

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

**Die Hemmung der Sphingosin-1-Phosphat (S1P) -Lyase
verbessert die post-ischämische kardiale Heilung via
S1P-Rezeptor 1**

Dissertation

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

vorgelegt von

Samantha Ahlbrecht

2022

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Buchbender

Publikationsverzeichnis:

1. Dannenberg, L., Zikeli, D., Benkhoff, M., **Ahlbrecht, S.**, Kelm, M., Levkau, B., & Polzin, A. (2020). *Targeting the human microbiome and its metabolite TMAO in cardiovascular prevention and therapy*. *Pharmacology and Therapeutics*, 213, 107584. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107584>
2. Petzold, T., Dannenberg, L., Thienel, M., **Ahlbrecht, S.**, Mourikis, P., Helten, C., M'Pembale, R., Achilles, A., Zikeli, D., Zhang, Z., Lüsebrink, E., Nicolai, L., Saleh, I., Jung, C., Gerdes, N., Hoffmann, T., Levkau, B., Hohlfeld, T., Zeus, T., . . . Polzin, A. (2020). *Response by Petzold et al to Letter Regarding Article, "Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of Fxa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1"*. *Circulation Research*, 126(10), e116-e117. <https://doi.org/10.1161/circresaha.120.316905>
3. Dannenberg, L., Afzal, S., Czychy, N., M'Pembale, R., Zako, S., Helten, C., Mourikis, P., Zikeli, D., **Ahlbrecht, S.**, Trojovsky, K., Benkhoff, M., Barcik, M., Wolff, G., Zeus, T., Kelm, M., & Polzin, A. (2021). *Risk prediction of bleeding and MACCE by PRECISE-DAPT score post-PCI*. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 33, 100750. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2021.100750>
4. Dannenberg, L., M'Pembale, R., Mourikis, P., Helten, C., Zako, S., **Ahlbrecht, S.**, Richter, H., Zikeli, D., Benkhoff, M., Huhn-Wientgen, R., Thienel, M., Levkau, B., Kelm, M., Petzold, T., & Polzin, A. (2021). *Rivaroxaban reduces thromboxane induced platelet aggregation - the forgotten Compass Arm?* *Platelets*, 1-3. <https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1905159>
5. Metzen, D., M'Pembale, R., Zako, S., Mourikis, P., Helten, C., Zikeli, D., Ahlbrecht, S., Ignatov, D., Ayhan, A., Huhn, R., Zeus, T., Levkau, B., Petzold, T., Kelm, M., Dannenberg, L., & Polzin, A. (2021). *Platelet reactivity is higher in e-cigarette vaping as compared to traditional smoking*. *International Journal of Cardiology*, 343, 146-148. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.09.005>
6. Naguib, D., Helten, C., Zako, S., Mourikis, P., M'Pembale, R., Trojovsky, K., Ahlbrecht, S., Zikeli, D., Zeus, T., Kelm, M., Dannenberg, L., & Polzin, A. (2021). *Aspirin I.V. Loading during Elective Percutaneous Coronary Intervention*. *Pharmacology*, 106(11-12), 682-686. <https://doi.org/10.1159/000517994>

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Polzin, A., Dannenberg, L., Benkhoff, M., Barcik, M., Keul, P., Ayhan, A., Weske, S., **Ahlbrecht, S.**, Trojovsky, K., Helten, C., Haberkorn, S., Flögel, U., Zeus, T., Müller, T., Gräler, M. H., Kelm, M., & Levkau, B. (2022). *Sphingosine-1-phosphate improves outcome of no-reflow acute myocardial infarction via sphingosine-1-phosphate receptor 1*. *ESC Heart Fail*. <https://doi.org/10.1002/ehf2.14176>

Zusammenfassung

Noch immer stellen kardiovaskuläre Erkrankungen, zu denen der akute Myokardinfarkt (AMI) zählt, die häufigste Todesursache weltweit dar. Die chronische Herzinsuffizienz als Folge des AMI ist mit einer hohen Mortalität assoziiert und ist zudem, bei der daraus resultierenden Erwerbsunfähigkeit, von hoher sozioökonomischer Bedeutung.

Bisher gibt es nur wenige therapeutische Optionen, die den Umbau von kardialen Muskelgewebe nach einer Ischämie positiv beeinflussen können. Bekanntermaßen können Ischämie-/Reperfusionsschäden durch eine Erhöhung der Konzentration des bioaktiven Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) reduziert werden. Dennoch ist dessen Einfluss auf den post-ischämischen kardialen Umbau bisher unbekannt.

Wir hypothetisieren, dass eine Erhöhung der S1P-Konzentration auch den post-ischämischen myokardialen Umbau, unabhängig von der Infarktgröße, verbessert.

Dazu haben wir einen AMI bei Mäusen hervorgerufen, indem der *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) durch eine transiente oder permanente Ligatur verschlossen wurde. Sieben Tage zuvor und während des gesamten Beobachtungszeitraumes erhielten die Mäuse den S1P-Lyase Inhibitor 4-Deoxypyridoxin (DOP), um den Abbau von S1P zu hemmen und somit dessen Konzentration zu erhöhen. Die kardiale Funktion, sowie der Heilungsprozess, wurden durch Histologie, transthorakale Echokardiografie, kardiale Magnetresonanztomographie, Immunhistochemie, Polymerase-Ketten-Reaktion und Durchflusszytometrie untersucht. Zudem wurden die Effekte zwischen Wildtyp-Mäusen und S1P-Rezeptor-1 (S1PR1) -defizienten Mäusen, die keinen S1PR1 auf Kardiomyozyten exprimieren, verglichen.

Einen Tag nach transienter oder permanenter Ligatur konnten keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit DOP vorbehandelt wurde, in Bezug auf Infarktgröße und kardiale Funktion festgestellt werden. Am Tag Fünf kam es zu einer Senkung der zirkulierenden Lymphozyten und einer Reduktion der myokardialen Granulozyten und Makrophagen. Am Tag 21 zeigten die Mäuse mit DOP-Vorbehandlung eine bessere kardiale Funktion und zudem kleinere Infarktfolgen. Dieser Effekt war in den Kardiomyozyten-spezifischen S1PR1-defizienten Mäusen aufgehoben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der S1P-Konzentration die myokardialen Umbau- und Heilungsprozesse nach AMI verbessert. Der Effekt wird über den S1PR1 erzielt. Aus diesem Grund könnte der S1P-Metabolismus ein vielversprechender pharmakologischer Angriffspunkt sein und somit auch, unabhängig von der initialen Infarktgröße, additiv zum interventionellen Eingriff helfen.

Abstract

Cardiovascular diseases, such as acute myocardial infarction (AMI), are still the most frequent cause of death all around the world. Chronic heart failure after AMI is associated with a high mortality and alongside leads to unemployability, causing a huge socio-economic burden.

So far, therapeutic options targeting the post-ischemic myocardial repair are rare. It is known that by increasing the concentration of sphingosin-1-phosphate (S1P), a bioactive sphingolipid with important immunological functions, ischemia/reperfusion injury can be reduced.

Still, the role of S1P regarding the post-ischemic cardiac remodeling is yet unknown. We hypothesized that an increased concentration of S1P leads to an improved post-ischemic myocardial remodeling, independently of the initial scar size, and can contribute to cardioprotection.

Therefore, we induced an AMI via transient or permanent ligation of the left anterior descending artery (LAD) in mice, that were treated with 4-deoxypyridoxine (DOP) 7 days antecedently. DOP enables an increase of S1P-concentrations by inhibiting the S1P-lyase. Myocardial healing and cardiac function were examined with histology, cardiovascular magnetic resonance imaging (cMRI), echocardiography, immunohistochemistry, real-time polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence activated cell sorting (FACS). Moreover, the effects were compared between wildtype mice and cardiomyocyte specific S1P-receptor-1 (S1PR1) deficient mice.

On the first day after permanent LAD ligation, no differences in between the control and the DOP treated group regarding infarct size and cardiac function could be seen. On the fifth day, circulating lymphocytes, myocardial granulocytes and myocardial macrophages were reduced in the DOP group. Further, myocardial scar size and cardiac function were improved on day 21 after ischemia in DOP treated mice. This effect was abrogated in the S1PR1 transgenic mice.

In summary, it could be shown that an increased S1P-concentration induced by DOP improved the myocardial repair- and healing after AMI. The effect was mediated via S1PR1. Therefore, S1P-metabolism might be a promising pharmacological target as adjunctive therapy to revascularization to exert a positive influence on the post-infarction myocardial remodeling.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µM	mikromolar
AAR	<i>area at risk</i>
AK	Antikörper
AMI	akuter Myokardinfarkt
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ApoM	Apolipoprotein M
ASS	Acetylsalicylsäure, Aspirin
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
bpm	<i>beats per minute</i>
Ca ²⁺	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA
cMRT	kardiale Magnetresonanztomographie
Coll1a2	Collagen1a2
Con	Kontrolle
DAB	Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOP	4-Deoxypyridoxin
EDD	enddiastolischer Durchmesser
EF	Ejektionsfraktion
EF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ESD	endsystolischer Durchmesser
FACS	Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HDL	<i>high-density-Lipoprotein</i>

HKL	Herzkatheterlabor
HMGB1	<i>high-mobility-group</i> Protein 1
I/R	Ischämie/Reperfusion
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IS	<i>Infarct size</i>
K ⁺	Kalium
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	linke Koronararterie
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	linksventrikuläres endsystolische Volumen
MCP-1	<i>monocyte-chemoattractant protein-1</i>
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MP-RM	<i>Mono-Poly-Resolving Medium</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
Na ⁺	Natrium
Na ⁺ /K ⁺ - ATPase	ATP-anhängiger Natrium-Kalium-Austauscher
nM	nanomolar
NSTEMI	Myokardinfarkt ohne ST-Hebung
PAS	Periodic-acid-Schiff
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POX	Peroxidase

RIVA	Ramus interventricularis anterior
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR1	S1P-Rezeptor 1
S1PR2	S1P-Rezeptor 2
S1PR3	S1P-Rezeptor 3
S1PR4	S1P-Rezeptor 4
S1PR5	S1P-Rezeptor 5
SSC	<i>sideward scatter</i>
STEMI	Myokardinfarkt mit ST-Hebung
SV	Schlagvolumen
SVI	Schlagvolumenindex
TH	T-Helfer
THI	Tetrahydroxybutylimidazol
TK	T-Killer
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TXA2	Thromboxan A2
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZETT	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Der akute Myokardinfarkt	2
1.1.1	Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit und des akuten Myokardinfarkts	2
1.1.2	Der akute Myokardinfarkt – Risikofaktoren und Genese	3
1.1.3	Der akute Myokardinfarkt – Vorgänge in der Ischämie	4
1.1.4	Der akute Myokardinfarkt – Ablauf der Reparatur	6
1.1.5	Der akute Myokardinfarkt – <i>Remodeling</i>	8
1.2	Sphingosin-1-Phosphat	9
1.3	Die Wirkung von 4-Deoxypyridoxin	10
1.4	Fragestellung, Hypothese und Ziele der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Studiendesign	12
2.2	Genehmigung des Versuchsvorhaben	16
2.3	Versuchstiere, Zucht- und Haltungsbedingungen	16
2.4	Material	17
2.4.1	Verwendete Substanzen	17
2.4.2	Verwendete Utensilien	19
2.4.3	Verwendete Geräte	20
2.4.4	Verwendete Software	21
2.5	Methoden	21
2.5.1	<i>Left-anterior-descending-artery</i> -Ligatur-Operation	21
2.5.2	Durchführung LAD-Ligatur-Operation	22
2.5.3	Kardiale-Magnetresonanztomografie	23
2.5.4	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung	24
2.5.5	Durchführung TTC	24
2.5.6	Histologie	25
2.5.7	Durchführung Histologie	26
2.5.8	<i>Real-time</i> Polymerase-Ketten-Reaktion	28
2.5.9	Durchflusszytometrie	31
2.5.10	Durchführung Durchflusszytometrie	32
2.6	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Gravimetrische Parameter	34
3.2	Experimentelle Versuchsergebnisse	35

3.2.1	Eine Inhibition der S1P-Lyase vor Induktion der Ischämie verbessert die post-ischämische myokardiale Reparatur:.....	35
3.2.2	DOP verbessert den post-ischämischen myokardialen Umbau auf eine S1PR1-abhängige Weise:.....	42
3.2.3	Die Behandlung mit DOP nimmt Einfluss auf die postischämische Inflammation	45
4	Diskussion.....	49
4.1	Einfluss der S1P-Erhöhung vor Induktion der Ischämie auf die post-ischämische myokardiale Reparatur	50
4.2	DOP verbessert den post-ischämischen myokardialen Umbau auf eine S1PR1-abhängige Weise.....	53
4.3	Die Behandlung mit DOP nimmt Einfluss auf die post-ischämische Inflammation	55
4.4	Limitationen der Arbeit	56
4.5	Zusammenfassung und Ausblick	57
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	58
6	Danksagung.....	68

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie der akute Myokardinfarkt (AMI), die koronare Herzkrankheit (KHK) oder Herzinsuffizienz stellen nach wie vor die häufigste Todesursache weltweit dar (1). Diese Erkrankungen führen häufig zu einer Erwerbsunfähigkeit, weshalb Ihnen eine hohe sozioökonomische Bedeutung zukommt.

Der AMI führt ischämisch bedingt zu einem Untergang von Herzmuskelgewebe. Mit mehr als 80% ist die häufigste Ursache dafür eine atherosklerotisch bedingte Plaqueruptur in einem Koronargefäß, durch die ein Thrombus entsteht und das Gefäßlumen vollständig oder unvollständig okkludiert (2). Bereits präklinisch wird die Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) empfohlen (3). ASS hemmt die Cyclooxygenase-1 in Thrombozyten irreversibel (4), blockiert dabei die Ausschüttung von Thromboxan A₂ (TXA) (5), wodurch die Aktivierung weiterer Blutplättchen gehemmt wird. Dadurch wird bei einer Gabe im AMI die Größenzunahme des Thrombus inhibiert, um einem vollständigen Gefäßverschluss entgegenzuwirken. Für eine definitive Versorgung ist eine möglichst zeitnahe Koronarangiografie mit perkutaner Koronarintervention (*percutaneous coronary intervention*, PCI) die optimale Therapie, um den koronaren Blutfluss und somit die Sauerstoffversorgung des Herzens wiederherzustellen (3). Durch den Patienten selbst, den Transport zur nächsten Klinik mit Herzkatheterlabor (HKL) oder durch die Verspätungen innerhalb der Klinik kann es zu relevanten Verzögerungen zwischen dem Eintritt der Symptome und dem Beginn der Koronarangiografie kommen, die mit einer schlechteren Prognose für den Patienten hinsichtlich der Mortalität oder einem kardiogenem Schock assoziiert sind (6). Je schneller die Revaskularisation erfolgt, desto kleiner fällt der Myokardschaden aus. Zusätzlich werden die Mortalität und Morbidität verringert (7). Patienten, die sich erst frühestens 12 Stunden nach Symptombeginn in der Klinik vorstellen, machen 12,3% der AMI aus (8). Bereits nekrotisches Gewebe kann durch eine Revaskularisierung nicht mehr gerettet werden. Durch die rasche Neutralisation des pH-Werts in der Reperfusion kann zudem ein extremer Wasserstoffgradient über der Zellmembran entstehen, was sequenziell zu Kalziumüberladung und der Bildung von freien

Sauerstoffradikalen führt (9). Durch diese sogenannten Ischämie-/Reperfusion-(I/R) Schäden besteht die Gefahr, dass weiteres Myokard nekrotisiert. Bei einer totalen Okklusion des versorgenden Gefäßes kommt es nach bereits 30 Minuten zu ersten irreversiblen Myokardzellschäden, nach 4-6 Stunden ist das gesamte Gewebe von einer Koagulationsnekrose betroffen (10). Mit einer PCI kann den betroffenen Patienten in diesem Fall meist nicht mehr ausreichend geholfen werden. Patienten, die sich erst 48 Stunden nach Symptombeginn vorstellen, wird daher sogar von einer PCI abgeraten, sofern sie zu dem Zeitpunkt wieder asymptomatisch sind (3). Wirksame Therapieoptionen, die den Umbau von kardialen Muskelgewebe nach einer Ischämie positiv beeinflussen können, werden also dringend benötigt.

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, welches immunologische, kardiovaskuläre und inflammatorische Funktionen im Körper einnimmt. Welchen Einfluss es auf den post-ischämischen kardialen Umbau hat, ist bisher allerdings noch unbekannt.

1.1 Der akute Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit und des akuten Myokardinfarkts

Die KHK, darunter insbesondere der AMI, ist eine Erkrankung von hoher sozioökonomischer Bedeutung. International stellen kardiovaskuläre Erkrankungen als Kollektiv noch immer die häufigste Todesursache dar. Im Jahr 2015 verstarben 17,92 Millionen Menschen daran (11). In Europa macht die KHK rund 20% der Todesfälle aus (12). In Deutschland beträgt die Lebenszeitprävalenz laut einer Studie des Robert Koch-Instituts (RKI) für eine KHK 9,3%, 4,7% erkranken im Laufe ihres Lebens an einem AMI. Männer sind insgesamt häufiger betroffen als Frauen (Männer 7%, Frauen 2,5%) (13). Dabei gibt es deutliche Unterschiede hinsichtlich des Alters. Frauen erkranken durchschnittlich 7-10 Jahre später als Männer. Bei den unter 60-Jährigen ist das Erkrankungsrisiko für einen Mann im Vergleich zu dem der Frau vierfach erhöht. Dahingegen machen Frauen die Mehrzahl der Erkrankten ab einem Alter von 75 Jahren aus (14).

1.1.2 Der akute Myokardinfarkt – Risikofaktoren und Genese

Der AMI ist pathophysiologisch definiert durch einen akuten Schaden des Herzmuskelgewebes aufgrund einer akuten Ischämie (15). Er ist daher abzugrenzen von akuten oder chronischen Myokardschäden anderer Genese.

Ursächlich für das Auftreten eines AMI ist häufig eine vorbestehende KHK. Hierbei kommt es zu Kalk- und Lipideinlagerungen in Intima, der inneren Wandschicht der Koronararterien. Dadurch entstehen atherosklerotische Plaques, die entweder direkt zu einer Stenosierung des Gefäßes führen oder im weiteren Zeitverlauf instabil werden und rupturieren können (16).

Risikofaktoren für das Auftreten eines AMI sind Rauchen, arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, abdominelle Adipositas, psychosoziale Faktoren, verminderter Konsum von Früchten und Gemüse und regelmäßiger Alkoholkonsum (17).

Klinisch kann man Myokardinfarkte nach Myokardinfarkten mit ST-Hebung (STEMI) und Myokardinfarkten ohne ST-Hebung (NSTEMI) unterscheiden. Zur Differenzierung bezieht man sich auf das Vorhandensein von Veränderung des Elektrokardiogrammes (EKG) im Sinne einer angehobenen ST-Strecke.

Weiterhin existiert eine Klassifikation nach Pathogenese, die die Myokardinfarkte in fünf verschiedene Typen unterteilt (18). In Kontext dieser Arbeit ist insbesondere der AMI Typ I von besonderer Relevanz. Bei einem AMI Typ I kommt es, atherosklerotisch bedingt, zu einer Plaqueruptur. Der Grad der Gefäßeinengung korreliert dabei nicht proportional mit der Wahrscheinlichkeit einer Ruptur, sondern er wird von der Anzahl der bestehenden Plaques beeinflusst. Die Myokardinfarkte, die auf einer Ruptur einer >70%igen Engstelle beruhen, machen nur 14% aller Myokardinfarkte aus, während sich zwei Drittel auf einem akuten thrombotischen Verschluss einer <50%igen Stenose ausbilden (19). An der subendothelialen Matrix und den Kollagenfasern, die durch die Ruptur aus dem Plaque austreten, können Thrombozyten haften, aktiviert werden und einen Thrombus bilden, der das Gefäß verschließt (20). Das Herzmuskelgewebe, welches durch das betroffene Gefäß versorgt wird, kann dann nicht mehr suffizient mit Sauerstoff versorgt werden und wird ischämisch. Weiterhin gibt es den Myokardinfarkt Typ II, der bei einem Sauerstoffdefizit auftritt. Die Koronarstenose im Rahmen der KHK führt bei stärkerer Ausprägung bereits zu einem verminderten Blutfluss im betroffenen Gefäß mit einer

konsekutiven Sauerstoffunterversorgung. Wenn sich die hämodynamischen Bedingungen im Körperkreislauf oder direkt in den Koronarien verändern, zum Beispiel durch eine Anämie, eine akute Blutung, eine anhaltende Tachykardie oder Koronarspasmen, kann die bereits eingeschränkte Koronarperfusion einen kritischen Wert erreichen und die Sauerstoffversorgung des Myokards nicht mehr gewährleisten. In der Folge kommt es zu einer Ischämie des versorgten Herzmuskelgewebes.

Darüber hinaus unterscheidet man den AMI Typ III in Form eines plötzlichen Herztodes, der sich symptomatisch wie ein AMI präsentierte und die typischen EKG-Veränderungen aufwies, aber vor Eintreten des Todes nicht mehr sicher als Infarkt diagnostizieren ließ. Schließlich lässt sich Typ IV unterscheiden, der mit einer PCI kausal oder zeitlich assoziiert ist und Typ V, der in Zusammenhang mit einer Bypass-Operation auftritt (18).

1.1.3 Der akute Myokardinfarkt – Vorgänge in der Ischämie

In der sehr frühen Phase im Myokardinfarkt, unmittelbar nach Ruptur der atherosklerotischen Gefäßläsion und Bildung des Thrombus, reichen die vorhandenen lokalen Sauerstoff- und Energievorräte der Kardiomyozyten nur noch einige Sekunden aus. Danach wird die Energieversorgung des nicht mehr durchbluteten Myokards auf anaerobe Glykolyse umgestellt (21). Die Kardiomyozyten enthalten einen hohen Anteil an Mitochondrien und sind primär für eine aerobe Energiegewinnung ausgelegt. Aufgrund der anaeroben Glykolyse fallen vermehrt Laktat und Wasserstoffionen (H^+) an (21). Das Milieu der Zelle wird sauer, wodurch enzymatische Reaktionen gehemmt werden. So verliert zum Beispiel Troponin C, eine Untereinheit der Myofilamente, seine Sensitivität gegenüber Calcium, weshalb das Myokard seine kontraktile Funktion nicht mehr aufrecht erhalten kann (22-24).

