

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Kardioprotektion durch aus Thrombozyten freigesetztes
Sphingosin-1-Phosphat im akuten Myokardinfarkt**

Dissertation

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

vorgelegt von

Dorothee Zikeli

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Amin Polzin

Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Buchbender

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Polzin A, Dannenberg L, Benkhoff M, Barcik M, Helten C, Mourikis P, Ahlbrecht S, Wildeis L, Ziese J, **Zikeli D**, Metzen D, Hu H, Baensch L, Schröder NH, Keul P, Weske S, Wollnitzke P, Duse D, Saffak S, Cramer M, Bönner F, Müller T, Gräler MH, Zeus T, Kelm M, Levkau B. Revealing concealed cardioprotection by platelet Mfsd2b-released S1P in human and murine myocardial infarction. Nat Commun. 2023 Apr 26;14(1):2404. doi: 10.1038/s41467-023-38069-5.

Zusammenfassung

Die Thrombozytenaktivierung ist eines der zentralen Elemente im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts (AMI). Sie entsteht an erodierten, atherosklerotischen oder rupturierten Läsionen und führt zur Thrombusbildung und folglich zu ischämischen Ereignissen. Daher zählt die Thrombozytenaggregationshemmung zur Standardtherapie des AMI. Thrombozyten sezernieren eine Vielzahl an Molekülen, die die Heilung des Herzmuskels nach einem AMI beeinträchtigen. Jedoch zeigen andere Studien das genaue Gegenteil: Eine schützende Funktion der von Thrombozyten ausgeschütteten Moleküle auf die Herzmuskelheilung.

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, welches unter Thrombozytenaktivierung freigesetzt wird und kardioprotektive Eigenschaften aufweist. Jedoch war die genaue Ausschüttungsquelle im Rahmen eines AMI unklar. Daher wird in dieser Arbeit hypothetisiert, dass der S1P-Burst während eines AMI durch die Sekretion von Thrombozyten beeinflusst wird und folglich für das Ausmaß der Myokardschädigung von Relevanz ist.

In einem experimentellen Setting wurde Wildtyp-Mäusen sowie Mäusen, denen Komponenten der S1P-Synthese fehlen ($SphK1^{-/-}$) Plättchenüberstand zugeführt und nach einem AMI die Auswirkungen auf Herzfunktion und Myokardschädigung untersucht. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Auswahl der Thrombozytenaggregationshemmung einen Einfluss auf die S1P-Ausschüttung und auf den AMI hat. Ebenfalls wurde eine hypothesengenerierende, prospektive, monozentrische, serielle und translationale Analyse bei 127 Patient*innen mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen S1P-Konzentration und der Infarktgröße (INF) sowie die Überlebensrate zu analysieren. Vor einem AMI bei Mäusen führte die Injektion von Überstand aktivierter Blutplättchen (SNT+) zu einer geringeren INF im Vergleich zum Überstand nicht aktivierter Blutplättchen (SNT-). Die S1P-Konzentration in SNT+ war im Vergleich zu SNT- um 25 % höher. Dagegen war die S1P-Konzentration in SNT- von $SphK1^{-/-}$ um 70 % niedriger und stieg in SNT+ nicht an. Eine Thrombozytenaggregationshemmung zeigte sich während der Aktivierung, vergleichbar zwischen $P2Y_{12}$ -Antagonisten (Cangrelor) und GPIIb/IIIa-Antagonisten (Tirofiban). Die P-Selektin-Expression sowie ATP-Freisetzung und zuletzt die Freisetzung von S1P blieben unter Tirofiban erhalten, jedoch war sie unter Cangrelor signifikant reduziert. Auch der kardioprotektive Effekt und eine kleinere INF zeigten sich unter Tirofiban, jedoch nicht unter Cangrelor. Bei Patient*innen mit STEMI zeigte sich der S1P-Plasmaspiegel negativ assoziiert mit dem kardiovaskulären Tod und der INF. Damit konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten im AMI durch die Freisetzung von S1P zur Kardioprotektion beitragen. Eine differenzierte Thrombozytenaggregationshemmung sollte in der Therapie des AMI berücksichtigt werden, um diesen positiven intrinsischen Effekt nicht zu reduzieren.

Abstract

Platelet activation is one of the key elements in the development of an acute myocardial infarction (AMI). It occurs at the side of atherosclerotic lesions leads to thrombus formation as well as ischemic events. Therefore, antiplatelet medication is the standard care for AMI. Platelets release a variety of molecules that impair the healing of the heart muscle after an AMI. However, other studies have shown exactly the opposite: a protective function of molecules released by platelets on myocardial healing. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid released during platelet activation. It has been described to have cardioprotective properties.

This study hypothesizes that platelets are an important source of the S1P burst during an AMI and that platelet-released S1P is consequently relevant to the extent of myocardial damage.

These questions have been addressed experimentally and clinically. In the setting of murine AMI as well as on murine deficient of S1P synthesis, we added platelet supernatant and examined the impact on heart function and myocardial damage. Furthermore, this study examined whether the choice of platelet inhibition influences S1P release during AMI. A hypothesis-generating, prospective, monocentric, serial, and translational analysis was also conducted in 127 ST-elevation myocardial infarction (STEMI) patients to analyze the link between S1P concentration and infarct size as well as survival rate. Injection of supernatant from activated platelets (SNT+) before an AMI in mice led to a smaller infarct size compared to the supernatant of non-activated platelets (SNT-). The S1P concentration in SNT- from mice lacking sphingosine kinase 1 was 70% lower and did not increase in SNT+. Platelet inhibition was compared between P2Y₁₂ antagonists (cangrelor) and GPIIb/IIIa antagonists (tirofiban). P-selectin expression, ATP release, and finally S1P release were maintained under the influence of tirofiban but were significantly reduced under cangrelor. The cardioprotective effect and a smaller infarct size were observed with tirofiban medication but not with cangrelor. Human analyses of S1P plasma levels showed a negative association with cardiovascular death and infarct size in STEMI patients.

These findings demonstrate that platelets contribute to cardioprotection during AMI through S1P release. Therefore, the choice of platelet inhibition should be considered carefully in AMI treatment to preserve this beneficial intrinsic effect.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	nM.....	Nanomolar
AAR.....	<i>area at risk</i>	NSAR.....	Nicht-Steroidale Antirheumatika
ACS.....	akutes Koronarsyndrom	NSTEMI	<i>non ST-elevation myocardial infarction</i>
ADP.....	Adenosindiphosphat	p.o.	per os
AMI.....	Akuter Myokardinfarkt	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
ARA.....	Arachidonsäure	PCI.....	Perkutane Koronarintervention
ASS.....	Acetylsalicylsäure	PFA.....	Paraformaldehyd
BE	Blutentnahme	PRP	Plättchenreiches Plasma
bpm.....	<i>beats per minute</i>	PSLA	Parasternale lange Achse
CD62P.....	p-Selektin	RIVA	Ramus interventricularis anterior
cMRT... ..	Kardiale Magnetresonanztomographie	RT	Raumtemperatur
CO	Herzminutenvolumen	s.c.....	Subkutan
COX.....	Cyclooxygenase	S1P	Sphingosin-1-Phosphat
DAPT.....	<i>dual antiplatelet therapy</i>	SAX	Parasternale kurze Achse
EDV	Enddiastolisches Volumen	SDF1- α	<i>stromal cell derived factor-1-alpha</i>
EF	Ejektionsfraktion	SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
EKG.....	Elektrokardiogramm	SNT-	<i>non-activated platelet supernant</i>
ESV	Endsystolisches Volumen	SNT+	<i>activated platelet supernant</i>
FACS.....	Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung	SphK	Sphingosinkinase
FSC	<i>forwards scatter</i>	SphK1 ^{-/-}	Mäuse mit globaler Defizienz an Sphingosinkinase 1
G	Gauge	SSC	<i>sideways scatter</i>
GP	Glykoprotein	STEMI.....	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>
HDL.....	<i>high-density</i> Lipoprotein	SV	Schlagvolumen
HF.....	Herzfrequenz	TF	<i>tissue factor</i>
HPLC.....	<i>high performance liquid chromatography</i>	TM.....	Thrombozytenmedium
i.p.	Intraperitoneal	TPO	Thrombopoetin
i.v.	intravenös	TTC.....	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
I/R.....	Ischämie/Reperfusion	TXA2.....	Thromboxan-A2
IL	Interleukin	VLDL	<i>very-low-density</i> Lipoprotein
INF.....	Infarktgröße	vWF	von-Willebrand-Faktor
KHK.....	Koronare Herzerkrankung	WT	Wildtyp
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein	μ g	Mikrogramm
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie	μ l	Mikroliter
LV.....	Linker Ventrikel	μ m	Mikrometer
MI	Myokardinfarkt		
MoA.....	<i>maximum of aggregation</i>		
NaCl	Isotone Natriumchloridlösung		

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Der akute Myokardinfarkt.....	1
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klassifikation des akuten Myokardinfarktes	1
1.1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts	2
1.2 Thrombozyten.....	3
1.2.1 Die Hämostase	3
1.2.2 Thrombozytenfunktionen im akuten Myokardinfarkt	6
1.3 Pharmakotherapie des akuten Myokardinfarktes: Die Thrombozytenaggregationshemmung	7
1.4 Sphingosin-1-phosphat	9
1.5 Fragestellung und Hypothese der Arbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Studiendesign	11
2.2 Versuchstierkollektiv.....	13
2.3 Proband*innenkollektiv	14
2.4 Patient*innenkollektiv	14
2.5 Material.....	15
2.5.1 Verwendete Substanzen	15
2.5.2 Verwendete Utensilien.....	17
2.5.3 Verwendete Gerätschaften	17
2.5.4 Verwendete Software	18
2.5.5 Verwendete Lösungen und Puffer.....	19
2.6 Methoden.....	20
2.6.1 Generation von Plättchenüberstand.....	20
2.6.2 Sphingosin-1-Phosphat Messung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	20
2.6.3 Myokardiales Ischämie/Reperfusions-Modell.....	21
2.6.4 Echokardiographie zur Bestimmung der kardialen Funktion	23
2.6.5 Histologische Myokarduntersuchungen.....	24

2.6.6 Probengewinnung und Verarbeitung des Patient*innen- und Proband*innenkollektivs	26
2.6.7 Lichttransmissionsaggregometrie	26
2.6.8 Durchflusszytometrie	28
2.6.9 Messung der Adenosintriphosphat – Freisetzung	28
2.6.10 Kardiale-Magnetresonanztomographie	29
2.6.11 Statistische Auswertung	30
3 Ergebnisse.....	31
3.1 Experimentelle Versuchsergebnisse	31
3.1.1 Der Überstand aktivierter Plättchen reduziert die Infarktgröße und verbessert die Herzfunktion in vivo	31
3.1.2 Die Kardioprotektion mittels aktivierter Plättchen ist abhängig von Sphingosin-Kinase-1	38
3.1.3 Die Sphingosin-1-Phosphat Freisetzung bleibt bei Gabe von Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten erhalten und wird bei Gabe von P2Y ₁₂ -Antagonisten gehemmt	39
3.2 Translationale Versuchsergebnisse.....	43
3.2.1 Patient*innencharakteristika	43
3.2.2 Die Höhe der Sphingosin-1-Phosphat-Konzentration im Plasma von Patient*innen mit ST-Hebungsinfarkt korreliert mit der Mortalität	46
4 Diskussion	48
4.1 Hauptergebnisse	48
4.2 Der Einfluss des thrombozytären Sphingosin-1-Phosphat im akuten Myokardinfarkt	48
4.3 Thrombozytenaggregationshemmung im akuten Myokardinfarkt	51
4.4 Limitationen der Arbeit, Schlussfolgerungen und Ausblick	54
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	56

1 Einleitung

1.1 Der akute Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klassifikation des akuten Myokardinfarktes

Der akute Myokardinfarkt (AMI) zählt weltweit immer noch zu den häufigsten Todesursachen [1]. In Deutschland allein starben 2022 46.608 Menschen an einem AMI [2]. In der Altersgruppe der 40- bis 79- Jährigen entspricht dies derzeit einer Lebenszeitprävalenz von 4,7 % [3].

Pathophysiologisch kommt es beim AMI zu einer akuten ischämischen Myokardnekrose, die in den meisten Fällen durch Gefäßokklusionen eines Thrombus nach Ruptur eines vulnerablen Plaques entsteht. Diese wird auch als Myokardinfarkt (MI) Typ 1 bezeichnet [4]. Als Grunderkrankung und als Entstehung eines Plaques ist hier die koronare Herzerkrankung (KHK) zu nennen, bei der es zur Atherosklerose der Koronararterien kommt. Maßgebliche Risikofaktoren sind neben metabolischen Veränderungen wie Diabetes mellitus, Adipositas und Dyslipidämien auch die arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, eine positive Familienanamnese, sowie demografische Parameter wie zunehmendes Alter und Geschlecht [5-9].

