin-Gabe beeinflusst.

Bei dem für die Nekroptose entscheidenden Protein, MLKL, kam es zu keiner veränderten Regulation innerhalb der Gruppen.

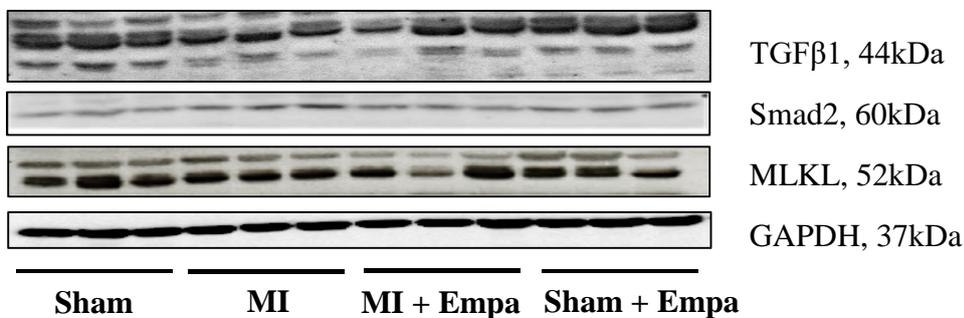
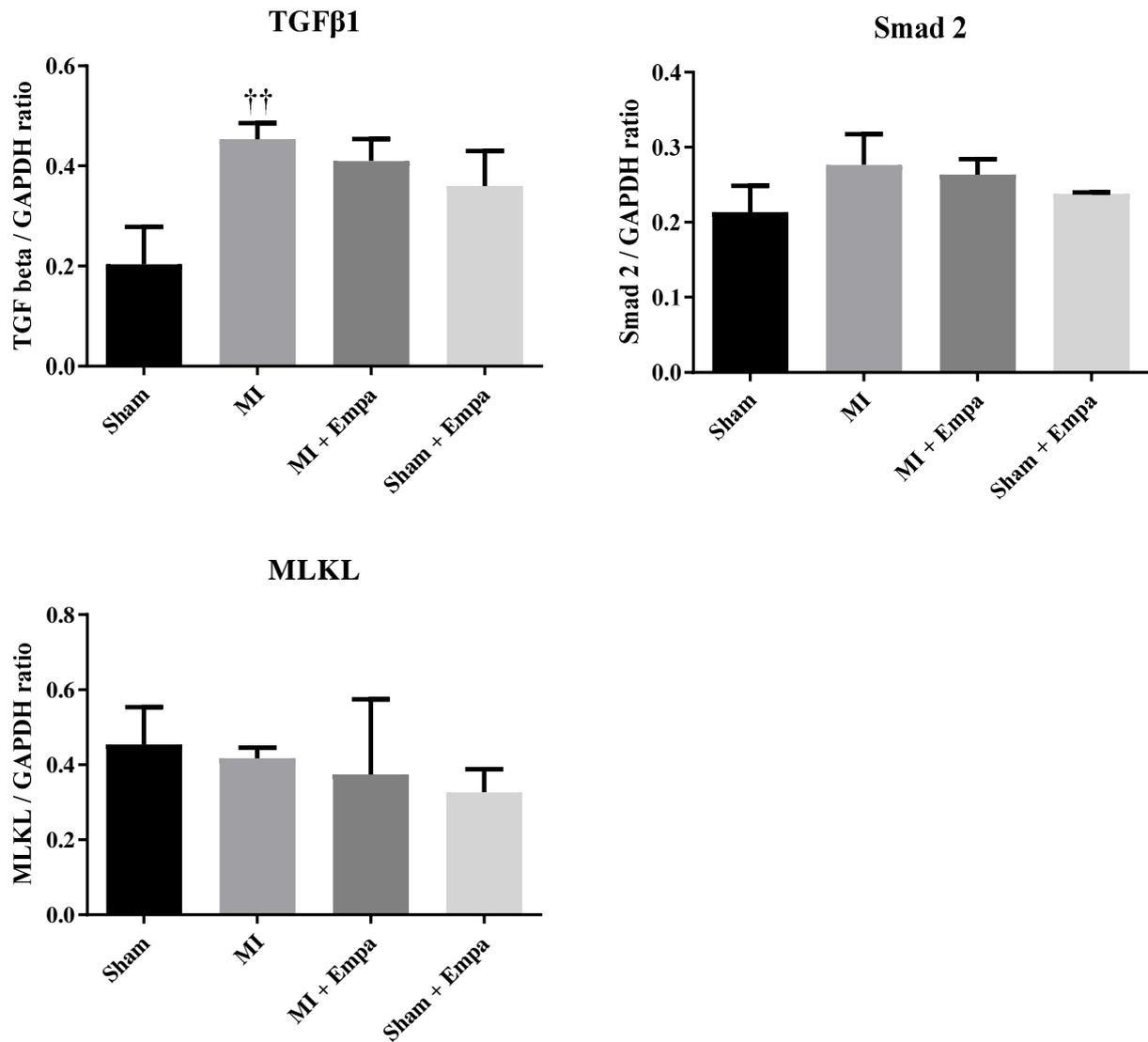


Abbildung 12: Western Blot der profibrotischen und nekroptotischen Proteine

Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1), Smad 2 (Smad 2), Mixed Lineage Kinase Domain-Like (MLKL), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)



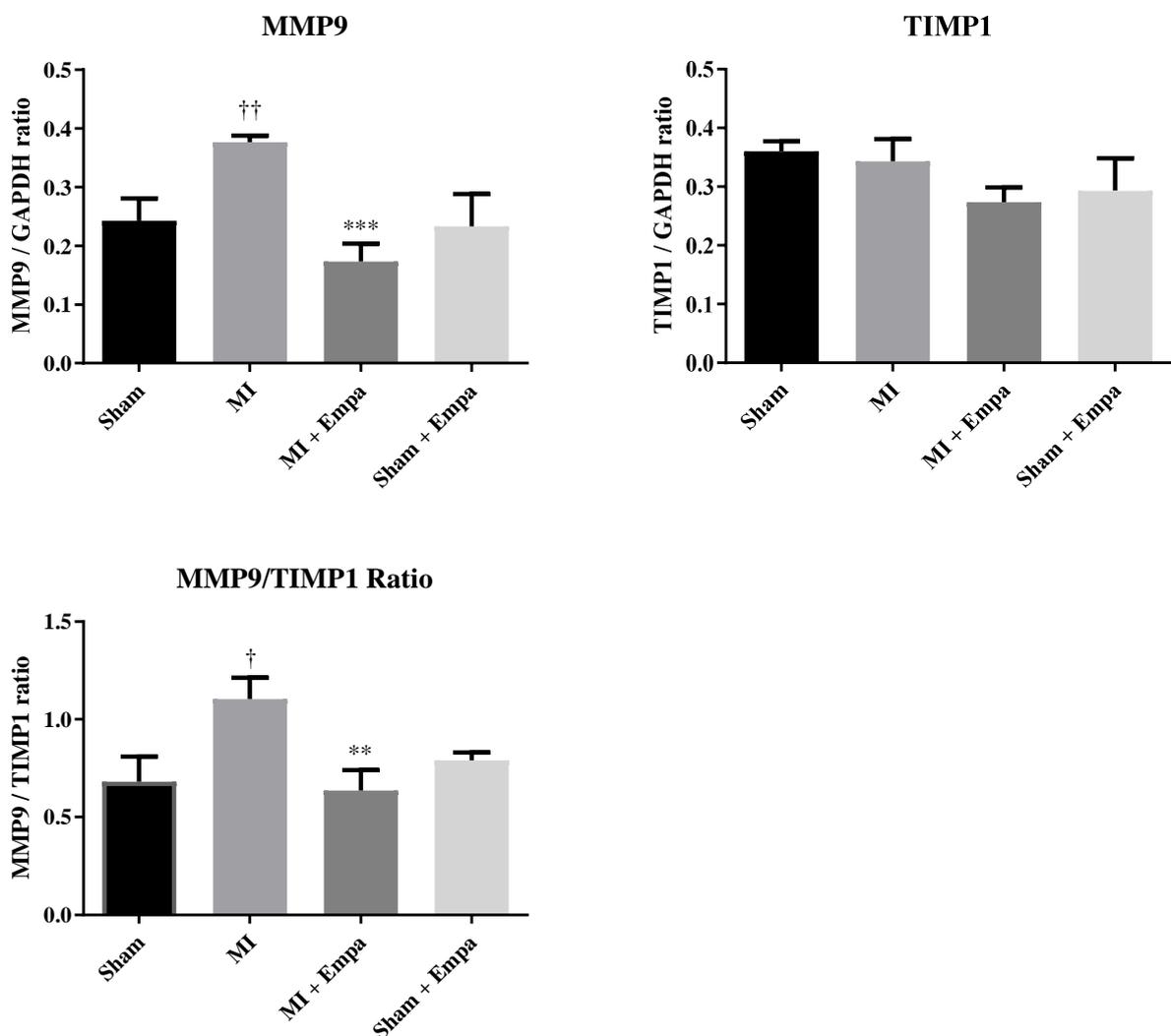
Grafik 8: Regulation der fibrotischen und nekroptotischen Proteine

Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1), Smad 2 (Smad 2), Mixed Lineage Kinase Domain-Like (MLKL)

†† $p < 0,01$ vs Sham

3.5.3 Regulation der MMPs Aktivität

Infolge des Myokardinfarktes kam es bei unbehandelten Tieren zu einer Hochregulation von MMP9. Eine Empagliflozin-Behandlung verursachte eine signifikante Verringerung der MMP9 Expression bei Myokardinfarkt-Tieren (MI + Empa $0,173 \pm 0,031$ vs MI $0,377 \pm 0,012$, $p < 0,001$). Der MMP-Inhibitor TIMP1 wurde nicht signifikant durch Empagliflozin-Gabe beeinflusst. Im MMP9/TIMP1 Ratio zeigte sich ebenfalls eine Herunterregulation bei den mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkt-Tieren (MI + Empa $0,637 \pm 0,104$ vs MI $1,103 \pm 0,110$, $p < 0,01$). Die MMP9- und die TIMP1-Expression blieb nach SGLT2 Inhibitor Behandlung bei Sham Tieren unverändert.



Grafik 9: Regulation von MMP9 und TIMP1

Metalloprotease 9 (MMP9), Tissue Inhibitor der Metalloprotease 1 (TIMP1)

† $p < 0,05$ vs Sham, †† $p < 0,01$ vs Sham, ** $p < 0,01$ vs MI, *** $p < 0,001$ vs MI

3.5.4 Immunhistologie des linken Ventrikels

Im linken Ventrikel von Vehicle behandelten Myokardinfarkt-Tieren konnte eine vermehrte MMP9 Expression gesehen werden. Es kam dabei insbesondere im Bereich des Zellkerns und in inflammatorischen Zellen zu einer Anfärbung. Infolge einer Empagliflozin Behandlung kam es zu einer Herunterregulation von MMP9.

NHE1 ist gleichmäßig über die gesamten Sarkolemma der Kardiomyozyten exprimiert, wobei bei Myokardinfarkt-Tiere, die mit Empagliflozin behandelt wurden, eine verringerte NHE Expression sichtbar ist.