Aufgrund der pH-Wert-Verschiebung kann auch weniger anaerobe Glykolyse stattfinden und die Versorgung mit Adenosintriphosphat (ATP), einem unentbehrlichen Energieträger, setzt schließlich vollständig aus. Durch den Mangel an ATP können wichtige von davon abhängige Transportvorgänge innerhalb der Zelle nicht mehr suffizient funktionieren. Dazu gehört insbesondere der ATP-anhängige Natrium-Kalium-Austauscher (Na^+/K^+ -ATPase) an der

Zellmembran, der den physiologischen Ionengradienten aufrechterhält. Konsekutiv kommt es in der Ischämie zu einer Überladung der Zellen mit osmotisch aktivem Natrium (Na^+), was einen Wassereinstrom und eine Zellschwellung auslöst. Weiterhin kann durch die erhöhte Natriumkonzentration auch kein Kalzium (Ca^{2+}) mehr aus dem Zellinneren zurück ins sarkoplasmatische Retikulum befördert werden. Die Folge ist ein Ionenungleichgewicht mit, neben Natrium- und Ca^{2+} -Überladung, einem Mangel an Kalium (K^+) und Magnesium (Mg^{2+}) (9, 25). Durch diese Ionenverschiebung verändert sich auch das Ruhemembranpotential und die betroffenen Zellen sind nicht mehr elektrisch erregbar (22).

Während viele Läsionen in den ersten 15-20 Minuten noch reversibel sind, führen die oben genannten Veränderungen nach 20-30 Minuten zu ersten irreversiblen Myokardzellschäden (26). Der myokardiale Schaden beginnt subendokardial und breitet sich dann, wenn eine Reperfusion mit Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung ausbleibt, transmural bis hin zum Epikard aus. (27).

Der Zelltod ist, insbesondere in der frühen Ischämie, durch Apoptose bedingt. Apoptose wird sowohl durch die Ca^{2+} -Überladung als auch durch direkte mitochondriale Schädigungen induziert (9). Diese führen zu einer Freisetzung apoptogener Substanzen, die eine enzymatische Reaktionen zur Zerstörung der Zelle hervorrufen (28). Zu einem späteren Zeitpunkt dominiert, durch die onkotisch bedingte starke Zellschwellung mit Verlust der Integrität der Zellmembran, die konsekutive Nekrose der Zelle.

Im Falle einer Revaskularisierung kann das Myokard erneut mit Sauerstoff versorgt werden. Diese Reperfusion birgt aber auch die Gefahr von I/R-Schäden. Durch die wiederhergestellte Durchblutung des durch die Ischämie vorgeschädigten Gewebes wird der extrazelluläre pH-Wert rasch normalisiert. Infolgedessen kommt es zu einem starken H^+ -gradienten über der Zellmembran mit einem Überschuss an intrazellulären H^+ -Ionen, den die Zelle anstrebt auszugleichen. So werden H^+ -Ionen im Austausch gegen Na^+ -Ionen über den Na^+/H^+ Austauscher nach extrazellulär transportiert (29). Der vorbestehende Natriumüberschuss wird weiter verstärkt und die Zellschwellung nimmt zu. Durch die Wiederherstellung des pH-Milieus und die erneut gewährleistete Versorgung mit Sauerstoff können wieder enzymatische Reaktionen zur Herstellung von ATP stattfinden. Um zusätzlich die Na^+ -Konzentration in der Zelle zu verringern,

befördert der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher Na^+ aus der Zelle und Ca^{2+} ins Zellinnere (29). Durch diese Ca^{2+} -Überladung kommt es zu einer Hyperkontraktilität des kontraktile Apparates und einer Nekrose der Kontraktionsbänder mit konsekutiver Ruptur der Kardiomyozyten (30). Weiterhin entstehen beim nun erneut verstärkt stattfindenden aeroben Metabolismus der Zelle vermehrt reaktive Sauerstoffradikale (ROS) in der mitochondrialen Atmungskette. Diese schädigen verschiedenste Zellbestandteile durch oxidativen Stress und können sogar zu mitochondrialer Schwellung und Ruptur führen (29, 31, 32). Diese Zellveränderungen bewirken eine weitere Apoptose von Herzmuskelzellen. Nach ungefähr einer Stunde normalisieren sich die Ionenverhältnisse der noch vitalen Zellen durch Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum, dem Hauptspeicher an Ca^{2+} der Myozyten (9).

1.1.4 Der akute Myokardinfarkt – Ablauf der Reparatur

Nach abgelaufenem Infarkt durchläuft das infarzierte Gewebe verschiedene Phasen der Reparatur und Rekonstruktion. Die Abläufe sind sehr komplex und noch nicht bis ins Detail verstanden. Initial überwiegt eine Entzündungsreaktion, gefolgt von einer proliferativen Phase. Schließlich kommt es zu einer finalen Ausbildung der Infarktnarbe (33).

In der inflammatorischen Phase werden durch den Untergang der nekrotischen Kardiomyozyten Signale, die sogenannten Alarmine, ausgesandt, die andere noch vitale Herzmuskelzellen dazu instruieren, proinflammatorische Zytokine auszusenden. Zu den Alarminen gehören zum Beispiel das *high-mobility-group* Protein 1 (HMGB1), mitochondriale DNA Fragmente, S100 Proteine, Hitzeschockproteine oder Proteine der extrazellulären Matrix (34). Sie agieren zum Großteil über *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) (35, 36). Die alarmierten übrigen Herzmuskelzellen produzieren daraufhin beispielsweise Interleukine, insbesondere Interleukin 1 (IL-1), IL-6, Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und das Chemokin *monocyte-chemoattractant protein-1* (MCP-1) (37, 38). Durch das Aussenden der proinflammatorischen Zytokine wird auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, der auf Gen-Ebene Einfluss auf Inflammation, Immunabwehr und den Zellzyklus nimmt (39). Zusätzlich werden die lokalen Fibroblasten und Endothelzellen durch die bei der Zellnekrose der

Kardiomyozyten freigesetzten Botenstoffe aktiviert und können Chemokine und Interleukine aussenden. Weiterhin exprimieren Endothelzellen nach Aktivierung Zelladhäsionsmoleküle, die das Einwandern der Leukozyten vereinfachen (33). Dadurch wird die Einwanderung diverser Entzündungszellen ermöglicht (34). In den nekrotischen Kardiomyozyten fallen außerdem ROS an, die zur Anlockung von Leukozyten beitragen (40). Darüber hinaus nehmen auch Thrombozyten Einfluss auf die Inflammation, indem sie Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten (41).

Die ersten Entzündungszellen, die in den Infarkt einwandern, sind neutrophile Granulozyten. Sie erreichen ihre maximale Anzahl ca. drei Tage nach Ischämie (42). Sie bewirken den Abbau abgestorbener Zellen, indem sie ROS und proteolytische Enzyme sekretieren. Eventuell schaden diese Substanzen aber auch umliegenden gesunden Kardiomyozyten und verstärken den ischämischen Schaden (43, 44). Weiterhin infiltrieren Monozyten das infarzierte Gewebe. In der frühen Phase dominieren inflammatorische Monozyten, die hohe Mengen des Antigens Ly6C exprimieren, und wandeln sich zu Gewebsmakrophagen um (33, 37). In späteren Phasen überwiegen hingegen die reparativen Monozyten mit niedriger Ly6C Expression, die die Proliferation anregen (45). Gewebsmakrophagen im Allgemeinen spielen eine wichtige Rolle in der inflammatorischen und proliferativen Phase, indem sie bei der Phagozytose helfen, weitere proinflammatorische Zytokine aussenden und am Umbau der extrazellulären Matrix teilnehmen (33). Lymphozyten wandern ebenfalls ins Infarktgewebe ein (42) und erreichen ihre maximale Anzahl ca. 7 Tage nach Ischämie (42). Ihre Rolle ist noch nicht vollständig erforscht. T-Lymphozyten, die das Antigen CD4 exprimieren, scheinen insbesondere durch Sekretion von IFN-gamma zu I/R- Schäden beizutragen (46). B-Lymphozyten sekretieren CCL17, wodurch inflammatorische Monozyten weiterhin ins infarzierte Gewebe rekrutiert werden. Durch Depletion von B-Zellen nach Myokardinfarkt konnte in murinen Versuchen die Infarktgröße verringert und die kardiale Funktion verbessert werden, was einen tendenziell negativen Einfluss der B-Zellen vermuten lässt (47).

Nicht nur zelluläre Veränderungen finden in der inflammatorischen Phase statt, auch kommt es zu Anpassungen der extrazellulären Matrix. Matrix-Metalloproteasen (MMP) sorgen nach Aktivierung für einen frühen Abbau der

kollagenen Strukturen (48, 49). Die Fragmente der Matrix führen wiederum zu einer Rekrutierung von Leukozyten (50). Eine fibrinbasierte provisorische Matrix wird gebildet, die verhindert, dass der Ventrikel rupturiert (51).

Nach der inflammatorischen Phase folgt die proliferative Phase. Wenn der programmierte Zelltod der involvierten neutrophilen Granulozyten einsetzt, werden sie von Gewebsmakrophagen abgebaut (52). Anti-inflammatorische Signalwege, unter anderem über IL-10 und TGF- β , werden eingeleitet, die die Entzündungsreaktion bremsen (53). Myofibroblasten sind zu dem Zeitpunkt der numerisch überlegene Zelltyp im Infarkt. Sie entstehen zum einen vermutlich durch Aktivierung bereits vorhandener Fibroblasten (54, 55), zum anderen können im Blut zirkulierende Vorläuferzellen einwandern und zu Myofibroblasten ausreifen (56). Sie zeigen eine hohe Proliferationsrate. Ihre Funktion besteht insbesondere darin, Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen zu synthetisieren (57).

Weiterhin werden in der proliferativen Phase viele neue Blutgefäße gebildet, um den heilenden Infarkt ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Diese Angiogenese erfolgt durch Freisetzung des Wachstumsfaktors *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in der frühen Ischämie und einer Hochregulierung seiner Rezeptoren VEGF-Rezeptor 1 und 2 auch noch prolongiert Tage nach dem Infarkt (58).

Die finale Phase der Reparatur ist gekennzeichnet durch eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix-Proteine, sowie Rückzug der eingewanderten Entzündungszellen, Myofibroblasten und Rückbildung der neu entstandenen Blutgefäße (59, 60). Kollagen wird mithilfe des Enzyms Lysyloxidase quervernetzt (61) und die Infarktnabe bildet sich aus.

1.1.5 Der akute Myokardinfarkt – *Remodeling*

Kardiales *Remodeling* beschreibt die komplexen Umbauprozesse nach stattgehabtem Myokardinfarkt, die nicht nur das ischämisch gewordene Gewebe, sondern die Gesamtheit des Herzens betreffen. Durch den Myokardinfarkt entstehen geometrische Veränderungen des Ventrikels mit einer Dilatation der Kammern. Dort, wo sich die Infarktnabe ausgebildet hat, kommt es zu einer Ausdünnung des Myokards, während das restliche Gewebe kompensatorisch

hypertrophiert (62). Dieses kann weiterhin auch von fibrotischen- und inflammatorischen Veränderungen betroffen sein (63), der Pathomechanismus dahinter ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Dysregulation inflammatorischer Kaskaden wird als Ursache vermutet (64, 65).

Durch die veränderte Geometrie des Ventrikels mit nachfolgender Behinderung des physiologischen kardialen Reizleitungssystems treten häufig ventrikuläre Arrhythmien auf (66). Weiterhin kann die Dilatation zu einer Einschränkung der systolischen Herzfunktion bis hin zum Herztod führen (67).

1.2 Sphingosin-1-Phosphat

S1P ist ein extrazellulärer Botenstoff, der unter Anderem wichtigen immunmodulatorischen Einfluss auf den Körper hat.

In den 60er Jahren hat ein deutsches Forschungsteam aus Köln entdeckt, dass Sphingolipide, die in Zellmembranen vorkommen, über Lysosomen mittels der Sphingosinkinasen SPHK1 und SPHK2 zu S1P metabolisiert werden (68). Das intrazellulär anfallende S1P kann entweder abgebaut werden oder insbesondere in Erythrozyten, Thrombozyten und Endothelzellen nach extrazellulär freigesetzt werden. Um an seinen Zielorten wirken zu können, ist es wichtig, dass ein Konzentrationsgradient mit hohen S1P-Konzentrationen in Plasma und Lymphe und niedrigen Konzentrationen in der interstitiellen Flüssigkeit des Gewebes aufgebaut wird (69). In der Lymphe sind lymphozytäre Endothelzellen für die Produktion und Sekretion von S1P zuständig (70). Im Plasma wird der Hauptanteil des S1P von Erythrozyten synthetisiert und ausgeschüttet, sowie gespeichert (71). Sie setzen S1P ins Plasma frei, was durch Plasmafaktoren reguliert wird (71). Vaskuläre Endothelzellen besitzen zur Sekretion im Gegensatz zu Erythrozyten und Thrombozyten den speziellen Transporter SPNS2 (72). In Thrombozyten gibt es zwei S1P-Reservoirs, in der Plasmamembran und in den α -Granula, die nur nach Aktivierung der Plättchen freigesetzt werden (73, 74). Die niedrige Konzentration von S1P im Gewebe wird durch vermehrten Abbau durch die S1P-Lyase erreicht.

Im Blut wird S1P hauptsächlich an Proteinen gebunden transportiert. Dafür verantwortlich sind zu ca. 65% das Apolipoprotein M (ApoM), welches in Assoziation mit dem *high-density*-Lipoprotein (HDL) vorkommt, und zu 35%

Albumin (75). ApoM kann die Plasma-Konzentration von S1P regulieren und verstärkt weiterhin seine vasoprotektive Wirkung an endothelialen S1P-Rezeptoren (75).

Im Organismus von Säugetieren sind insgesamt fünf verschiedene S1P-Rezeptoren (S1PR1-5) bekannt (76). Sie gehören zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren und lösen nach Aktivierung intrazelluläre Signalkaskaden unterschiedlicher Wirkung aus. Die Rezeptoren S1PR1-3 werden ubiquitär im Körper auf verschiedensten Zellen exprimiert, unter anderem auf Kardiomyozyten und vaskulären Endothelzellen (77). Der am meisten verbreitete S1P-Rezeptor ist der S1PR1 und ist mit einem $G_{i/o}$ -Protein gekoppelt. Der S1PR4 beschränkt sich auf Zellen der Hämatopoese und lymphatische Zellen. Auf Zellen des Nervensystems wird der S1PR5 exprimiert (78).

Durch die weite Verbreitung der S1PR lässt sich erklären, dass auch die Effekte von S1P vielseitig sind und nicht in ihrer Gesamtheit in dieser Arbeit abgebildet werden können. Bereits in der Embryonalentwicklung spielt S1P eine wichtige Rolle bei der Bildung von Herz, Gefäßen und Nervensystem (79, 80). Am Herzen wirkt S1P je nach Rezeptor negativ oder positiv inotrop und chronotrop, bewirkt zelluläre Hypertrophie, steigert die Proteinsynthese und führt zu Veränderung von intrazellulären Ionenkonzentrationen (81-84). Die Expression des S1PR1 auf B- und T-Zellen ist wesentlich für deren Auswanderung aus sekundären lymphatischen Organen und Thymus in die Blutbahn (85). Aus einem Antagonismus am S1PR1 resultiert unter anderem deshalb eine Immunsuppression, was zu der Zulassung des S1PR-Modulators FTY720, auch Fingolimod genannt, in der schubweise-remittierenden Multiplen Sklerose führte (86).

1.3 Die Wirkung von 4-Deoxypyridoxin

4-Deoxypyridoxin (DOP) ist ein Pyridinring mit 2 Methyl-, einer Hydroxyl- und einer Hydroxymethylgruppe. Es kommt in der Pflanze Ginkgo Biloba vor und fungiert als Metabolit (87). Durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Pyridoxin, auch bekannt als Vitamin B6, wirkt es in Säugetieren als starker Vitamin-B6 Antagonist.

Beim Abbau von S1P wird dieses entweder durch die Enzyme SGP1 oder SGP2 dephosphoryliert und der Sphingosinanteil des S1P durch Ceramidsynthese recycelt (88), oder S1P wird durch die S1P-Lyase zu Phosphoethanolamin und 2-Hexadecenal abgebaut (89). Die S1P-Lyase ist ein Vitamin-B6 abhängiges Enzym (90). Durch den Vitamin-B6 Antagonismus des DOPs ist die S1P-Lyase nicht mehr funktionstüchtig und der Abbau von S1P über diesen Weg blockiert. Konsekutiv kommt es so zu einem Anstieg der Plasma-Konzentration von S1P.

1.4 Fragestellung, Hypothese und Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit setzte sich als Ziel, folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Welchen Einfluss hat die Erhöhung der plasmatischen S1P-Konzentration vor Ischämie auf Infarktgröße und kardiale Funktion?
2. Welchen Einfluss hat die Erhöhung der plasmatischen S1P-Konzentration vor Ischämie auf die postischämische myokardiale Heilung, unabhängig von der Infarktgröße?
3. Über welchen Rezeptor werden mögliche Effekte vermittelt?

Dazu wurde hypothetisiert, dass erhöhte Plasma S1P-Level zu einer Verbesserung des postischämischen *Remodelings* über den S1PR1 führen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Mit dem Ziel, den Einfluss einer erhöhten S1P-Plasma-Konzentration während eines AMI durch S1P-Lyase-Inhibition zu untersuchen, wurden 48 C57BL/6 Versuchsmäuse verwendet (Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich). 24 Mäuse wurden als Kontrollgruppe gebraucht, die anderen 24 erhielten DOP in einer Konzentration von 30mg/l über das Trinkwasser (= DOP-Gruppe). Zudem wurde bei dieser Gruppe Vitamin-B6-freies Futter verwendet, um den Vitamin-B6-antagonisierenden Effekt weiter zu verstärken.

Um die unmittelbaren Auswirkungen einer Erhöhung der S1P-Konzentration vor einem Myokardinfarkt zu untersuchen, erhielten die Mäuse DOP 7 Tage lang (n = 8), bevor eine transiente Ligatur der proximalen linken Koronararterie (LAD), auch bekannt als *Ramus interventricularis anterior* (RIVA), für 30 Minuten induziert wurde. Eine Kontrollgruppe (n = 8) erhielt keine Vorbehandlung mit DOP. Nach 24 Stunden wurde eine transthorakale Echokardiografie durchgeführt, um funktionelle- und strukturelle kardiale Parameter zwischen DOP-Behandlung und der Kontrollgruppe zu vergleichen. Danach kam es zu einer Tötung der Tiere und zu einer Entnahme der thorakalen Organe. Die Herzen wurden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung angefärbt, wodurch die Infarktgröße und das durch die Ischämie gefährdete Gewebe bestimmt werden konnten. (s. Abb. 1).

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde ein Teil der Tiere (n = 16) ebenfalls mit DOP vorbehandelt, die gleiche Anzahl an Mäusen diente als Kontrolle (n = 16). Sie erhielten aber anstelle der transienten eine permanente Ligatur der LAD, um ein Modell eines schweren Myokardinfarkts ohne die Möglichkeit einer Reperfusion zu imitieren. Die Behandlung mit DOP wurde auch postoperativ für den gesamten Beobachtungszeitraum weitergeführt. 24 Stunden sowie 21 Tage später wurden funktionelle- und strukturelle Parameter der Herzen beider Versuchsgruppen mittels kardialer Magnetresonanztomographie (cMRT) erhoben (91).

Darüber hinaus wurde an Tag 5 bei Kontrolltieren (n = 7) und Mäusen mit DOP-Behandlung (n = 7) Blut entnommen und die Verteilung der Leukozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Weiterhin wurden die Herzen in Paraffin eingebettet und eine Immunhistochemie (IHC) zum Nachweis von Makrophagen und Granulozyten durchgeführt.

Außerdem kam es an Tag 21 zur Tötung der Tiere durch Entbluten mit anschließender thorakaler Organentnahme. Das *remote*-Gewebe des linken Ventrikels wurde bei den Kontrollmäusen (n = 5) und der DOP-Gruppe (n = 5) für die Polymerase-Kettenreaktion entnommen, um die Gen-Expression von Herzinsuffizienz-Peptiden zu bestimmen. Bei jeweils 4 der Tiere pro Gruppe wurden die Herzen für histologische Analysen der Kardiomyozyten-Größe und des Umfangs der Herzmuskelnarbe in Paraffin eingebettet (s. Abb. 1).

Um weiterhin den Einfluss des S1PR1 zu ermitteln, waren transgene Mäuse ohne den S1PR1 auf Kardiomyozyten notwendig (S1PR1 Cardio Cre+, n = 14), die gegen die Geschwistertiere (*Littermate*) der eigenen Linie ohne das *Knock-out*-Gen (S1PR1 Cardio Cre-, n = 11) verglichen wurden. Sie wurden 7 Tage lang mit DOP vorbehandelt. 24 Stunden und 21 Tage nach Infarkt wurden die strukturellen und funktionellen kardialen Parameter mittels MRT erhoben und nun nicht nur zwischen DOP-Behandlung und Kontrolle verglichen, sondern auch bezüglich *Littermate* oder *Knock-out*. Die DOP-Behandlung wurde dabei den gesamten Beobachtungszeitraum über weitergeführt (s. Abb. 2) (91).