Eine weitere Ursache eines AMI kann ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -bedarf sein, dem sog. MI-Typ 2. Die Genese ist multifaktoriell bedingt und kann beispielsweise nach einer bestehenden Herzerkrankung oder systemischen Erkrankung auftreten. Des Weiteren können auch Koronarspasmen, Koronardissektionen, koronaren Embolien, Arrhythmien, Hypo- oder Hypertonien, Schock, Anämien oder respiratorische Insuffizienz verantwortlich sein.

Ergänzend der Einteilung in die fünf Typen des MI ist der MI Typ 3 zu nennen, bei dem ein Herztod mit vorangegangenen Hinweisen einer Myokardischämie ein bei einer Autopsie festgestellter MI besteht. Bei den MI Typ 4 und 5 steht dagegen der AMI im Zusammenhang mit einer koronaren Intervention oder Operation.

Klinisch wird die Diagnose des AMI durch den Nachweis einer akuten Myokardschädigung und einer Erhöhung und/oder Erniedrigung kardialer Troponinwerte mit mindestens einem Wert oberhalb der 99. Perzentile und mit Hinweisen auf eine akute Myokardischämie gestellt. Eine weitere Einteilung kann nach dem Elektrokardiogramm (EKG) nach Veränderungen der ST-Strecke erfolgen. Dabei wird zwischen einem ST-Hebungsinfarkt (*ST-elevation myocardial infarction* STEMI) und einem nicht ST-Hebungsinfarkt (*non-ST-elevation myocardial infarction* NSTEMI) unterschieden [4, 10].

Die Lokalisation des Infarktes betrifft in den meisten Fällen die Vorderwand, somit den muskelstärkeren linken Ventrikel, durch einen Verschluss des Ramus interventricularis anterior (RIVA) oder einen seiner Äste [11].

1.1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts

Bei einem akuten Ischämieereignis kann die Kontraktilität des Herzens noch für ein paar Minuten erhalten bleiben, nimmt aber schon nach ca. 60 Sekunden ab [12]. Bereits nach ca. 10 Sekunden sind die lokalen Sauerstoffreserven aufgebraucht, sodass die initiale Phase des MI durch die Akkumulation von Endprodukten der anaeroben Glykolyse im ischämischen Gewebe geprägt ist [13]. Es kommt zu einer Störung des Elektrolytmilieus und folglich zu einer Änderung des Membranpotenzials. Dabei entsteht unter anderem anorganisches Phosphat durch den Abbau von Kreatinphosphat, was zu der Hemmung der kontraktilen Proteine führt [14-16]. Des Weiteren führt das veränderte Elektrolytmilieu auch zu einer azidotischen pH-Wert-Änderung, welche die Calcium-Bindung an die kontraktilen Proteine hemmt und die kontraktile Funktion weiter eingeschränkt [14, 17, 18]. Der azidotische pH-Wert reduziert im Verlauf die anaerobe Glykolyse. Es wird weniger ATP gebildet, was folglich ATP-abhängige Mechanismen reduziert. Dazu gehört der Austausch von Natrium und Kalium, sodass es zu einer Natrium- und Chloridakkumulation in den Kardiomyozyten kommt, die folglich den osmotischen Druck verschiebt und zu einem intrazellulären Ödem führt. Auch die zytosolische Calciumkonzentration erhöht sich, da ein Transport durch die Hypernatriämie in das sarkoplasmatische Retikulum und das Sarkolemm gestört ist. Nach 20 bis 40 Minuten kommt es zu einem irreversiblen Zellschaden [19, 20].

Es werden zwei Zonen des Myokardschadens beschrieben. Zum einen eine zentrale Zone, bei der keine bis hin zu einer sehr niedrigen Perfusion besteht, und eine Marginalzone mit Kollateralgefäßen [19, 21].

Der Schaden breitet sich von subendokardial nach transmural aus. Die Größe des Infarktareals richtet sich nach der Größe der *area at risk* (AAR), der Dauer der Koronarokklusion und der Menge an gebildeten Kollateralgefäßen sowie der mikrovaskulären Koronardysfunktion [22]. Bei der AAR handelt es sich um das potenzielle Ischämieareal der okkludierenden Arterie bei ausbleibender Reperfusion [23].

Bei einer therapeutischen Wiederherstellung der Reperfusion kann es zu einem Reperfusionsschaden kommen, welcher zu einer Verschlechterung des Myokardschadens führen kann. Dieses kann sich durch Arrhythmien und Einschränkungen des Kontraktionsverhaltens äußern. Dabei kommt es zu einer Zellschädigung durch einen

exzessiven Anstieg von zytosolischen Calcium und der Bildung von freien Sauerstoffradikalen [24].

Das infarzierte Gewebe durchläuft verschiedene Phasen der Rekonstruktion. Initial kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Durch Einwanderung von neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen wird die Koagulationsnekrose phagozytiert und in einer Prolifertionsphase durch kollagenes Bindegewebe und eine Angiogenese ersetzt [25, 26].

Das vernarbte Gewebe führt im Verlauf, des sogenannten kardialen *Remodelings*, zu einer Verschmälerung der Wandstärke. Als Komplikation kann sich bei einem großen Infarktareal eine Herzinsuffizienz entwickeln. Dabei führt das große Infarktareal zu einer Verdünnung und einer Dilatation der Kammer; die systolische und die diastolische Wandspannung nehmen zu. Kompensatorisch hypertrophiert das restliche Areal [25].

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind bikonvexe, kernlose Blutzellen mit einem Durchmesser von zwei bis vier Mikrometer (μm) [27], die mit einer Anzahl von 150.000-400.000 pro Mikroliter (μl) in inaktiver Form im Blut zirkulieren [28]. Sie werden von myeloischen Stammzellen gebildet und letztendlich durch die Abschnürung von Megakaryozyten im Knochenmark unter Stimulierung von Thrombopoetin (TPO) und Interleukin (IL) – 11 gebildet [27, 29]. Auch die Lunge konnte nun als ein weiterer Bildungsort mit der Fähigkeit zur Thrombopoese identifiziert werden [30]. Sie haben eine Lebensdauer von fünf bis zwölf Tagen und werden anschließend von der Milz und Leber abgebaut [31, 32]. Ihre Hauptaufgabe besteht in der primären und sekundären Hämostase und sie spielen daher auch in der Genese thromboembolischer Ereignisse eine zentrale Rolle [33]. Daneben verfügen Thrombozyten auch über Funktionen in inflammatorischen Prozessen und der Immunabwehr [34-36].

1.2.1 Die Hämostase

Die Hämostase ist ein komplexer physiologischer Prozess der Blutstillung. Didaktisch lässt sie sich in die zwei Phasen der primären und sekundären Hämostase unterteilen. Letztere wird in ein extrinsisches und ein intrinsisches System unterteilt. Diese Phasen laufen nicht hintereinandergeschaltet ab, sondern vielmehr parallel und überschneidend. Physiologisch kommt es dem zellgebundenen Modell nach Hoffman et al. am nächsten [37].

Idealerweise bildet sich im Körper ein Gleichgewicht zwischen Hyperkoagulabilität (überschießender Gerinnung) und Hypokoagulabilität (übermäßiger Blutungsneigung) [38],

das aber im Rahmen pathophysiologischer Prozesse in eine Unausgewogenheit geraten kann und daher auch Ansätze für Therapiemöglichkeiten darstellt.

Die Initiation der primären Hämostase erfolgt nach Endothelschaden durch subendothelial freigesetzte Kollagenfasern, die durch den Glykoprotein (GP)-Ib-IX-V-Rezeptor an den von-Willebrand-Faktor (vWF) aus dem zirkulierenden Blut binden [38]. Über den vWF-Rezeptorkomplex GP-Ib-IX-V der Thrombozytenoberfläche wird sowohl die Thrombozytenadhäsion an der Läsionsstelle als auch die Thrombozytenaktivierung initiiert [39]. Durch die Aktivierung vom Integrin α IIb β 3 und dessen Bindung an multiplen Liganden kommt es zur weiteren Thrombozytenaggregation [40]. Die Bindung von Kollagenfasern an den Thrombozytenrezeptor GPVI und an das Integrin α 2 β 1 führt ebenfalls zu einer Thrombozytenaktivierung [41, 42].

Die Aktivierung trägt einerseits zur Freisetzung löslicher Mediatoren aus α - und *dense*-Granula der Thrombozyten bei. Die α -Granula können über hunderte dieser Mediatoren und Proteine freisetzen [43]. Durch die Aktivierung akkumulieren die Granula und können sowohl miteinander als auch mit einem Kanalsystem fusionieren, sodass die Granula-Inhalte in den Extrazellularraum sekretiert werden können [44, 45]. Des Weiteren können die α -Granula mit den Thrombozytenmembranen über die *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor* (SNARE) -Proteine fusionieren [44, 46]. Als wichtigste Mediatoren, die freigesetzt werden, sind hier im Zusammenhang vWF, Faktor II, V, XI, XIII, Fibronektin und p-Selektin (CD62P) zu nennen. Die aufgeführten Faktoren sowie Fibronektin werden in die Umgebung freigegeben und führen im Verlauf zu einer Thrombusformation [47, 48]. CD62P hingegen wird an die Thrombozytenzelloberfläche freigegeben, bindet an den zugehörigen Rezeptor und sorgt für eine Verstärkung der Thrombozytenaggregation sowie Thrombozyten-Fibrin Bindung [49].

Die Funktion der *dense*-Granula ist vor allem die Sekretion von Adenosindiphosphat (ADP), Calcium und Serotonin [48]. Sie führen zu einer Potenzierung der Thrombozytenaktivierung. ADP bindet an die Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ [50]. Durch die Stimulation der Cyclooxygenase (COX) 1 aktivierter Thrombozyten wird aus Arachidonsäure (ARA) Thromboxan-A2 (TXA2) *de novo* synthetisiert. [38, 51, 52].

Ebenfalls führt die Aktivierung zu einer Konformationsänderung der Thrombozyten und geht von der flachen zu einer nun rundlichen Form mit Ausläufern, sog. Pseudopodien, über [53]. Die Pseudopodien vernetzen sich mittels des GPIIb-IIIa-Komplexes mit Fibrinogen und sind in der Lage, Thrombozyten aneinander zu binden und dadurch Thrombozytenaggregate zu bilden. Diese Aggregate stellen einen instabilen weißen Thrombus dar, der in der Lage ist, den Endothelschaden zu überlagern und damit abzudichten [38, 54, 55].

Die sekundäre Hämostase besteht aus der Gerinnungskaskade der plasmatischen Gerinnungsfaktoren mit dem Ziel der Fibrinbildung. Zusätzlich kann zwischen einem intrinsischen Weg und einem extrinsischen Weg unterschieden werden, die anschließend in einer gemeinsamen Endstrecke enden. Der extrinsische Weg wird nach erfolgtem Endothelschaden durch freigesetztes Gewebsthromboplastin (*tissue factor* TF, Faktor III) aktiviert. TF aktiviert durch Bindung des Plasmaproteins Faktor VII zum Faktor VIIa, der nun mit dem TF sowie Phospholipiden und Calcium-Ionen einen Enzym-Komplex bildet [38, 56]. Diese ist in der Lage, Faktor IX und X in ihre aktiven Formen IXa und Xa zu spalten, was wiederum Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) spaltet [56]. Neben der Mündung in der gemeinsamen Endstrecke und damit der Aktivierung von Fibrin ist Thrombin in der Lage, sowohl Faktor XI, VIII und X zu aktivieren als auch an Protease-aktivierte-Rezeptoren der Thrombozyten zu binden und damit die Aktivierung der Thrombozyten zu unterstützen [56, 57].

Der intrinsische Weg beginnt mit der Aktivierung von Faktor XII zu XIIa durch negativ geladene Oberflächen von beispielsweise Kollagenfasern mithilfe der Kofaktoren Präkallikrein und Kininogen. Der aktive Faktor XIIa verstärkt die eigene Synthese durch die Spaltung von Präkallikrein zu Kallikrein [56, 58]. Des Weiteren führt Faktor XIIa zu einer Aktivierung von Faktor XI zu XIa und dieser wiederum zur Aktivierung von Faktor IX zu IXa. Faktor XI kann zusätzlich durch Thrombin aktiviert werden. Der Faktor VIII wird ebenfalls durch Thrombin aktiviert. Als Resultat des intrinsischen Wegs bildet sich die intrinsische Tenase zu einem Enzymkomplex aus Faktor IXa und VIIIa mit Phospholipiden und Calcium-Ionen.

Beide Wege münden in einer gemeinsamen Endstrecke. Die Tenasenkomplexe sind beide in der Lage, Faktor X zu Xa zu aktivieren, wobei die intrinsische Tenase viel effektiver wirkt. Faktor X kann mit Hilfe des Kofaktors V das Prothrombin (Faktor II) spalten, sodass Thrombin (Faktor IIa) gebildet wird. Thrombin ist wiederum in der Lage, Fibrinogen (Faktor I) zu spalten, und es entsteht Fibrin (Faktor Ia). Thrombin ist ebenfalls in der Lage, Faktor XIII zu aktivieren. Fibrinmonomere bilden ein Fibrinnetz und stabilisieren den Thrombus. Zusätzlich findet durch den Faktor XIII eine feste Quervernetzung des Fibrinnetzes statt, in der sich nun auch Erythrozyten anlagern [56, 59, 60].