SERCA2a war schwach innerhalb der Kardiomyozyten der Myokardinfarkt-Tiere exprimiert.

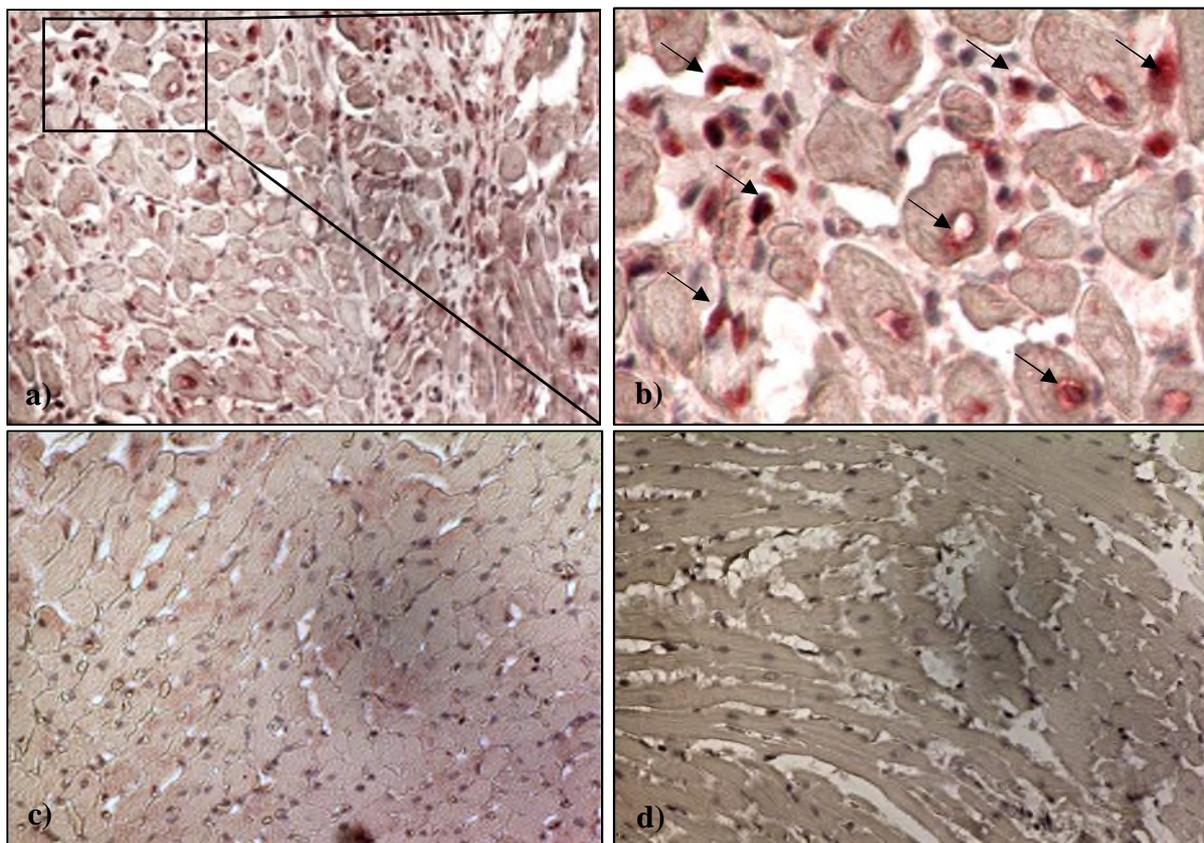


Abbildung 13: MMP9 Expression im linken Ventrikel nach Myokardinfarkt

(rote Anfärbung von MMP9)

a) Vehicle behandelte Myokardinfarkt, Vergrößerung x20 b) Vehicle behandelte Myokardinfarkt, Vergrößerung x40 c) Empagliflozin behandelte Myokardinfarkt, Vergrößerung x20 d) Kontrolle Vehicle, ohne 2. Antikörper.

4 Diskussion

4.1 Direkte inotrope Wirkung von Empagliflozin

4.1.1 Verbesserung der Hämodynamik nach 7-tägiger oraler Empagliflozin-Gabe

Nach einwöchiger Behandlung mit Empagliflozin konnte in der behandelten Myokardinfarkt-Gruppe ein erhaltener GLS nachgewiesen werden. Der GLS hat dabei einen hohen prognostischen Wert und spricht gemeinsam mit der tendenziell verbesserten Ejektionsfraktion für eine kardioprotektive und positiv inotrope Wirkung von Empagliflozin bei Myokardinfarkt (112). Auch über einen Zeitraum von 10 Wochen wurde bei Empagliflozin Behandlung in einem ähnlichen Modell eine erhaltene Ejektionsfraktion beobachtet (92).

Eine positiv inotrope Wirkung konnten wir ebenfalls bei mit Empagliflozin behandelten Sham Tieren sehen. Dabei kam es zu einem signifikanten Anstieg des Fractional Shortening, des Stroke Volumen und des Cardiac Output. Bei langfristigerer Gabe von Empagliflozin konnte in weiteren Studien bei Sham Tieren meist nur eine minimale verbesserte bzw. unveränderte Fractional Shortening beobachtet werden (92, 95).

Widersprüchlich zu der positiv inotropen Wirkung von SGLT2 Hemmern sind die Ergebnisse aus kleinen Studien an Typ 2 Diabetikern, die über 6 Monate mit Empagliflozin behandelt wurden, jedoch im MRT keine Veränderung der Ejektionsfraktion aufwiesen (96, 97).

Bei der invasiven Herzkatheteruntersuchung konnten wir bei den Myokardinfarkt-Tieren einen leichten Anstieg des minimalen intraventrikulären Drucks dokumentieren, wohingegen es eher zu einem Abfall des intraventrikulären Drucks und $\max/dp/dt$ kam. Die Behandlung mit Empagliflozin hatte auf die vorherrschenden hämodynamischen Drücke im Ventrikel oder in der Aorta 7 Tage nach Myokardinfarkt keine Auswirkungen.

Einen Ausblick auf das mögliche Wirkspektrum bei einer längerfristigen Behandlung eines Myokardinfarktes mit Empagliflozin bieten verschiedene Studien, wobei es hier zu kontroversen Ergebnissen kam. So zeigten sich einerseits keinen signifikanten Veränderungen der Hämodynamik nach 10-wöchiger Behandlung (92). Andererseits fiel ein unveränderter systolischer Blutdruck und eine erhöhte end-systolische Druck-Volumen Relation bei Myokardinfarkt Tieren im Rahmen einer 6-wöchigen SGLT2 Inhibitor-Gabe auf (95). Eine langfristige Gabe von SGLT2 Inhibitoren scheint somit, wenn überhaupt, nur mit einer leichten Kontraktilitätssteigerung einherzugehen.

Bei der genauen Analyse der intraoralen Durckkurve zur Bestimmung der Stiffness-Parameter fiel eine verkürzte Inflection Time bei den mit Empagliflozin behandelten Gruppen im Vergleich zur Sham-Kohorte auf. Der Augmentations-Index blieb jedoch unbeeinflusst.

Die Verkürzung der Inflection Time bei Empagliflozin-Gabe zeigt eine schnellere Reflektion der Druckwelle durch das arterielle System, die im Zusammenhang mit steiferen, unelastischeren Gefäßen steht (116, 117). Die unveränderten Druckverhältnisse in der Aorta und der gleichbleibende Augmentation Index sprechen dagegen dafür, dass eine Elastizität der großen Gefäße erhalten bleibt. Weiterhin kam es zu einem verringerten Pulse Pressure bei den Vehicle behandelten Myokardinfarkt Tieren im Vergleich zur der Sham Kohorte. Es handelt sich bei dem Pulse Pressure bzw. der Pulsamplitude um die Differenz des systolischen und diastolischen Drucks (115). Dies erklärt den Unterschied zwischen den beiden Gruppen, da es bei den Myokardinfarkt-Tieren zu einem nicht signifikanten Abfall des systolischen Blutdrucks kam. Ein allgemeiner Abfall des Blutdrucks nach Myokardinfarkt wie auch im weiteren zeitlichen Verlauf wurden für Ratten schon dokumentiert (118). Bei den mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkten kam es ebenfalls zu einem leichten Abfall des Pulse Pressures, der jedoch geringer als in der Vehicle behandelten Gruppe ausfiel.

In der Literatur wurden unterschiedliche hämodynamische Ergebnisse nach SGLT2-Inhibitor-Gabe beschrieben. Dabei gab es Studien, die eher systolische andere, die eher diastolische Effekte beobachteten (81, 82, 87, 89, 92). In unserer Studie sehen wir eine leichte Zunahme der systolischen Kraft, während wir keine diastolischen Veränderungen, weder in der Echokardiographie noch in der Herzkatheteruntersuchung, nachweisen konnten. Es kam bei uns jedoch auch zu keinen signifikanten Unterschieden der diastolischen Werte zwischen der Myokardinfarkt- und den Sham-Gruppe.

Zusammenfassend sprechen unsere hämodynamischen Ergebnisse für eine kontraktilitätssteigernde Wirkung von Empagliflozin. Die diabetesunabhängige kardiale Wirkung von Empagliflozin wurde in verschiedenen Veröffentlichungen schon beschrieben werden (81, 82, 87, 92). Wir konnten jedoch zusätzlich nachweisen, dass Empagliflozin schon innerhalb von einer Woche und bereits bei einer Dosis von 1mg/kg eine Wirkung zeigte, wohingegen die meisten anderen Studien einen längeren Zeitraum und 20 bis 30mg/kg Empagliflozin zur Behandlung nutzten (81, 92, 95, 110).

4.1.2 Serum- bzw. Uringlucose und Gewichtsverlust nach Empagliflozin-Gabe

Nach einwöchiger täglicher Empagliflozin Behandlung kam es zu keinen Veränderungen der Blutglucose. Hierbei muss beachtet werden, dass bei unserem Forschungsprojekt normoglykämische, nicht-diabetische Tiere verwendet wurden. Auch in weiteren Studien an nicht-diabetischen Tieren wurde die Blutglucose durch SGLT2-Inhibitoren nicht beeinflusst (89, 92, 93). Zu dem gleichen Ergebnis kam ein Versuch bei gesunden menschlichen Probanden - unabhängig von der applizierten Empagliflozin-Menge (69).

Bei den mit Empagliflozin behandelten Kohorten konnte eine tendenziell erhöhte Glucoseausscheidung im Urin nachgewiesen werden, die sich durch den renalen Wirkmechanismus von SGLT2 Inhibitoren erklärt (61, 63, 79).

Die geringere Gewichtszunahme der mit Empagliflozin behandelten Gruppen im Vergleich zu den unbehandelten Sham-Kohorten konnte auch bei Typ 2 Diabetikern innerhalb der ersten Monate nach Beginn der Empagliflozin-Einnahme beobachtet werden (119). Auch Yurista et al. und Connelly et al. verzeichneten einen Gewichtsverlust bei der mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkt- oder Sham-Gruppe; 10 bzw. 6 Wochen nach Therapiebeginn (92, 95). Eine Gewichtsabnahme spricht für eine katabole, abbauende Stoffwechsellage, die möglicherweise durch Empagliflozin-Gabe verursacht wird und in Folge eines Myokardinfarktes kritisch gesehen werden muss.