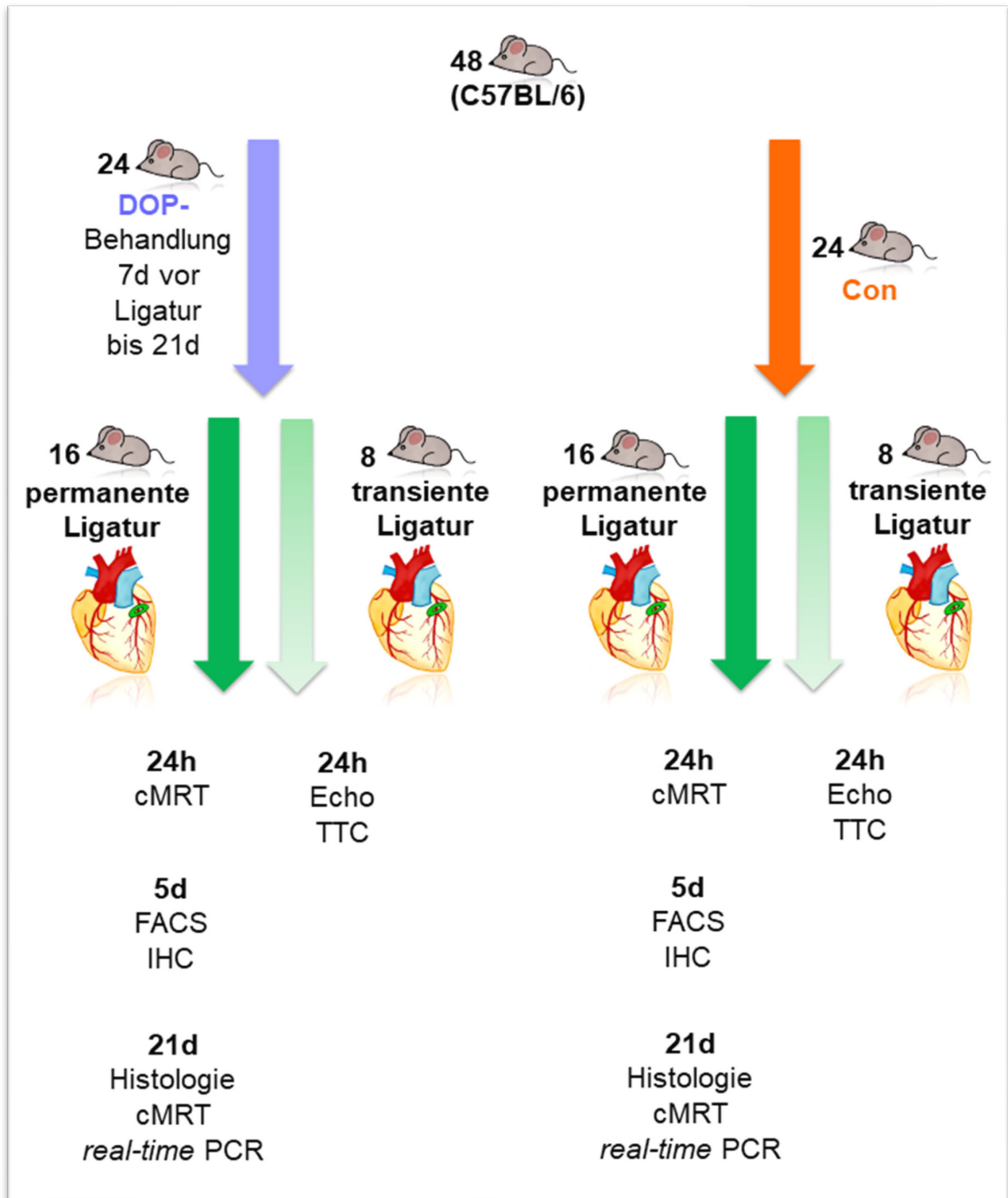


Abb. 1: Die Grafik zeigt den Versuchsaufbau der Wildtyp C57BL/6 Mäuse mit DOP-Gabe 7 Tage vor myokardialer Ischämie. (Con = Kontrolle; DOP = 4-Deoxyypyridoxin, d = Tag/Tage, h =Stunden, cMRT = kardiale Magnetresonanztomografie, Echo = Echokardiografie, TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung, FACS = Durchflusszytometrie, IHC = Immunhistochemie, *real-time* PCR = *real-time* Polymerase-Ketten-Reaktion).

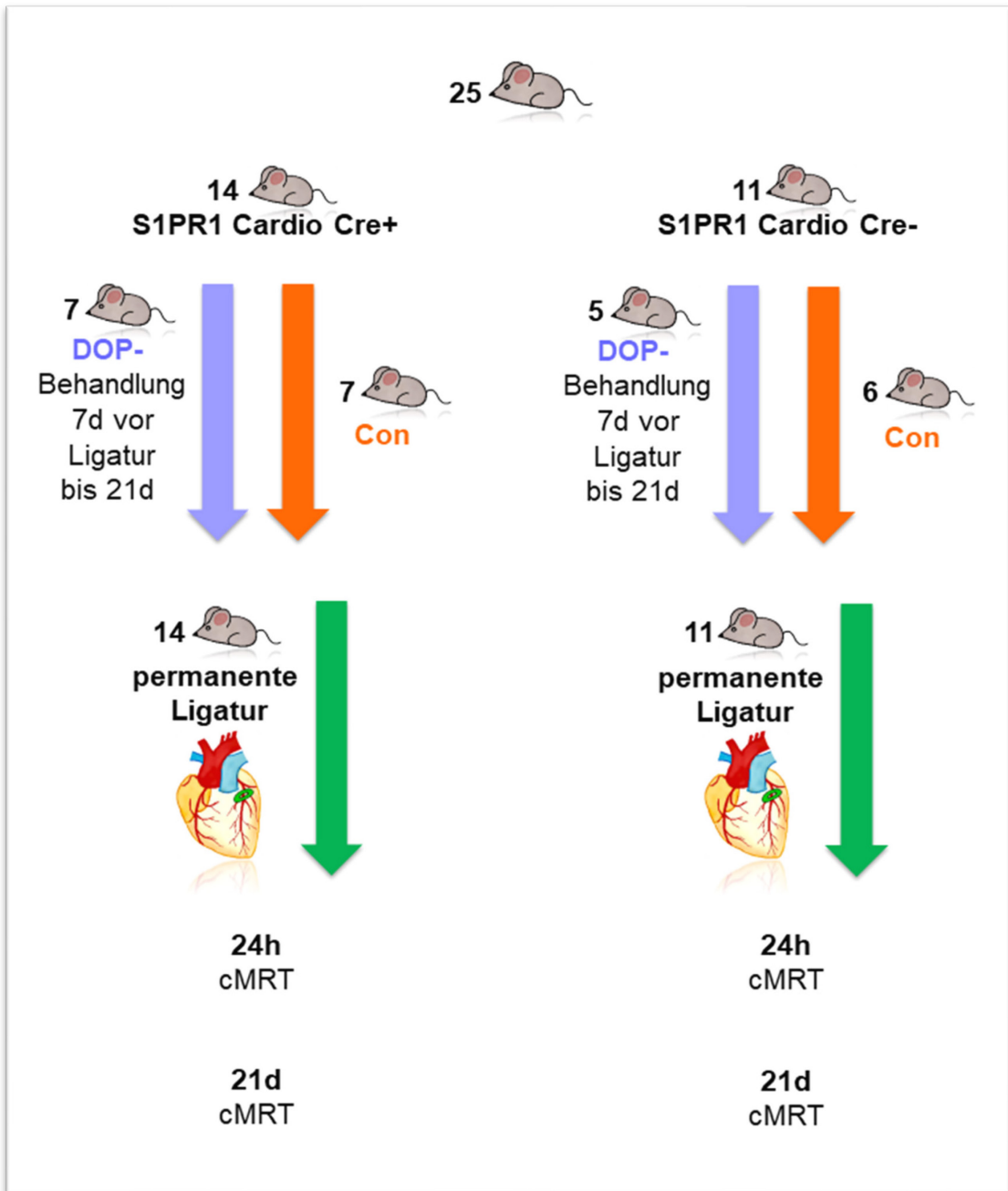


Abb. 2: Die Grafik zeigt den Versuchsaufbau der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-1 (= S1PR1)-defizienten Mäuse bzw. der Geschwistertiere ohne *knock-out* Gen. (Con = Kontrolle; DOP = 4-Deoxyripyridoxin, d = Tag/Tage, h = Stunden, cMRT = kardiale Magnetresonanztomografie, S1PR1 = Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-1, S1PR1 Cardio Cre+ = S1PR1-defiziente Mäuse, S1PR1 Cardio Cre- = Geschwistertiere ohne *knock-out* Gen).

2.2 Genehmigung des Versuchsvorhaben

Alle Versuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2016.A425). Es erfolgte die erfolgreiche Teilnahme am Kurs „Versuchstierkundliche Einführung zur Erlangung des Fachkundenachweises gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes“.

2.3 Versuchstiere, Zucht- und Haltungsbedingungen

Die S1PR1-defizienten Mäuse wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Levkau (zum Zeitpunkt: Institut für Pathophysiologie Universität Essen; aktuell: Institut für Molekulare Medizin 3, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Die Tiere wurden vor den Versuchen und in der Nachbeobachtung in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf gehalten.

Dort lebten die Mäuse in Typ II Käfigen mit einer Größe von 370 Quadratcentimetern welche mit staubfreiem Weichholzgranulat als Einstreu ausgelegt waren. Die Kontrollgruppe erhielt *ad libitum* das Standardfutter von Sniff, die DOP-Gruppe wurde mit Vitamin-B6-freiem Futter von Altromin GmbH & Co.KG versorgt. Das Wasser wurde ozonisiert und mit Salzsäure (HCl) auf einen pH-Wert von 2,6-3 angesäuert und in der DOP-Gruppe weiterhin mit DOP angereichert (30 mg/l, 7 Tage vor Versuchsbeginn). Die Haltungsräume der ZETT wurden in der Zeit von 07:00 bis 19:00 Uhr beleuchtet (mitteleuropäische Zeit). Die Luftfeuchtigkeit betrug $55 \pm 5 \%$, die Raumtemperatur $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

24 Stunden vor Operation wurden die Tiere zur Akklimatisierung in die Haltungsräume des Kardiologischen Labors gebracht. Die Haltungsbedingungen entsprachen hier denen der ZETT. Zur postoperativen Nachversorgung verblieben sie weitere 24 Stunden dort. Sie wurden zum Schutz der Wundnähte für diese Zeit in Einzelkäfigen gehalten. Autoklavierter Zellstoff in den Käfigen diente den Tieren als Rückzugsort und zum Nestbau.

2.4 Material

2.4.1 Verwendete Substanzen

Aqua dest. Milli Q	Millipore GmbH, Burlington, US
Buprenorphin	Indivior Europe limited, Dublin, Irland
CD19 FITC <i>anti-mouse</i> AK	BioLegend, San Diego, US
CD3 APC <i>anti-mouse</i> AK	BioLegend, San Diego, US
CD4 PerCP/Cy5.5 <i>rat anti-mouse</i> AK	BD Biosciences, US
CD45 Pe-Cy7 <i>anti-mouse</i> AK	BioLegend, San Diego, US
CD8 V500 <i>rat anti-mouse</i> AK	BD Biosciences, US
Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid (DAB) Substrate Kit	ZYTOMED Systems, Bargteheide, Deutschland
DOP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Evans Blue-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
F4/80 PE <i>anti-mouse</i> AK	BioLegend, San Diego, US
Gadolinium- Diethylentriaminpentaacetat	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Goat Anti Rat IgG Biotin gelabelt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hämalaun Lösung nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin Lösung nach Gill II	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
iQ SYBR Green	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Isofluran	Piramal critical care, Voorschoten, Niederlande

Isotonische Kochsalzlösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ketamin	Zoetis, Berlin, Deutschland
Ly6C APC <i>rat anti-mouse</i> AK	BD Biosciences, US
Ly6G FITC <i>anti-mouse</i> AK	BioLegend, San Diego, US
Lyse-Puffer	Apotheke, Uniklinik Düsseldorf
Monoclonal Rat Anti Mouse Mac-2	Fa. Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada
<i>Mono-Poly-Resolving Medium</i> (MP-RM)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	
Perjodsäure-Lösung, 0,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, mit Calcium und Magnesium	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, ohne Calcium und Magnesium	Sigma, Steinheim, Deutschland
Pikro-Siriusrot	MORPHISTO GmbH, Offenbach am Main, Deutschland
Proteinase K	
Rat Gamma Globulin	Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, Vereinigte Staaten
Rat monoclonal to Ly6g antibody	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
RNeasy Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Roticlear	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schiff-Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Standardfutter	Ssniff, Soest, Deutschland

Streptavidin POX	Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, Vereinigte Staaten
Triphenyltetrazoliumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vitamin-6-freies Futter	Altromin GmbH & Co.KG, Lage, Deutschland
Vitroclud <i>Mounting medium</i>	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Xylazin	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.4.2 Verwendete Utensilien

20G Venenverweilkatheter	VYCON, Écouen, Frankreich
Deckgläschen	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Greiner 15ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Greiner 50ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Nahtmaterial, verschiedene Fadendicken	Ethicon, Puerto Rico USA
Parafilm	Pechiney plastic packaging, Chicago, US
Pipetten, verschieden Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, verschieden Größen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Skalpelle, verschieden Größen	Pfm medical, Köln, Deutschland

Vasofix Sicherheits-Katheter IV	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
---------------------------------	---

2.4.3 Verwendete Geräte

BD FacsVerse™	BD Biosciences, US
Spektralfotometer/Fluorometer der Serie DS-11	DeNovix, Wilmington, US
Bio-Rad CFX96 system	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Bruker AVANCE III 9.4-T wide bore nuclear magnetic resonance spectrometer	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
M1025 System	SA Instruments, Stony Brook, NY
<i>microimaging unit</i> Micro 2.5	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
Mikroskop Leica DM6B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Leica MZ6	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Leica MZ95	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroventilator mit OP-Tisch	UNO, NL
Mikrotom Jung Biocut 2035	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Tissue-ruptor	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Vortex Genie 2	Scientific industries, New York, US
Zentrifuge Microstar 17R	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Mikro 2000R	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge Rotina 38R	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 120R	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad W20	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.4.4 Verwendete Software

Diskus View	Technisches Büro Hilgers, Königswinter
flowJo@_v10.8.1	BD Biosciences, US
GraphPad Prism 9	GraphPad software Inc, San Diego
ImageJ v1.53c	Wayne Rasband
ParaVision 5.1	Bruker, Rheinstetten, Deutschland

2.5 Methoden

2.5.1 *Left-anterior-descending-artery*-Ligatur-Operation

Bei der *left-anterior-descending-artery* (LAD) -Ligatur-Operation handelt es sich um ein etabliertes Modell, mit dem man einen AMI bei Mäusen unter kontrollierten Bedingungen induzieren kann.

Der Thorax wird dabei unter Narkose und sterilen Bedingungen eröffnet. Unter Anwendung eines Operationsmikroskopes wird die proximale linke Koronararterie aufgesucht und für eine permanente Ligatur des Gefäßes wird ein Faden unternäht und zugezogen. Alternativ wird ein Schlauch über den Faden gezogen, um eine transiente Ligatur zu erreichen. Im Falle der transienten Ligatur wird der Schlauch nach 30 Minuten wieder gelöst, wodurch es zu einer Reperfusion in dem vom Gefäß versorgten Gewebe kommt.

Mit der Methode ruft man einen AMI der Vorderwand hervor, der bei der Bevölkerung Deutschlands ungefähr 50% der Myokardinfarkte ausmacht (10). Somit deckt man mit diesem Vorgehen die häufigste Infarktlokalisierung ab.

2.5.2 Durchführung LAD-Ligatur-Operation

Die Mäuse erhielten intraperitoneal gewichtsadaptiert Ketamin (100 mg/kg BW) und Rompun (10 mg/kg BW), um die drei Bausteine einer Narkose, Analgesie, Hypnose und Relaxierung, zu erreichen. Sie wurden mit einem 20G Venenverweilkatheter (VYCON) intubiert und durch einen speziellen Mikroventilator (UNO, NL) auf einem gewärmten OP-Tisch beatmet. Die Raumluft wurde mit 40 % Sauerstoff und 2 % Isofluran angereichert. Der Brustbereich wurde mithilfe eines Kleintierrasierers enthaart. Nach der klinischen Kontrolle einer ausreichenden Narkosetiefe durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes wurde der Thorax mittels lateraler Sternotomie eröffnet. Dafür wurde ein 1,5 cm breiter Schnitt zwischen der 3. und 4. Rippe appliziert. Mithilfe eines Operationsmikroskopes (Leica MZ95) wurde das Herz frei präpariert, die proximale linke Koronararterie aufgesucht und mit 7-0 Seide unterbunden.

Um eine transiente Ligatur im Sinne eines I/R-Modelles hervorzurufen, wurde ein dünner Schlauch über beide Enden des Fadens durchgezogen und Richtung des Gefäßes zugezogen. Als Erfolgskontrolle diente die Beobachtung des Erblässens des Myokards sowie ST-Strecken-Veränderungen EKG. Die Ischämie wurde für 30 Minuten aufrecht gehalten, danach wurde der Schlauch wieder entfernt und der Faden lose im Thorax belassen. Das Myokard konnte erneut perfundiert werden.

Für eine permanente Ligatur wurde der Faden aus 7-0 Seide stattdessen zu einem festen Knoten zugebunden, was die Myokardischämie verursachte. Auch hier wurden EKG-Veränderungen und Abblässen des Myokards zur Beurteilung herangezogen.

Im Anschluss wurden die Rippen mit zwei Ligaturen aus 4-0 Seide verschlossen, die Muskulatur und Haut wurden mit 5-0 Prolene vernäht. Nach Ausschleichen der Narkose konnten die Mäuse extubiert werden und verweilten bis zum vollständigen Erwachen auf dem erwärmten Operationstisch. Postoperativ

wurden sie für 24 Stunden überwacht und mittels Rotlichtlampe gewärmt. Analgetisch wurden sie für 3 Tage alle 6-8 h mit Buprenorphin (0,1 mg/kg subcutan) versorgt.

2.5.3 Kardiale-Magnetresonanztomografie

Die MRT ist ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Organen und Gewebe. Ihre Wirkweise beruht auf starken Magnetfeldern, die zu einer Anregung der Wasserstoffatome im Körper führen, was wiederum eine Erzeugung elektrischer Signale bewirkt, die in Bilder transferiert werden können. Dabei kann das untersuchte Gewebe, in diesem Fall das Herz, in mehreren Schnitten betrachtet werden.

Verwendet wurde das MRT *Bruker AVANCE III 9.4-T wide bore nuclear magnetic resonance spectrometer* (Bruker, Rheinstetten, Germany) bei einer Frequenz von 400.13 MHz. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde die 25-mm Vogelkäfig-Resonator Kamera *Bruker microimaging unit Micro 2.5* (mit aktiv abgeschirmten Gradientensets [1.5 T/m]) verwendet.

Die Mäuse erhielten während der Aufnahme eine Narkose mit 1,5%igem Isofluran. Eine Analgesie war nicht von Nöten, da der Eingriff nicht schmerzhaft ist. EKG, Atemfrequenz und Körpertemperatur wurden mithilfe eines M1025 Monitors (SA Instruments, Stony Brook, NY) überwacht und die Daten wurden mit der Atemfrequenz synchronisiert. Eine Venenverweilkanüle (Vasofix Sicherheits-Katheter IV, Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) wurde intraperitoneal gelegt, um das Gadolinium haltige Kontrastmittel (Gadolinium-Diethylentriaminpentaacetat [0.2 mmol/kg]) zu applizieren. Abhängig von der Atemfrequenz wurden Videos in der Länge von ein bis zwei Minuten in Lang- und Kurzachse aufgenommen (92).

Zur Analyse des linken Ventrikels wurden 8-10 Aufnahmen in kurzer Achse herangezogen. Um strukturelle Parameter der Herzen zu bewerten, wurden das linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Volumen (LVESV, LVEDV) gemessen. An funktionellen kardialen Parametern wurden Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV) sowie der Schlagvolumenindex (SVI) als Quotient aus SV, Herzfrequenz und der Körperoberfläche erhoben.

2.5.4 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung

Mittels der 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Färbung lässt sich vitales Gewebe von ischämischem Gewebe anhand des Anfärbe-Verhaltens differenzieren. Es handelt sich dabei um eine Redox-Reaktion, bei der in vitalen Zellen vorhandene Dehydrogenasen den Farbstoff Tetrazolium, der farblos ist, zu Formazan reduzieren. Formazan hat ein Extinktionsmaximum bei 492 nm, sodass er rot erscheint. So färbt sich vitales Gewebe rot, während ischämisches Gewebe farblos bleibt (93).

2.5.5 Durchführung TTC

Die Versuchstiere erhielten eine intraperitoneale Narkose mit Ketamin (Ketanest® 100 mg/kg) zur Hypnose und Analgesie und Xylazin (Rompun® 10 mg/kg) zur Muskelrelaxierung. Die ausreichende Narkosetiefe wurde durch ein Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes bestätigt. Es kam zu einer Ausblutung der Tiere mit finaler Absicht, die thorakalen Organe wurden direkt anschließend entnommen und in eisgekühlter isotonischer Kochsalzlösung präpariert. Dabei musste das Herz von umliegendem kardialem Fettgewebe und sonstigen Geweberesten befreit werden. Ein ca. fünf Millimeter langer Abschnitt der Aorta ascendens blieb zur Kanülierung des Herzens bestehen. Über die Kanüle wurden mit isotonischer Kochsalzlösung Blutreste entfernt. Anschließend wurde die Stelle der vorherigen transienten LAD-Ligatur aufgesucht, wo sich noch ein loser Faden des Eingriff befand, und mithilfe eines 7-0 Seidefaden (Seraflex) permanent zugezogen. Über die Kanüle wurde das Herz mit 0,1-prozentige Evans Blue-Lösung (gelöst in isotonischer Kochsalzlösung, Sigma Aldrich) durchspült, wodurch es zu einer Blaufärbung des Myokards kam. Im nächsten Schritt wurde das Herz fest in Frischhaltefolie eingepackt und inkubierte für drei Stunden im Gefrierfach bei -20 °C. Das tiefgefrorene Herz wurde, beginnend bei der Herzspitze, in sechs 1mm breite Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden schließlich in einer einprozentige TTC- Lösung (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, in isotonischer Kochsalzlösung gelöst) für fünf Minuten bei 37 °C gefärbt. Vitales Gewebe wurde durch TTC rot angefärbt, in ischämischem Gewebe wurde der Farbstoff nicht reduziert und stellte sich nahezu weiß dar.

Anschließend wurden Fotos der Schnitte unter einem Mikroskop (Leica DM6B) aufgenommen und mithilfe des Programmes Diskus View (Technisches Büro Hilgers, Königswinter) analysiert.

2.5.6 Histologie

Die Histologie, oder auch Gewebelehre, untersucht Gewebeproben. Dazu wird das entnommene Gewebe in der Regel in Paraffin eingebettet und in sehr feine Schichten im Mikrometerbereich geschnitten. So können verschiedene Gewebestrukturen durch spezielle Färbeverfahren voneinander unterschieden werden. Dabei weisen die verschiedenen Färbelösungen spezifische Affinitäten zu den einzelnen Zellsubtypen oder sogar Zellorganellen auf, sodass z.B. Kollagen, Zellkerne und Zytoplasma differenziert erscheinen. Die gefärbten Schnitte werden zuletzt mit 2,5- bis 400-facher Vergrößerung unter dem Licht- oder Fluoreszenzmikroskop betrachtet und repräsentative Fotos aufgenommen. Bei der Auswertung können quantitativ gewisse Zellen, wie zum Beispiel Granulozyten, gezählt werden. Möglich ist auch eine qualitative Unterscheidung der Zellen z.B. in Bezug auf die Größe, aber auch der prozentuale Anteil einer angefärbten Fläche kann verglichen werden.

Die Pikro-Siriusrot-Färbung ist eine Methode zur Färbung von Kollagenfasern im Gewebe. Kollagen stellt sich dann lichtmikroskopisch rot dar, während Muskelzellen und Zytoplasma gelb erscheinen. So lässt sich Vernarbung des Herzmuskels abgrenzen.