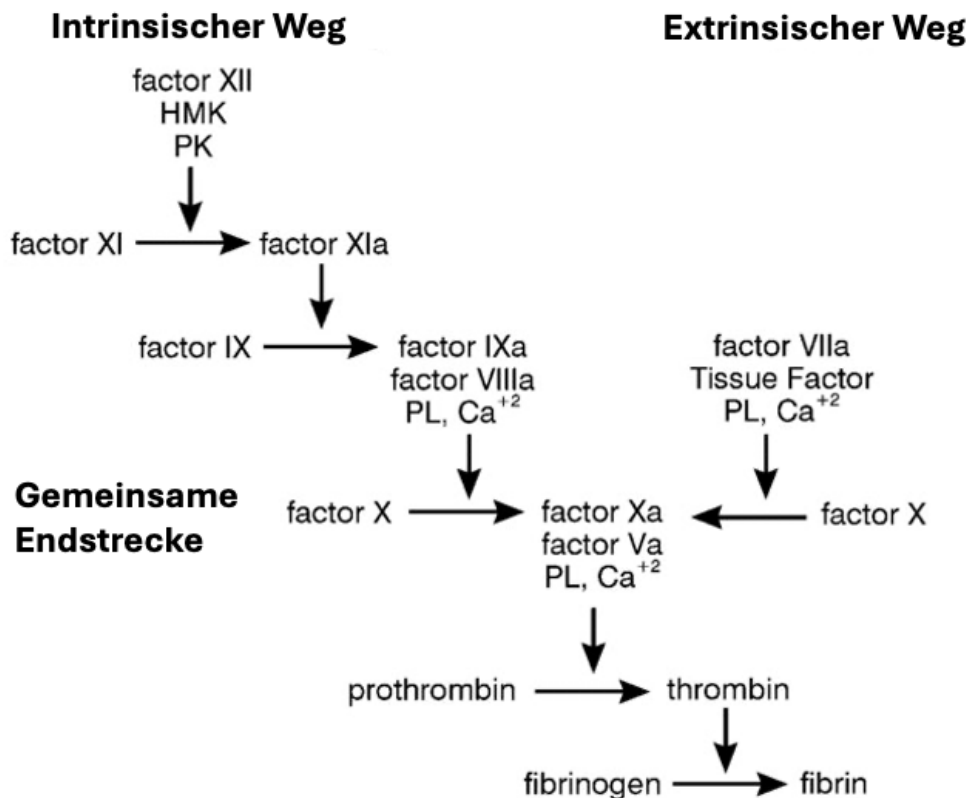


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade modifiziert nach Hoffman et al. [37]

Dargestellt ist der Ablauf des extrinsischen und intrinsischen Wegs sowie der gemeinsamen Endstrecke. Dabei sind aktivierte Faktoren (a) von nicht aktivierten Faktoren zu unterscheiden.

Ca⁺² = Calcium, HMK = *high molecular weight kininogen*, PK = Präkallikrein, PL = Phospholipide

1.2.2 Thrombozytenfunktionen im akuten Myokardinfarkt

Die Thrombozytenaktivierung ist eines der zentralen Elemente im Rahmen eines AMI [61, 62]. Bei einer Plaqueruptur kommt es zunächst zu einer thromboembolischen Auflagerung und folglich zu einer totalen Gefäßokklusion und einem ischämischen Schaden [63]. Daher ist im Rahmen der akuten MI-Phase sowie zur sekundären Prävention nach AMI eines der Haupttherapieansätze die Inhibition der Thrombozytenaktivierung beziehungsweise der -aggregation [4, 64].

Des Weiteren ist bekannt, dass Thrombozyten an inflammatorischen Prozessen und Reparaturmechanismen des Myokards nach einem AMI beteiligt sind. Sie gehören zu den ersten inflammatorischen Zellen, die das Infarktareal infiltrieren [65]. Während der anfänglichen inflammatorischen Phase kommt es durch die Thrombozytenaktivierung zur Ausschüttung von Chemokinen (wie RANTES, CXCL4, CXCL5, CXCL12, CXCL14), Selektinen und Integrinen (P-Selektin, GP-Ib- α , ICAM-2, GP-IIb/IIIa, CD147, CD40L), die zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten führen [66-70]. Durch die Sekretion von Serotonin und Histamin werden kardiale Fibroblasten sowie Myofibroblasten

aktiviert, die an Prozessen der Fibrosierung beteiligt sind [71-73]. Somit haben Thrombozyten auch Einfluss auf den Prozess der kardialen Dysfunktion nach AMI.

Andere Studien zeigten dagegen protektive Eigenschaften durch Thrombozyten in den Prozessen der Regeneration nach einem AMI. Diese Funktion ist hauptsächlich der Sekretion bioaktiver Moleküle zuzuschreiben [67]. Eine erhöhte Expression von CXCL12, oder auch *stromal cell derived factor-1 α* (SDF1- α), konnte mit kleineren Infarktgrößen (INF) sowie einer besseren Herzfunktion assoziiert werden [74]. Erniedrigte TGF- β 1 Werte waren mit einer höheren Mortalität assoziiert [75]. Eine Limitierung des fibrotischen Umbaus konnte mit Thrombospondin-1 assoziiert werden [76]. Ebenfalls zeigten Adenin-Nukleotide, Serotonin und Lipoxin A4 kardioprotektive Effekte [67, 77]. Annexin A1 sowie Maresin 1 zeigten positive Eigenschaften in Bezug auf inflammatorische Prozesse [78, 79]. Als weiteres bioaktives Molekül ist in diesem Zusammenhang das Sphingosin-1-Phosphat (S1P) aufzuführen, dass im Verlauf dieser Arbeit noch genauer aufgegriffen wird.

1.3 Pharmakotherapie des akuten Myokardinfarktes: Die Thrombozytenaggregationshemmung

Zur Entgegenwirkung der prothrombotischen Prozesse hat sich in der pharmakologischen Therapie des AMI die Thrombozytenaggregationshemmung bewährt. Hierzu zählen einerseits die Behandlung mittels Acetylsalicylsäure (ASS) und eine erweiterte Therapie als duale antithrombozytäre Therapie (*dual antiplatelet therapy* DAPT) mit P2Y₁₂-Antagonisten oder GP-IIb/IIIa-Antagonisten [64, 80].

ASS ist ein Derivat der Salicylsäure und hat sowohl antithrombotische als auch analgetische, antiinflammatorische und antipyretische Eigenschaften und zählt zur Wirkstoffgruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR). Der Wirkmechanismus beruht auf der irreversiblen Inhibierung des Enzyms COX-1. Dabei kommt es zunächst zur Acetylierung im katalytischen Zentrum am Serin-Rest Ser 530. Arachidonsäure wird dabei an der Umwandlung zu Prostaglandin H₂ und zu TXA₂ gehindert, sodass es zu einer Thromboxan-abhängigen verminderten Thrombozytenaggregation kommt [81, 82].

Eine Dosis von 75-100 mg ASS kann bereits zur Thrombozytenaggregationshemmung verwendet werden. Zur Therapie des akuten Koronarsyndroms (ACS) wird eine Aufsattdosis von 150-300 mg per os (p.o.) oder 75-250 mg intravenös (i.v.) empfohlen, gefolgt von einer Erhaltungsdosis von 75-100 mg pro Tag [64, 80].

Als weiterer Angriffspunkt der Thrombozytenaggregationshemmung dient der ADP-Rezeptor. Hierbei kommt es durch eine selektive Blockierung des Subtyps P2Y₁₂ auf der Oberfläche der

Thrombozyten. Dies führt zu einer Hemmung der ADP-vermittelnden Aktivierung des GP-IIb/IIIa-Rezeptors und sequenziell zum Ausbleiben der Vernetzung von Thrombozyten über Fibrinogen [83].

Zu der Gruppe gehört das Prodrug Clopidogrel. Es wird durch das Cytochrom P450 2C19 (CYP2C19) zum aktiven Metaboliten umgewandelt und hemmt den P2Y₁₂-Rezeptor irreversibel [84]. Als Aufsattdosis werden 300 bis 600 mg eingesetzt. Die Erhaltungsdosis beträgt einmal täglich 75 mg [64, 80].

Als neuere und potentere Vertreter der Gruppe im Vergleich zu Clopidogrel sind sowohl Prasugrel, als auch Ticagrelor zu nennen. Prasugrel hemmt den P2Y₁₂-Rezeptor irreversibel, dagegen hemmt Ticagrelor diesen reversibel. Primär finden sie Anwendung in der DAPT in Kombination mit ASS [85, 86].

Ebenfalls ist als reversibler Vertreter der P2Y₁₂-Antagonisten und als einziger i.v. Vertreter Cangrelor aufzuführen. Derzeit ist Cangrelor bei Patient*innen in Betracht gezogen, die vor einer perkutanen Koronarintervention (PCI) keinen P2Y₁₂-Antagonisten erhalten haben und die orale Gabe nicht möglich oder wünschenswert ist. Als Dosierung wird eine Bolusgabe von 30 Mikrogramm (µg)/kg i.v. verwendet, gefolgt von einer Administration von 4 µg/kg/min über mindestens zwei Stunden [64, 80, 87].

GP-IIb/IIIa-Antagonisten sind Thrombozytenaggregationshemmer, die über eine direkte Blockierung des GP-IIb/IIIa-Rezeptors an der Thrombozytenoberfläche wirken und es somit ebenfalls zum Ausbleiben der Vernetzung von Thrombozyten über Fibrinogen kommt. Als Vertreter der Gruppe sind sowohl Eptifibatid, welches eine niedrige Bindungsaffinität aufweist, als auch Tirofiban zu nennen, welches eine weitaus höhere Affinität besitzt [88, 89].

Im akuten MI zeigten GP-IIb/IIIa-Antagonisten positive Effekte auf die ST-Strecke [90] sowie auf die INF [91]. Die Dosis für Tirofiban liegt bei einer Bolusgabe von 25 µg/kg über drei Minuten i.v. und einer Erhaltungsinfusion mit 0,15-0,2 µg/kg/min bis zu 18 Stunden [64, 80].

Derzeit werden GP-IIb/IIIa-Antagonisten nur für die folgende Indikation empfohlen: als *bail-out* bei Hinweisen auf einen reduzierten oder stagnierenden Blutfluss oder eine thrombotische Komplikation [64]. Gründe für die eingeschränkten Indikationen sind zum einen ein hohes Blutungsrisiko, das ebenfalls bei anderen antithrombotischen Substanzen erhöht ist, [92-94] und zum anderen, dass die GPIIb/IIIa-Antagonisten nicht ausreichend untersucht wurden, da anstatt dessen die potenteren P2Y₁₂-Antagonisten eingesetzt wurden [95, 96].

In weiteren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein periprozedurales Blutungsrisiko durch einen radialen Zugangsweg minimiert werden konnte [94, 97, 98].

Derzeit empfehlen die Leitlinien eine DAPT im klinischen Setting nach der Entscheidungsfindung für den Einsatz einer Koronarintervention. Große Studien zur weiteren Investigation einer DAPT im präklinischen Setting werden immer noch benötigt [64, 80].

1.4 Sphingosin-1-phosphat

S1P ist ein Sphingolipid mit verschiedenen Funktionen im immunologischen und kardiovaskulären System [99, 100]. Gebildet wird es durch die Phosphorylierung aus Sphingomyelin mittels zweier Gruppen an Sphingosinkinasen (SphK), SphK-1 und -2. Degradiert wird es durch S1P-Phosphatasen und S1P-Lyasen [100, 101].

S1P wirkt durch die Bindung an spezifische S1P-Rezeptoren. Insgesamt sind fünf verschiedene G-Protein-gekoppelte S1P-Rezeptoren bekannt [102]. Im kardiovaskulären System befinden sich die S1P-Rezeptoren 1-3 auf Kardiomyozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen sowie Endothelzellen [103]. Der S1P-Rezeptor 3 ist auf Zellen der Hämatopoese sowie lymphatischen Zellen exprimiert und der S1P-Rezeptor 5 befindet sich im Nervensystem [104]. Pharmakologisch gibt es verschiedene S1P-Rezeptor-Agonisten, die aber derzeit noch keine Zulassung bei kardiovaskulären Erkrankungen finden. Eingesetzt werden sie vor allem in der Behandlung der multiplen Sklerose [105, 106]. Für den S1P-Rezeptor-Agonist FTY720, auch Fingolimod genannt, zeigten Tierversuchsstudien an Schweinen bereits eine positive Wirkung auf die INF, auf die LV-Funktion beim AMI, sowie auf das *Remodelling* [107].