4.1.3 Inotrope kardiale Wirkung bei iv-Applikation von Empagliflozin

Im Ventrikel verursachte die intravenöse Gabe von Empagliflozin einen signifikanten Anstieg des Mean Pressures und maximal Pressures im Vergleich zu den Tieren, denen NaCl-injiziert wurde. Weiterhin konnte ein signifikanter Anstieg des max dp/dt bei Empagliflozin-Gabe beobachtet werden, der repräsentativ für eine linksventrikulären Kontraktilitätssteigerung bzw. erhöhte Inotropie steht (120). Der systolische Blutdruck war nach 35 Minuten in der Aorta nur tendenziell erhöht, wohingegen es zu einem signifikanten Anstieg des Pulse Pressures kam. Es konnte keine Veränderungen des Augmentation Indexes bzw. der Gefäßelastizität bei der akuten Applikation von Empagliflozin nachgewiesen werden. Bei den für die Diastole entscheidenden Parametern kam es zu einem Anstieg der Zeitkonstante für die Relaxation, Tau. Dabei benötigte der Ventrikel zeitlich

länger für die aktive Entspannung während der isovolämischen Kontraktion (121). Ansonsten gab es keine weiteren signifikanten Veränderungen der diastolischen Funktion.

Die verlängerte Zeitkonstante für die Relaxation, Tau, steht repräsentativ für eine eingeschränkte diastolische Funktion (122). Dieses Resultat widerspricht den hämodynamischen Messungen bei HFpEF-Ratten, die nach längerfristiger Empagliflozin-Behandlung eine Verkürzung von Tau aufwiesen (82). Ebenfalls bei HFpEF-Tieren konnte 30 Minuten nach direkter iv.-Applikation von 0,25mg Empagliflozin pro kg Körpergewicht eine verbesserte diastolische Pumpfunktion dokumentiert werden (81).

Zur Erklärung der verlängerten Tau gibt es verschiedene Ansätze. Einerseits muss in Betracht gezogen werden, dass es durch eine hohe Dosierung von Empagliflozin – trotz 2.500fach höherer Bindungsaffinität zu SGLT2 Rezeptoren – zu einer zusätzlichen SGLT1 Hemmung gekommen ist (63). Im Rahmen einer tierexperimentellen Studie konnte bei einer simultanen Inhibition von SGLT1 und SGLT2 ebenfalls eine eingeschränkte Tau beobachtet werden (123). Andererseits kann Tau durch eine erhöhte Nachlast beeinflusst werden, die durch eine Veränderung des arteriellen Drucks oder der peripheren Resistenz zustande kommt (124, 125). Der stabil bleibende Augmentation Index spricht dabei eher für einen Erhalt der Gefäßelastizität, im Gegensatz dazu war 30 Minuten nach Empagliflozin-Applikation der maximale Druck im Ventrikel signifikant und in der Aorta tendenziell erhöht.

Der leichte Anstieg des systolischen Blutdrucks und der gleichbleibende diastolische Blutdruck erklären in unserem Experiment den signifikant erhöhten Pulse Pressure. Eine permanente Steigerung des Pulse Pressure steht bei älteren Patienten in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen (126). Jedoch konnte weder der leicht erhöhte systolische Blutdruck, noch der gesteigerte Pulse Pressure bei einwöchiger per os Gabe bei der behandelten Myokardinfarkt- oder Sham-Gruppe gesehen werden. Ganz im Gegenteil kam es bei Typ 2 Diabetikern, die mit Empagliflozin behandelt wurden, zu einer Abnahme des Blutdrucks und des Pulse Pressures (80).

Bei akuter intravenöser Gabe von Empagliflozin zeigte sich eine positiv inotrope Wirkung auf das Herz, die auch echokardiographisch bei längerfristiger oraler Applikation nachgewiesen werden konnte.

Der schnelle Anstieg der Inotropie nach zum Teil schon 15 Minuten lässt Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus von Empagliflozin zu. Man kann hierdurch davon ausgehen, dass es sich nicht um einen Prozess handelt, der erst nach einem längeren Zeitraum seine Wirkung entfaltet. So ist

es unwahrscheinlich, dass der kardiale Effekt von Empagliflozin, allein durch beispielsweise eine Reduktion der Vorlast, verursacht wird. Die Vorlastsenkung bei Empagliflozin-Gabe entsteht durch den diuretischen Effekt von SGLT2 Inhibitoren (127). Dieser würde jedoch weder innerhalb von wenigen Minuten stattfinden, noch die Kontraktilitätssteigerung erklären. Auch Connelly et al. fand nach speziellen Messungen im Herzkatheter heraus, dass die kardiale Wirkung von Empagliflozin nach längerer Gabe in HFrEF Tiere unabhängig von der Vor- bzw. Nachlast ist, wobei unsere Ergebnisse dies unterstützen (95).

Eine weitere Hypothese für den möglichen Wirkmechanismus von Empagliflozin ist die vermehrte kardiale Verwendung von Ketonkörper als „super fuel“ aufgrund ihrer hohen Stoffwechseleffizienz (79, 100). Im gesunden menschlichen Herzen erfolgt nur 10% der Energiegewinnung durch Ketonkörper und verzweigtkettige Aminosäuren (100). Bei Herzinsuffizienz greift dagegen das Herz vermehrt als Energieträger auf Ketonkörper zurück (100, 128).

Durch verschiedene Versuche konnte bei diabetischen und nicht-diabetischen Tieren nach Gabe von Empagliflozin ein erhöhtes Level an zirkulierenden Ketonkörper und zum Teil auch eine vermehrte kardiale Aufnahme dieser gezeigt werden (89, 92, 101). Auch bei Typ 2 Diabetikern wurde nach längerfristiger Canagliflozin-Gabe ein patientenabhängiger, variabler Anstieg der Ketonkörper im Serum nachgewiesen (98). Dennoch gibt es auch einige Ergebnisse von Studien, die der vermehrten kardialen Verwendung von Ketonkörper durch SGLT2 Inhibitoren widersprechen (102-104).

Die in unserem Experiment innerhalb von wenigen Minuten beobachtete Inotropiesteigerung nach iv-Applikation von Empagliflozin lässt sich nur schlecht mit einer plötzlichen vermehrten Verwendung von Ketonkörpern erklären. Ob eine gesteigerte Ketonkörper Nutzung nach längerer Behandlung mit SGLT2 Inhibitoren zusätzliche positive Auswirkungen hat, muss im Rahmen weiterer Studien evaluiert werden.

Es spricht vieles dafür, dass die akute Kontraktilitätssteigerung eher im Rahmen einer direkten kardialen Reaktion entsteht. Diese könnte beispielsweise durch eine Empagliflozin vermittelte Beeinflussung von myokardialen Transportern und Pumpen verursacht werden. Um ein besseres Verständnis für den Wirkmechanismus von Empagliflozin zu erlangen, haben wir das ventrikuläre Gewebe der für 7 Tagen mit Empagliflozin behandelten Ratten auf die Expression der kardialen Transporter bzw. Pumpen untersucht.

4.2 Anpassung der Kontraktilität und pH-Regulation nach Empagliflozin-Gabe

4.2.1 Beeinflussung der kardialen pH-regulierenden Transporter durch Empagliflozin

NHE1 ist im linken Ventrikel von Versuchstieren, die mit Empagliflozin behandelt wurden – unabhängig vom Myokardinfarkt bzw. der Sham-Operation herunterreguliert. Der kardiale Natrium-Protonen-Austauscher ist insbesondere während einer intrazellulären Azidose, wie sie bei einer Ischämie vorkommt, für einen Großteil des Natriumeinstroms in die Zelle verantwortlich (35). Der durch Azidose bedingte hohe Natriumgradient verhindert den NCX vermittelten Austausch von einem intrazellulären Calcium mit drei Natriummolekülen und verursacht eine Calciumüberladung (35).

Eine Blockade des NHE hatte bei der Therapie von Ischämie-Reperfusionen-Modellen im Tierversuch eine kardioprotektive Wirkung (54). Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht in klinischen Studien bestätigen (56).

In Kardiomyozyten konnte eine NHE Inhibition durch Empagliflozin, aber auch durch Canagliflozin und Dapagliflozin, nachgewiesen werden (129). Dabei wurde im Zellexperiment eine Verringerung des zytosolischen Natriums und Calciums bei Empagliflozin-Gabe unabhängig von der Anwesenheit von Glucose beobachtet (105). Unsere Ergebnisse bestätigen hierbei, dass es auch im Tiermodell zu einer verringerten NHE Expression bei normoglykämischen Ratten durch Empagliflozin kommt. Zusätzlich konnten wir nachweisen, dass Empagliflozin bei Sham-operierten, also „herzgesunden“ Versuchstieren, wie auch bei Myokardinfarkt-Tieren zu einer geringeren NHE-Expression führte. Dabei war NHE bei den Myokardinfarkt-Tieren stärker herunterreguliert, in denen es wahrscheinlich durch Ischämie bedingt zu einer intrazellulären Azidose gekommen ist.

Allgemein stellt die Hemmung von NHE durch Empagliflozin einen Erklärungsansatz für die kardioprotektive Wirkung unabhängig vom Glukoselevel dar. Schwieriger ist es zu erklären, warum es bei mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkt-Tieren zu einer unterschiedlichen Regulation der verschiedenen Banden von NBC kommt. NBC ist neben NHE für die pH Regulation der Kardiomyozyten zuständig. Als Cotransporter für Bicarbonat hat NBC je nach pH einen unterschiedlich hohen Einfluss auf den Natriumeinstrom (35, 36). Dabei transportiert NBCe1, im Vergleich zu NBCn1, nur ein Natrium-Molekül gemeinsam mit 2 Bicarbonat-Molekülen in die Zelle und wird so auch als „Natriumsparender-Mechanismus“ bezeichnet (35, 36).

Die bei Empagliflozin-Behandlung beobachtete Hochregulation der 60kDa NBC Bande, steht im Gegensatz zu der unveränderten, vom Hersteller als NBCe1 vermerkten 130kDa Bande und ist bis jetzt noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Da sich das Expressionsmuster der 60kDa und 130kDa Bande widersprechen, lassen sich keine klaren Aussagen zu dem eigentlichen Expressionslevel von NBC machen. Allgemein ist eine NBCe1-Überexpression jedoch eher mit einem Verlust der kardialen Pumpleistung verbunden, was der bei uns beobachteten kontraktilitäts-erhaltenen Wirkung von Empagliflozin widerspricht (59).

Insgesamt ist NHE während einer Azidose vor allem für den Natriumeinstrom in den Kardiomyozyten verantwortlich, wohingegen NBCe1 eher eine natriumsparende Eigenschaft aufweist (35, 36). Schwer einzuschätzen ist, inwiefern die NBCe1-Expression die intrazelluläre Natrium- bzw. Calciumkonzentration beeinflusst – insbesondere während eines Myokardinfarktes bei dem NHE durch Empagliflozin gehemmt wird. Dabei könnte eine erhöhte NBC Expression auch möglicherweise dem Ausgleich des intrazellulären pHs dienen, der durch eine NHE Inhibition erschwert ist.