Mit der *Periodic-acid-Schiff* (PAS) Reaktion lassen sich Glykogen und andere mehrkettige Kohlenhydrate in Geweben wie Leber, Herz- oder Skelettmuskulatur anfärben. Mit ihrer Hilfe erscheinen Zellplasma magentarot und Zellkerne blau. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten: Durch Zugabe der Perjodsäure oxidieren freie Hydroxylgruppen an den Kohlenhydraten zu Aldehydgruppen. Im nächsten Schritt kann das im Schiff-Reagenz erhaltene Fuchsin an die Aldehydgruppen binden und die rote Farbe entsteht.

Die IHC ist ein Untergebiet der Histologie, mit der spezifische Antigene auf Zellen oder Geweben zielgerichtet angefärbt werden können. Dazu werden entweder Antikörper verwendet, die mit einem Fluorochrom gekoppelt sind und die erwünschten Strukturen erscheinen farbig unter dem Fluoreszenzmikroskop,

oder Biotin-gekoppelte Antikörper, die durch Färbung mit einem Chromogen eine braune Farbe hervorrufen.

2.5.7 Durchführung Histologie

Die entnommenen Herzen wurden in Paraffin eingebettet. Dafür wurden sie vorsichtig in Metallkästen, die zur Hälfte mit flüssigem Paraffin befüllt waren, eingelassen und auf eine Kühlplatte gestellt. Sobald das Paraffin etwas ausgehärtet war, wurden die Herzen vollständig damit bedeckt. Bis zur ausreichenden Aushärtung verweilten die Proben weiterhin auf der Kühlplatte. Danach konnten sie über Nacht im Kühlschrank gelagert werden und waren am nächsten Tag völlig ausgehärtet.

Die Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom Jung Biocut 2035 in fünf bis acht µm breite Schnitte geschnitten und auf ein Wasserbad gegeben. Es wurden je zehn Schnitte von zehn verschiedenen Ebenen des Herzens angefertigt. Die dünnen Gewebsschichten auf dem Wasserbad wurden auf ein Deckgläschen überführt und vor dem Färbeprozess getrocknet.

Für die Pikro-Siriusrot-Färbung wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert und gewässert. Dazu wurden sie der Reihe nach für fünf Minuten in Roticlear-Lösung, drei Minuten in 100-prozentigem Ethanol, eine Minute in 96-prozentigem Ethanol, eine Minute in 70-prozentigem Ethanol und schließlich in destilliertes Wasser eingetaucht. Zur vorbereitenden Färbung des Gewebes wurden die Proben für 25 Sekunden mit Hämatoxylin Lösung nach Gill II bedeckt und danach für zehn Minuten kontinuierlich mit fließendem Leitungswasser gespült. Im nächsten Schritt wurden sie für 30 Minuten in purer Pikro-Siriusrot-Lösung gefärbt. Abschließend durchliefen die Proben die zu Beginn durchgeführte Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge zur erneuten Entwässerung. Zur Konservierung bis zur Auswertung unter dem Lichtmikroskop wurden sie mit einem Tropfen von Vitroclud *Mounting-Medium* (Langenbrinck) und einem Deckgläschen bedeckt.

Die Bilder wurden in einer 25-fachen Vergrößerung aufgenommen, um möglichst das gesamte Herz abzubilden. Verglichen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde die Ebene, die den größten Anteil der Vorderwand des linken Ventrikels abbildete, da dort der Myokardinfarkt hervorgerufen wurde. Die

Fotos wurden mit dem Programm ImageJ (v1.53c, Wayne Rasband) ausgewertet. Dabei wurde der prozentuale Anteil der rot gefärbten Fläche, also der Narbenfläche, bestimmt.

Für die PAS-Färbung wurden die Schnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und gewässert und zusätzlich am Ende in zehnprozentigem Formalin fixiert. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten in 0,5-prozentiger Perjodsäure-Lösung oxidiert. Sie wurden in destilliertem Wasser gewaschen und inkubierten danach für 15 Minuten in Schiff-Reagenz. Dabei färbten sich die Schnitte makroskopisch hellrosa. Um sie zu waschen, wurden sie für fünf Minuten unter lauwarmes, laufendes Leitungswasser gehalten, wobei sie eine dunkelpinke Farbe annahmen. Im weiteren Verlauf wurden sie für eine Minute mit Hämalaun-Lösung nach Mayer gegengefärbt und danach erneut unter Leitungswasser gewaschen. Wie bei der Pikro-Siriusrot-Färbung wurden sie schließlich wieder entwässert, mit Vitroclud *Mounting-Medium* (Langenbrinck) bedeckt und ein kleines Deckglas aufgelegt. Für die Auswertung wurden Bilder in einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen. Dabei wurden je fünf Herzmuskelzellen aus fünf verschiedenen Bereichen des Infarktes begutachtet und mit ImageJ in der Länge gemessen.

Für die IHC wurden die Schnitte ebenfalls im ersten Schritt entparaffiniert und gewässert. Vor Färbung mit den Antikörpern wurde eine Antigendemaskierung durch Erhitzen der Schnitte in der Mikrowelle zweimal für zehn Minuten bei 600 Watt durchgeführt. Anschließend kamen die Proben für fünf Minuten in eine Peroxidase-Block Lösung mit dreiprozentigem Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur (RT), wurden anschließend dreifach in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mittels 2,5-prozentigem Ziegen Serum 20 Minuten lang geblockt.

Zur Anfärbung der Gewebsmakrophagen wurde der primäre Antikörper *Monoclonal Rat Anti Mouse Mac-2* (Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada) in einer Konzentration von 0,25 µg/ml, verdünnt in PBS und dreiprozentigem Ziegen Serum, verwendet. Als Negativkontrolle wurde *Rat Gamma Globulin* (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, Vereinigte Staaten) in derselben Konzentration benutzt. Beide Antikörper inkubierten über Nacht bei 4 °C im Dunklen und wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper *Goat Anti Rat IgG*

(Biotin gelabelt, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer 5 µg/ml Konzentration bedeckt und inkubierten für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit PBS (dreimalig) wurde Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (4 µg/ml, Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, Vereinigte Staaten) aufgebracht. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 45 Minuten bei RT und im Dunklen, anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Zur farblichen Entwicklung der an die Antigene gebundenen Peroxidase wurde 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, ZYTOMED Systems, Bargteheide, Deutschland) verwendet. Je zwei Tropfen der Lösung wurden pro Schnitt appliziert und inkubierten für fünf Minuten, die Schnitte wurden anschließend in destilliertem Wasser gewaschen.

Zuletzt wurden sie für 30 Sekunden in Hämalaun-Lösung nach Mayer gegengefärbt und für eine Minute in Leitungswasser gebläut.

Analog zur Färbung der Gewebsmakrophagen wurden die neutrophilen Granulozyten gefärbt. Als primärer Antikörper wurde *Rat monoclonal to Ly6g antibody* (abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) verwendet, als Negativkontrolle *Rat Gamma Globulin* (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, Vereinigte Staaten) und als sekundärer Antikörper ebenfalls *Goat Anti Rat IgG* (Biotin gelabelt, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

Die Schnitte wurden wieder entwässert, mit Vitroclud *Mounting-Medium* (Langenbrinck) bedeckt und Deckgläser aufgelegt. Es wurden Bilder in 100-facher Vergrößerung des linken Ventrikels aufgenommen. In einem Areal von 100 x 100 µm wurden an repräsentativen Stellen des Infarktes die braun gefärbten Zellen, entsprechend den Makrophagen bzw. Neutrophilen, ausgezählt.

2.5.8 Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur künstlichen Vervielfältigung ausgewählter Gen-Sequenzen der vorliegenden Desoxyribonukleinsäure (DNA). Sie wird angewandt, wenn nur geringe Probenmengen vorhanden sind, wie zum Beispiel bei den sehr kleinen Herzen der Mäuse.

Bevor die DNA-Sequenzen vervielfältigt werden können, muss zuerst Ribonukleinsäure (RNA) aus dem Myokardgewebe extrahiert und anschließend in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert werden. Im Anschluss wird die cDNA vervielfältigt. Bei der *real-time* PCR, einer in dieser Arbeit angewandten Unterform, wird die Zeit bestimmt, nach der das Ziel-Gen identifizierbar ist. So kann je nach Dauer des Experiments auf die Quantität der Genexpression geschlossen und Proben miteinander verglichen werden. Die Vorgehensweise wird in den nächsten Unterkapiteln erläutert.

2.5.8.1 Extraktion der Ribonukleinsäure

Zur Durchführung der *real-time*-Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zunächst RNA mithilfe des *RNeasy-Kits* (Qiagen) aus dem entnommenen Herzgewebe isoliert. Dazu wurde im ersten Schritt die Gewebsstruktur mit RLT-Puffer (Qiagen) lysiert. Dem Puffer wurde zuvor β -Mercaptoethanol in einer 1:100 Verdünnung hinzugefügt, um möglicherweise in der Lösung vorhandene RNase-Enzyme zu inaktivieren und somit die RNA zu schützen. Der RLT-Puffer sorgte neben der Lyse außerdem für eine verbesserte Bindung der RNA an die Silikon-Membran durch seine hohe Konzentration an Guanidin-Isothiocyanat. Anschließend wurde die Suspension mithilfe eines sog. *Tissue-ruptors* (Qiagen) homogenisiert. 300 μ l der Lösung wurden in *QIAshredder* (Qiagen) überführt und für zwei Minuten bei 13.200 g zentrifugiert. 300 μ l des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß DOP überführt und inkubierten für zehn Minuten bei 55 °C mit 600 μ l Proteinase K Lösung (10 μ l Proteinase K in 590 μ l H₂O), um vorhandene Proteine zu lysieren. Es wurde danach für drei Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, 900 μ l des Überstandes wurden in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. 450 μ l eines 100-prozentigen Ethanol wurden hinzugefügt und die Mischung wurde auf einer Vortex-Platte gut durchmischt. Zur Trennung der gelösten RNA vom restlichen Material wurden 700 μ l der Suspension auf die *RNeasy-Mini-spin* Silikatsäule pipettiert und bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Dabei band die RNA an die Säule, die nicht benötigten Bestandteile setzten sich unten ab (= *flow-through*) und wurden verworfen. Die übrigen 650 μ l der Gewebslösung wurden ebenfalls auf die Säule pipettiert und nach gleichem Schema zentrifugiert. Die nächsten Schritte fungierten alle als Waschprozess, um eine

höhere Reinheit der Proben zu erhalten. 350 µl des RW1-Puffers aus dem Kit wurden auf die Säule gegeben und erneut bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert, der *flow-through* verworfen. 80 µl DNase I Mix (70 µl RDD-Puffer + 10 µl DNase-I-Stammlösung) kamen auf die Säule und inkubierten dort für 15 Minuten bei Raumtemperatur, wodurch DNA-Reste entfernt wurden. Wieder 350µl des RW1-Puffers wurden auf die Säule gegeben und bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert, der *flow-through* verworfen. 500 µl des RPE-Puffers wurden auf die Säule pipettiert und bei 10.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, in der letzten Durchführung allerdings stattdessen zwei Minuten zentrifugiert. Mit Zentrifugation bei 13.200 g für eine Minute wurde der restliche Waschpuffer von der Säule entfernt.

Um schließlich die an der Silikatsäule gebundene RNA in Lösung zu bringen, wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und inkubierten dort für fünf Minuten. Im letzten Schritt wurde zweimal für jeweils eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert, das Eluat vor dem zweiten Durchgang erneut auf die Säule gebracht, um die Ausbeute an RNA zu erhöhen.

5µl der extrahierten RNA wurden für eine Qualitätskontrolle mit einem Fluoremeter (DeNovix) verwendet.

2.5.8.2 Konvertierung in komplementäre DNA

Zur Durchführung der *real-time*-Polymerase-Ketten-Reaktion musste die extrahierte RNA in cDNA transkribiert werden. Dazu wurde das *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Qiagen) verwendet. Hierbei werden zwei Schritte benötigt: In einem ersten Schritt wird vorhandene genomische DNA aus der Suspension bereinigt, um eine Kontamination zu vermeiden. Dazu inkubierten die Proben für fünf Minuten bei 37 °C mit 6 µl des im Kit enthaltenen DNA-Elimination-Puffers und 8 µl RNase-freiem Wasser und wurden anschließend auf Eis gestellt. Im zweiten Schritt wurden 6µl zu der Mischung gegeben. Sie inkubierten 15 Minuten bei 42 °C gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei 95 °C, um die Reaktion zu stoppen. Die fertige Probe lagerte bis zur Messung auf Eis.

2.5.8.3 Durchführung PCR

Zur Amplifizierung der gewonnenen RNA und anschließender Messung wurde der *iQ SYBR Green Master Mix* (Thermo Fischer) verwendet. Darin enthalten sind alle für die PCR notwendigen Enzyme. Zu ergänzen waren Primer der zu messenden Gene atriales natriuretisches Peptid, natriuretisches Peptid Typ B und Collagen1a2 (Thermo Fischer). Die *real-time* PCR wurde auf dem *Bio-Rad CFX96* System durchgeführt.

2.5.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch bekannt als FACS (=Fluorescence activated cell scanning/sorting), ist eine seit 1969 etablierte Methode. Sie wurde erstmals durch Leonard Herzenberg beschrieben (94). Eine Suspension von Zellen wird hierbei auf Ebene von „*single cells*“, also einzelnen Zellen, analysiert. Dabei wird zwischen der Größe der Zellen, der Granularität und der Antigen-Expression unterschieden. Somit können die Zellen quantifiziert, aber auch qualitativ identifiziert werden. Das *Cytometer* besteht aus einem Flusskanal, in der die Zellen durch einen Unterdruck in einen laminaren Fluss gebracht werden, drei verschiedenen Lasern in den Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 633 nm, verschiedenen Detektoren und einem Computer zur Verarbeitung der Impulse in sogenannte FacsPlots. Die Laser treffen im 90°-Winkel auf den Zellfluss. Dabei wird detektiert, wie viel des Lichtes auf der gegenüberliegenden Seite ankommt (*forward scatter*, FSC), und wie viel Licht gestreut wird (*sideward scatter*, SSC). Anhand dessen kann unterschieden werden, wie groß und wie granular die Zellen sind. Zudem können Antikörper, die mit einem Fluorochrom gekoppelt sind, zielgerichtet an die Antigene der Zelloberfläche binden. Die Fluorochrome werden von den verschiedenen Lasern angeregt und geben fluoreszierendes Licht in einer bekannten Wellenlänge ab. Das *Cytometer* kann durch vorherige Definition der verwendeten Antikörper die emittierten Wellenlängen dem jeweiligen Antigen zuordnen und so die Zellen nach ihrer Antigenexpression sortieren und quantifizieren. Jeder einzelnen Zelle wird ein Wert für FSC und SCA zugeteilt. Dargestellt wird sie durch einen Punkt im FACS-Plot. Dadurch können manchmal bereits verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden. Für

eine genauere Unterscheidung innerhalb einer Population ist es nötig, diese auf Antigen Expression untersuchen.

2.5.10 Durchführung Durchflusszytometrie

Zur Qualifizierung und Quantifizierung der murinen Leukozyten wurden 500 µl heparin-antikoaguliertes Vollblut langsam auf 900 µl *Mono-Poly-Resolving Medium* (MP-RM) in 5 ml *FACS-Tubes* pipettiert, ohne die Flüssigkeiten zu vermischen. Anschließend wurden die Proben für 45 Minuten, bei 300 g und Raumtemperatur, ohne Bremse, zentrifugiert. Es bilden sich bei der Zentrifugation verschiedene Schichten, von unten nach oben: Hämatokrit, MP-RM, Polymorphnukleäre Leukozyten, MP-RM, mononukleäre Leukozyten und Plasma. Das Plasma wurde verworfen, die nachfolgenden Schichten wurden vorsichtig vom Hämatokrit getrennt und in 2,5 ml PBS resuspendiert, um sie zu waschen. Es wurde für zehn Minuten bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. 5 ml Lyse-Puffer wurden hinzugefügt, um übrig gebliebene Erythrozyten zu lysieren, und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss wie oben beschrieben mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das aus Leukozyten bestehende *pellet* in 400 µl PBS resuspendiert und je 200 µl der Suspension zur Färbung auf zwei 0.5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Den Proben wurden Antikörper in einer 1:100 Verdünnung hinzugefügt. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei 4 °C im Lichtgeschützten wurden 250 µl PBS hinzugefügt und bei 500 g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Die dann gefärbten und gewaschenen *Pellets* wurden zur finalen Messung am *Flow-Cytometer* in 200 µl PBS gelöst.

Die Färbung der Proben erfolgte mit zwei verschiedenen Antikörper-Panels. CD45 ist ein Glykoprotein, welches alle weißen Blutkörperchen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Beide *panels* enthielten einen Antikörper für CD45, gekoppelt mit dem Fluorochrom PE-Cy7, als Marker, um die Leukozyten in den Proben sicher als solche zu identifizieren und sie vom Zell-Debris zu trennen. In Panel 1 waren außerdem Antikörper gegen CD3 als Oberflächenmarker für T-Zellen, gegen CD19 als Marker für B-Zellen, und gegen CD4/CD8 enthalten, mit denen sich die T-Zellen weiterhin in die Untergruppen T-Helfer- (TH) und T-Killer-

(TK) Zellen differenzieren ließen. In Panel 2 waren Antikörper gegen Ly6G, ein Antigen, das Mäuse auf Granulozyten exprimieren, und Ly6C, welches sich auf Monozyten befindet. Um die zirkulierenden Makrophagen abzugrenzen, wurde ein Antikörper gegen F4/80 angewandt.

Ausgewertet wurde mit FlowJo® (v10.8.1, BD Life Sciences, US).

2.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Statistik Software GraphPad-Prism© 9.0 (GraphPad software Inc, San Diego) durchgeführt. Im ersten Schritt wurde durch Anwendung von Kolmogorov-Smirnof-Tests und Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Bei normalverteilten Variablen wurden gepaarte bzw. ungepaarte T-Test angewandt, bei nicht-normalverteilten Variablen wurde ein Mann-Whitney U Test durchgeführt. Um die DOP-Effekte zwischen S1PR1 Cardio Cre- und S1PR1 Cardio Cre+ zu vergleichen, wurde eine *two-way-ANOVA* Analyse durchgeführt. Für normalverteilte Variablen werden die Ergebnisse und die deskriptiven Statistiken der erhobenen Daten als Mittelwerte mit Standardabweichung (Mean \pm SD) dargestellt. Binäre Variablen werden in der deskriptiven Statistik als absolute Anzahl mit prozentuaalem Anteil an der Population in Klammer (No. [%]) präsentiert. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt. P-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen. (91)

3 Ergebnisse

3.1 Gravimetrische Parameter

Es wurden Körpergewicht der Versuchsmäuse und die durchschnittliche Herzfrequenz während der Versuche erhoben und verglichen.

Das Körpergewicht der Mäuse unterschied sich weder bei den Wildtyp Mäusen noch bei den S1PR1-defizienten Mäusen (S1PR1 Cardio Cre+) zwischen der Kontrollgruppe und der DOP-Gruppe (Wildtypen: Kontrolle (Con) $26,35 \pm 5,52$ g vs. DOP $23,25 \pm 2,08$ g, $p = 0,2673$; S1PR1 Cardio Cre+: Con $24,02 \pm 1,47$ g vs. DOP $21,99 \pm 1,42$ g, $p = 0,3568$) (s. Abb. 3A).

Auch bezüglich der Herzfrequenz, gemessen in Schlägen pro Minute (*beats per minute*, bpm), konnten kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Wildtypen: Con: $546,80 \pm 52,60$ bpm vs. DOP: $527,00 \pm 39,24$ bpm, $p = 0,9859$; S1PR1 Cardio Cre+: Con: $533,90 \pm 47,99$ bpm vs. DOP: $556,10 \pm 71,12$ bpm, $p = 0,9894$) (s. Abb. 3B).

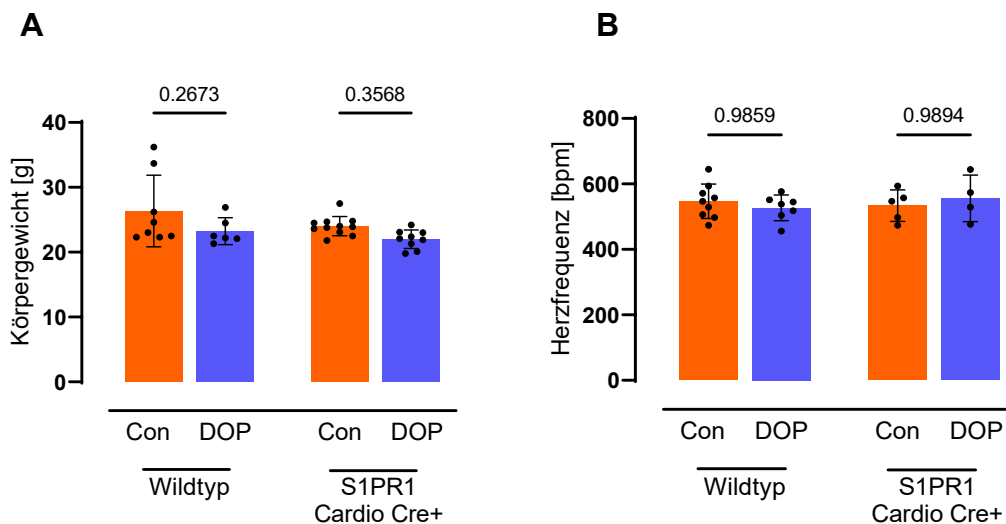


Abb. 3: Gravimetrische Parameter während der Versuche: A) zeigt das Körpergewicht der Versuchsmäuse, welches sich nicht zwischen den Gruppen unterschied. B) zeigt die durchschnittlichen Herzfrequenzen während der Versuche, auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. (g = Gramm, bpm = *beats per minute*, Schläge pro Minute, Con= Kontrolle; DOP= mit DOP behandelte Mäuse, S1PR1 Cardio Cre+= S1PR1-defiziente Mäuse)

3.2 Experimentelle Versuchsergebnisse

3.2.1 Eine Inhibition der S1P-Lyase vor Induktion der Ischämie verbessert die post-ischämische myokardiale Reparatur:

Durch eine permanente oder transiente Ligatur der LAD wurde ein AMI hervorgerufen. Verglichen wurden Versuchstiere, die zuvor sieben Tage lang den S1P-Lyase-Hemmer DOP über die Nahrung erhielten, mit Kontrolltieren ohne DOP-Zufuhr. Wie erwartet konnte DOP die Konzentration der S1P-Plasmaspiegel zur Zeit des Myokardinfarkts um das Vierfache erhöhen (Con: $0,97 \pm 0,22 \mu\text{M}$ vs. DOP: $3,83 \pm 0,22 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$, (s. Abb. 4)) (91).