Endogenes S1P wird sowohl im Gewebe als auch in Zellen gespeichert [108]. Im Plasma ist S1P an Transportmolekülen gebunden, zum größeren Anteil von ca 50-70 % am *high-density* Lipoprotein (HDL) und zum kleineren Anteil von ca. 30 % an Albumin sowie von ca. 10 % am *low-density* Lipoprotein (LDL) und *very-low-density* Lipoprotein (VLDL) [109, 110]. Die Plasmakonzentrationen von S1P liegen zwischen 200 und 900 Nanomolar (nM) [111]. Die S1P-Plasma-Halbwertszeit wird als relativ kurz, zwischen ca. 1 und 15 Minuten, beschrieben [112, 113].

Die Hauptausschüttungsquelle von S1P ins Plasma stellen die Erythrozyten dar [114]. Als weitere Quellen dienen Endothelzellen sowie Thrombozyten und Leukozyten [113, 115]. Thrombozyten speichern hohe Mengen an S1P, bedingt durch eine hohe S1P-Kinase-Aktivität. S1P degradierende Enzyme finden sich in Thrombozyten nicht [101]. Bei Thrombozytenaktivierung wird das gespeicherte S1P freigesetzt [116].

Im kardiovaskulären System ist S1P an der Angiogenese sowie Morphogenese der Gefäße beteiligt und beeinflusst über das Endothel und die glatten Muskelzellen den arteriellen Tonus, die Gefäßpermeabilität und die Gewebssperfusion [117]. In einigen Studien konnte gezeigt

werden, dass eine exogene Administration von S1P einen positiven Effekt auf die Endorgane im Ischämie/Reperfusion (I/R)-Modell hat [118-120]. Bei einem AMI konnte im Menschen auch eine dynamische Regulierung der S1P-Level gezeigt werden [121-123]. Ebenfalls zeigten sich dynamische S1P-Level bei transienten Ischämien in Koronarinterventionen [123]. Jedoch ist noch unklar, ob die Ausschüttung von S1P während Ischämien oder des AMI durch Thrombozyten reguliert wird und welche Rolle die pharmakologische Thrombozyteninhibierung bei der Ausschüttung spielt. Ebenso ist unbekannt, ob die Menge des ausgeschütteten S1P während des AMI einen Einfluss auf die Myokardschädigung hat.

1.5 Fragestellung und Hypothese der Arbeit

In dieser Dissertation werden die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Wird S1P während eines AMI aus Thrombozyten sekretiert?
- Welchen Einfluss hat S1P auf die myokardiale Funktion nach einem AMI?
- Nimmt die Wahl der Thrombozytenaggregationshemmung einen Einfluss auf das S1P und damit auf eine mögliche Kardioprotektion?

In dieser Arbeit wurde hypothetisiert, dass Thrombozyten eine wichtige Quelle für die S1P-Sekretion im AMI sind und einen Einfluss auf das Ausmaß der Myokardschädigung infolge eines AMI haben.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Versuchsteile. Der erste Teil umfasst grundlagenwissenschaftliche Experimente, der zweite Teil umfasst einen klinisch-translationalen Versuchsteil.

Im grundlagenwissenschaftlichen Teil wurde an C57Bl/6J Wildtyp (WT) Mäusen die Effekte von S1P auf den AMI getestet. An einer Gruppe an Versuchsmäusen wurde eine Blutentnahme (BE) aus dem retrobulbären Plexus durchgeführt. Im Anschluss wurde aus dem gewonnenen Blut ein Plättchenüberstand generiert und entweder als aktivierter Plättchenüberstand (*activated platelet supernant* SNT+) oder als nicht aktivierter Plättchenüberstand (*non-activated platelet supernant* SNT-) asserviert (s. 2.6.1). Ein Teil des SNT+ und des SNT- wurde zur Bestimmung des S1P-Gehaltes durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography* HPLC) (s. 2.6.2) genutzt.

An einer weiteren Gruppe an Versuchsmäusen wurde das myokardiale I/R-Modell unter dem Einfluss von i.v. injizierten SNT+, SNT- oder isotoner Natriumchloridlösung (NaCl) angewendet (s. 2.6.3). Anschließend wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Es erfolgten entweder nach 24 Stunden Infarktgrößenbestimmungen mittels Evans-Blau und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Färbungen oder Inflammations- und Apoptosebestimmungen mittels histologischer Färbungen durch Ly6G. Bei einem weiteren Teil der Versuchsmäuse erfolgte nach fünf Tagen die histologische Färbung durch Caspase-3 (s. 2.6.5). Echokardiographische Untersuchungen wurden jeweils vor I/R als *Baseline* und 24 Stunden oder 5 Tage nach I/R durchgeführt (s. 2.6.4).

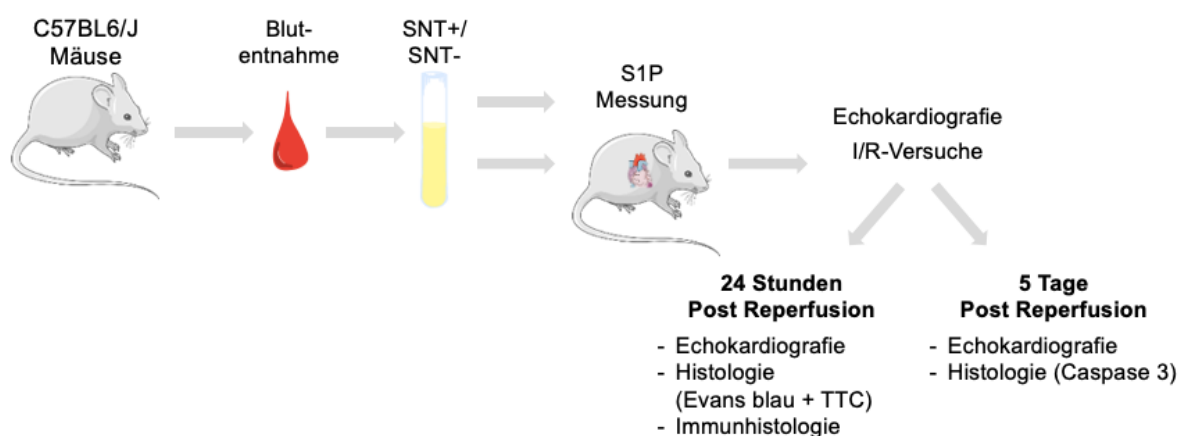


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuche an C57Bl/6J WT Mäusen

I/R = Ischämie/Reperfusion, S1P = Sphingosin-1-Phosphat, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*, TTC = 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

Um eine mögliche Kardioprotektion von S1P aus SNT+ nachzuweisen, wurden zusätzlich Mäuse mit globaler Defizienz an Sphingosinkinase 1 ($\text{SphK1}^{-/-}$) eingeschlossen. Die Durchführung der Methodiken sowie die Messung der Ergebnisse waren gleichermaßen zu den C57Bl/6J WT-Mäusen.

Einer Gruppe an $\text{SphK1}^{-/-}$ wurde eine retrobulbäre BE durchgeführt, anschließend SNT+ und SNT- generiert und der S1P-Gehalt mittels HPLC bestimmt (s. 2.6.1-2). Bei einer weiteren Gruppe an $\text{SphK1}^{-/-}$ wurde das I/R-Modell unter dem Einfluss von i.v. injizierten SNT+, SNT- oder NaCl angewendet (s. 2.6.3). Es erfolgte die Infarktgrößenbestimmung mittels Evans-Blau und TTC-Färbungen nach 24 Stunden (s. 2.6.5).

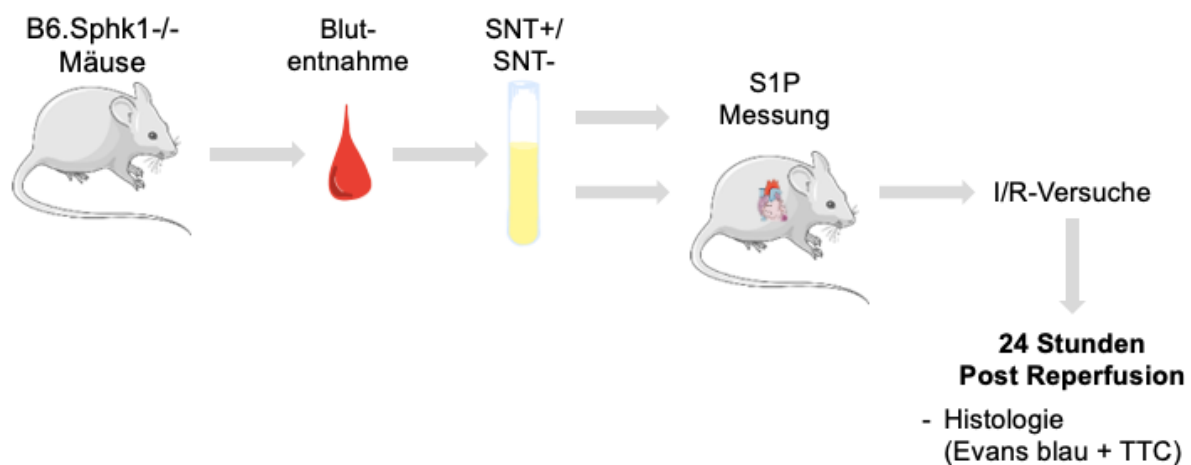


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuche an $\text{SphK1}^{-/-}$ Mäusen

I/R = Ischämie/Reperfusion, S1P = Sphingosin-1-Phosphat, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*, $\text{SphK1}^{-/-}$ = Mäuse mit globaler Defizienz an Sphingosinkinase 1, TTC = 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

Des Weiteren wurden Proband*innen im experimentellen Teil eingeschlossen, bei denen im SNT+ *in vitro* die Thrombozytenaggregationshemmung durch Cangrelor und Tirofiban verglichen wurde. Dabei wurden nach einer peripheren BE (s. 2.6.6) die Thrombozytenreaktivität und -aktivierung mittels Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) (s. 2.6.7) und Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) (s. 2.6.8) gemessen sowie die ATP-Freisetzung (s. 2.6.9) bestimmt.

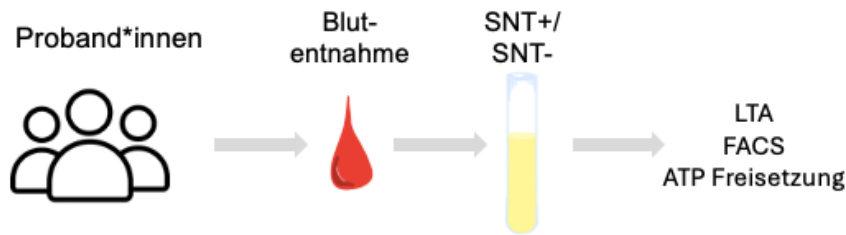


Abbildung 4: Schematische Darstellung der *in vitro* Versuche

ATP = Adenosintriphosphat, FACS = Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*), LTA = Lichttransmissionsaggregometrie, S1P = Sphingosin-1-Phosphat, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

Im zweiten Teil der Dissertation, dem klinisch-translationalen Versuchsteil, wurden 127 Patient*innen mit einem diagnostizierten STEMI eingeschlossen. Es erfolgten S1P-Messungen bei initialer Klinikaufnahme. Nach sechs Monaten wurde eine kardiale Magnetresonanztomographie (cMRT) (s. 2.6.10) zur Infarktgrößenbestimmung durchgeführt. Sowohl die INF nach sechs Monaten als auch das Überleben der Patient*innen nach zwölf Monaten wurden mit dem initialen S1P-Gehalt verglichen und korreliert.

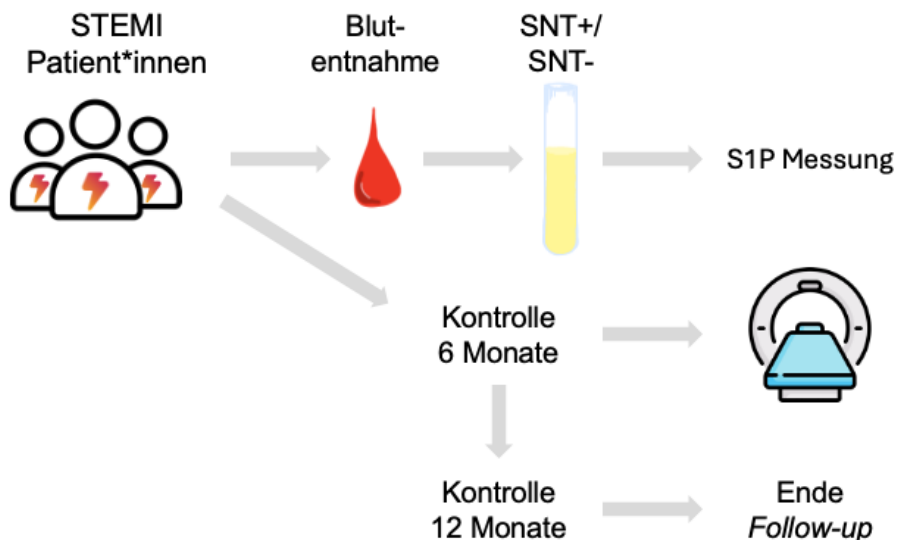


Abbildung 5: Schematische Darstellung der klinisch-translationalen Versuche

SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*, STEMI = ST-Hebungsinfarkt

2.2 Versuchstierkollektiv

Alle verwendeten Versuchstiere wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) unter dem europäischen Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used*

for Experimental and other Scientific Purposes, Council of Europe Treaty Series No. 123) und 2010/63/EU genehmigt. Die Genehmigung läuft unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2017.A440.