4.2.2 Beeinflussung der kontraktilitätsbestimmenden Transporter durch Empagliflozin

Es gab keine signifikante Veränderung der NCX1 Expression nach Empagliflozin-Gabe. Der Natrium-Calcium-Austauscher stellt das Verbindungsglied zwischen dem intrazellulären pH und der Kontraktilität der Kardiomyozyten dar (35, 37). Die Hauptaufgabe des Austauschers ist es, dass bei einer Kontraktion durch spannungsabhängige Kanäle anfallende Calcium aus der Zelle zu befördern und so eine Entspannung des Kardiomyozyten zu ermöglichen (34, 35, 37).

Im linken Ventrikel der unbehandelten Myokardinfarkttiere konnten wir eine Herunterregulation der SERCA 2a beobachten. Die mit Empagliflozin behandelte Myokardinfarkt-Gruppe zeigte dagegen einen signifikanten Anstieg der SERCA 2a. Die Hochregulation von SERCA 2a erklärt die verbesserte kardiale Funktion nach Myokardinfarkt, da SERCA 2a entscheidend für die Kontraktilität ist (33, 41). Sie nimmt das bei der letzten Kontraktion vom Sakroplasmatischen Retikulum freigesetzten Calcium wieder auf und stellt so Calcium für die nächste Kontraktion bereit (33, 41).

Eine Herunterregulation der SERCA 2a kann bei Herzinsuffizienz beobachtet werden und steht im Zusammenhang mit dem Verlust der kardialen Pumpleistung (33, 41). Dabei konnte ein verringerter Calcium-Peak in der Systole und eine geringere Beladung des Sakroplasmatischen Retikulums,

sowie eine vermehrte Entfernung von Calcium durch NCX nachgewiesen werden (48). Auch in Folge eines Myokardinfarktes wurde im Tiermodell eine lokal herunterregulierte SERCA 2a beobachtet, die mit einem langsam abnehmenden Calcium-Transient im angrenzenden Infarktbereich einherging (40).

Zusätzlich zu einer geringen SERCA 2a Aktivität konnten in einem Teil der Studien bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine Hochregulation der NCX beobachtet werden (41, 46). Dabei wurde vermutet, dass eine kompensatorische NCX Erhöhung als Ausgleich der erniedrigten SERCA 2a Aktivität dient (41). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Myokardgewebe, das einen geringeren diastolischen Kraftanstieg nach Stimulation aufwies, eine erhöhte NCX Expression zeigte (47).

Die von uns beobachtete Hochregulation von SERCA 2a widerspricht den Ergebnissen weiterer Studien, die Empagliflozin 6 Wochen bei diabetischen Mäusen oder nach Myokardinfarkt bei normoglykämischen Ratten appliziert haben (95, 130). Hier konnte keine Hochregulation von SERCA 2a gesehen werden, jedoch zeigte sich bei behandelten diabetischen Mäusen eine Herunterregulation von Phospholamban (95, 130). Dieses wirkt hemmend auf SERCA 2a, sodass die Autoren trotz unveränderter SERCA 2a Expression von einer verstärkten Aktivität dieser ausgehen (130).

In der mit Empagliflozin behandelten Sham-Kohorte kam es zu keiner Regulation der SERCA 2a, wobei auch in dieser Gruppe eine leichte verbesserte Pumpleistung des Herzens nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich kam es nach iv-Applikation von Empagliflozin bei gesunden Ratten zu einer Kontraktilitätssteigerung. Möglicherweise lässt sich die Hochregulation von SERCA 2a bei mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkttieren durch eine Beeinflussung weitere Faktoren erklären, auf die noch genauer eingegangen werden.

4.3 Beeinflussung des kardialen Remodelings bei Empagliflozin-Gabe

4.3.1 Wirkung von Empagliflozin auf Fibrose und Nekroptose

TGF- β 1 aktiviert die Smad-Signal Kaskade und beeinflusst dadurch die kardiale Fibrosebildung (21, 22). In Folge eines Myokardinfarktes wurde in unterschiedlichen Tiermodellen eine Hochregulation von TGF- β 1 beobachtet – deren höchstes Expressionslevel im Infarktbereich am Tag 7 auffiel (21, 22, 24, 109). Dieses Ergebnis konnten wir ebenfalls im Western Blot des linken Ventrikels nachweisen. In der unbehandelten Myokardinfarkt-Kohorte kam es dabei zu einer vermehrten Expression von TGF- β 1 im Vergleich zur Sham-Gruppe. Auch Smad 2 war in unserem Experiment, wenn auch nicht signifikant, bei den Myokardinfarkttieren erhöht. Es zeigten sich keine Veränderung der Regulation bei Empagliflozin-Gabe. Daraus lässt sich schließen, dass Empagliflozin 7 Tage nach Myokardinfarkt keinen Einfluss auf TGF- β 1 bzw. Smad 2 hat und über diese Kaskade nicht die Fibrosebildung beeinflusst.

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist noch nicht untersucht, ob SGLT2 Inhibitoren eine Auswirkung auf die Nekroptose haben. Diese spezifische Art der programmierten Nekrose ist unter anderem im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben worden (25). Sie führte bei Knockout-Tieren nach Ischämie-Reperfusion-Versuchen oder Myokardinfarkt zu einer erhaltenden bzw. verbesserten kardialen Pumpfunktion (25-27, 131).

MLKL ist letztendlich das ausführende Protein der Nekroptose und damit ein sehr spezifischer Marker (25). Im Western Blot ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sham- und Myokardinfarkt-Gruppe zeigen, ebenso wenig nach Empagliflozin-Behandlung. Daraus lässt sich schließen, dass die Nekroptose als Form des Zelluntergangs in unserem Modell wahrscheinlich nicht im großen Ausmaß stattgefunden hat.

Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass es zu keiner Beeinflussung des kardialen Remodelings durch Nekroptose oder TGF- β vermittelte Fibrose nach 7-tägiger Empagliflozin-Behandlung kommt.

4.3.2 Regulation der MMP-9 Aktivität durch Empagliflozin

In Folge eines Myokardinfarktes kommt es zu einem kardialen Remodeling, an dem verschiedene Metalloproteasen beteiligt sind (13, 14). Diese haben Einfluss auf die postmyokardiale inflammatorische Antwort und den Abbau der Extrazellulär Membran (13, 14).

Eine erhöhte Konzentration von MMP9 konnte innerhalb der ersten Tage nach Myokardinfarkt bei Patienten beobachtet werden (13, 16). Dabei litten Patienten, die zum Zeitpunkt eines Myokardinfarktes eine hohe MMP9-Expression aufwiesen, im weiteren Verlauf häufiger an einer Herzinsuffizienz (17). Eine Überexpression von MMP9 innerhalb der akuten Phase eines Myokardinfarktes scheint daher mit einem schlechteren Remodeling in Verbindung zu stehen.

In unserem Experiment wiesen wir im Western Blot eine erhöhte MMP9 Expression 7 Tage infolge eines Infarktes nach, die durch Empagliflozin-Gabe herunterreguliert wurde. Die Herunterregulation von MMP9 trat dabei unabhängig von seinem Gegenspieler TIMP 1 auf (7). Unsere Arbeitsgruppe konnte zusätzlich bei neonatalen Ratten Kardiomyozyten (Zelllinie H9c2) nach Empagliflozin-Behandlung eine verringerte Aktivität der IL1 α stimulierten MMP9 nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass Empagliflozin eine hemmende Wirkung auf MMP9 hat.

Den Einfluss von SGLT2 Inhibitoren auf die Aktivität von MMPs ist bis jetzt noch nicht bei Myokardinfarkt beschrieben worden. Im Rahmen von Tierexperimenten konnte in Atherosklerose-Modellen bei SGLT2 Inhibitor Gabe trotz erhöhtem TIMP1/MMP2 Ratio, keine Veränderung der MMP9 und MMP2 Expression in der Aorta gemessen werden (132, 133). In suprarenalen Aortenaneurysmen kam es dagegen zu einer TIMP1 Hochregulation und einem verringerten MMP2 und MMP9 Level (134).

Nicht geklärt ist bis jetzt, wie SGLT2-Inhibitoren MMPs beeinflussen – ob es beispielsweise zu einer direkten Hemmung von MMPs kommt oder durch eine Beeinflussung der inflammatorischen Prozesse und Zellen eine verringerte Freisetzung folgt. Ebenfalls ein Erklärungsansatz für die MMP9 Regulation stellt ein Zusammenhang zwischen der NHE und MMP9 Expression da, der in einem anderen Kontext in verschiedenen Experimenten schon gesehen werden konnte. Diese befassten sich vor allem mit der Invasion bzw. Metastasierung von Karzinomen (135-139). Allgemein wurde eine Hochregulation von NHE in verschiedenen Tumoren gezeigt (136, 138, 140, 141). Dabei scheint NHE für die Mikroumgebung innerhalb eines Tumors von entscheidender Bedeutung zu sein, indem NHE eine extrazelluläre Ansäuerung und eine intrazelluläre Alkalisie-

rung vermittelt (142). Es wird vermutet, dass der saure pH Proteasen aktiviert, darunter auch Metalloproteasen (142, 143). In Zellkulturen wurde der Einfluss einer NHE1 Inhibition auf verschiedene Tumorzellen untersucht (135-139). Insgesamt fiel neben der Herunterregulation von NHE, auch eine verminderte Aktivität und Expression von MMP9 auf (135-139). Da Empagliflozin NHE hemmt, kann man vermuten, dass es dadurch zu der herunterregulierten MMP9 Expression kommt. Dies würde auch erklären, warum die MMP9 Regulation in unserem Experiment ohne Beeinflussung durch TIMP1 abgelaufen ist. Auch TGF- β , das in ständiger Wechselwirkung mit Metalloproteasen steht, scheint hier keinen Einfluss auf die MMP9 Expression zu haben (20).

Eine verringerte MMP9 Expression hat nicht nur positive Auswirkung auf das Remodeling nach Myokardinfarkt, sondern beeinflusst ebenfalls die Kontraktilität des Myokards. Priyanka et al. zeigten, dass ein MMP9 Knockdown bei diabetischen Mäusen zu einer vermehrten SERCA2a Expression und einem verbesserten Calciumtransport führt (144). Die Autoren der Studie vermuteten, dass es durch den MMP9 Knockout nicht weiter zu einer MMP9 vermittelten Spaltung von β 2-Rezeptoren kommt (144). β 2-Rezeptoren aktivieren eine Kaskade, die ein vermehrtes SERCA2a Level hervorruft und die Kontraktilität der Kardiomyozyten beeinflusst (144). Überträgt man diesen Gedankenansatz auf die Ergebnisse unserer Studie, so könnte die Herunterregulation von MMP9 nach Empagliflozin-Gabe im Zusammenhang mit der Hochregulation von SERCA2a bei Infarktieren stehen und so die verbesserte kardiale Leistung erklären.