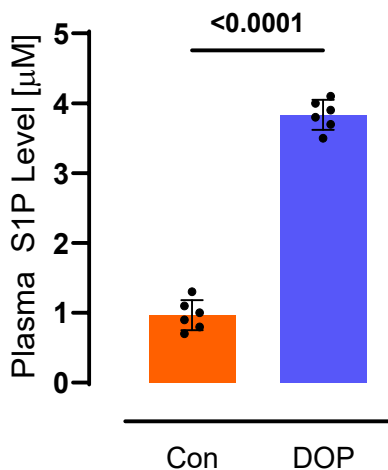


Abb. 4: S1P-Plasma-Konzentration zum Zeitpunkt der Ligatur: DOP erhöhte die S1P-Plasmalevel um das 4-fache zum Zeitpunkt des AMI (μM = Mikromolar, Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

Die Gabe von DOP sieben Tage vor einer transienten Ligatur führte nach 24 Stunden zu einer Reduktion der Infarktgröße (*infarct size*, IS), gemessen mithilfe einer TTC-Färbung (IS: Con: $42,02 \pm 3,91 \%$ vs. DOP: $37,01 \pm 3,27 \%$, $p = 0.0307$ (s. Abb. 5A)). Das durch die Ischämie gefährdete Gewebe, genannt *area at risk* (AAR), unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (AAR: Con: $45,58 \pm 6,30 \%$ vs. DOP: $45,38 \pm 6,93 \%$, $p = 0.9562$ (s. Abb. 5B)).

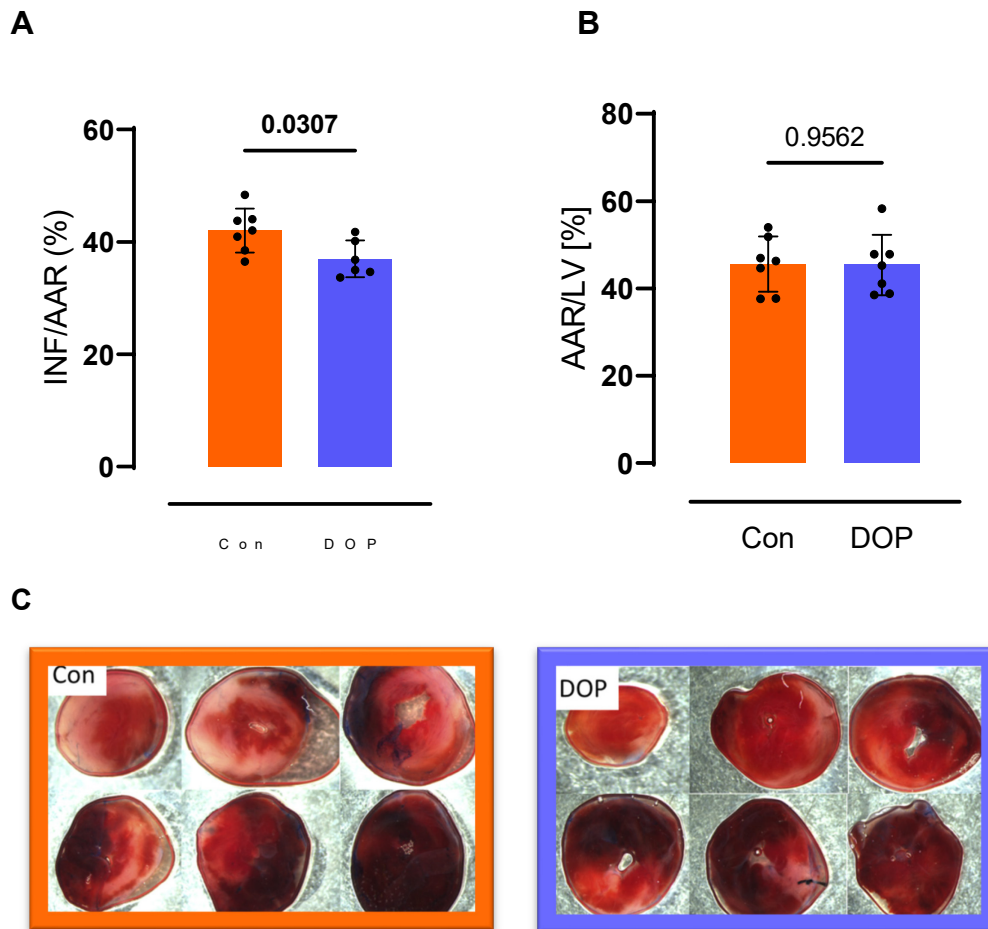


Abb. 5: Infarktgröße und gefährdetes Gewebe 24 Stunden nach transienter Ligatur: Die Erhöhung der S1P-Konzentration mit DOP konnte die Infarktgröße 24 Stunden nach transienter Ligatur signifikant verringern (Graph A). Das durch die Ischämie gefährdete Gewebe unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (Graph B). In C) sind repräsentative Bilder der TTC gefärbten Herzen nach 24 Stunden zu sehen. Die hellen, fast weißen Areale entsprechen dem Infarktbereich, das gefährdete Gewebe ist rötlich verfärbt. (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse)

24 Stunden nach der Reperfusion kam es in der DOP-Gruppe weiterhin zu einer Verbesserung des SV und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) (SV: Con: $26,08 \pm 3,31 \mu\text{l}$ vs. DOP: $31,48 \pm 2,36 \mu\text{l}$, $p = 0.0033$ (s. Abb. 6A); EF: Con: $37,68 \pm 3,64 \%$ vs. DOP: $43,45 \pm 4,87 \%$, $p = 0.0211$ (s. Abb. 6B)). Die strukturellen Parameter LVEDV und LVESV blieben unverändert (LVEDV: Con: $69,38 \pm 7,71 \mu\text{l}$ vs. DOP: $71,49 \pm 6,46 \mu\text{l}$, $p = 0.5622$ (s. Abb. 6C); LVESV: Con: $43,30 \pm 6,05 \mu\text{l}$ vs. DOP: $41,56 \pm 5,55 \mu\text{l}$, $p = 0.5594$ (s. Abb. 6D)).

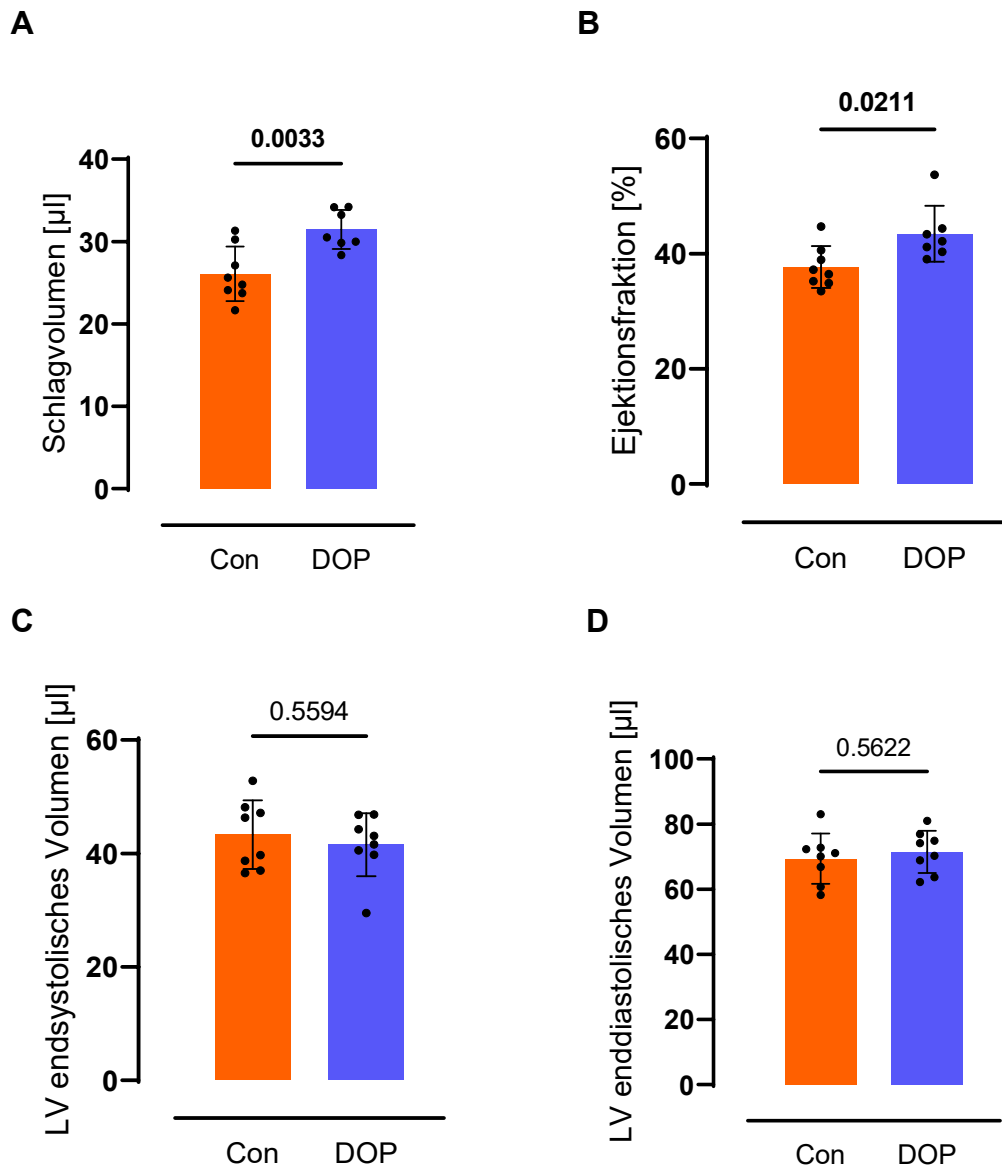


Abb. 6: Funktionelle und strukturelle Parameter, 24 Stunden nach transienter Ligatur, Kontrolle vs. DOP: In der DOP Gruppe kam es zu einer Verbesserung der funktionellen Parameter: A) Schlagvolumen (SV [µl]), B) Ejektionsfraktion (EF [%]). Die strukturellen Parameter unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen: C) linksventrikuläres endsystolisches Volumen (ESV [µl]), D) linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (EDV [µl]) (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

Im Modell eines schweren Myokardinfarkts ohne Reperfusion wurden 24 Stunden nach der permanenten Ligatur cMRTs durchgeführt, um die Größe der Infarkt Narben zu bestimmen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der DOP-Gruppe gezeigt werden (Con: $26,27 \pm 8,32$ % vs. DOP: $31,57 \pm 7,28$ %, $p = 0.15$ (s. Abb. 7)). (91)

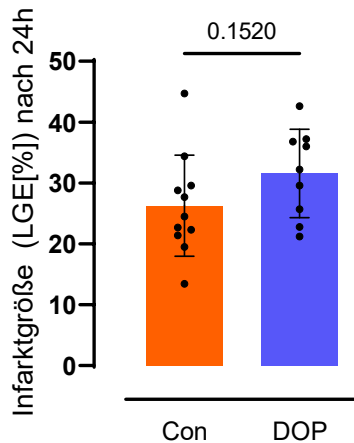
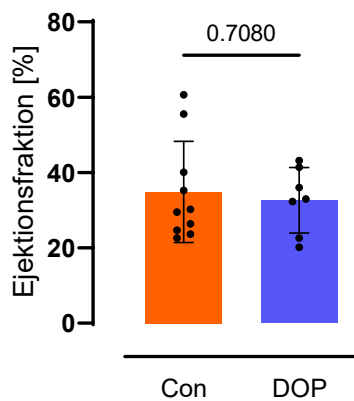


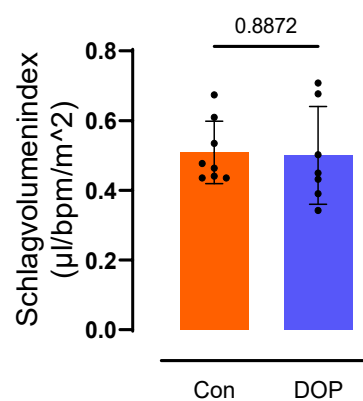
Abb. 7: Infarktgröße 24 Stunden nach permanenter Ligatur: Der Graph zeigt die Infarktgröße nach 24 Stunden, gemessen durch cMRT, die sich nicht zwischen den Gruppen unterschied (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

Ähnlich verhielt es sich mit den funktionellen Parametern SVI (SV/Herzschlag/Körperoberfläche; $\mu\text{l}/\text{Schlag}/\text{m}^2$: Con: $0,51 \pm 0,09$ vs. DOP: $0,50 \pm 0,14$, $p = 0,8872$ (s. Abb. 8B)) und EF (EF: Con: $34,86 \pm 13,41$ % vs. DOP: $32,64 \pm 8,72$ %, $p = 0,7080$ (s. Abb. 8A)), sowie den strukturellen Parametern LVESV (Con: $47,45 \pm 17,96$ μl vs. DOP: $49,56 \pm 18,68$ μl , $p = 0,8175$ (s. Abb. 8C und Abb. 8B)) und LVEDV (Con: $102,20 \pm 29,82$ μl vs. DOP: $92,23 \pm 23,89$ μl , $p = 0,7984$ (s. Abb. 8D)). (91)

A



B



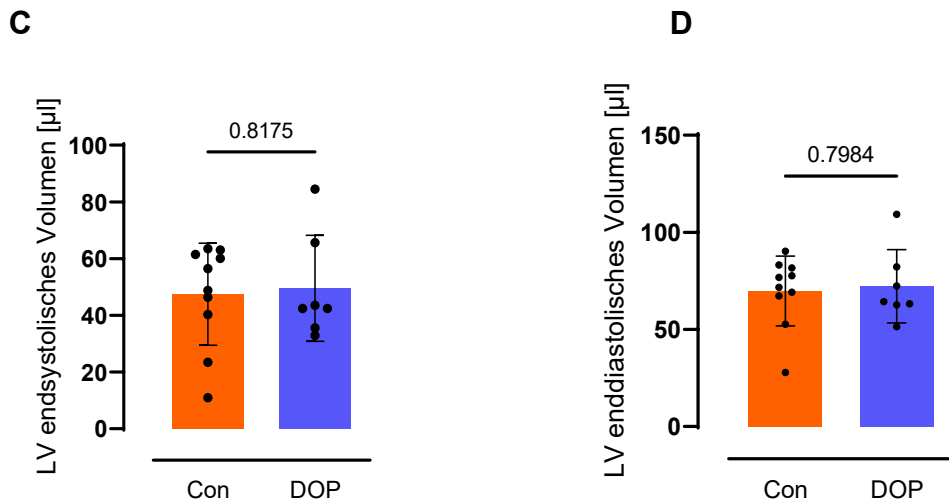


Abb. 8: Funktionelle und strukturelle Parameter, 24 Stunden nach permanenter Ligatur, Kontrolle vs. DOP: Die funktionellen und strukturellen Parameter, verglichen zwischen Kontrollen und mit DOP behandelten Mäusen, unterschieden sich nicht nach 24 Stunden. A) Ejektionsfraktion (EF, [%]), B) Schlagvolumenindex (SVI, [SV/Herzfrequenz/Körperoberfläche; µl/bpm/m²]), C) linksventrikuläres endsystolisches Volumen (ESV, [µl]), D) linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (EDV, [µl]) (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

21 Tage nach permanenter Ligatur hingegen lieferten die cMRTs andere Ergebnisse. In der DOP-Gruppe kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Verbesserung der systolischen Funktion (EF: Con: 26,42 ± 8,74 % vs. DOP: 38,22 ± 11,82 %, p = 0.0448 (s. Abb. 9A); SVI [µl/bpm/m²]: Con: 0,55 ± 0,07 vs. DOP: 0,80 ± 0,22, p = 0.009 (s. Abb. 9B)), sowie zu einer sichtbaren, aber nicht statistisch signifikanten Verbesserung der endsystolischen und enddiastolischen Volumina (ESV: Con: 81,39 ± 26,64 µl vs. DOP: 58,92 ± 25,34 µl, p = 0.1195 (s. Abb. 9C); EDV: Con: 102,20 ± 29,82 µl vs. DOP: 92,23 ± 23,89 µl, p = 0.48 (s. Abb. 9D)). (91)

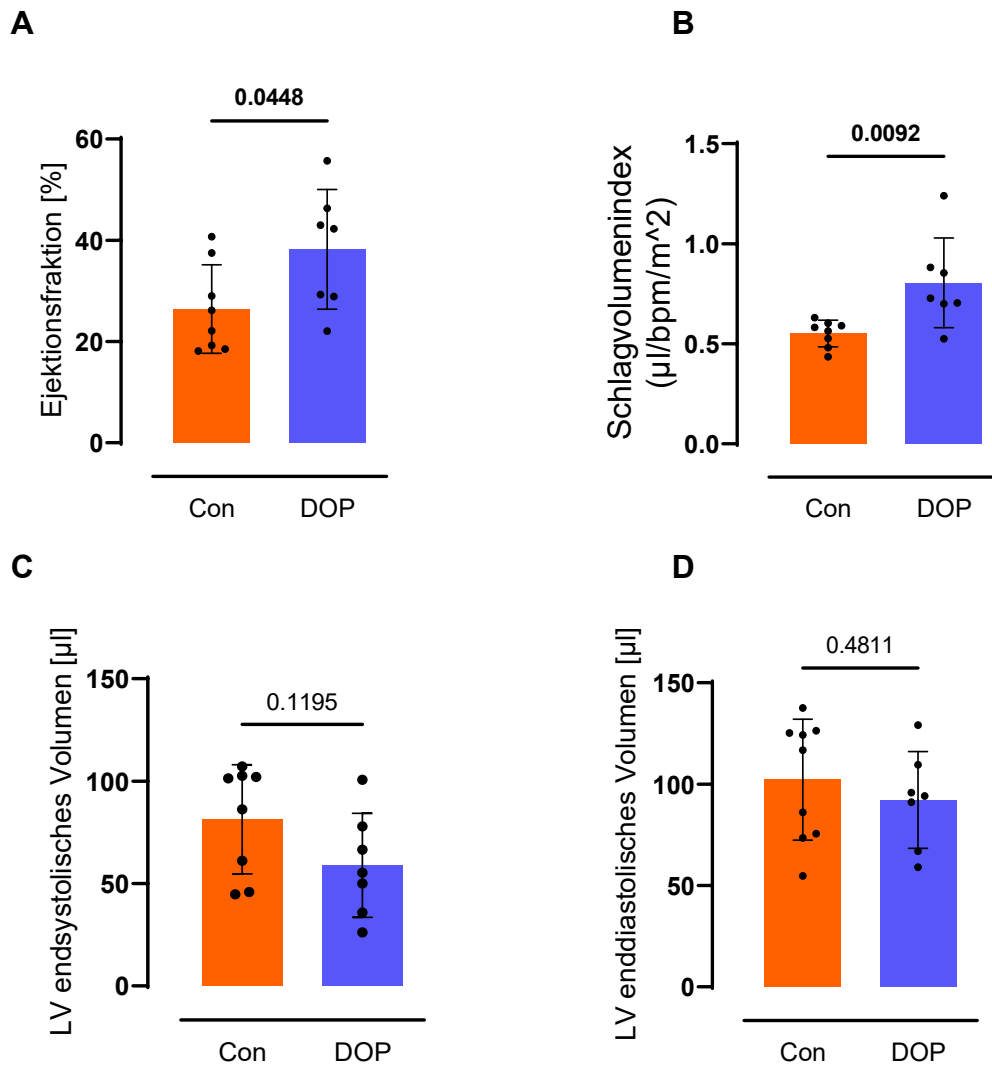


Abb. 9: Funktionelle und strukturelle Parameter, 21 Tage nach permanenter Ligatur, Kontrolle vs. DOP: Die systolische Funktion wurde durch die DOP Behandlung verbessert, das endsystolische und enddiastolische Volumen waren numerisch kleiner. A) Ejektionsfraktion (EF, [%]), B) Schlagvolumenindex (SVI, [SV/Herzfrequenz/Körperoberfläche; $\mu\text{l}/\text{bpm}/\text{m}^2$]), C) linksventrikuläres endsystolisches Volumen (ESV, [μl]), D) linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (EDV, [μl]) (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

Ferner wurde die Gen-Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP), des natriuretischen Peptids Typ B (BNP) und von Collagen1a2 (Coll1a2) im *remote*-Gewebe des linksventrikulären Myokards 21 Tage nach permanenter Ligatur untersucht. Hier konnte für alle untersuchten Gene eine Reduktion der Expression in den mit DOP behandelten Mäusen gezeigt werden. (ANP: $0,58 \pm 0,34$ -fache der Kontrolle, $p = 0,0688$; BNP: $0,49 \pm 0,24$ -fache der Kontrolle, $p = 0,0017$; Coll1a2: $0,45 \pm 0,17$ -fache der Kontrolle, $p < 0,0001$ (s. Abb. 10)). (91)

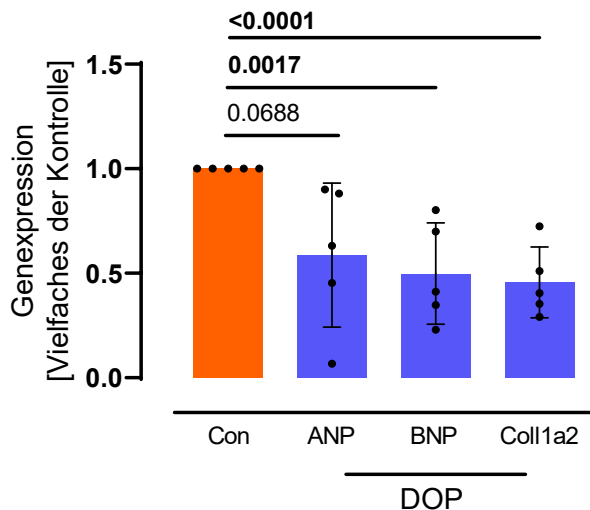


Abb. 10: Gen-Expression im *remote* Myokard des linken Ventrikels 21 Tage nach permanenter Ligatur: An Tag 21 nach Ischämie kam es in der DOP Gruppe zu einer Veränderung der Gen Expression (gemessen mit *real-time* PCR; ANP= atriales natriuretisches Peptid; BNP = B-Typ Natriuretisches Peptid; Coll1a2 = Collagen1a2; Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