Die C57BL6/J WT-Mäuse wurden über Janvier Labs bezogen (Saint-Berthevin, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). SphK1^{-/-} wurden freundlicherweise von Richard L. Proia (*National Institutes of Health*, Vereinigte Staaten) zur Verfügung gestellt. Alle Tiere waren zu Beginn der Versuche 12-15 Wochen alt und wogen 20-30 g. Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Sowohl vor als auch nach den Versuchen wurden alle Mäuse durch das Fachpersonal in den Räumlichkeiten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf betreut. Entsprechend den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA) wurden die Tiere in Typ II Käfigen vom 370 cm² auf Einstreu mittels staubfreien Weichholzgranulat bei einer Raumtemperatur (RT) von 22 ± 2 Grad Celsius (°C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 ± 5 % gehalten. Der zirkadiane 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus wurde durch eine Beleuchtungszeit der Räumlichkeit von 07:00 bis 19:00 Uhr gesetzt. Es bestand allzeit ein Zugang zu Trinkwasser und Futter ad libitum.

24 Stunden vor und nach den Versuchen wurden die Tiere in den Haltungsräumen des kardiologischen Labors unter gleichen Haltungsbedingungen versorgt. Als Rückzugsort innerhalb der Käfige diente autoklavierter Zellstoff. In der postoperativen Nachversorgung wurden die Tiere zum Schutz der Wunden in Einzelkäfigen gehalten.

2.3 Proband*innenkollektiv

Nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung wurden insgesamt sechs gesunde Proband*innen eingeschlossen. Als Ausschlusskriterien galten ein Alter unter 18 Jahren, eine Einnahme von Medikamenten mit Einfluss auf die Thrombozytenfunktion (insbes. Thrombozytenfunktionshemmer, NSAR-Analgetika) innerhalb der letzten sieben Tage, hämatologische Erkrankungen und Erkrankungen mit Störung der Hämostase, kardiovaskuläre Vorerkrankungen, maligne Vorerkrankungen und eine eingeschränkte Nierenfunktion.

2.4 Patient*innenkollektiv

Für den translationalen Teil der Studie wurden in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf innerhalb einer prospektiven, monozentrischen Zeitreihenanalyse 127 Patient*innen mit STEMI eingeschlossen im Rahmen

eines *All-comers* Studiendesigns. Als Einschlusskriterien galten das Alter ≥ 18 Jahre, ein bestätigter STEMI sowie die Einwilligungsfähigkeit. Als STEMI galten die Definitionskriterien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und *European Society of Cardiology*: Patient*innen mit anhaltenden Brustbeschwerden oder anderen auf Ischämie hindeutenden Symptomen und mit ST-Streckenhebung in mindestens zwei zusammenhängenden EKG-Ableitungen [64, 80].

Ausschlusskriterien waren bewusstlose, nicht einwilligungsfähige Patient*innen, maligne Vorerkrankungen sowie Koagulopathien. Nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung erfolgte während der Ischämiezeit, zwölf Stunden und fünf Tage nach Intervention eine BE. Innerhalb der klinischen Nachuntersuchung wurde sechs Monate nach STEMI eine cMRT durchgeführt, um die INF messen zu können. Die Charakteristika wurden aus den Arztbriefen sowie aus den zugänglichen Untersuchungsergebnissen entnommen. Die Laborparameter wurden im Zentrallabor des Zentralinstituts für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf ermittelt.

Die Studie zum Patient*innen- und Proband*innenkollektiv wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt und entspricht der Deklaration von Helsinki. Die Registrierung liegt auf clinicaltrials.gov unter der ID „NCT03539133“ vor.

2.5 Material

2.5.1 Verwendete Substanzen

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Adenosin 5'- diphosphat	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti-Ly6G <i>antibody (rat monoclonal)</i>	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Cleaved Caspase-3 <i>antibody (rat monoclonal)</i>	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
BLOXALL®- <i>Endogenous Blocking solution</i>	Vector laboratories, Burlingame, USA
Buprenorphin (Temgesic®)	Indivior Europe Ltd., Dublin, Irland
Cangrelor	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CD41/61 APC-Cy7 <i>anti-human</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD42b Pe-Cy7 <i>anti-human</i>	Invitrogen, Massachusetts, USA
CD62P BV421 <i>anti-human</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Citratpuffer (pH 6.0)	ThermoFisher, Massachusetts, USA
Dexpanthenol Augensalbe (Bepanthen®)	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

Elektrodenkontaktcreme	Gello GmbH Geltechnik, Ahaus, Deutschland
Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser, Slough, Vereinigtes Königreich
Ethanol 100%, 96%, 70%	Carl Roh GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Evans Blau Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Gadovist 1,0 mmol/ml	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
<i>Goat Serum Blocking Solution 2.5 %</i>	Vector laboratories, Burlingame, Kanada
Hämatoxylinlösung nach Gill II	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
ImmPRESS®- <i>Goat Anti-Rat IgG (Mouse Adsorbed)</i> Polymer Kit (MP-7444)	Vector laboratories, Burlingame, Kanada
ImmPRESS®-AP <i>Goat Anti-Rabbit IgG</i> Polymer Kit (MP-7451)	Vector laboratories, Burlingame, Kanada
Isofluoran	Piramal critical care, Voorschoten, Niederlande
Isotonische Kochsalzlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ketamin	Zoetis, Berlin, Deutschland
Kollagen	Probe & go Labor Labordiagnostica GmbH, Deutschland
Ly6G FITC <i>anti-mouse</i>	BioLegend, San Diego, USA
Methanol (MeOH)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
Milli-Q®	Millipore GmbH, Burlington, USA
<i>Mounting medium (H-5000)</i>	Vector laboratories, Burlingame, Kanada
Octenisept	SCHÜLKE & MAYR GmbH, Norderstedt, Deutschland
Paraformaldehyd 4 %	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline PBS</i>)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Prostaglandin E1 (PGE1)	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Roticlear®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sphingosin-1-Phosphat (d18:1 und d17:1)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
Standardfutter	Ssniff, Soest, Deutschland
Tirofiban (Aggrastat ®)	Correvio Pharma Corp., Vancouver, Kanada
Ultraschallgel (Aquasonic)	Roeser Medical, Essen, Deutschland

Xylazin (Rompun®)	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
-------------------	--

2.5.2 Verwendete Utensilien

4-0 Perma-Hand	Ethicon, Raritan, New Jersey, USA
5-0 Prolene	Ethicon, Raritan, New Jersey, USA
7-0 Prolene	Ethicon, Raritan, New Jersey, USA
7-0 Seraflex	Serag Wiessner GmbH & Co. KG, Naila, Deutschland
96-Well-Platte	ThermoFisher, Massachusetts, USA
Adhäsionsobjektträger	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ATP Assay	FLAA, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Eppendorf Tubes®	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Glaskappillaren Lithium-Heparin	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
Massenspektrometer Fläschchen	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Vacutainer® Blutentnahmeset Safety-Lok und Einmalhalter	BD Beckton, Dickson and Company, Franklin Lakes, USA
Vacutainer® EDTA-Röhrchen	BD Beckton, Dickson and Company, Franklin Lakes, USA
Vacutainer® Citrat-Röhrchen	BD Beckton, Dickson and Company, Franklin Lakes, USA
Venenverweilkanüle Vasofix 20 Gauge (G)	B. Braun, Melsungen, Deutschland

2.5.3 Verwendete Gerätschaften

18-38 MHz Schallkopf MS400	Visual Sonics, Fujifilm, Toronto, Kanada
Aggregometer APACT 4004	LABiTec® Labor BioMedical Technologies GmbH, Ahrensburg, Deutschland
BD FacsVerse®	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Biolumineszenz Messgerät Fluostar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
<i>Heated small animal operating table</i> , 50-1247	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
Hitachi LaChrom Elite HPLC System	Hitachi High-Technologies Corporation, Präfektur Tokio, Japan

LCMS-8050 triple-quadrupole Massenspektrometer	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Leica Biocut 2035	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DM6B Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DM4000 M Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica MZ95 Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Jung Biocut 2035	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
MiniVent Ventilator für Mäuse, Model 845	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
Ultraschallgerät Vevo 3100	Visual Sonics, Fujifilm, Toronto, Kanada
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge Microstar 17R	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Mikro 2000R	Hettich Zentrifugen, Andreas Httich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich Zentrifugen, Andreas Httich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 120R	Hettich Zentrifugen, Andreas Httich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

2.5.4 Verwendete Software

cmr42	Circle Cardiovascular Imaging Inc., Calgary, Alberta, Kanada
Diskus View	Technisches Büro Hilgers, Königswinter, Deutschland
Extended Workspace	Philips Healthcare, Hamburg, Deutschland
Flow-Jo®	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
GraphPad-Prism® 8	GraphPad Software, Boston, USA
IBM SPSS®-Statistics 25	International Buisness Machines Corporation, Armonk, New York, USA
ImageJ v1.53c	Wayne Rasband

LabSolutions 5.99 SP2 und LabSolutions Insight	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
VevoLab 3.2.6	Visual Sonics, Fujifilm, Toronto, Kanada

2.5.5 Verwendete Lösungen und Puffer

ACD-Lösung:

Natriumcitrat	3,4 mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Zitronensäure	1,3 mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glukose	20,0 mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Milli-Q®		
Natriumhydroxid	Zur Einstellung des pH auf 4,6	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

HEPES-Thyroides-Thrombozytenpuffer:

	FACS	ATP Assay	
Natriumchlorid	140 mM	137 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumchlorid	3 mM	2,9 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydrogencarbonat	16,6 mM	12 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HEPES	10 mM	5 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glukose	5,5 mM	5 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Humanes Serumalbumin	0,5 %		Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dinatriumhydrogenphosphat		0,34 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Magnesiumchlorid		1 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Calciumchlorid		1 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Die pH Einstellung erfolgte mittels ACD-Lösung auf 7,4.			

CGS-Puffer:

Zitronensäure	1,7 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumcitrat	18,3 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glukose	10 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid	120 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Prostaglandin E1	50 nM	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Milli-Q®		

2.6 Methoden

2.6.1 Generation von Plättchenüberstand

Mittels eines heparinisierten Kapillarröhrchens wurde Spendermäusen Blut aus dem retrobulbären Plexus entnommen und in einem Eppendorf-*Tube* gesammelt [124]. Anschließend wurde das Blut für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und bei 170 g für fünf Minuten bei RT zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP), welches die obere Schicht im Reaktionsgefäß bildet, wurde abpipettiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-*Tube* überführt und mit ADP (10 µM) oder Kollagen (10 µg/ml) versetzt und bei 37 °C für drei Minuten inkubiert. Durch eine erneute Zentrifugation bei 2000 g für fünf Minuten bei RT konnte SNT+ generiert werden. Zur Vergleichbarkeit wurde der SNT- anstatt eines Aktivators mit dem gleichen Volumen an NaCl (0,9 %) inkubiert.

Für die Versuchsansätze der Testung von Thrombozytenaggregationshemmern wurden 200 µM Cangrelor oder 50 nM Tirofiban vor der ersten Zentrifugation und zwei Minuten vor der ADP-Inkubation hinzugefügt.

2.6.2 Sphingosin-1-Phosphat Messung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die HPLC ist eine Analysemethode, mit der Substanzen durch die Chromatographie getrennt und anschließend durch die Massenspektrometrie identifiziert und analysiert werden können [125]. Dabei wird die zu untersuchende Substanz mit einem Eluent (sog. mobile Phase) unter hohem Druck durch eine Trennsäule mit enthaltener stationärer Phase gepumpt. Durch Wechselwirkungen werden Moleküle an die stationäre Phase gebunden und je Wechselwirkungsstärke unterschiedlich schnell wieder getrennt. Am Ende der Trennsäule werden die Substanzen anhand ihrer Retentionszeit und Menge detektiert.

Die S1P-Extraktionen, sowie die dazugehörigen Messungen wurden von der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Dr. med. Bodo Levkau durchgeführt (Institut für molekulare Medizin III, Universitätsklinikum Düsseldorf).