Die Ergebnisse unserer Studie legen nahe, dass Empagliflozin eine Herunterregulation von NHE1 und MMP9 und eine Hochregulation von SERCA2a im linken Ventrikel nach Myokardinfarkt verursacht. Ob Empagliflozin durch Inhibition von NHE1 MMP9 herunterreguliert, was wiederum zu einer vermehrten SERCA2a Expression und Kontraktilität führen könnte, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

4.4 Zusammenfassung: Neuerkenntnisse zu dem kardialen Wirkmechanismus von Empagliflozin

Empagliflozin verursachte nach iv.-Applikation und innerhalb der Frühphase nach Myokardinfarkt einen Anstieg der Kontraktilität bei normoglykämischen Wistar Ratten. Es kam dabei vor allem zu einer verstärkten systolischen Kraft ohne signifikante Beeinflussung der diastolischen Herzfunktion. Weder nach iv.-Gabe, noch nach 7 tägiger p.o. Behandlung konnte eine Veränderung der Gefäßelastizität durch den SGLT2 Inhibitor dokumentiert werden. Die Expression der Fibrose und Nekroptose regulierenden Proteine im Herzen blieben unbeeinflusst. Dagegen konnte nach Myokardinfarkt eine kardiale Regulation von NHE1, SERCA2a und MMP9 beobachtet werden, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Kontraktilitätssteigerung steht. Insgesamt konnten wir die kardiale Wirkung von Empagliflozin schon bei Gabe einer minimalen Dosierung von 1 mg / kg nachweisen.

Die beobachtete Regulation der kardialen Proteinexpression lässt erste Rückschlüsse auf einen möglichen Wirkmechanismus von Empagliflozin zu:

Die Hemmung von NHE1 durch den SGLT2 Inhibitor führt zu einem geringeren Natrium- und Calciumlevel im Zytosol und verhindert damit wahrscheinlich eine ischämiebedingte akute Natrium- und Calciumüberladung (105). Die Vermeidung einer vermehrten Calciumansammlung im Zytosol ist dabei von großer Bedeutung, da eine zu starke Calciumüberladung Zelltod verursacht. Durch eine Hochregulation von SERCA 2a kann zusätzlich eine größere Menge an intrazellulärem Calcium in das Sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen werden, wodurch bei einem darauffolgenden Aktionspotential eine erhöhte Calciumamplitude freigesetzt wird und es zu einer verstärkten Kontraktion kommt (33, 41). Dies würde auch die beobachtete inotrope Wirkung nach Empagliflozin-Gabe erklären.

Die Hochregulation von SERCA 2a wurde nur bei mit Empagliflozin behandelten Myokardinfarkt Tieren beobachtet. Erklären lässt sich dies möglicherweise durch die Herunterregulation von MMP9, das in einer anderen Studie eine hemmende Wirkung auf SERCA 2a hatte (144). MMP9 ist normalerweise nach Myokardinfarkt hochreguliert und kann durch NHE1 aktiviert werden (13, 16, 142, 143). Die bei Empagliflozin beobachtete NHE1 Hemmung, die bei unseren Experimenten verstärkt nach Myokardinfarkt auftrat, hat so vielleicht einen regulativen Einfluss auf MMP9 und SERCA 2a.

Die von uns präsentierten Daten, stellen eine Grundlage für weitere Forschungsansätze dar und geben dabei Hinweise auf den kardialen Wirkmechanismus von Empagliflozin. Um genauere Aussagen zu der Wirkung von Empagliflozin auf zellulärer Ebene zu treffen, müssen jedoch weitere Experimente durchgeführt werden. Hierbei sollte ein Fokus auf die Interaktion zwischen den kardialen Transportern, Pumpen und Kanälen gelegt werden - beispielsweise durch Untersuchung von Kardiomyozyten mittels Patch-Clamp-Technik. Auch die Empagliflozin vermittelte Beeinflussung des intrazellulären pHs und der dabei führenden Ionengradienten müssen noch genauer erforscht werden.

In den aktuellen klinischen Studien zur Evaluation der kardialen Wirkung des SGLT-Inhibitors bei Nicht-Diabetikern wird eine Dosierung von 10mg verwendet (83-85). Jedoch gibt es keine klinischen Studien darüber, ab welcher Dosierung Empagliflozin einen kardialen Effekt bei Menschen hat. In unseren Experimenten konnten wir - wenn auch in einem Ratten-Modell - zeigen, dass eine geringe Dosis ausreichend ist, um eine kardiale Wirkung zu erzielen. Sollte es in Zukunft zu einer regulären Behandlung von Nicht-Diabetikern mit SGLT2 Inhibitoren kommen, wäre dies eine wichtige Fragestellung, um mögliche, dosisabhängige Nebenwirkungen zu minimieren.

Insgesamt handelt es sich bei Empagliflozin um ein Medikament, das nicht nur in der Diabetologie, sondern auch in der Kardiologie einen wichtigen Stellenwert einnimmt - dessen kardialer Wirkmechanismus jedoch noch genauer erforscht werden muss.

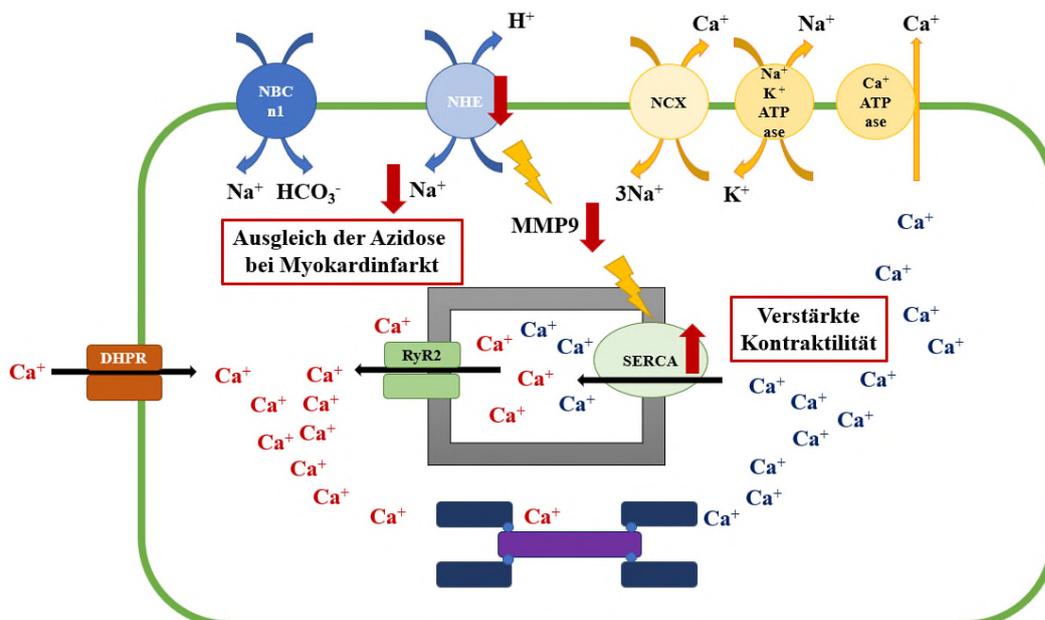


Abbildung 14: möglicher Wirkmechanismus von Empagliflozin bei Myokardinfarkt

5 Quellen

1. Markewitz A, Lehner A, Diegeler A, Zapf A, Welz A, Frerker C, Schlensak C, Fleck E, Wienbergen H, Burger H, Völler H, Möllmann H, Nef H, Katus HA, Gummert J, Cremer J, Falk J, Heinemann M, Werner N, Frey N, Roeder N, Dewald O, Sommer P, Hambrecht R, Ensminger S, Gielen S, Dittrich S, Deneke T, Eschenhagen T, Meinertz T, Friede T, Landmesser U, Laufs U, Weinbrenner S, U H. Deutscher Herzbericht 2018. Deutscher Herzbericht. 2018.
2. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mähönen M, Niemelä M, Haffner SM, Pyörälä K, Tuomilehto J. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care*. 1998;21(1):69-75.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD, for the Universal Definition of Myocardial Infarction EGobotJESoCACoCAHAWHFTF. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):e618-e51.
4. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013;368(21):2004-13.
5. Ibáñez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevanos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2017;70(12):1082.
6. Torabi A, Cleland JG, Rigby AS, Sherwi N. Development and course of heart failure after a myocardial infarction in younger and older people. *J Geriatr Cardiol*. 2014;11(1):1-12.
7. Mouton AJ, Rivera OJ, Lindsey ML. Myocardial infarction remodeling that progresses to heart failure: a signaling misunderstanding. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(1):H71-h9.
8. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2000;101(25):2981-8.
9. Ong SB, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2018;186:73-87.
10. Abbate A, Trankle CR, Buckley LF, Lipinski MJ, Appleton D, Kadariya D, Canada JM, Carbone S, Roberts CS, Abouzaki N, Melchior R, Christopher S, Turlington J, Mueller G, Garnett J, Thomas C, Markley R, Wohlford GF, Puckett L, Medina de Chazal H, Chiabrando JG, Bressi E, Del Buono MG, Schatz A, Vo C, Dixon DL, Biondi-Zoccai GG, Kontos MC, Van Tassell BW. Interleukin-1 Blockade Inhibits the Acute Inflammatory Response in Patients With ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 2020;9(5):e014941.
11. Tardif JC, Tanguay JF, Wright SR, Duchatelle V, Petroni T, Grégoire JC, Ibrahim R, Heinonen TM, Robb S, Bertrand OF, Cournoyer D, Johnson D, Mann J, Guertin MC, L'Allier PL. Effects of the P-selectin antagonist inclacumab on myocardial damage after percutaneous coronary intervention for non-ST-segment elevation myocardial infarction: results of the SELECT-ACS trial. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(20):2048-55.
12. Kleveland O, Kunszt G, Bratlie M, Ueland T, Broch K, Holte E, Michelsen AE, Bendz B, Amundsen BH, Espevik T, Aakhus S, Damås JK, Aukrust P, Wiseth R, Gullestad L. Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and

- troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur Heart J*. 2016;37(30):2406-13.
13. DeLeon-Pennell KY, Altara R, Yabluchanskiy A, Modesti A, Lindsey ML. The circular relationship between matrix metalloproteinase-9 and inflammation following myocardial infarction. *IUBMB Life*. 2015;67(8):611-8.
 14. Lindsey ML, Iyer RP, Jung M, DeLeon-Pennell KY, Ma Y. Matrix metalloproteinases as input and output signals for post-myocardial infarction remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;91:134-40.
 15. Phatharajaree W, Phrommintikul A, Chattipakorn N. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction. *Can J Cardiol*. 2007;23(9):727-33.
 16. Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM, Thompson MM. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail*. 2004;10(4):328-33.
 17. Wagner DR, Delagardelle C, Ernens I, Rouy D, Vaillant M, Beissel J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *J Card Fail*. 2006;12(1):66-72.
 18. Iyer RP, de Castro Bras LE, Patterson NL, Bhowmick M, Flynn ER, Asher M, Cannon PL, DeLeon-Pennell KY, Fields GB, Lindsey ML. Early matrix metalloproteinase-9 inhibition post-myocardial infarction worsens cardiac dysfunction by delaying inflammation resolution. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;100:109-17.
 19. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2000;106(1):55-62.
 20. Iyer RP, Jung M, Lindsey ML. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(1):H190-8.
 21. Hanna A, Frangogiannis NG. The Role of the TGF-beta Superfamily in Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:140.
 22. Liu G, Ma C, Yang H, Zhang PY. Transforming growth factor beta and its role in heart disease. *Exp Ther Med*. 2017;13(5):2123-8.
 23. Frantz S, Hu K, Adamek A, Wolf J, Sallam A, Kg Maier S, Lonning S, Ling H, Ertl G, Bauersachs J. Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology*. 2008;103(5):485-92.
 24. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, Kubota T, Takeshita A. Inhibition of TGF- β signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovascular Research*. 2004;64(3):526-35.
 25. Zhe-Wei S, Li-Sha G, Yue-Chun L. The Role of Necroptosis in Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol*. 2018;9:721.
 26. Johnston A, Wang Z. Necroptosis: MLKL Polymerization. *J Nat Sci*. 2018;4(7).
 27. Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M, Gautheron J, Roderburg C, Borg N, Reisinger F, Hippe HJ, Linkermann A, Wolf MJ, Rose-John S, Lullmann-Rauch R, Adam D, Flogel U, Heikenwalder M, Luedde T, Frey N. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2014;103(2):206-16.
 28. Goraya TY, Leibson CL, Palumbo PJ, Weston SA, Killian JM, Pfeifer EA, Jacobsen SJ, Frye RL, Roger VL. Coronary atherosclerosis in diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(5):946-53.