Zudem ergaben die histologischen Analysen eine Verkleinerung des Kardiomyozyten-Durchmessers im *remote*-Herzgewebe der DOP-Gruppe (Con: $21,95 \pm 1,59$ % vs. DOP: $17,35 \pm 0,77$ %, $p = 0.0020$ (s. Abb. 11A, 11B)). (91)

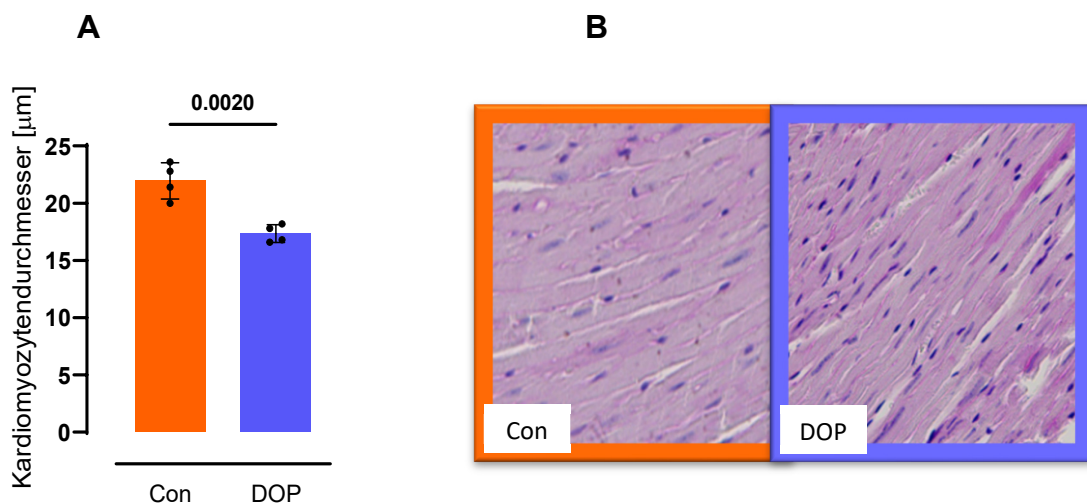


Abb. 11: Histomorphologische Untersuchung der Kardiomyozyten-Durchmesser 21 Tage nach permanenter Ligatur: A) In der Histomorphologie zeigten sich verringerte Kardiomyozyten-Durchmesser in der mit DOP behandelten Gruppe (mindestens in je fünf Kardiomyozyten und fünf Schnitten gemessen). B) zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Kardiomyozyten, in periodic acid-Schiff (PAS) Färbung, 100-fache

Vergrößerung, nach 21 Tagen (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

Darüber hinaus war die Narbengröße im Herzgewebe in der DOP-Gruppe an Tag 21 nach permanenter Ligatur verkleinert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Con: $18,40 \pm 6,61$ % vs. DOP: $11,97 \pm 6,83$ %, $p = 0.0494$ (s. Abb. 12A, 12B)). (91)

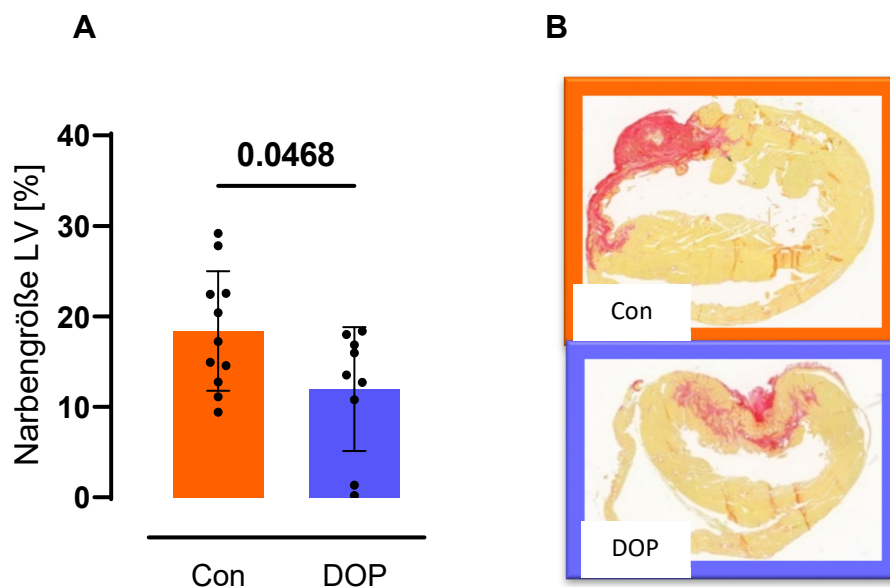


Abb. 12: Kardiale Narbengröße 21 Tage nach permanenter Ligatur, mit DOP Vorbehandlung: A) Herzmuskelfibrose war bei mit DOP behandelten Mäusen an Tag 21 nach AMI reduziert. B) zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen, in Siriusrotfärbung, linker Ventrikel, 25-fache Vergrößerung, nach 21 Tagen. Hierbei erkennt man rot angefärbt das Narbengewebe. (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

3.2.2 DOP verbessert den post-ischämischen myokardialen Umbau auf eine S1PR1-abhängige Weise:

Auch beim Vergleich zwischen S1PR1-defizienten- und Wildtypmäusen gab es 24 Stunden nach Myokardinfarkt keine signifikanten Unterschiede mit und ohne DOP-Behandlung in Bezug auf EF (s. Abb. 13A) und SVI (s. Abb. 13B) (EF: Cre-Con: $27,23 \pm 5,47$ % vs. Cre- DOP: $29,03 \pm 6,99$ %, $p = 0.9724$; Cre+ Con: $28,09 \pm 9,24$ % vs. Cre+ DOP: $24,85 \pm 6,53$ %, $p = 0.8795$; SVI [$\mu\text{l}/\text{Herzfrequenz}/\text{m}^2$]: Cre- Con: $0,59 \pm 0,18$ vs. Cre- DOP: $0,75 \pm 0,10$, $p = 0.6510$; Cre+ Con; $0,73 \pm 0,29$ vs. Cre+ DOP: $0,87 \pm 0,18$, $p = 0.7422$). (91)

Ähnlich verhielt es sich mit den strukturellen Parametern endsystolischer Durchmesser (ESD, s. Abb. 13C) und enddiastolischer Durchmesser (EDD, s. Abb. 13D) (ESD: Cre- Con: $3,30 \pm 0,55$ mm vs. Cre- DOP: $3,39 \pm 0,49$ mm, $p = 0,9852$, Cre+ Con: $3,31 \pm 0,35$ mm vs. Cre+ DOP: $3,13 \pm 0,36$ mm, $p = 0,9090$; EDD: Cre- Con: $3,99 \pm 0,45$ mm vs. Cre- DOP: $3,98 \pm 0,6$ mm, $p > 0,9999$, Cre+ Con: $3,92 \pm 0,22$ mm vs. Cre+ DOP: $3,69 \pm 0,41$ mm, $p = 0,8095$). (91)

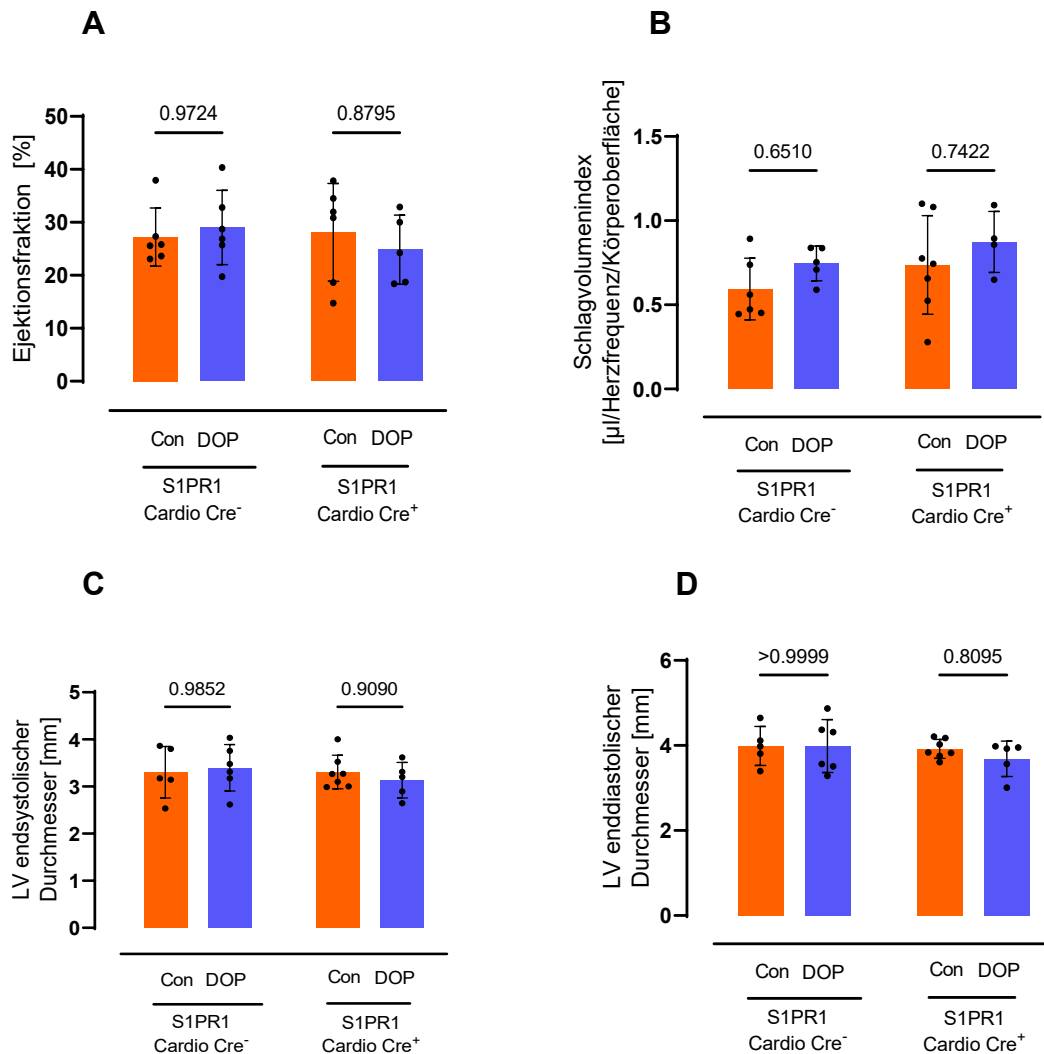
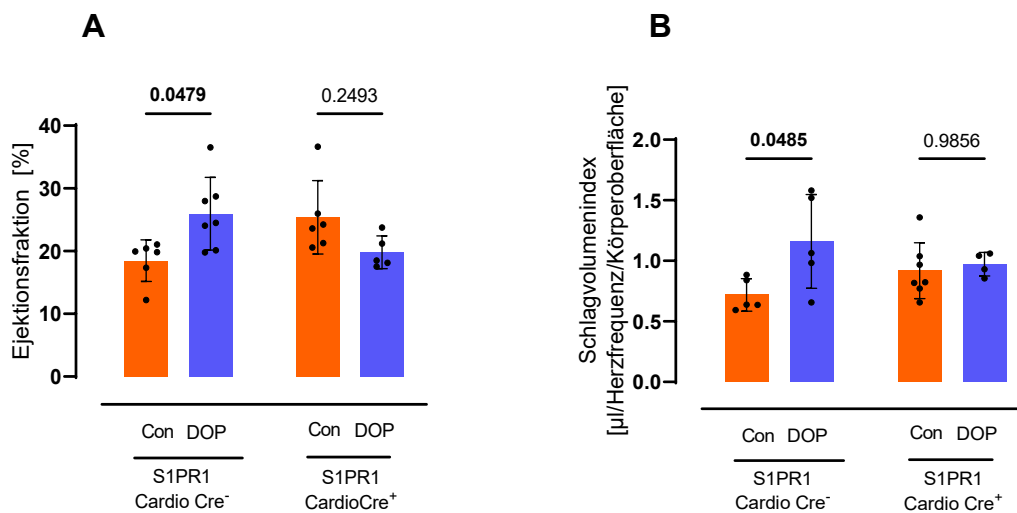


Abb. 13: Funktionelle und strukturelle Parameter bei den S1PR1 Cardio Cre- und S1PR1 Cardio Cre+, 24 Stunden nach Ligatur, jeweils Kontrolle vs. DOP: 24 Stunden nach Ligatur der LAD gab es keine Unterschiede zwischen S1PR1 Cardio Cre- und Cre+ mit und ohne DOP Behandlung. A) Ejektionsfraktion (EF, [%]) B) Schlagvolumenindex (SVI, [SV/Herzfrequenz/Körperoberfläche; $\mu\text{l}/\text{bpm}/\text{m}^2$]), C) linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser [mm], D) linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser [mm], (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse, S1PR1 Cardio Cre+ = S1PR1-defiziente Mäuse, S1PR1 Cardio Cre- = Wildtypmäuse). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

Dahingegen zeigten die S1PR1-defizienten Tiere mit DOP-Behandlung an Tag 21 eine Verbesserung der EF und des SVI (EF: Cre- Con: $19,1 \pm 1,9$ % vs. Cre-DOP $22,3 \pm 3,5$ %, $p = 0.0479$ (s. Abb. 14A); SVI [$\mu\text{l}/\text{bpm}/\text{m}^2$]: Cre- Con: $0,7 \pm 0,1$ vs. Cre- DOP: $1,16 \pm 0,4$, $p = 0.2493$ (s. Abb. 14B)). Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt nicht bei den Cardio Cre+ Tieren mit DOP-Behandlung gezeigt werden. (EF: Cre+ Con: $25,9 \pm 5,70$ % vs. Cre+ DOP: $19,8 \pm 2,60$ %, $p = 0.0485$ (s. Abb. 14A); SVI, [$\mu\text{l}/\text{bpm}/\text{m}^2$]: Cre+ Con: $0,97 \pm 0,09$ vs. Cre+ DOP: $0,92 \pm 0,23$, $p = 0.6787$ (s. Abb. 14B)). Bezüglich der strukturellen Parameter zeigten sich bei den linksventrikulären enddiastolischen- und endsystolischen Durchmessern keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (ESD: Cre- Con: $4,4 \pm 0,63$ mm vs. Cre- DOP: $3,7 \pm 1,30$ mm, $p = 0.6771$; Cre+ Con: $4,6 \pm 1,10$ mm vs. Cre+ DOP: $3,9 \pm 0,60$ mm, $p = 0.5946$ (s. Abb. 14C); EDD: Cre- Con: $4,86 \pm 0,42$ mm vs. Cre- DOP: $4,38 \pm 1,16$ mm, $p = 0.7789$; Cre+ Con: $5,15 \pm 0,89$ mm vs. Cre+ DOP: $4,76 \pm 0,49$ mm, $p = 0.8587$ (s. Abb. 14D)). (91)



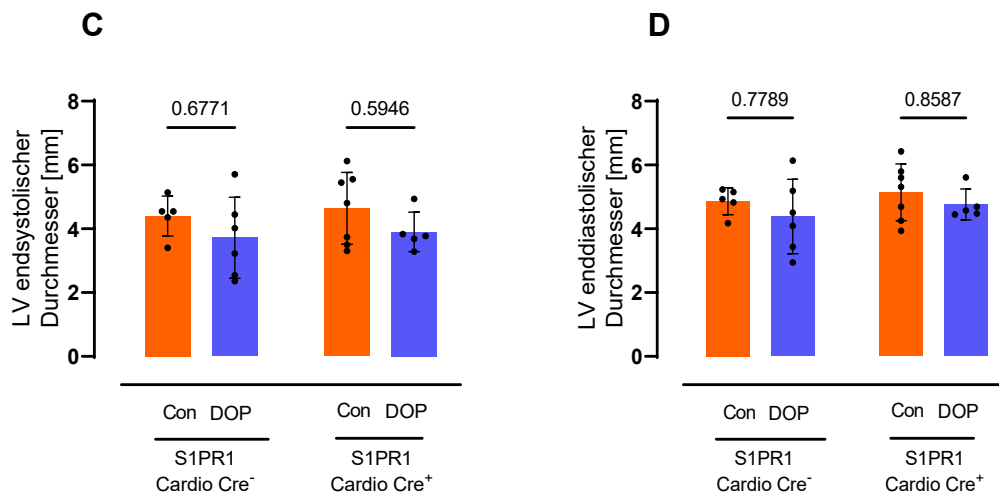


Abb. 14: Funktionelle und strukturelle Parameter bei den S1PR1 Cardio Cre- und S1PR1 Cardio Cre+, 21 Tage nach Ligatur, jeweils Kontrolle vs. DOP: 21 Tage nach Ligation des RIVA waren EF und SVI höher bei den mit DOP behandelten S1PR1 Cardio Cre-, aber nicht bei den S1PR1 Cardio Cre+. Bei den linksventrikulären enddiastolischen- und endsystolischen Durchmessern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. A) Ejektionsfraktion [%], B) Schlagvolumenindex (SVI, [SV/Herzfrequenz/Körperoberfläche; $\mu\text{l}/\text{bpm}/\text{m}^2$]), C) linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser [mm], D) linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser [mm] (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse, S1PR1 Cardio Cre⁺ = S1PR1-defiziente Mäuse, S1PR1 Cardio Cre⁻ = Wurfgeschwister ohne *knock-out* Gen). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. (91))

3.2.3 Die Behandlung mit DOP nimmt Einfluss auf die postischämische Inflammation

An Tag fünf nach Induktion des AMI wurde Blut aus den Herzen entnommen und für immunologische Analysen mittels Durchflusszytometrie aufbereitet. Erneut wurden die Ergebnisse zwischen Mäusen mit DOP-Vorbehandlung und Kontrolltieren verglichen.

Der prozentuale Anteil der zirkulierenden T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, gemessen an der Gesamtheit aller Leukozyten, nahm bei der mit DOP behandelten Gruppe ab (T-Lymphozyten: Con: $24,00 \pm 7,87$ % vs. DOP $4,812 \pm 0,62$ %, $p = 0.0003$ (s. Abb. 15A); B-Lymphozyten: Con: $39,52 \pm 4,58$ % vs. DOP $25,19 \pm 12,22$ %, $p = 0.0359$ (s. Abb. 15B)). Zudem kam es in der DOP-Gruppe zu einer Zunahme der Subpopulation der TK-Zellen innerhalb der Gesamtheit der T-Lymphozyten. Die TH-Zellen blieben unbeeinflusst (TK: Con $14,99 \pm 3,88$ %

vs. DOP $34,43 \pm 9,74 \%$, $p = 0.0001$; TH: Con $52,67 \pm 2,32 \%$ vs. DOP $50,17 \pm 7,95 \%$, $p = 0.9381$ (s. Abb. 15C)).

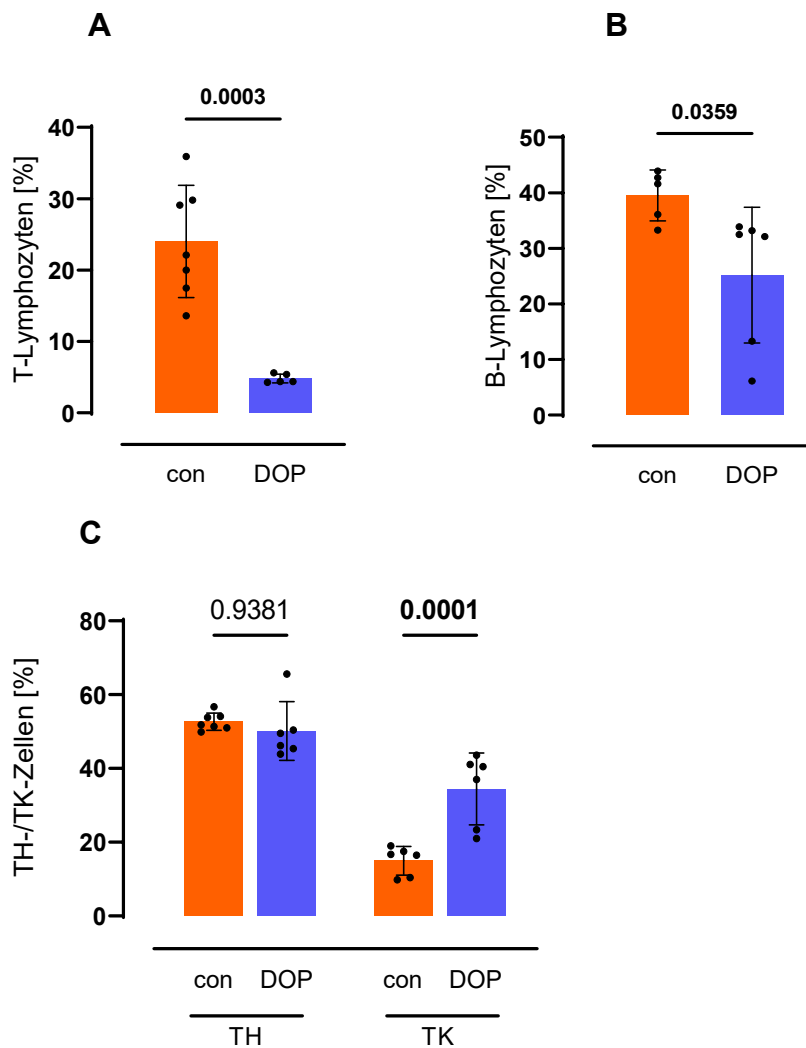


Abb. 15: Durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozyten-Verteilung an Tag fünf, Lymphozyten: Der Anteil der T- und B-Lymphozyten an der Gesamtheit der Leukozyten nahm in der mit DOP behandelten Gruppe ab. Ferner wurde der Anteil der T-Killer-Zellen an den gesamten T-Lymphozyten durch DOP-Behandlung erhöht, die T-Helfer-Zellen blieben gleichverteilt. A) T-Lymphozyten [%], B) B-Lymphozyten [%], C) T-Helfer-Zellen/T-Killer-Zellen [%]. (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse)

Dahingegen konnte eine Zunahme des Anteils der Granulozyten im Blut durch die Vorbehandlung mit DOP vermerkt werden. (Con: $22,85 \pm 13,90 \%$ vs. DOP: $46,10 \pm 17,35 \%$, $p = 0.0195$ (s. Abb. 16A)). Die Verteilung der Makrophagen, Monozyten und die Anteile der inflammatorischen und der nicht-inflammatorischen an den gesamten Monozyten zeigten sich in der DOP-Gruppe

nicht verschieden zur Kontrollgruppe. (Makrophagen: Con: $5,93 \pm 4,32$ % vs. DOP: $6,49 \pm 3,6$ %, $p = 0.8037$ (s. Abb. 16B); Monozyten: Con: $16,67 \pm 6,89$ % vs. DOP: $16,78 \pm 4,36$ %, $p = 0.9760$ (s. Abb. 16C); inflammatorische Monozyten: Con: $52,67 \pm 2,32$ % vs. DOP: $44,50 \pm 7,09$ %, $p = 0.2963$, nicht-inflammatorische Monozyten: Con: $41,73 \pm 2,24$ % vs. DOP: $34,43 \pm 9,74$ %, $p = 0.4242$ (s. Abb. 16D)).