Die BE des Patient*innenkollektivs erfolgte im Rahmen der klinisch notwendigen diagnostischen Blutabnahme nach Einwilligung über eine aseptische Venenpunktion in EDTA-Röhrchen Vacutainer®. Die Proben wurden im Anschluss innerhalb einer halben Stunde bei 270 g für zehn Minuten zentrifugiert, um PRP zu gewinnen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die BE der Versuchsmäuse erfolgte nach Determination des Gewichtes und entsprechender Narkotisierung mit Ketamin (100 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)) und Xylazin (10 mg/kg, i.p.). Nach Überprüfung des fehlenden Zwischenzehenreflexes erfolgte die Blutabnahme und wurde direkt in EDTA-Röhrchen auf Eis aufbewahrt. Nach Zentrifugation bei 270 g für

zehn Minuten wurde das PRP abgenommen und in Eppendorf-*Tubes* bei ebenfalls -80 °C aufbewahrt.

Zur Lipidextraktion wurde PRP in Methanol resuspendiert und 10 µl Standardlösung dazugegeben (für S1P (d18:1): 10 pmol C17 S1P in MeOH; für S1P (d17:1): d7 S1P in MeOH). Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei -80 °C und daraufhin eine Zentrifugation bei 4 °C für fünf Minuten bei 21300 g. Der Überstand wurde bis zur Messdurchführung in Massenspektrometer-Fläschchen bei -80 °C gelagert.

Die chromatographische Trennung erfolgte mittels Massenspektrometer (LCMS-8050 triple-quadruple Massenspektrometer) mit dualen Ionen Sensor und Nexera X3-Front-End-System in einer 2 x 60 mm Säule mit 3 µm Partikelgrößeneinstellung bei einer Flussrate von 400 µl/min bei 40 °C. Es wurden jeweils 10 µl der Proben pro Ansatz verwendet. Die Zusammensetzung der mobilen Phasen bestand aus 1 % aq HCO₂H (beschrieben im Verlauf als [A]) und MeOH (beschrieben als [B]). Die Gradienteneinstellung erfolgte beim Start auf 10 % [B] mit einem anschließenden linearen Anstieg von [B] auf 100 % bis Minute drei (B-Kurve = -2) und Fortführung von 100 % [B] bis Minute acht. Von Minute acht bis zehn erfolgte eine Äquilibration.

Das Massenspektrometer wurde wie folgt eingestellt: Schnittstelle: Elektrospray-Ionisation, Zerstäuber-Gasfluss: 10 l/min, Schnittstellentemperatur: 300 °C, Durchlauftemperatur: 250 °C, Heizblocktemperatur: 400 °C, Trockengasfluss: 10 l/min, Modus: *multiple reaction monitoring* (MRM). Die Daten wurden mittels Regressionsanalyse mit der Software LabSolutions 5.99 SP2 und LabSolutions Insight analysiert. Positive Messwerte lagen zwischen 100 fmol bis 50 pmol und wurden anhand des internen Standards quantifiziert.

2.6.3 Myokardiales Ischämie/Reperfusions-Modell

Bei dieser Methodik wird mittels Operation von Versuchsmäusen ein AMI anhand temporärer Ligation des RIVA induziert. Diese Methode ist eine der zwei meistangewandten Methoden, um einen MI *in vivo* zu induzieren [126]. Die Methodik der temporären Ligation stellt die Methodik der Wahl dar, um die klinische Situation eines AMI der Vorderwand mit anschließender Reperfusion zu simulieren.

Nach einer Analgesie durch Buprenorphin (0,1 mg/kg subkutan (s.c.)) erfolgte nach 30 Minuten die Narkotisierung in einer transparenten Inhalationskammer mit 3 % Isofluran (Piramal) bei Raumluft. Bei fehlendem Zwischenzehenreflex wurden die Mäuse mit einer 20 G Venenverweilkanüle intubiert und mittels eines murinen Respirators unter 2 % Isofluran und 40 % O₂ angereicherter Raumluft beatmet. Zur Verhinderung der Augenaustrocknung wurde eine dexpanthenolhaltige Augensalbe verwendet. Die Überprüfung der Körperkerntemperatur erfolgte mittels Rektalsonde. Die OP wurde auf einem beheizten OP-Tisch ausgeführt, um die

Körpertemperatur der Maus stabil zu halten. Für das Monitoring der Ligation und Reperfusion über ST-Wellen im EKG wurden Oberflächen EKG-Elektroden angebracht. Eine Enthaarung erfolgte bereits bei der vorangegangenen echokardiographischen Untersuchung (s. 2.5.5).

Nach Desinfektion mit Octenidinlösung erfolgte die Eröffnung des Thorax zwischen der dritten und vierten Rippe. Nach Freipräparation des Herzes mithilfe eines Mikroskops (Leica MZ95) und Darstellung der RIVA wurden 100 µl SNT-, SNT+ oder NaCl i.v. injiziert. Nach fünfminütiger Wartezeit wurde der RIVA mittels 7/0 Prolene umstochen und ein Tourniquet durch das Hindurchziehen der Fadenenden durch einen dünnen Kunststoffschlauch gebildet. Es erfolgte die Induktion der Ischämie durch Tourniquetschließung für 30 Minuten. Die Reperfusion wurde durch das Entfernen des Tourniquets wiederhergestellt. Die Fadenenden wurden zur Lokalisationsmarkierung der Einstichstelle für die Bestimmung der INF in der späteren histologischen Untersuchung locker geknotet, ohne jegliche Ligation oder Komprimierung der Arterie zu verursachen. Die Rippenadaption erfolgte mittels eines Seidefadens (4/0 Perma-Hand) und der Hautverschluss mittels 5/0 Prolene. Nach abschließender Octenidindesinfektion der Naht wurden die Mäuse extubiert und in einem Haltungskäfig unter einer Wärmelampe bis zur Wiedererlangung des Bewusstseins beobachtet.

Für zwei bis drei Tage erfolgte eine Analgesie mittels Buprenorphin, in der Hellphase zwischen sieben und 19 Uhr s.c. (0,1 mg/kg) und in der Nachtphase über das Trinkwasser p.o. (0,009 mg/ml).

Den Versuchen folgte eine Reperfusionsphase von 24 Stunden oder fünf Tagen mit anschließenden Analysen.

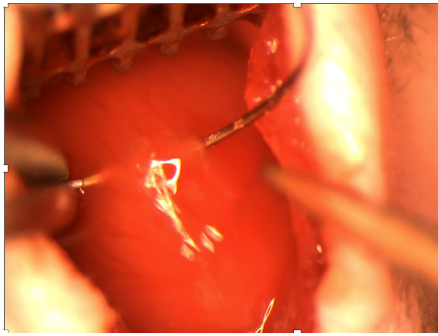
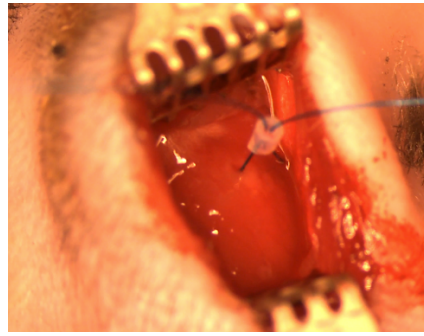
A**B**

Abbildung 6: Exemplarische Darstellung des I/R-Modells

Beide Abbildungen zeigen den eröffneten Thorax einer Maus nach Freipräparation des Herzens. In (A) wurde der RIVA umstochen. In (B) ist bereits ein Tourniquet aus dem 7/0 Prolenefaden und einem dünnen Kunststoffschlauch gebildet worden, der nun zur Ischämieinduktion zugezogen werden kann.

I/R = Ischämie/Reperfusion, RIVA = Ramus interventricularis anterior

2.6.4 Echokardiographie zur Bestimmung der kardialen Funktion

Um die kardiale Funktion beurteilen zu können, wurden vor I/R, 24 Stunden und ggf. 21 Tage nach I/R echokardiale Untersuchungen durchgeführt.

Die Mäuse wurden zunächst in einer transparenten Inhalationskammer bei 3 % Isofluran, 40 % O₂ und 57 % Raumluft narkotisiert. Nach Überprüfung des fehlenden Zwischenzehenreflexes wurden die Tiere in Rückenlage auf einen Operationstisch mit Wärmefunktion gelegt und unter einer Nasenmaske bei 2 % Isofluran, 40 % O₂ und 58 % Raumluft beatmet. Eine dexpanthenolhaltige Augencreme wurde zur Verhinderung der Austrocknung der Augen appliziert. Die Extremitäten wurden mit Klebeband fixiert. Zur späteren Kontaktherstellung des Schallkopfes zur Körperoberfläche wurden der Thorax und Teile des Abdomens durch Enthaarungscreme nach Herstellerangaben enthaart. Durch eine Rektalsonde konnte die Körpertemperatur überprüft werden. Zur Ankopplung des Schallkopfes wurde ein vorgewärmtes Ultraschallgel verwendet. Mittels eines hochauflösenden Ultraschallgerätes und einem 18-38 MHz Schallkopf MS400 wurden Aufnahmen der parasternalen langen Achse (PSLA), der parasternalen kurzen Achse (SAX) und des linken Ventrikels (LV) erstellt. Nach Narkoseausleitung erfolgte die Überwachung der Mäuse in einem Haltungskäfig unter Wärmelampe.

Zur Datenanalyse mittels der Software VevoLab 3.2.6 (Visual Sonics, Fujifilm) wurden die Parameter Schlagvolumen (SV), Ejektionsfraktion (EF), endsystolisches- und enddiastolisches Volumen (ESV, EDV), Herzminutenvolumen (CO) und Herzfrequenz (HF) Anhand der folgenden Formeln ermittelt: $SV (\mu l) = EDV (\mu l) - ESV (\mu l)$; $EF (\%) = (SV (\mu l) / EDV (\mu l)) * 100$; $CO (ml/min) = HR (1/min) * SV (\mu l) * 0,001$.

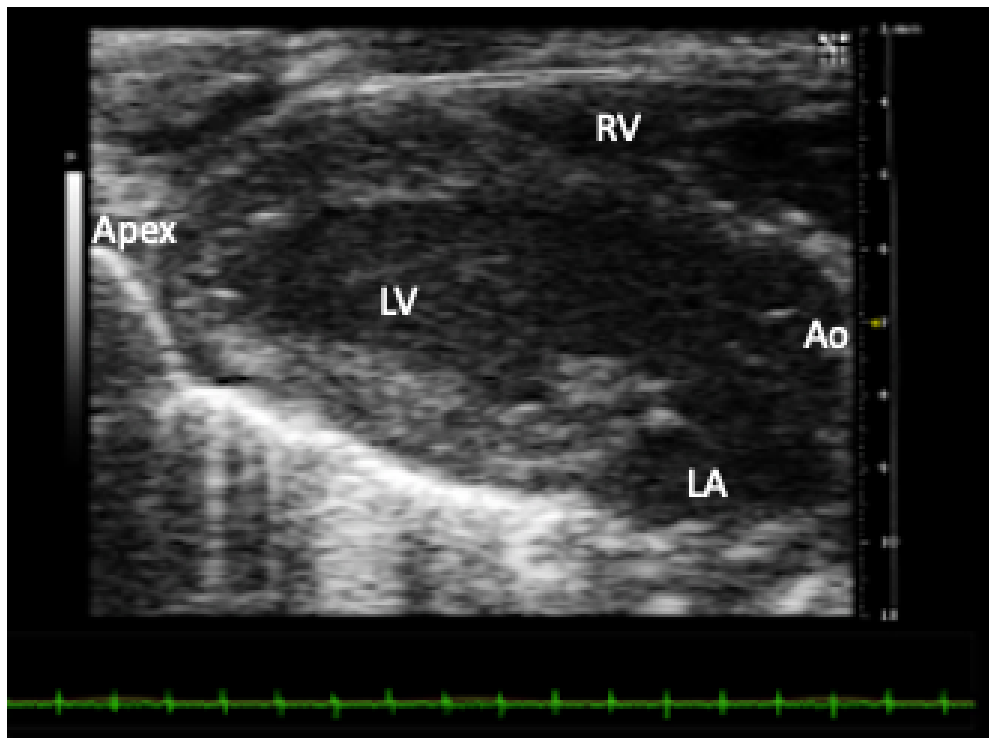


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung einer echokardiographischen Aufnahme der PSLA

Dargestellt ist die PSLA zwischen Apex und Aorta (Ao), bei dem der linke Ventrikel (LV), der rechte Ventrikel (RV) und der linke Vorhof (LA) zur Ansicht kommen.

PSLA = parasternalen langen Achse

2.6.5 Histologische Myokarduntersuchungen

Die histologischen Untersuchungen ermöglichen die Darstellung von myokardialen Gewebestrukturen. Dabei werden spezielle Färbungen angewendet, um gezielt Zellen und Zellorganellen zu visualisieren. Anhand dessen kann anschließend eine Quantifikation erfolgen.

2.6.5.1 Infarktgrößenbestimmung durch Evans-Blau und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

Um die INF bestimmen zu können, wurden die Evans-Blau und TTC-Färbemethode an den Mausherzen 24 Stunden nach I/R angewendet.