29. Juutilainen A, Kortelainen S, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Gender difference in the impact of type 2 diabetes on coronary heart disease risk. *Diabetes Care*. 2004;27(12):2898-904.
30. Arenja N, Mueller C, Ehl NF, Brinkert M, Roost K, Reichlin T, Sou SM, Hochgruber T, Osswald S, Zellweger MJ. Prevalence, extent, and independent predictors of silent myocardial infarction. *Am J Med*. 2013;126(6):515-22.
31. Carrabba N, Valenti R, Parodi G, Santoro GM, Antoniucci D. Left ventricular remodeling and heart failure in diabetic patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;110(14):1974-9.
32. Eguchi M, Xu G, Li RK, Sweeney G. Diabetes influences cardiac extracellular matrix remodelling after myocardial infarction and subsequent development of cardiac dysfunction. *J Cell Mol Med*. 2012;16(12):2925-34.
33. Neef S, Maier LS. Novel aspects of excitation-contraction coupling in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(4):360.
34. Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskyi A, Bossuyt J, Bridge JH, Chen-Izu Y, Clancy CE, Edwards A, Goldhaber J, Kaplan J, Lingrel JB, Pavlovic D, Philipson K, Sipido KR, Xie ZJ. Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *J Physiol*. 2015;593(6):1361-82.
35. Garcarena CD, Youm JB, Swietach P, Vaughan-Jones RD. H⁽⁺⁾-activated Na⁽⁺⁾ influx in the ventricular myocyte couples Ca⁽²⁺⁾-signalling to intracellular pH. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;61:51-9.
36. Vaughan-Jones RD, Villafuerte FC, Swietach P, Yamamoto T, Rossini A, Spitzer KW. pH-Regulated Na⁽⁺⁾ influx into the mammalian ventricular myocyte: the relative role of Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange and Na⁽⁺⁾-HCO⁻ Co-transport. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006;17 Suppl 1:S134-S40.
37. Pott C, Eckardt L, Goldhaber JJ. Triple threat: the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the pathophysiology of cardiac arrhythmia, ischemia and heart failure. *Curr Drug Targets*. 2011;12(5):737-47.
38. Szepesi J, Acsai K, Sebok Z, Prorok J, Pollesello P, Levijoki J, Papp JG, Varro A, Toth A. Comparison of the efficiency of Na⁺/Ca²⁺ exchanger or Na⁺/H⁺ exchanger inhibition and their combination in reducing coronary reperfusion-induced arrhythmias. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(2):215-26.
39. Chen S, Li S. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit*. 2012;18(11):Ra161-5.
40. Roe AT, Ruud M, Espe EK, Manfra O, Longobardi S, Aronsen JM, Norden ES, Husebye T, Kolstad TRS, Cataliotti A, Christensen G, Sejersted OM, Niederer SA, Andersen GO, Sjaastad I, Louch WE. Regional diastolic dysfunction in post-infarction heart failure: role of local mechanical load and SERCA expression. *Cardiovasc Res*. 2019;115(4):752-64.
41. Gorski PA, Ceholski DK, Hajjar RJ. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure--a rational approach for disease treatment. *Cell Metab*. 2015;21(2):183-94.
42. Lyon AR, Bannister ML, Collins T, Pearce E, Sepehrpour AH, Dubb SS, Garcia E, O'Gara P, Liang L, Kohlbrenner E, Hajjar RJ, Peters NS, Poole-Wilson PA, Macleod KT, Harding SE. SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4(3):362-72.
43. Motloch LJ, Cacheux M, Ishikawa K, Xie C, Hu J, Agüero J, Fish KM, Hajjar RJ, Akar FG. Primary Effect of SERCA 2a Gene Transfer on Conduction Reserve in Chronic Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(18):e009598.
44. Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR, Pogoda JM, Rudy JJ, Zsebo KM. Calcium upregulation by

- percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet*. 2016;387(10024):1178-86.
45. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, Guerrero JL, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(2):793-8.
 46. Seiler PU, Stypmann J, Breithardt G, Schulze-Bahr E. Real-time RT-PCR for gene expression profiling in blood of heart failure patients-a pilot study: gene expression in blood of heart failure patients. *Basic Res Cardiol*. 2004;99(3):230-8.
 47. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*. 1999;99(5):641-8.
 48. Piacentino V, 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*. 2003;92(6):651-8.
 49. Magee WP, Deshmukh G, Deninno MP, Sutt JC, Chapman JG, Tracey WR. Differing cardioprotective efficacy of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(3):H903-10.
 50. Kaljusto ML, Rutkovsky A, Stenslokken KO, Vaage J. Postconditioning in mouse hearts is inhibited by blocking the reverse mode of the sodium-calcium exchanger. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010;10(5):743-8.
 51. Komuro I, Ohtsuka M. Forefront of Na⁺/Ca²⁺ exchanger studies: role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger--lessons from knockout mice. *J Pharmacol Sci*. 2004;96(1):23-6.
 52. Shi X, O'Neill MM, MacDonnell S, Brookes PS, Yan C, Berk BC. The RSK Inhibitor BIX02565 Limits Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2016;21(2):177-86.
 53. Chen L, Chen CX, Gan XT, Beier N, Scholz W, Karmazyn M. Inhibition and reversal of myocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure by NHE-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(1):H381-7.
 54. Oh KS, Seo HW, Yi KY, Lee S, Yoo SE, Lee BH. Effects of KR-33028, a novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor, on ischemia and reperfusion-induced myocardial infarction in rats and dogs. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007;21(3):255-63.
 55. Kingma JG. Inhibition of Na. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2018;23(3):254-69.
 56. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linssen G, Tebbe U, Schröder R, Tiemann R, Machnig T, Neuhaus KL, Investigators E. The Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(6):1644-50.
 57. Fantinelli JC, Orłowski A, Aiello EA, Mosca SM. The electrogenic cardiac sodium bicarbonate co-transporter (NBCe1) contributes to the reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 2014;23(4):224-30.
 58. Ciocci Pardo A, González Arbeláez LF, Fantinelli JC, Aiello EA, Mosca SM. Calcineurin/P38MAPK/HSP27-dependent pathways are involved in the attenuation of postischemic mitochondrial injury afforded by sodium bicarbonate co-transporter (NBCe1) inhibition. *Biochem Pharmacol*. 2019;161:26-36.
 59. Chen Z, Chen L, Chen K, Lin H, Shen M, Chen L, Zhu H, Zhu Y, Wang Q, Xi F, Huang X, Wang Y, Liao W, Bin J, Asakura M, Liu J, Kitakaze M, Liao Y. Overexpression of Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter contributes to the exacerbation of cardiac remodeling in mice with

- myocardial infarction by increasing intracellular calcium overload. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(3):165623.
60. Vairamani K, Prasad V, Wang Y, Huang W, Chen Y, Medvedovic M, Lorenz JN, Shull GE. NBCe1 Na(+)-HCO₃(-) cotransporter ablation causes reduced apoptosis following cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo. *World J Cardiol.* 2018;10(9):97-109.
 61. Pandey J, Tamrakar AK. SGLT2 inhibitors for the treatment of diabetes: a patent review (2013-2018). *Expert Opin Ther Pat.* 2019;29(5):369-84.
 62. Vrhovac I, Balen Eror D, Klessen D, Burger C, Breljak D, Kraus O, Radović N, Jadrijević S, Aleksic I, Walles T, Sauvant C, Sabolić I, Koepsell H. Localizations of Na(+)-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. *Pflugers Arch.* 2015;467(9):1881-98.
 63. Garcia-Ropero A, Badimon JJ, Santos-Gallego CG. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of SGLT2 inhibitors for type 2 diabetes mellitus: the latest developments. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018;14(12):1287-302.
 64. Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE, Bakker RA, Mark M, Klein T, Eickelmann P. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14(1):83-90.
 65. Katsuno K, Fujimori Y, Takemura Y, Hiratochi M, Itoh F, Komatsu Y, Fujikura H, Isaji M. Sergliflozin, a novel selective inhibitor of low-affinity sodium glucose cotransporter (SGLT2), validates the critical role of SGLT2 in renal glucose reabsorption and modulates plasma glucose level. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320(1):323-30.
 66. Scheen AJ. Pharmacodynamics, efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs.* 2015;75(1):33-59.
 67. Scheen AJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of empagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(3):213-25.
 68. Heise T, Seman L, Macha S, Jones P, Marquart A, Pinnetti S, Woerle HJ, Dugi K. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of multiple rising doses of empagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Ther.* 2013;4(2):331-45.
 69. Seman L, Macha S, Nehmiz G, Simons G, Ren B, Pinnetti S, Woerle HJ, Dugi K. Empagliflozin (BI 10773), a Potent and Selective SGLT2 Inhibitor, Induces Dose-Dependent Glucosuria in Healthy Subjects. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2013;2(2):152-61.
 70. Frampton JE. Empagliflozin: A Review in Type 2 Diabetes. *Drugs.* 2018;78(10):1037-48.
 71. Vallon V, Thomson SC. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition. *Diabetologia.* 2017;60(2):215-25.
 72. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondun N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews DR. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2017;377(7):644-57.
 73. Bersoff-Matcha SJ, Chamberlain C, Cao C, Kortepeter C, Chong WH. Fournier Gangrene Associated With Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors: A Review of Spontaneous Postmarketing Cases. *Ann Intern Med.* 2019;170(11):764-9.
 74. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, Federici M, Filippatos G, Grobbee DE, Hansen TB, Huikuri HV, Johansson I, Jüni P, Lettino M, Marx N, Mellbin LG, Östgren CJ, Rocca B, Roffi M, Sattar N, Seferović PM, Sousa-Uva M, Valensi P, Wheeler DC, Group ESD. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J.* 2019.
 75. Zinman B, Lachin JM, Inzucchi SE. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016;374(11):1094.