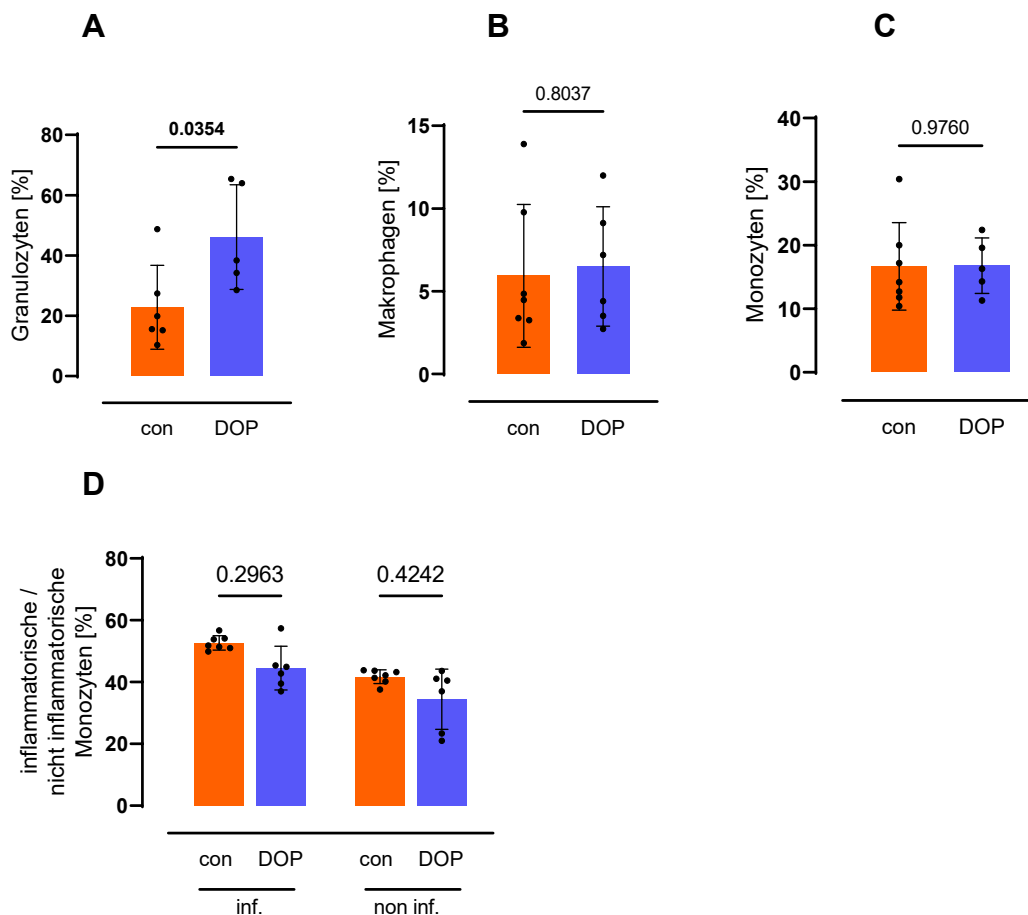


Abb. 16: Durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozyten-Verteilung an Tag fünf, Granulozyten, Makrophagen, Monozyten: Der Anteil der Granulozyten zur Gesamtheit der weißen Blutkörperchen nahm in der mit DOP behandelten Gruppe zu. Makrophagen, Monozyten und die Anteile der inflammatorischen und nicht inflammatorischen Monozyten wurden durch DOP nicht verändert. A) Granulozyten [%], B) Makrophagen [%], C) Monozyten [%], D) Anteile der inflammatorischen (inf.) und nicht-inflammatorischen (non inf.) Monozyten [%] (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse)

In den mikroskopischen Schnitten der Herzen an Tag fünf nach Ligatur wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern durchgeführt, die Makrophagen und Granulozyten im Gewebe anfärben, und die Anzahl dieser

inflammatorischen Zellen zwischen den Gruppen verglichen. Beide Entzündungszelltypen wurden in der DOP-Gruppe signifikant weniger im Herzmuskel gefunden (Makrophagen [Anzahl in 100 x 100 μm]: Con: $29,33 \pm 7,08$ vs. DOP: $16,23 \pm 2,75$, $p = 0.0018$ (s. Abb. 17A); Granulozyten [Anzahl in 100 x 100 μm]: Con: $25,71 \pm 4,23$ vs. DOP: $14,40 \pm 3,89$, $p = 0.0004$ (s. Abb. 17B)).

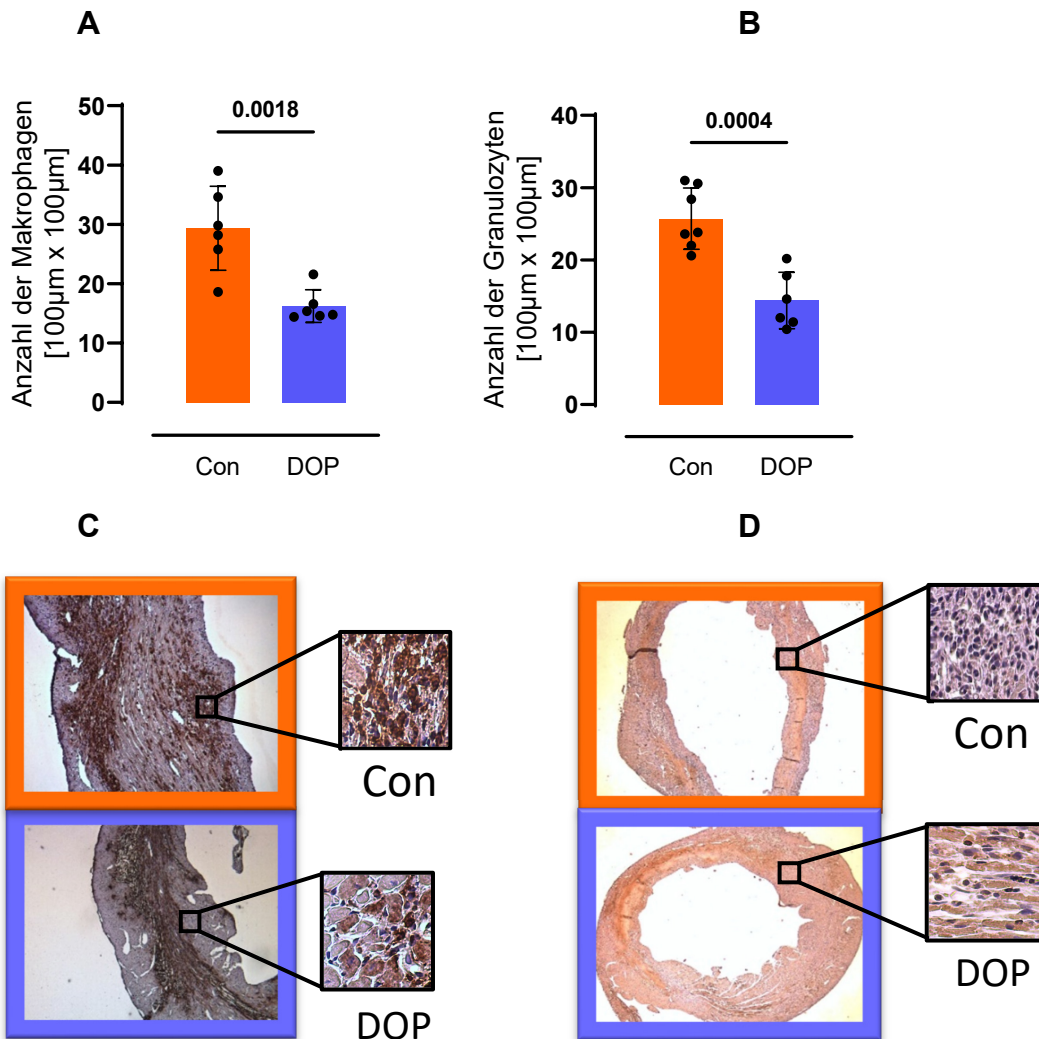


Abb. 17: Immunhistochemische Färbung der Herzen 5 Tage nach Ligatur, Zählung der Gewebemakrophagen und Granulozyten in 100x100 μm : A) Makrophagen und B) Granulozyten konnten in der mit DOP behandelten Gruppe signifikant weniger im Herzmuskel gefunden werden. C) zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen, in immunhistochemischer mac2-Färbung, 100-fache Vergrößerung, nach 21 Tagen, oben Kontrolle, unten DOP-Gruppe. D) zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen, in immunhistochemischer LY6G-Färbung, 100-fache Vergrößerung, nach 21 Tagen, oben Kontrolle, unten DOP-Gruppe. (Con = Kontrolle; DOP = mit DOP behandelte Mäuse).

4 Diskussion

Diese Arbeit konnte übergreifend vier wichtige Ergebnisse präsentieren, die zum besseren Verständnis des Einflusses von S1P auf die komplexen Prozesse während und nach AMI beitragen.

Erstens konnten wir zeigen, dass eine Erhöhung der Plasma Konzentration von S1P mittels DOP-Vorbehandlung unmittelbare kardioprotektive Auswirkungen im Modell des transienten Infarktes hat. So konnte die Infarktgröße verringert und die kardiale Funktionalität verbessert werden.

Außerdem zeigte die DOP-Behandlung im Modell eines permanenten Gefäßverschlusses ohne die Möglichkeit einer Reperfusion zwar keine Auswirkung auf die Infarktgröße 24 Stunden nach Infarkt, die erhöhten S1P-Konzentrationen wirkten sich aber positiv auf die langfristige myokardiale Heilung aus.

Aus diesem Grund könnte der S1P-Metabolismus ein vielversprechender pharmakologischer Angriffspunkt sein und somit auch, unabhängig von der initialen Infarktgröße, additiv zum interventionellen Eingriff helfen.

Weiterhin haben wir untersucht, über welche Mechanismen S1P seine kardioprotektive Wirkung vermittelt. Dafür wurden die Versuche der permanenten Ligatur zum einen bei transgenen Mäusen ohne Expression des S1PR1 auf den Kardiomyozyten durchgeführt. Hierdurch wurden die positiven Effekte, die DOP auf die kardiale Funktion nach 21 Tagen ausübte, aufgehoben. So ließ sich der S1PR1 als ein entscheidender Rezeptor identifizieren.

Schließlich haben wir die Auswirkung der DOP-Behandlung auf die postischämische Inflammation untersucht und hier Unterschiede sowohl hinsichtlich der zirkulierenden als auch der residenten Leukozyten feststellen können. Aufgrund der enormen Wichtigkeit inflammatorischer Vorgänge nach dem Infarkt für eine suffiziente myokardiale Heilung ist es naheliegend, dass auch diese Veränderungen durch S1P zu dessen kardioprotektiver Wirkung beitragen.

Im Folgenden sollen die einzelnen Ergebnisse in den Kontext der bereits vorhandenen Forschungsergebnisse zu diesem Thema eingeordnet werden.

4.1 Einfluss der S1P-Erhöpfung vor Induktion der Ischämie auf die post-ischämische myokardiale Reparatur

In unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass eine Erhöhung der plasmatischen S1P-Konzentration durch S1P-Lyase-Inhibition bei transienter Ligatur zu einer Verkleinerung der Infarktgröße und Verbesserung der kardialen Funktion 24 Stunden nach Infarktinduktion führte.

Diese Ergebnisse sind kongruent zu anderen in der Literatur beschriebenen Studien. In der Arbeit von Bandhuvula et al. aus dem Jahr 2011 (95) wurde untersucht, ob eine Inhibition der S1P-Lyase I/R-Schäden verringern kann. Dazu wurde die S1P-Konzentration entweder durch heterozygote Depletion des Genes für die S1P-Lyase oder durch Gabe von Tetrahydroxybutylimidazol (THI) erhöht. THI hemmt ähnlich wie DOP die Aktivität der S1P-Lyase (96). Die S1P-Plasma Konzentrationen, die durch 24-stündige Gabe von THI erreicht wurden, glichen den von uns gemessenen S1P-Konzentrationen durch DOP-Gabe. Die Mäuse erhielten im Gegensatz zu unserer Studie eine ex-vivo I/R im Langendorff Modell. Die Infarktgröße zeigte sich in dieser Studie bei beiden Mechanismen der S1P-Erhöpfung verringert und die kardiale Funktion, verglichen anhand des Druckes im linken Ventrikel, verbessert.

Die von uns verwendete in-vivo Methode der LAD-Ligatur hat den Vorteil, dass auch Langzeitauswirkungen untersucht werden können und auch Veränderungen im Körper, die außerhalb des Herzens stattfinden, wie zum Beispiel humorale Reaktionen, miterfasst werden. Unsere Ergebnisse unterstreichen und ergänzen jene von Bandhuvula et al. durch die in-vivo Methodik.

Im Modell eines schweren Myokardinfarkts ohne Reperfusion, der permanenten Ligatur, kam es 24 Stunden nach Infarktinduktion zu keiner Verkleinerung der Infarktgröße. Die kardiale Funktion, gemessen mittels cMRT, war in der DOP-Gruppe unverändert. Dahingehen wurde die Infarktnarbe nach 21 Tagen durch S1P-Erhöpfung deutlich verkleinert, die Größe der Kardiomyozyten zeigte sich verringert und die Marker der Herzinsuffizienz, ANP, BNP und Coll1a2, wurden weniger exprimiert. Wir konnten deshalb zeigen, dass eine Erhöhung von S1P bereits vor dem Infarkt

zwar den Infarkt selbst nicht verkleinert, aber bei den kardialen Umbauprozessen in den Wochen danach hilft und sich so positiv auf die Herzfunktion auswirkt.

Die von Devarakonda et al. (97) veröffentlichte Studie konnte ähnliche Ergebnisse präsentieren, verfolgte dabei aber einen unterschiedlichen Versuchsansatz. Hier wurde untersucht, inwieweit das Peptidhormon Serelaxin seine herzschtützende Wirkung über einen S1P-abhängigen Mechanismus ausübt. Serelaxin ist das rekombinante Protein zu dem im menschlichen Organismus vorkommenden Relaxin, einem pleiotropen Hormon, das unter anderem in der Schwangerschaft ausgeschüttet wird. In Tiermodellstudien wurde gezeigt, dass es ischämisch bedingte Herzinsuffizienz vermindern kann und sich positiv auf Arrhythmien (98), Fibrose (99) und Inflammation (100) auswirkt. Frati et al. (101) konnten zeigen, dass Relaxin die Aktivität der Sphingosinkinase-1 erhöht, die bei der Bildung von S1P entscheidend ist, und so die S1P-Produktion steigert. Devarakonda et al. (97) wollten diesen Zusammenhang weiter untersuchen. Sie verwendeten ebenfalls das Modell der permanenten LAD-Ligatur und behandelten die Mäuse für 28 Tage über eine subkutane Pumpe mit Serelaxin oder alternativ mit Kochsalzlösung als Kontrollgruppe. Analysen der kardialen und plasmatischen Proteine wurden durchgeführt und die Serelaxin Gruppe hatte an Tag 28 erhöhte Konzentrationen von S1P im Gewebe und im Plasma. Durch die Gabe von Serelaxin wurde das Überleben der Mäuse bis zum Ende der Beobachtungszeit verbessert, sie zeigten eine verbesserte kardiale Funktion und eine verringerte Narbengröße. Das stimmt mit unseren Erkenntnissen überein, dass erhöhte S1P-Werte die kardiale Reparatur nach ischämischem Myokardinfarkt verbessern.

Gleichzeitig ist die Datenlage zu diesem Forschungsthema kontrovers. Zhang et al. (102) untersuchten ebenfalls die Auswirkung einer pharmakologischen Beeinflussung des S1P-Metabolismus auf das postischämische *Remodeling*. Sie kamen dabei zu gegenteiligen Ergebnissen. In ihrem Versuchsaufbau erhielten Mäuse eine permanente LAD-Ligatur und wurden 24 Stunden nach AMI bis zu Tag 28 mit drei unterschiedlichen Medikamenten oder Kochsalzlösung behandelt. Sie verwendeten den Sphingosinkinase-Inhibitor PF543, um die Bildung von S1P

zu unterbrechen. Eine andere Versuchsgruppe erhielt THI als S1P-Lyase Inhibitor, um so erhöhte S1P-Konzentrationen zu erreichen. Die dritte Gruppe wurde mit dem S1PR-Modulator FTY720 behandelt, welches einen funktionellen Antagonismus am S1PR1 ausübt. Zusammenfassend sahen sie eine Verbesserung des *Remodelings* nach 28 Tagen sowohl durch die verringerte Bildung von S1P als auch durch eine Blockade des S1PR1. Gleichzeitig zeigten die Mäuse mit THI-Behandlung eine signifikant schlechtere EF 28 Tage nach Infarkt verglichen zur Kontrollgruppe. Die Herzinsuffizienz Marker ANP, BNP und β -MHC waren erhöht. Weiterhin war das Verhältnis von Herz- und Lungengewicht verglichen mit dem Körpergewicht erhöht. Wie oben bereits beschrieben handelt es sich bei THI analog zu dem von uns verwendeten DOP um einen S1P-Lyase Inhibitor. Während DOP die Lyase über einen Vitamin-B6-Antagonismus hemmt, ist der Mechanismus hinter THI noch nicht geklärt. Prinzipiell sollte eine Behandlung mit beiden Medikamenten zu einer ähnlichen Erhöhung der S1P-Konzentration führen (96). Allerdings sind die von Zhang et al. (102) nach THI-Behandlung erreichten Werte nur in etwa halb so hoch, wie diese, die wir nach DOP-Behandlung erzielen konnten. Eventuell war deren Erhöhung des S1P nicht ausreichend. Außerdem fehlen histologische Untersuchungen, um die Auswirkung auf die kardiale Narbengröße und die Kardiomyozyten-Durchmesser als wichtige Endpunkte zu vergleichen. Der vermutlich entscheidendste Unterschied liegt aber darin, dass die Mäuse im Aufbau von Zhang et al. erst 24 Stunden nach Infarkt mit THI behandelt wurden. In unserer Arbeit wurde die DOP-Gabe über das Trinkwasser bereits sieben Tage vor Infarktinduktion gestartet und dann weitergeführt. Das bedeutet, dass die S1P-Level in unserem Versuchsaufbau bereits während der kardialen Ischämie und in den ersten 24 Stunden danach erhöht waren, wohingegen bei Zhang et al. frühestens 24 Stunden nach Infarkt mit einer Erhöhung zu rechnen war. Das lässt die Hypothese zu, dass erhöhte S1P-Werte bereits vor Infarkt und in den ersten Stunden danach elementar sind, um die positiven Effekte auf das *Remodeling* zu erreichen. Hier fehlt es noch an Studien, die sich mit den exakten molekularen und zellulären Wirkungen des S1P in dieser Frühphase beschäftigen.

4.2 DOP verbessert den post-ischämischen myokardialen Umbau auf eine S1PR1-abhängige Weise

Um den Mechanismus hinter den positiven Effekten der S1P-Erhöhung zu verstehen, haben wir die Versuche der permanenten Ligatur auch an gen-defizienten Mäusen, die keinen S1PR1 auf den Kardiomyozyten exprimierten, genannt Cardio Cre+ Mäuse, mit und ohne DOP untersucht. 24 Stunden nach Myokardinfarkt gab es keine signifikanten Unterschiede mit und ohne DOP-Behandlung in Bezug auf funktionelle Parameter, weder bei den Cardio Cre+, noch bei den Cardio Cre-. Dahingegen zeigten die Cardio Cre- Tiere mit DOP-Behandlung an Tag 21 wie aufgrund der vorherigen Versuche erwartet eine Verbesserung der EF und des SVI. Diese positiven Effekte konnten bei den Cardio Cre+ Tieren mit DOP-Behandlung nicht gezeigt werden. Das lässt darauf schließen, dass der S1PR1 entscheidend für die kardioprotektive Wirkung des S1P ist.

Auch bezüglich des Einflusses des S1PR1 zeigt die Literatur uneinheitliche Ergebnisse. Es ist bekannt, dass die S1P-Rezeptoren G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind. Der S1PR1 ist mit einem $G_{i/o}$ -Protein gekoppelt. Nach Bindung an den Rezeptor wird eine Signalkaskade seitens des G-Proteins initiiert, die zu einer Hemmung der Adenylatzyklase führt. Dadurch wird die intrazelluläre Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) gesenkt.

β 1-adrenerge Rezeptoren (β 1R) sind reichlich auf Kardiomyozyten exprimiert. Sie gehören zu den wichtigsten kardialen Zielstrukturen des sympathischen Nervensystems. Sie fungieren über G_s -gekoppelte G-Proteine und bewirken im Gegensatz zum S1PR1 eine Steigerung der cAMP-Konzentration. Dadurch wirken sie positiv inotrop, positiv chronotrop und positiv dromotrop. Die Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) raten mit einer Klasse I Empfehlung zu einer Therapie mit einem β 1R-Blocker (BB) für alle Patienten nach AMI mit und ohne ST-Hebung mit eingeschränkter linksventrikulärer EF (3). Auch Patienten ohne Einschränkung ihrer kardialen Auswurfleistung könnten von einer Therapie mit BB profitieren, wie eine aktuelle Metaanalyse zeigt (103). Cannavo et al. (104) haben untersucht, inwieweit sich die antagonistischen Wirkungen des

S1PR1 und der β 1R gegenseitig regulieren, und inwiefern sich das auf die post-ischämische Herzinsuffizienz auswirkt. In einer Zellkultur mit humanen embryonalen Nierenzellen konnten sie feststellen, dass es zu einer Herunterregulierung von β 1R kam, nachdem mit S1P stimuliert wurde. Umgekehrt wurde auch eine verringerte Expression des S1PR1 nach Inkubation mit dem β 1R-Agonisten Isoprenalin beobachtet. Sie behandelten außerdem Ratten für 7 Tage mit dem S1PR1-Agonisten SEW2871 und sahen ebenfalls einer Herunterregulierung der β 1R auf der kardialen Plasmamembran. Sie induzierten weiterhin einen AMI bei Ratten und beobachteten die Tiere für 8 Wochen, bis sich eine ischämische Herzinsuffizienz ausbildete. Durch Gentherapie erzeugten sie anschließend eine Überexpression des S1PR1 und warteten weitere 12 Wochen. Es war zu beobachten, dass die Ratten, die initial in den ersten 8 Wochen eine eingeschränkte Auswurfleistung entwickelten, durch die Gentherapie nach 12 Wochen in Form einer wiederhergestellten EF profitierten, während sich die Herzinsuffizienz der Tiere ohne S1PR1-Überexpression innerhalb der 12 Wochen weiter verschlechterte.