Die Evans-Blau-Färbung dient der Unterscheidung zwischen vitalem und avitalem Gewebe. Die AAR wird dabei nicht gefärbt.

Für eine Unterscheidung innerhalb der AAR von gesundem Gewebe und den bereits betroffenen avitalen Zellen dient die TTC-Färbung [23]. Dabei wird das farblose TTC von mitochondrialen Dehydrogenasen vitaler Zellen zu 1,3,5-Triphenylformazan reduziert, welches rot erscheint [127].

Die Präparation der Mäuse erfolgte bis zur Blutabnahme, wie zuvor beschrieben (s. 2.6.2). Die BE erfolgt final bis zur Tötung. Das Herz wurde zügig entnommen und noch schlagend in eine eisgekühlte NaCl-Lösung überführt. Gewebereste außerhalb des Herzmuskels und ein ca. 5 mm langer Anteil der Aorta ascendens wurden entfernt. Durch die Aorta wurde mittels Kanüle NaCl durch das Herz gespült, damit es möglichst blutleer weiter genutzt werden konnte. Der RIVA wurde anschließend an der Stelle des verbliebenen Fadens der I/R (s. 2.5.3.) mit einem geflochtenen Seidenfaden (Seraflex 7-0) verschlossen. Der übrige Faden wurde entfernt. Eine 0,1 % Evans Blau Lösung (gelöst in NaCl) wurde durch die Kanüle in das Herz injiziert bis zur makroskopischen Myokardblaufärbung. Überflüssige Blaulösung wurde mit NaCl ausgespült. Die Herzen wurden in handelsübliche Frischhaltefolie eingewickelt und bei -20 °C für drei Stunden eingefroren. Danach wurde das Herz vom Apex ausgehend in sechs Schnitte bei einer Schnittbreite von ca. 1 mm geschnitten und gewogen. Die Schnitte wurden anschließend in Eppendorf-*Tubes* überführt. Eine 1 % TTC-Lösung (in NaCl gelöst) wurde hinzugegeben und die Herzschnitte wurden bei 37 °C für fünf Minuten inkubiert. Bilder wurden mittels eines Mikroskops (Leica DM6B) erstellt und anschließend durch die Software Diskus View in den Parametern INF/AAR-ratio und AAR/ LV-ratio analysiert.

2.6.5.2 Inflammation- und Apoptosebestimmung durch Ly6G und Caspase-3

24 Stunden oder fünf Tage nach I/R-Versuchen wurden histologische Färbungen durchgeführt. Zur Bestimmung der inflammatorischen Aktivität des myokardialen Infarktareals diente die immunhistochemische Färbung von neutrophilen Granulozyten mittels Ly6G. Durch eine Caspase-3 Färbung konnten Apoptoseaktivitäten des Myokards dargestellt und analysiert werden.

Die Präparation der Mäuse erfolgte bis zur Blutabnahme, wie zuvor beschrieben (s. Abschnitt 2.6.2). Die Blutabnahme erfolgt final bis zur Tötung. Die Herzen wurden mit eisgekühltem PBS gespült, anschließend entnommen und für 24 Stunden in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Es erfolgte eine Entwässerung des Herzens mittels Ethanol-Reihe im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie (Universitätsklinikum Düsseldorf). Danach wurden die Herzen in Paraffin eingebettet und in 5 µm dicke Schnitte geschnitten (Leica Biocut 2035). Je Herz erfolgten zehn Schnitte pro Ebene für insgesamt zehn verschiedene Ebenen. Zwischen jeder Ebene bestand ein Sprung von 150 µm. In einem Wasserbad wurden die Schnitte auf Objektträger überführt und getrocknet. Im Anschluss erfolgte eine fünfminütige Deparaffinierung in Roticlear®, gefolgt von zwei Waschschritten mit 100 % Ethanol für drei Minuten, mit 96 % Ethanol und 70 % Ethanol für jeweils eine Minute und eine Rehydrierung

in destilliertem Wasser. Eine Antigendemaskierung wurde mit Citratpuffer (pH von 6,0) und zweimal zehn-minütiger Erhitzung in der Mikrowelle bei 600 W durchgeführt. Die Schnitte wurden für fünf Minuten in eine Blockungslösung bei RT überführt, daraufhin dreimal mit PBS gewaschen und mittels 2,5 %-igem Ziegenserum für 20 Minuten geblockt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C mit primärer Antikörperlösung (Anti-Ly6G-Antikörper 1:100 oder Anti-Caspase-3 Antikörper 1:400 in PBS und 3 %-igem Ziegenserum). Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte eine 30-minütige lichtgeschützte Inkubation mit einem sekundären Antikörper bei RT. Für Ly6G wurden mit einem Peroxidase Polymer Goat Anti-Rat IgG Antikörper und für Caspase-3 mit einem Peroxidase Polymer Goat Anti-Rabbit IgG Antikörper inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen mit PBS wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung nach Gill II angefertigt, die Schnitte mit PBS gewaschen und entwässert, abschließend eingedeckt (*Mounting Medium*). Bilder wurden mittels eines Mikroskops (Leica DM4000M) in 20-facher Vergrößerung von fünf Arealen von jeweils 100 µm x 100 µm erstellt. Zur Bildanalyse wurden die Zellen in den jeweiligen Bildarealen mit Hilfe der Software ImageJ gezählt.

2.6.6 Probengewinnung und Verarbeitung des Patient*innen- und Proband*innenkollektivs

Die Blutabnahme des Patient*innenkollektivs erfolgte im Rahmen der klinisch notwendigen diagnostischen Blutabnahme nach Einwilligung. Das Blut wurde innerhalb einer Stunde nach Entnahme weiterverarbeitet.

Die Blutabnahme der Proband*innen wurde nach Einwilligung mittels aseptischer Punktion einer peripheren Vene durch eine Punktionskanüle durchgeführt. Das Blut wurde direkt in 2,7 ml Citratröhrchen Vacutainer® gewonnen und mittels Na₃-Citrat im Verhältnis 1:10 antikoaguliert. Die Proben wurden im Anschluss bei 270 g für zehn Minuten zentrifugiert, um für die im Weiteren aufgeführten Folgeuntersuchungen PRP zu gewinnen.

2.6.7 Lichttransmissionsaggregometrie

Die LTA ist eine Methode zur Bestimmung der Thrombozytenreaktivität und ein Standard der Plättchenfunktionsmessung [128]. Dabei wird durch eine photometrische Messung zunächst die maximale optische Dichte der Thrombozytenprobe bestimmt. Durch Hinzugabe eines Stimulus wird anschließend die Thrombozytenaggregation induziert. Die entstandenen Aggregate verändern die Zelldichtigkeit und lassen damit eine höhere Lichtdurchlässigkeit der Probe zu. Durch eine graphische Darstellung der Messung kann die Menge an aggregierten Thrombozyten in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufes gezeigt werden und das Maximum der

Aggregation (*maximum of aggregation* MoA) in Prozent bestimmt werden. Das verwendete Aggregometer lässt eine Messung von vier Versuchsansätzen gleichzeitig zu.

Von Proband*innen wurde gewonnenes PRP (s. 2.6.7) abgenommen und ein Anteil bei 1800 g für fünf Minuten zentrifugiert. Das nun generierte PAP wurde zur Kalibrierung des Aggregometers verwendet. Das PAP dient dabei der Eichung als 100 % Wert, das PRP als Nullwert. Nach zweiminütiger Equilibration wurden die Versuchsansätze bestimmt. Hierbei wurden je 200 µl PRP und 50 µl Thrombozytenmedium (TM) verwendet, zunächst bei 37 °C in Küvetten inkubiert und im Anschluss für zwei Minuten bei 37 °C mit einem im System integrierten magnetisierten Rührer bei 1000 Umdrehungen/min umgerührt. Die Plättchenaggregation wurde mittels 5 µl ADP in einer Konzentration von 5 µM nach vier weiteren Minuten induziert. Aufzeichnungen wurden für insgesamt zehn Minuten angelegt. Bei den Versuchsansätzen des Proband*innenkollektivs wurde das PRP zusätzlich vor Beginn der Aggregation mit Cangrelor (200 µM) oder Tirofiban (50 nM) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

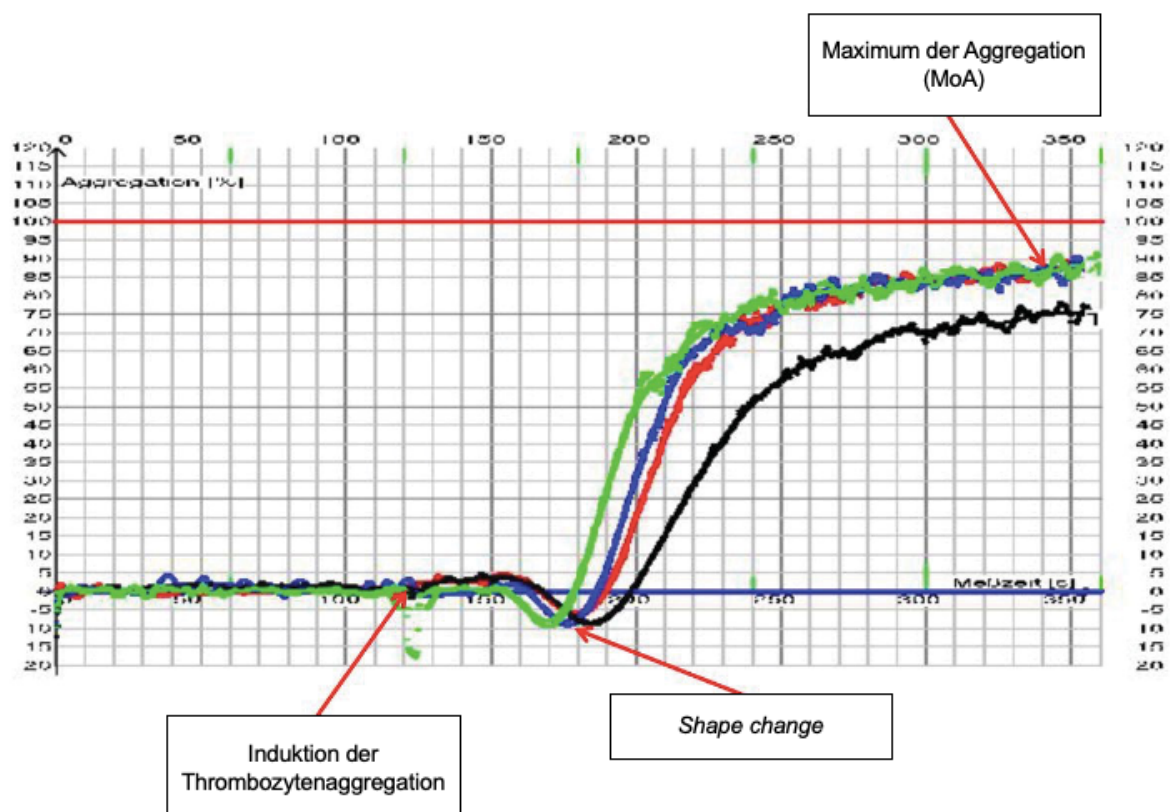


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Aggregationskurve, aufgenommen mit dem ATRACT 4004 Aggregometer

Abgebildet sind der Zeitpunkt der Induktion der Thrombozytenaggregation durch Hinzufügen eines Stimulus, der Umschlagspunkt (*Shape change*) sowie das MoA (Modifiziert nach der Dissertation von P. Mourikis [129]).

MoA = *maximum of aggregation*

2.6.8 Durchflusszytometrie

Die Plättchenreaktivität wurde anhand der Expression von CD62P auf Thrombozyten beurteilt. CD62P dient dabei als Marker der Thrombozytenaggregation und der α -Granula Freisetzung. Bei Aktivierung wird es an die Thrombozytenzelloberfläche freigegeben, bindet an den zugehörigen Rezeptor und sorgt für eine Verstärkung der Thrombozytenaggregation sowie Thrombozyten-Fibrin Bindung [49]. Hierfür wurde ein durchflusszytometrisches Verfahren mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung angewendet.

In einem Zytometer werden Blutzellsuspensionen durch ein Unterdruckverfahren in einen Flusskanal aufgenommen und hydrodynamisch fokussiert. Der Durchmesser des Probenstroms wird reduziert, sodass nun einzelne Zellen durch einen Laserstrahl treten können. Anschließend können Lichtstreuungen einzelner Zellen sowohl vorwärts (*forward scatter* FSC) als auch seitwärts (*sidewards scatter* SSC) ermittelt werden. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen Zellgröße und Granularität möglich gemacht. Unter zusätzlicher Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen können spezifische Zellpopulationen der Probe identifiziert und quantifiziert werden.