76. Sinha B, Ghosal S. Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors (SGLT-2i) Reduce Hospitalization for Heart Failure Only and Have No Effect on Atherosclerotic Cardiovascular Events: A Meta-Analysis. *Diabetes Ther.* 2019;10(3):891-9.
77. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Furtado RHM, Bhatt DL, Leiter LA, McGuire DK, Wilding JPH, Sabatine MS. 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. *Lancet.* 2019;393(10166):31-9.
78. Tikkanen I, Narko K, Zeller C, Green A, Salsali A, Broedl UC, Woerle HJ, Investigators E-RB. Empagliflozin reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes and hypertension. *Diabetes Care.* 2015;38(3):420-8.
79. Filippatos TD, Lontos A, Papakitsou I, Elisaf MS. SGLT2 inhibitors and cardioprotection: a matter of debate and multiple hypotheses. *Postgrad Med.* 2019;131(2):82-8.
80. Chilton R, Tikkanen I, Cannon CP, Crowe S, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2015;17(12):1180-93.
81. Pabel S, Wagner S, Bollenberg H, Bengel P, Kovács Á, Schach C, Tirilomis P, Muströph J, Renner A, Gummert J, Fischer T, Van Linthout S, Tschöpe C, Streckfuss-Bömeke K, Hasenfuss G, Maier LS, Hamdani N, Sossalla S. Empagliflozin directly improves diastolic function in human heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2018;20(12):1690-700.
82. Connelly KA, Zhang Y, Visram A, Advani A, Batchu SN, Desjardins JF, Thai K, Gilbert RE. Empagliflozin Improves Diastolic Function in a Nondiabetic Rodent Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Basic Transl Sci.* 2019;4(1):27-37.
83. Packer M, Butler J, Filippatos GS, Jamal W, Salsali A, Schnee J, Kimura K, Zeller C, George J, Brueckmann M, Anker SD, Zannad F, Committees EM-RT, Investigators. Evaluation of the effect of sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin on morbidity and mortality of patients with chronic heart failure and a reduced ejection fraction: rationale for and design of the EMPEROR-Reduced trial. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(10):1270-8.
84. Anker SD, Butler J, Filippatos GS, Jamal W, Salsali A, Schnee J, Kimura K, Zeller C, George J, Brueckmann M, Zannad F, Packer M, Committees EM-PT, Investigators. Evaluation of the effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure and a preserved ejection fraction: rationale for and design of the EMPEROR-Preserved Trial. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(10):1279-87.
85. Santos-Gallego CG, Garcia-Ropero A, Mancini D, Pinney SP, Contreras JP, Fergus I, Abascal V, Moreno P, Atallah-Lajam F, Tamler R, Lala A, Sanz J, Fuster V, Badimon JJ. Rationale and Design of the EMPA-TROPISM Trial (ATRU-4): Are the "Cardiac Benefits" of Empagliflozin Independent of its Hypoglycemic Activity? *Cardiovasc Drugs Ther.* 2019;33(1):87-95.
86. Banerjee SK, McGaffin KR, Pastor-Soler NM, Ahmad F. SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. *Cardiovasc Res.* 2009;84(1):111-8.
87. Byrne NJ, Parajuli N, Lvasseur JL, Boisvenue J, Beker DL, Masson G, Fedak PWM, Verma S, Dyck JRB. Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an Experimental Model of Pressure Overload-Induced Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci.* 2017;2(4):347-54.
88. Lim VG, Bell RM, Arjun S, Kolatsi-Joannou M, Long DA, Yellon DM. SGLT2 Inhibitor, Canagliflozin, Attenuates Myocardial Infarction in the Diabetic and Nondiabetic Heart. *JACC Basic Transl Sci.* 2019;4(1):15-26.
89. Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, Ishikawa K, Watanabe S, Picatoste B, Flores E, Garcia-Ropero A, Sanz J, Hajjar RJ, Fuster V, Badimon JJ. Empagliflozin

- Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(15):1931-44.
90. Krasnova M, Kulikov A, Okovityi S, Ivkin D, Karpov A, Kaschina E, Smirnov A. Comparative efficacy of empagliflozin and drugs of baseline therapy in post-infarct heart failure in normoglycemic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020.
 91. Oshima H, Miki T, Kuno A, Mizuno M, Sato T, Tanno M, Yano T, Nakata K, Kimura Y, Abe K, Ohwada W, Miura T. Empagliflozin, an SGLT2 Inhibitor, Reduced the Mortality Rate after Acute Myocardial Infarction with Modification of Cardiac Metabolomes and Antioxidants in Diabetic Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;368(3):524-34.
 92. Yurista SR, Silljé HHW, Oberdorf-Maass SU, Schouten EM, Pavez Giani MG, Hillebrands JL, van Goor H, van Veldhuisen DJ, de Boer RA, Westenbrink BD. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(7):862-73.
 93. Lee HC, Shiou YL, Jhuo SJ, Chang CY, Liu PL, Jhuang WJ, Dai ZK, Chen WY, Chen YF, Lee AS. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin attenuates cardiac fibrosis and improves ventricular hemodynamics in hypertensive heart failure rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):45.
 94. Zhang N, Feng B, Ma X, Sun K, Xu G, Zhou Y. Dapagliflozin improves left ventricular remodeling and aorta sympathetic tone in a pig model of heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):107.
 95. Connelly KA, Zhang Y, Desjardins JF, Nghiem L, Visram A, Batchu SN, Yerra VG, Kabir G, Thai K, Advani A, Gilbert RE. Load-independent effects of empagliflozin contribute to improved cardiac function in experimental heart failure with reduced ejection fraction. *Cardiovasc Diabetol*. 2020;19(1):13.
 96. Hsu JC, Wang CY, Su MM, Lin LY, Yang WS. Effect of Empagliflozin on Cardiac Function, Adiposity, and Diffuse Fibrosis in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci Rep*. 2019;9(1):15348.
 97. Cohen ND, Gutman SJ, Briganti EM, Taylor AJ. Effects of empagliflozin treatment on cardiac function and structure in patients with type 2 diabetes: a cardiac magnetic resonance study. *Intern Med J*. 2019;49(8):1006-10.
 98. Polidori D, Iijima H, Goda M, Maruyama N, Inagaki N, Crawford PA. Intra- and inter-subject variability for increases in serum ketone bodies in patients with type 2 diabetes treated with the sodium glucose co-transporter 2 inhibitor canagliflozin. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(5):1321-6.
 99. Daniele G, Xiong J, Solis-Herrera C, Merovci A, Eldor R, Tripathy D, DeFronzo RA, Norton L, Abdul-Ghani M. Dapagliflozin Enhances Fat Oxidation and Ketone Production in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2016;39(11):2036-41.
 100. Abdul Kadir A, Clarke K, Evans RD. Cardiac ketone body metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(6):165739.
 101. Kim JH, Lee M, Kim SH, Kim SR, Lee BW, Kang ES, Cha BS, Cho JW, Lee YH. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors regulate ketone body metabolism via inter-organ crosstalk. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21(4):801-11.
 102. Moellmann J, Klinkhammer BM, Droste P, Kappel B, Haj-Yehia E, Maxeiner S, Artati A, Adamski J, Boor P, Schutt K, Lopaschuk GD, Verma S, Marx N, Lehrke M. Empagliflozin improves left ventricular diastolic function of db/db mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(8):165807.
 103. Abdurrachim D, Teo XQ, Woo CC, Chan WX, Lalic J, Lam CSP, Lee PTH. Empagliflozin reduces myocardial ketone utilization while preserving glucose utilization in diabetic

- hypertensive heart disease: A hyperpolarized (13) C magnetic resonance spectroscopy study. *Diabetes Obes Metab.* 2019;21(2):357-65.
104. Verma S, Rawat S, Ho KL, Wagg CS, Zhang L, Teoh H, Dyck JE, Uddin GM, Oudit GY, Mayoux E, Lehrke M, Marx N, Lopaschuk GD. Empagliflozin Increases Cardiac Energy Production in Diabetes: Novel Translational Insights Into the Heart Failure Benefits of SGLT2 Inhibitors. *JACC Basic Transl Sci.* 2018;3(5):575-87.
 105. Baartscheer A, Schumacher CA, Wüst RC, Fiolet JW, Stienen GJ, Coronel R, Zuurbier CJ. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na. *Diabetologia.* 2017;60(3):568-73.
 106. Uthman L, Baartscheer A, Schumacher CA, Fiolet JWT, Kuschma MC, Hollmann MW, Coronel R, Weber NC, Zuurbier CJ. Direct Cardiac Actions of Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Target Pathogenic Mechanisms Underlying Heart Failure in Diabetic Patients. *Front Physiol.* 2018;9:1575.
 107. Lee TI, Chen YC, Lin YK, Chung CC, Lu YY, Kao YH, Chen YJ. Empagliflozin Attenuates Myocardial Sodium and Calcium Dysregulation and Reverses Cardiac Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7).
 108. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation.* 2008;118(24):2523-32.
 109. Slavic S, Lauer D, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Grzesiak A, Trappiel M, Thone-Reineke C, Baulmann J, Paulis L, Kappert K, Kintscher U, Unger T, Kaschina E. Cannabinoid receptor 1 inhibition improves cardiac function and remodelling after myocardial infarction and in experimental metabolic syndrome. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(7):811-23.
 110. Yang CC, Chen YT, Wallace CG, Chen KH, Cheng BC, Sung PH, Li YC, Ko SF, Chang HW, Yip HK. Early administration of empagliflozin preserved heart function in cardiorenal syndrome in rat. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:658-70.
 111. Lauer D, Slavic S, Sommerfeld M, Thöne-Reineke C, Sharkovska Y, Hallberg A, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM, Kaschina E. Angiotensin type 2 receptor stimulation ameliorates left ventricular fibrosis and dysfunction via regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1/matrix metalloproteinase 9 axis and transforming growth factor β 1 in the rat heart. *Hypertension.* 2014;63(3):e60-7.
 112. Kalam K, Otahal P, Marwick TH. Prognostic implications of global LV dysfunction: a systematic review and meta-analysis of global longitudinal strain and ejection fraction. *Heart.* 2014;100(21):1673-80.
 113. Potter E, Marwick TH. Assessment of Left Ventricular Function by Echocardiography: The Case for Routinely Adding Global Longitudinal Strain to Ejection Fraction. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2018;11(2 Pt 1):260-74.
 114. Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, 3rd, Dokainish H, Edvardsen T, Flachskampf FA, Gillebert TC, Klein AL, Lancellotti P, Marino P, Oh JK, Alexandru Popescu B, Waggoner AD. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2016;17(12):1321-60.
 115. Westerhof N, Westerhof BE. A review of methods to determine the functional arterial parameters stiffness and resistance. *J Hypertens.* 2013;31(9):1769-75.
 116. Hayashi T, Nakayama Y, Tsumura K, Yoshimaru K, Ueda H. Reflection in the arterial system and the risk of coronary heart disease. *Am J Hypertens.* 2002;15(5):405-9.