Auf der anderen Seite kann der S1PR1 für das Herz schädliche Effekte vermitteln. Robert et al. (82) haben mittels Zellkultur feststellen können, dass eine Inkubation muriner Kardiomyozyten mit S1P zu einer Größenzunahme der Zellen und vermehrter intrazellulärer Proteinsynthese führte. Die Hypertrophie konnte durch eine parallele Applikation mit einem spezifischen S1PR1-Antagonisten aufgehoben werden. Das zeigt, dass der S1PR1 die anabole Wirkung des S1P vermittelt. Es ist bekannt, dass eine kardiomyozytäre Hypertrophie ein wichtiger Risikofaktor zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist (105). Ohkura et al. (106) untersuchten transgene Mäuse mit einer Überexpression des S1PR1. Diese entwickelten nach 12 Wochen eine Ventrikel-übergreifende Hypertrophie des Myokards, nach 24 Wochen kam es außerdem zu einer diffusen Fibrosierung, jedoch ohne Einschränkung der Hämodynamik (106).

4.3 Die Behandlung mit DOP nimmt Einfluss auf die post-ischämische Inflammation

Fünf Tage nach permanenter Ligatur wurden die zirkulierenden und residenten Leukozyten untersucht. Wir konnten zeigen, dass der prozentuale Anteil der zirkulierenden T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, gemessen an der Gesamtheit aller Leukozyten, bei der mit DOP behandelten Gruppe verringert war. Die Subpopulation der TK-Zellen nahm in der DOP-Gruppe zu. Gleichzeitig war auch der Anteil an zirkulierenden neutrophilen Granulozyten signifikant erhöht.

Hinsichtlich der kardial lokalisierten Leukozyten sahen wir eine Abnahme sowohl der Granulozyten als auch der Makrophagen.

Ein kontinuierlich hoher S1P-Gradient spielt die entscheidende Rolle bei der Auswanderung von Lymphozyten aus Lymphknoten in die Zirkulation (85). Hierbei ist eine hohe Konzentration von S1P in der Lymphflüssigkeit sowie eine niedrige S1P-Konzentration in der interstitiellen Flüssigkeit von sekundären lymphatischen Organen notwendig. So kann sowohl eine Abnahme der S1P-Konzentration in der Lymphflüssigkeit als auch eine Zunahme der Konzentration von S1P in der interstitiellen Flüssigkeit dieses System aus dem Gleichgewicht bringen. Das Enzym S1P-Lyase, welches S1P abbaut, wird vermehrt auf den Zellen, die die interstitielle Flüssigkeit in Lymphknoten produzieren, exprimiert (107). So kann dort eine niedrige S1P-Konzentration aufrechterhalten werden. Dies erklärt die beobachtete Abnahme der zirkulierenden T- und B-Lymphozyten in unserer Arbeit durch den verminderten Abbau des S1P mittels S1P-Lyase-Blockierung mit konsekutiver Erhöhung der S1P-Konzentration insbesondere in der interstitiellen Flüssigkeit.

Der Mechanismus hinter der Erhöhung des Anteils der TK-Zellen ist in der Literatur bisher noch nicht geklärt. Aber auch andere Studien konnte diesen Anstieg zeigen, so unter anderem Wang et al. (108). Sie untersuchten den Zusammenhang von S1P und einer Myokarditis durch Coxsackie-B3 Viren. Hier wiesen sie einen Anstieg der TK-Zellen in der Milz und im Blut des linken Ventrikels während der Virusinfektion durch medikamentös induzierte S1P-Konzentrationserhöhung bei Mäusen nach.

Harris et al. (109) führten durchflusszytometrische Analysen des Blutes von Patienten mit schubförmiger remittierender Multipler Sklerose unter Ozanimod-Therapie durch. Ozanimod ist ein S1P-Rezeptor Modulator, der an den S1PR1 und -5 agonistisch wirkt. In der Studie konnte ebenfalls eine Senkung der T- und B- Lymphozyten gezeigt werden, mit einem geringeren Abfall der CD8+ TK-Zellen.

Der beobachtete Anstieg der Neutrophilen Granulozyten im Blut lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass jeweils die Anteile der Sub-Populationen der Leukozyten an der Gesamtheit aller Leukozyten verglichen wurden und keine absoluten Werte. So liegen durch den starken Abfall der Lymphozyten, der zu erwarten war, nur scheinbar mehr Granulozyten vor.

Ein direkter Einfluss des S1P auf das kardiale Immunsystem in Form von Granulozyten oder Makrophagen ist in der Literatur bis dato nicht beschrieben. Ein möglicher Ansatz, die Abnahme der residenten Granulozyten und Makrophagen in unserer Studie zu erklären, ist die gegenseitige Beeinflussung der Zellen der angeborenen- und der erworbenen Immunität. T-Zellen können nach Aktivierung den *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) sezernieren (110). Dieser fungiert nicht nur als Wachstumsfaktor und wirkt stimulierend auf das Knochenmark, sondern dient auch als ein Zytokin, welches eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Granulozyten und Makrophagen in das Gewebe spielt (110). Durch die Reduktion der Lymphozyten durch S1P-Konzentrations-Erhöhung wird so indirekt auch die Anzahl der Gewebs-Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten vermindert.

4.4 Limitationen der Arbeit

Ein wichtiger limitierender Faktor dieser Arbeit ist die Wahl der Methode zur S1P-Konzentrationserhöhung. Dadurch, dass DOP ein starker Vitamin B6 Antagonist ist, ist dieses Modell nicht am Menschen anzuwenden. Es wäre mit zu vielen Nebenwirkungen durch den Vitaminmangel zu rechnen. Gleichzeitig können auch Nebenwirkungen bei der Maus, die den Einfluss auf den S1P-Metabolismus überschreiten, nicht ausgeschlossen werden. Durch die sehr kurze Halbwertszeit von S1P ist eine direkte intravenöse oder

intraperitoneale Gabe von S1P keine sinnvolle Alternative zur S1P-Lyase Inhibition. Hier müsste noch ein Wirkstoff entwickelt werden, der die S1P-Lyase durch einen spezifischeren Mechanismus hemmt. Die Antagonisierbarkeit unserer Ergebnisse durch das Ausschalten des Genes für den S1PR1 auf Kardiomyozyten macht es allerdings unwahrscheinlich, dass die gesehen Effekte alleinig auf einen Vitaminmangel zurückzuführen sind.

An der Stelle zeigt sich eine weitere Limitation. Da die Beschaffung der transgenen Cardio Cre+ Mäuse zeit- und kostenintensiv ist, wurden nicht alle an den C57BL/6 Mäusen durchgeführten Versuche auch an den Cardio Cre+ Mäusen wiederholt. Es wäre sicherlich spannend, ob alle gesehenen Veränderungen über den S1PR1 vermittelt werden, oder ob auch andere kardiale S1P-Rezeptoren eine Rolle spielen.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis des Einflusses von S1P auf die post-ischämische kardiale Reparatur leisten konnte.

Die Forschung zum Thema S1P ist ein komplexes Forschungsgebiet, das aktuell immer mehr Bedeutung erlangt. Durch die Zulassung des S1P-Rezeptormodulators Fingolimod zur Therapie der Multiplen Sklerose im Jahre 2010 wird der S1P-Metabolismus nun in der Neurologie bereits pharmakologisch adressiert (86). Das eröffnet spannende Möglichkeiten, Fingolimod und auch andere S1P-Agonisten bzw. -Antagonisten wie Ozanimod oder Siponimod auch auf ihre Wirksamkeit zur Verbesserung der Prognose nach Myokardinfarkt zu untersuchen. Hierzu wird aber zuerst notwendig sein, die genaue Kinetik hinter der S1P-Wirkung während und nach Ischämie zu verstehen. Außerdem müssen die geeigneten Zeitpunkte identifiziert werden, in denen der S1PR1 aktiviert oder gehemmt werden sollte. Auch der Einfluss der anderen S1P-Rezeptoren, insbesondere S1PR2 und S1PR3, die ebenfalls kardial exprimiert werden, sollte in diesem Kontext besser untersucht werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
2. Cohen M, Visveswaran G. Defining and managing patients with non-ST-elevation myocardial infarction: Sorting through type 1 vs other types. *Clin Cardiol*. 2020;43(3):242-50.
3. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-77.
4. Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol*. 1995;2(8):637-43.
5. Patrono C, Davì G, Ciabattoni G. Thromboxane biosynthesis and metabolism in relation to cardiovascular risk factors. *Agents Actions Suppl*. 1992;37:10-7.
6. Wenner JB, Wong GC, Cairns JA, Perry-Arnesen M, Tocher W, Mackay M, et al. Impact of Patient- and System-Level Delays on Reperfusion Among Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction. *CJC Open*. 2020;2(3):94-103.
7. De Luca G, Suryapranata H, Ottervanger JP, Antman EM. Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction: every minute of delay counts. *Circulation*. 2004;109(10):1223-5.
8. Roberto M, Radovanovic D, de Benedetti E, Biasco L, Halasz G, Quagliana A, et al. Temporal trends in latecomer STEMI patients: insights from the AMIS Plus registry 1997-2017. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2020;73(9):741-8.
9. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(5):H1723-41.

10. W. Böcker HD, Ph. U. Heitz, G. Höfler, H. Kreipe, H. Moch. Herz - Myokardinfarkt. Pathologie. 5. Auflage Elsevier 2012. p. 380-4.
11. Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, et al. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res.* 2017;121(6):677-94.
12. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J.* 2016;37(42):3232-45.
13. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2013;56(5-6):650-5.
14. Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Prescott E, Franconi F, Gerds E, Foryst-Ludwig A, et al. Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes. *Eur Heart J.* 2016;37(1):24-34.
15. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(22):2173-95.
16. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114(12):1852-66.
17. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet.* 2004;364(9438):937-52.
18. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J.* 2019;40(3):237-69.
19. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995;92(3):657-71.
20. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart.* 2000;83(3):361-6.
21. Kübler W, Spieckermann PG. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1970;1(4):351-77.

22. Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res.* 1987;60(2):153-68.
23. Solaro RJ, Lee JA, Kentish JC, Allen DG. Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ Res.* 1988;63(4):779-87.
24. Steenbergen C, Deleeuw G, Rich T, Williamson JR. Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ Res.* 1977;41(6):849-58.
25. Marban E, Kitakaze M, Kusuoka H, Porterfield JK, Yue DT, Chacko VP. Intracellular free calcium concentration measured with ¹⁹F NMR spectroscopy in intact ferret hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(16):6005-9.
26. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation.* 1990;82(3 Suppl):li2-12.
27. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest.* 1979;40(6):633-44.
28. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-89.
29. Tibaut M, Mekis D, Petrovic D. Pathophysiology of Myocardial Infarction and Acute Management Strategies. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2017;14(3):150-9.
30. Inserte J, Barrabés JA, Hernando V, Garcia-Dorado D. Orphan targets for reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2009;83(2):169-78.
31. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev.* 2014;66(4):1142-74.
32. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res.* 2015;116(4):674-99.
33. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol.* 2015;5(4):1841-75.
34. Ghigo A, Franco I, Morello F, Hirsch E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res.* 2014;102(2):270-80.

35. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(5):292-300.
36. de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G, Arslan F. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:206039.
37. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res.* 2016;119(1):91-112.
38. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation.* 1999;99(4):546-51.
39. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83.
40. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):H1269-75.
41. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2007;100(1):27-40.
42. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;62:24-35.
43. Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA, et al. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1335-45.
44. Simpson PJ, Todd RF, 3rd, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest.* 1988;81(2):624-9.
45. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, et al. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res.* 2014;114(10):1611-22.

46. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, et al. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4⁺ T lymphocytes. *Circulation*. 2006;114(19):2056-64.
47. Zouggar Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med*. 2013;19(10):1273-80.
48. Etoh T, Joffs C, Deschamps AM, Davis J, Dowdy K, Hendrick J, et al. Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(3):H987-94.
49. Villarreal F, Omens J, Dillmann W, Risteli J, Nguyen J, Covell J. Early degradation and serum appearance of type I collagen fragments after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36(4):597-601.
50. Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6-7):1101-10.
51. Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res*. 2006;324(3):475-88.
52. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):427-39.
53. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest*. 2002;109(1):41-50.
54. Ali SR, Ranjbarvaziri S, Talkhabi M, Zhao P, Subat A, Hojjat A, et al. Developmental heterogeneity of cardiac fibroblasts does not predict pathological proliferation and activation. *Circ Res*. 2014;115(7):625-35.
55. Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Banerjee I, Zambon AC, Kisseleva T, Velayoudon A, et al. Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. 2014;124(7):2921-34.
56. Haudek SB, Xia Y, Huebener P, Lee JM, Carlson S, Crawford JR, et al. Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18284-9.
57. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(4):945-53.

58. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol*. 1996;270(5 Pt 2):H1803-11.
59. Dobaczewski M, Akrivakis S, Nasser K, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Vascular mural cells in healing canine myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(8):1019-29.
60. Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(1):71-9.
61. Xie Y, Chen J, Han P, Yang P, Hou J, Kang YJ. Immunohistochemical detection of differentially localized up-regulation of lysyl oxidase and down-regulation of matrix metalloproteinase-1 in rhesus monkey model of chronic myocardial infarction. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237(7):853-9.
62. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-72.
63. Lee WW, Marinelli B, van der Laan AM, Sena BF, Gorbатов R, Leuschner F, et al. PET/MRI of inflammation in myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(2):153-63.
64. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(5):255-65.
65. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110(1):159-73.
66. St John Sutton M, Lee D, Rouleau JL, Goldman S, Plappert T, Braunwald E, et al. Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation*. 2003;107(20):2577-82.
67. St John Sutton M, Pfeffer MA, Moya L, Plappert T, Rouleau JL, Lamas G, et al. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial. *Circulation*. 1997;96(10):3294-9.
68. Stoffel W, Sticht G, LeKim D. Metabolism of sphingosine bases. IX. Degradation in vitro of dihydrospingosine and dihydrospingosine phosphate to

palmitaldehyde and ethanolamine phosphate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1968;349(12):1745-8.

69. Olivera A, Allende ML, Proia RL. Shaping the landscape: metabolic regulation of S1P gradients. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(1):193-202.

70. Pham TH, Baluk P, Xu Y, Grigorova I, Bankovich AJ, Pappu R, et al. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med.* 2010;207(1):17-27.

71. Hänel P, Andréani P, Gräler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 2007;21(4):1202-9.

72. Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(6):e38941.

73. Jonnalagadda D, Sunkara M, Morris AJ, Whiteheart SW. Granule-mediated release of sphingosine-1-phosphate by activated platelets. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(11):1581-9.

74. Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N, et al. Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem.* 1997;121(5):969-73.

75. Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevvana M, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(23):9613-8.

76. Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res.* 2014;55(8):1596-608.

77. Knapp M. Cardioprotective role of sphingosine-1-phosphate. *J Physiol Pharmacol.* 2011;62(6):601-7.

78. Fan X, Liu L, Shi Y, Guo F, He X, Zhao X, et al. Recent advances of the function of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor S1P3. *J Cell Physiol.* 2021;236(3):1564-78.

79. Cartier A, Hla T. Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science.* 2019;366(6463).

80. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*. 2005;25(24):11113-21.
81. Levkau B. Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate (S1P). *Handb Exp Pharmacol*. 2013(216):147-70.
82. Robert P, Tsui P, Laville MP, Livi GP, Sarau HM, Brill A, et al. EDG1 receptor stimulation leads to cardiac hypertrophy in rat neonatal myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(9):1589-606.
83. Landeen LK, Dederko DA, Kondo CS, Hu BS, Aroonsakool N, Haga JH, et al. Mechanisms of the negative inotropic effects of sphingosine-1-phosphate on adult mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(2):H736-49.
84. Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2011;69(5):759-77.
85. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:69-94.
86. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(11):883-97.
87. 4-Deoxypyridoxine [Internet]. 2022 [cited 1 June, 2022]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Deoxypyridoxine>.
88. Le Stunff H, Giussani P, Maceyka M, Lépine S, Milstien S, Spiegel S. Recycling of sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 and sphingosine kinase 2. *J Biol Chem*. 2007;282(47):34372-80.
89. Zhou J, Saba JD. Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(3):502-7.
90. Ueland PM, McCann A, Midttun Ø, Ulvik A. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Mol Aspects Med*. 2017;53:10-27.
91. Polzin A, Dannenberg L, Benkhoff M, Barcik M, Keul P, Ayhan A, et al. Sphingosine-1-phosphate improves outcome of no-reflow acute myocardial infarction via sphingosine-1-phosphate receptor 1. *ESC Heart Fail*. 2022.

92. Jacoby C, Molojavyi A, Flögel U, Merx MW, Ding Z, Schrader J. Direct comparison of magnetic resonance imaging and conductance microcatheter in the evaluation of left ventricular function in mice. *Basic Res Cardiol.* 2006;101(1):87-95.
93. Altman FP. Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem.* 1976;9(3):1-56.
94. Hardy RR, Roederer M. Leonard Herzenberg (1931-2013): the life of FACS. *Immunity.* 2013;39(6):989-91.
95. Bandhuvula P, Honbo N, Wang GY, Jin ZQ, Fyrst H, Zhang M, et al. S1P lyase: a novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(5):H1753-61.
96. Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science.* 2005;309(5741):1735-9.
97. Devarakonda T, Valle Raleigh J, Mauro AG, Lambert JM, Cowart LA, Salloum FN. Chronic treatment with serelaxin mitigates adverse remodeling in a murine model of ischemic heart failure and modulates bioactive sphingolipid signaling. *Sci Rep.* 2022;12(1):8897.
98. Wang D, Zhu H, Yang Q, Sun Y. Effects of relaxin on cardiac fibrosis, apoptosis, and tachyarrhythmia in rats with myocardial infarction. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:348-55.
99. Samuel CS, Cendrawan S, Gao XM, Ming Z, Zhao C, Kiriazis H, et al. Relaxin remodels fibrotic healing following myocardial infarction. *Lab Invest.* 2011;91(5):675-90.
100. Valle Raleigh J, Mauro AG, Devarakonda T, Marchetti C, He J, Kim E, et al. Reperfusion therapy with recombinant human relaxin-2 (Serelaxin) attenuates myocardial infarct size and NLRP3 inflammasome following ischemia/reperfusion injury via eNOS-dependent mechanism. *Cardiovasc Res.* 2017;113(6):609-19.
101. Frati A, Ricci B, Pierucci F, Nistri S, Bani D, Meacci E. Role of sphingosine kinase/S1P axis in ECM remodeling of cardiac cells elicited by relaxin. *Mol Endocrinol.* 2015;29(1):53-67.
102. Zhang F, Xia Y, Yan W, Zhang H, Zhou F, Zhao S, et al. Sphingosine 1-phosphate signaling contributes to cardiac inflammation, dysfunction, and

remodeling following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(2):H250-61.

103. Safi S, Sethi NJ, Korang SK, Nielsen EE, Feinberg J, Gluud C, et al. Beta-blockers in patients without heart failure after myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;11(11):Cd012565.

104. Cannavo A, Rengo G, Liccardo D, Pagano G, Zincarelli C, De Angelis MC, et al. β 1-adrenergic receptor and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) reciprocal downregulation influences cardiac hypertrophic response and progression to heart failure: protective role of S1PR1 cardiac gene therapy. *Circulation*. 2013;128(15):1612-22.

105. Schwartz K, Mercadier JJ. Molecular and cellular biology of heart failure. *Curr Opin Cardiol*. 1996;11(3):227-36.

106. Ohkura SI, Usui S, Takashima SI, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, et al. Augmented sphingosine 1 phosphate receptor-1 signaling in cardiac fibroblasts induces cardiac hypertrophy and fibrosis through angiotensin II and interleukin-6. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182329.

107. Park SM, Angel CE, McIntosh JD, Brooks AE, Middleditch M, Chen CJ, et al. Sphingosine-1-phosphate lyase is expressed by CD68+ cells on the parenchymal side of marginal reticular cells in human lymph nodes. *Eur J Immunol*. 2014;44(8):2425-36.

108. Wang X, Yu Y, Li M, Yu Y, Liu G, Xie Y, et al. Sphingosine 1-phosphate alleviates Cocksackievirus B3-induced myocarditis by increasing invariant natural killer T cells. *Exp Mol Pathol*. 2017;103(2):210-7.

109. Harris S, Tran JQ, Southworth H, Spencer CM, Cree BAC, Zamvil SS. Effect of the sphingosine-1-phosphate receptor modulator ozanimod on leukocyte subtypes in relapsing MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(5).

110. Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*. 2016;45(5):963-73.

6 Danksagung

Vielen Dank an Professor Kelm für die Möglichkeit eine Dissertation in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie zu absolvieren.

Zusätzlich möchte ich mich für die Unterstützung meines Betreuers und Mentors PD Dr. med. Amin Polzin bedanken, der Potenzial in mir gesehen hat und immer darauf bedacht ist, mich zu fördern.

Ein Dankeschön geht an Dr. med. Lisa Dannenberg, die zu jeder Tageszeit ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Mein Dank gilt ebenfalls unserer Arbeitsgruppe mit den besten Kollegen- Doro, Marcel, Maïke, Caro, Philipp- und vielen weiteren, ohne die die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht hätte.

Ich bedanke mich außerdem bei Timm, Joana und Philipp für die großartigen Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge, um das Beste aus meiner Dissertationsschrift herauszuholen.

Ich möchte mich bei meinem Lebensgefährten René für die seelische Unterstützung bedanken. Du musstest Vieles mit mir durchmachen und hast mich immer wieder motiviert und inspiriert. Ohne dich wäre diese Arbeit bestimmt noch nicht fertig und auch nur halb so gut geworden. Danke.

Ich möchte mich herzlich bei meiner Familie bedanken, die schon von klein auf an mich geglaubt hat. Das Motto meiner Eltern Trixie und Mike lautete immer „Kann ich nicht? – Gibt's nicht!“. Das hat mir geholfen, an meine Ziele zu glauben und auch bei Hindernissen niemals aufzugeben. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mich bedingungslos liebt.

Außerdem gilt meinen lieben Großeltern, Opa Rudi und Oma Ingrid, ein großes Dankeschön, die für mich wie zweite Eltern waren und mich immer unterstützt haben, wo es nur ging.