117. Nichols WW, Denardo SJ, Wilkinson IB, McEniery CM, Cockcroft J, O'Rourke MF. Effects of arterial stiffness, pulse wave velocity, and wave reflections on the central aortic pressure waveform. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2008;10(4):295-303.
118. Aires R, Pimentel EB, Forechi L, Dantas EM, Mill JG. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rats with myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*. 2017;50(1):e5511.
119. Neeland IJ, McGuire DK, Chilton R, Crowe S, Lund SS, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE. Empagliflozin reduces body weight and indices of adipose distribution in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2016;13(2):119-26.
120. Monge Garcia MI, Jian Z, Settels JJ, Hunley C, Cecconi M, Hatib F, Pinsky MR. Performance comparison of ventricular and arterial dP/dtmax for assessing left ventricular systolic function during different experimental loading and contractile conditions. *Crit Care*. 2018;22(1):325.
121. Schertel ER. Assessment of left-ventricular function. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;46 Suppl 2:248-54.
122. Langer SF, Schmidt HD. Influence of preload on left ventricular relaxation in isolated ejecting hearts during myocardial depression. *Exp Clin Cardiol*. 2003;8(2):83-90.
123. Connelly KA, Zhang Y, Desjardins JF, Thai K, Gilbert RE. Dual inhibition of sodium-glucose linked cotransporters 1 and 2 exacerbates cardiac dysfunction following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):99.
124. Norton JM. Toward consistent definitions for preload and afterload. *Adv Physiol Educ*. 2001;25(1-4):53-61.
125. Langer SF, Schmidt HD. Different left ventricular relaxation parameters in isolated working rat and guinea pig hearts. Influence of preload, afterload, temperature, and isoprenaline. *Int J Card Imaging*. 1998;14(4):229-40.
126. Vaccarino V, Holford TR, Krumholz HM. Pulse pressure and risk for myocardial infarction and heart failure in the elderly. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;36(1):130-8.
127. Rajasekeran H, Lytvyn Y, Cherney DZ. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes: the emerging role of natriuresis. *Kidney Int*. 2016;89(3):524-6.
128. Qian N, Wang Y. Ketone body metabolism in diabetic and non-diabetic heart failure. *Heart Fail Rev*. 2019.
129. Uthman L, Baartscheer A, Bleijlevens B, Schumacher CA, Fiolet JWT, Koeman A, Jancev M, Hollmann MW, Weber NC, Coronel R, Zuurbier CJ. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na. *Diabetologia*. 2018;61(3):722-6.
130. Hammoudi N, Jeong D, Singh R, Farhat A, Komajda M, Mayoux E, Hajjar R, Lebeche D. Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017;31(3):233-46.
131. Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, den Ouden K, van Middelaar BJ, Doevendans PA, Sluijter JP. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(4):270.
132. Nasiri-Ansari N, Dimitriadis GK, Agrogiannis G, Perrea D, Kostakis ID, Kaltsas G, Papavassiliou AG, Randeve HS, Kassi E. Canagliflozin attenuates the progression of atherosclerosis and inflammation process in APOE knockout mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):106.
133. Dimitriadis GK, Nasiri-Ansari N, Agrogiannis G, Kostakis ID, Randeve MS, Nikiteas N, Patel VH, Kaltsas G, Papavassiliou AG, Randeve HS, Kassi E. Empagliflozin improves primary haemodynamic parameters and attenuates the development of atherosclerosis in high fat diet fed APOE knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;494:110487.

134. Ortega R, Collado A, Selles F, Gonzalez-Navarro H, Sanz MJ, Real JT, Piqueras L. SGLT-2 (Sodium-Glucose Cotransporter 2) Inhibition Reduces Ang II (Angiotensin II)-Induced Dissecting Abdominal Aortic Aneurysm in ApoE (Apolipoprotein E) Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(8):1614-28.
135. Lv C, Yang X, Yu B, Ma Q, Liu B, Liu Y. Blocking the Na⁺/H⁺ exchanger 1 with cariporide (HOE642) reduces the hypoxia-induced invasion of human tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(10):1206-10.
136. Zhu W, Carney KE, Pigott VM, Falgoust LM, Clark PA, Kuo JS, Sun D. Glioma-mediated microglial activation promotes glioma proliferation and migration: roles of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Carcinogenesis.* 2016;37(9):839-51.
137. Yang X, Wang D, Dong W, Song Z, Dou K. Inhibition of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1 by 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride reduces hypoxia-induced hepatocellular carcinoma invasion and motility. *Cancer Lett.* 2010;295(2):198-204.
138. Bai H, Chen G, Fang C, Yang X, Yu S, Hai C. Osteosarcoma cell proliferation and migration are partly regulated by redox-activated NHE-1. *J Clin Transl Res.* 2015;1(3):168-79.
139. Wang J, Xu H, Wang Q, Zhang H, Lin Y, Zhang H, Li Q, Pang T. CIAPIN1 targets Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1 to mediate MDA-MB-231 cells' metastasis through regulation of MMPs via ERK1/2 signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2015;333(1):60-72.
140. Xie R, Wang H, Jin H, Wen G, Tuo B, Xu J. NHE1 is upregulated in gastric cancer and regulates gastric cancer cell proliferation, migration and invasion. *Oncol Rep.* 2017;37(3):1451-60.
141. Xu J, Ji B, Wen G, Yang Y, Jin H, Liu X, Xie R, Song W, Song P, Dong H, Tuo B. Na⁺/H⁺ exchanger 1, Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 and calmodulin complex regulates interleukin 6-mediated cellular behavior of human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 2016;37(3):290-300.
142. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(10):786-95.
143. Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noel A, Franken F, Foidart JM, Baba M, Hata R, Miyazaki K, Tsukuda M. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 2005;280(12):10938-44.
144. Prathipati P, Metreveli N, Nandi SS, Tyagi SC, Mishra PK. Ablation of Matrix Metalloproteinase-9 Prevents Cardiomyocytes Contractile Dysfunction in Diabetics. *Front Physiol.* 2016;7:93.

Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jana Catherine Görg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die protektiven Effekte von Empagliflozin bei Myokardinfarkt im Rattenmodell“ und „The protective effects of Empagliflozin in myocardial infarction in a rat model“ selbstständig und ohne nicht offen-gelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Publikation

Goerg J, Sommerfeld M, Greiner B, Lauer D, Kulikov A, Ivkin D, Kintscher U, Okovityi S, Kaschina E. *Improvement of systolic heart function by empagliflozin post myocardial infarction in the rat: Impact of MMP9, NHE1 and SERCA2a*. Clinical Science, submitted Oktober 2020.

Beitrag im Einzelnen:

Frau PD Dr. med. Elena Kaschina übernahm die Planung und Aufsicht des Projektes. Unter Aufsicht von Frau PD Dr. med. Elena Kaschina führten wir gemeinsam die Myokardinfarkt-Operation und die Herzkatheter Untersuchung mit anschließender Organentnahme durch. Die Versorgung der Tiere, die Auswertung der Herzkatheter-Daten und das Erheben und Auswerten der Echokardiographie wurden vollständig von mir übernommen. Die molekularbiologischen Untersuchungen und die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgten gemeinsam mit Frau Manuela Sommerfeld. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten und die graphischen Darstellungen wurden von mir erstellt. Zusätzlich wurden die Zellkulturexperimente durch Frau Bettina Greiner durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Kaschina entstand das Manuskript.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Paper:

Goerg J, Sommerfeld M, Greiner B, Lauer D, Kulikov A, Ivkin D, Kintscher U, Okovityi S, Kaschina E. *Improvement of Systolic Heart Function by Low-Dose Empagliflozin in Post Myocardial Infarction Rat Model: Regulation of MMP9, NHE1 and SERCA2a*. Clinical Science, Manuscript submitted for publication on 26. October 2020.

Posterpräsentation:

- 15.10.2016 **Goerg J**, Lange C, Sommerfeld M, Frese J, Greiner A, Kintscher U, Unger T, Kaschina E. *Expression of necroptosis regulatory proteins in abdominal aortic aneurysm*. 20th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research, Poiano, Lake Garda, Italy, 2016.
- 02.09.2019 **Goerg J**, Sommerfeld M, Kintscher U, Lauer D, Kulikov A, Ivkin D, Okovityi S, Kaschina E, *P4466 Empagliflozin improves heart function after myocardial infarction in the rat*. European Society of Cardiology (ESC) Congress 2019 together with World Congress of Cardiology, Paris, France, 2019.

Vorträge:

- 19.10.2018 **Goerg J**, Hinterseher I, Lange C, Sommerfeld M, Frese J, Greiner A, Kintscher U, Dollinger P, Kaschina E. *Nekroptoseregulation in der Wand abdominalen Aortenaneurysmen*. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin, Bonn, Deutschland, 2018.
- 21/22.11.2019 **Goerg J**, Sommerfeld M, Kintscher U, Lauer D, Kulikov A, Ivkin D, Okovityi S, Kaschina E. *Improvement of cardiac function by Empagliflozin in a myocardial infarction rat model*. 43. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL® Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Berlin, Deutschland, 2019.

Stipendien / Auszeichnungen:

- 2019 Reisetipendium der „Freunde und Förderer der Berliner Charité“
ESC Congress 2019 together with World Congress of Cardiology - Paris, France
- 22.11.2019 Präsentation in der Best of Session: *Improvement of cardiac function by Empagliflozin in a myocardial infarction rat model.*
43. Wissenschaftlicher Kongresses der Deutschen Hochdruckliga

Published Abstracts:

Goerg J, Lange C, Sommerfeld M, Frese J, Greiner A, Kintscher U, Unger T, Kaschina E. *Expression of necroptosis regulatory proteins in abdominal aortic aneurysm.* High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention. 2016;23(4):405-21.

Goerg J, Sommerfeld M, Kintscher U, Lauer D, Kulikov A, Ivkin D, Okovityi S, Kaschina E. *P4466Empagliflozin improves heart function after myocardial infarction in the rat.* European Heart Journal. 2019;40(Supplement_1).

Goerg J, Sommerfeld M, Kintscher U, Lauer D, Kulikov A, Ivkin D, Okovityi S, Kaschina E. *Improvement of cardiac function by Empagliflozin in a myocardial infarction rat model.* Nieren- und Hochdruckkrankheiten. 2019;48(11):533-75.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Dr. Elena Kaschina. Frau Kaschina hat sich immer für mich Zeit genommen und in jeder Situation mir mit Rat und Tat zur Seite gestand. Sie ist eine exzellente Forscherin und die Art von Doktormutter, die man sich nur wünschen kann. Mit Ihrer Erfahrung und Weitsicht hat sie mich in die Welt der Forschung eingeführt und ich bin Ihr unglaublich dankbar für all die Möglichkeiten, die sie mir damit eröffnet hat.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch besonders bei Manuela Sommerfeld bedanken, die mir die Arbeit im Labor nähergebracht hat und mich immer unterstützt hat. Auch Christoph Lange, Bettina Greiner und Dilyara Lauer waren stets Kollegen, auf die ich mich immer verlassen konnte, genauso wie das Team der AG von Professor Ulrich Kintscher. Zusammen hat die Arbeit im Labor Spaß gemacht und ich werde immer in sehr guten Erinnerungen an die gemeinsame Zeit zurückdenken.

Ein weiterer Dank geht an meine Familie – insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder. Wenn immer es Phasen gab, in denen die Doktorarbeit nicht fertig werden wollte, haben sie mich motiviert.