Von Proband*innen gewonnenem PRP (s. 2.6.7) wurden jeweils 100 μ l abpipettiert und zu 25 μ l Thrombozytenmedium (vorgewärmt bei 37 °C) hinzugegeben, im Anschluss für sechs weitere Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 5 μ M ADP stimuliert und wiederholt für sechs Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Färbung der Probe wurde eine nach Herstellerangaben verdünnte Antikörperlösung (CD41/61 – APC-Cy7, CD42b – Pe-Cy7, CD62P – BV421) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde die Probe 1:100 in PBS verdünnt und im Zytometer BD FACSVerse® gemessen. Die Daten wurden mit der Software Flow-Jo® analysiert.

2.6.9 Messung der Adenosintriphosphat – Freisetzung

Diese Methode dient der Messung von freigesetztem ATP aus den delta-Granula bzw. δ -Granula aktivierter Thrombozyten [130]. Bei dem Testverfahren wird durch Biolumineszenz emittiertes Licht gemessen, welches proportional zur ATP-Konzentration ist. Chemisch wird hierbei ATP in Verbindung mit Luciferin durch Luciferase zu Adenyl Luciferin und O_2 umgesetzt. Dieses zerfällt im Anschluss zu Adenosinmonophosphat (AMP), Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Oxylluciferin.

Zur Durchführung des Verfahrens wurden von Proband*innen gewonnenes PRP (s. 2.6.7) abpipettiert und Prostaglandin E1 (PGE1, gelöst in PBS) 50 nM sowie ACD 12,5 % Volumina hinzugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Probe bei 1000 g für zehn Minuten bei RT zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet wurde in CGS Puffer resuspendiert und wiederholt bei 1000 g für zehn Minuten bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in

Tyrodes Puffer auf das ursprüngliche PRP-Ausgangsvolumen gelöst. Davon wurden 100 µl in 96-well-Platten (U Greiner Böden) überführt und mit Cangrelor (200 µM) oder Tirofiban (50 nM) für 3 Minuten inkubiert und mittels ADP für sechs Minuten aktiviert (5 µM). Eine 37 °C erwärmte ATP Assay Lösung wurde hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Platte im Biolumineszenz Messgerät analysiert. Es erfolgten 150 Messintervalle pro Sekunde durch eine Emissionslinse (*Gain* 3600, *Target value* 40 %).

Die Berechnung erfolgte anhand einer mitgemessenen Standardreihe nach Herstelleranweisung.

2.6.10 Kardiale-Magnetresonanztomographie

Um die INF des Patient*innenkollektivs bestimmen zu können, wurde die Kardiale-Magnetresonanztomographie eingesetzt. Als nicht-invasives bildgebendes Verfahren kann auf der Grundlage von Magnetfeldern Gewebe in mehreren Schnitten betrachtet werden.

Die Untersuchung beruht auf der Eigenschaft von Eigendrehimpulsen in den spezifischen Frequenzen der körpereigenen Protonen, den sogenannten Spins. Bei Ausrichtung des Körpers innerhalb des Magnetfeldes, werden die Protonen angeregt und richten sich gleichmäßig parallel und antiparallel zum Magnetfeld aus. Die Rotation erfolgt nun um die Feldlinien des Magnetfeldes in einer Längsachse (Präzessionsbewegung). Die Bewegung ist dabei proportional zur Stärke des Magnetfeldes (Larmor-Frequenz). Durch Einstrahlung eines Hochfrequenzimpulses, entsprechend der Larmor-Frequenz, geht die Längsmagnetisierung in eine Quermagnetisierung über. Dies erzeugt eine Wechselspannung und kann als ein MR-Signal gemessen werden.

Die T1 und T2 Messungen werden während der Relaxation gemessen. Die T1-Messung ist der Zeitpunkt, bei dem 63 % der Protonen nach Ausschaltung des Hochfrequenzimpulses zurück in ihrer Ursprungslage in ihrer Längsrichtung relaxiert sind (Spin-Gitter-Relaxation). Die T2-Messung ist der Zeitpunkt, bei dem 63 % der Protonen nach Ausschaltung des Hochfrequenzimpulses aus ihrer Querausrichtung reduziert sind (Spin-Spin-Relaxation).

Bei der Untersuchung wurde zusätzlich das Kontrastmittel Gadolinium eingesetzt. Gadolinium hat eine starke paramagnetische Eigenschaft, sodass die Protonen in der Umgebung von Gadolinium schneller relaxieren und es zudem zu einer Erhöhung des Kontrastes zwischen verschiedenen Gewebearten kommt. Bei myokardialen Narben und fibrotischen Arealen kommt es zu einer späten Kontrastanreicherung (*Late Gadolinium Enhancement*) nach zehn bis 20 Minuten, weshalb sich dieses Verfahren für die kardiale Vitalitätsdiagnostik etabliert hat.

Das Patient*innenkollektiv wurde sechs Monate nach diagnostiziertem STEMI im Rahmen einer klinischen Nachuntersuchung untersucht. Sie erhielten 0,2 mmol/kg Gadolinium i.v.. Die Analysen der cMRT-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software cmr42 (*Circle Cardiovascular Imaging Inc.*) durch einen erfahrenen Kardiologen des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

2.6.11 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mittels der Software IBM SPSS®-Statistics 25 und GraphPad-Prism® 8 durchgeführt. Die Testung der Normalverteilung erfolgte durch Kolmogorov-Smirnov Test, D'Agostino-Pearson Test, q-q-Plots und Histogramme. Die normalverteilten Daten wurden anhand gepaarter und ungepaarter t-Tests untersucht. Nicht normalverteilte Daten wurden bei unabhängigen Variablen mittels Mann-Whitney-U Test oder bei abhängigen Variablen mittels Wilcoxon-Tests analysiert. Zur Prüfung der Varianzhomogenität wurde der Levene-Test angewendet. Bei Heteroskedastizität der Daten wurde ein Welch-Test durchgeführt. Bei dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die Multivarianzenanalyse *one-way* ANOVA und anschließend der *Tukey's-multiple-comparison-post-hoc*-Test durchgeführt. Im Fall eines signifikanten Levene-Tests, also einer nichtzutreffenden Varianzhomogenität, wurde der Kruskal-Wallis Test angewendet. Zur Fragestellung, ob bei verschiedenen S1P-Konzentrationen eine erhöhte Inzidenz der Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse auftritt, wurde der Log-rank Test angewendet. Korrelationen zwischen S1P-Konzentrationen und INF wurden durch den Person Test bei normalverteilten Daten und durch den Spearman Test bei nicht normalverteilten Daten angeschaut. Das Konfidenzintervall liegt bei 95 %. P-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

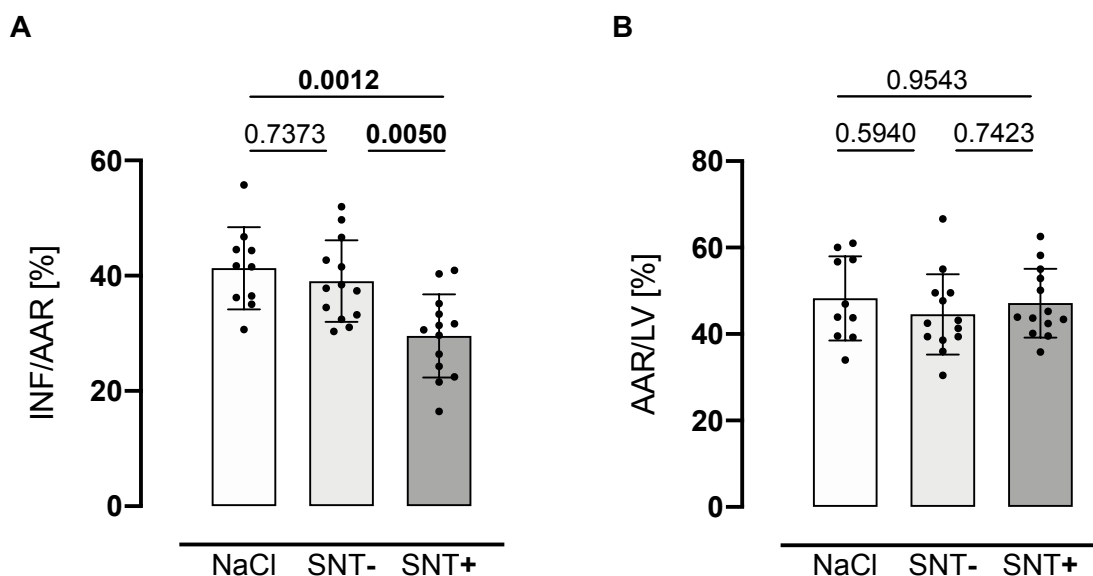
3 Ergebnisse

3.1 Experimentelle Versuchsergebnisse

3.1.1 Der Überstand aktivierter Plättchen reduziert die Infarktgröße und verbessert die Herzfunktion in-vivo

In der histomorphologischen Untersuchung mit Evans Blau- und TTC-Färbungen 24 Stunden nach I/R konnte eine Reduktion der INF zwischen durch ADP aktivierten SNT+ und SNT- um 24 % gemessen werden. Als Bezugsparameter der INF diente die AAR (INF/AAR [%]: NaCl: $41,31 \pm 7,145$ % vs. SNT-: $39,06 \pm 7,076$ vs. SNT+: $29,56 \pm 7,212$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, NaCl vs. SNT- $p=0,7373$, NaCl vs. SNT+ $p=0,0012$, SNT- vs. SNT+ $p=0,005$) (Abb. 9A).

Die AAR in Abhängigkeit zum LV zeigte dagegen keinen Unterschied zwischen den Gruppen (AAR/LV [%]: NaCl: $48,26 \pm 9,746$ vs. SNT-: $44,56 \pm 9,277$ vs. SNT+: $47,16 \pm 7,965$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, NaCl vs. SNT- $p=0,594$, NaCl vs. SNT+ $p=0,9543$, SNT- vs. SNT+ $p=0,7423$) (Abb. 9B).



C

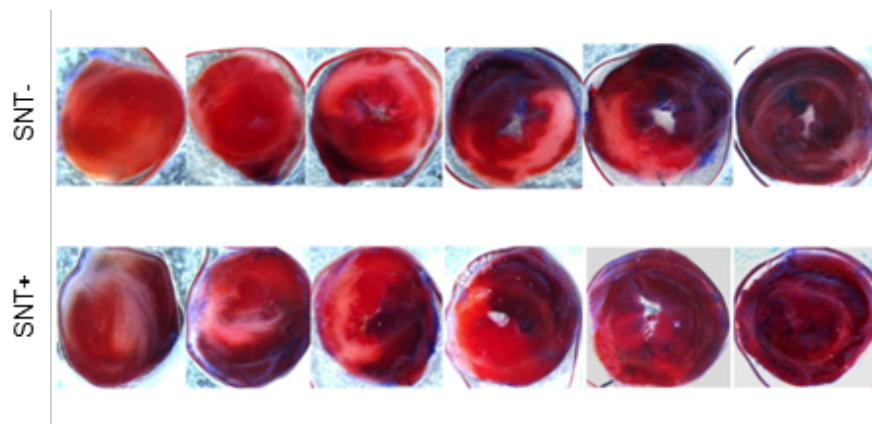


Abbildung 9: Infarktgrößenbestimmung 24 Stunden nach I/R-Versuchen *in vivo* der Gruppen ADP SNT+, SNT- und Kontrollen mit NaCl

In (A) ist die INF in Bezug zu der ARR dargestellt. Dagegen ist in (B) die AAR in Abhängigkeit zum linken Ventrikel zu sehen. In (C) befinden sich beispielhafte Bilder der Evans Blau und TTC-Färbungen. Infarktgebiete mit avitalem Gewebe erscheinen weiß, die AAR ist dagegen rot-weißlich. Blaue Bereiche sind nicht von der Ischämie betroffene Areale. Rote Areale sind von der Ischämie betroffen, jedoch noch vital. (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131])

ARR = area at risk, INF = Infarktgröße, I/R = Ischämie/Reperfusion, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*, TTC = 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

In der Echokardiographie zeigte sich bereits 24 Stunden nach den I/R-Versuchen bei der ADP aktivierter SNT+ Gruppe eine Verbesserung der linksventrikulären EF um 21% im Vergleich zur SNT- Gruppe (EF [%]: NaCl: $31,75 \pm 5,405$ % vs. SNT-: $31,01 \pm 5,212$ % vs. SNT+: $37,64 \pm 4,298$ %, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, NaCl vs. SNT- $p=0,9459$, NaCl vs. SNT+ $p=0,0406$, SNT- vs. SNT+ $p=0,0048$) (Abb. 9C). Das SV verbesserte sich um 20% (SV [ml]: NaCl: $18,22 \pm 2,702$ μ l vs. SNT-: $19,30 \pm 4,071$ μ l vs. SNT+: $23,10 \pm 3,859$ μ l, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, NaCl vs. SNT- $p=0,8139$, NaCl vs. SNT+ $p=0,0247$, SNT- vs. SNT+ $p=0,0383$) (Abb. 10A).

Die HF sowie das CO zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 10B und Abb. 10D).

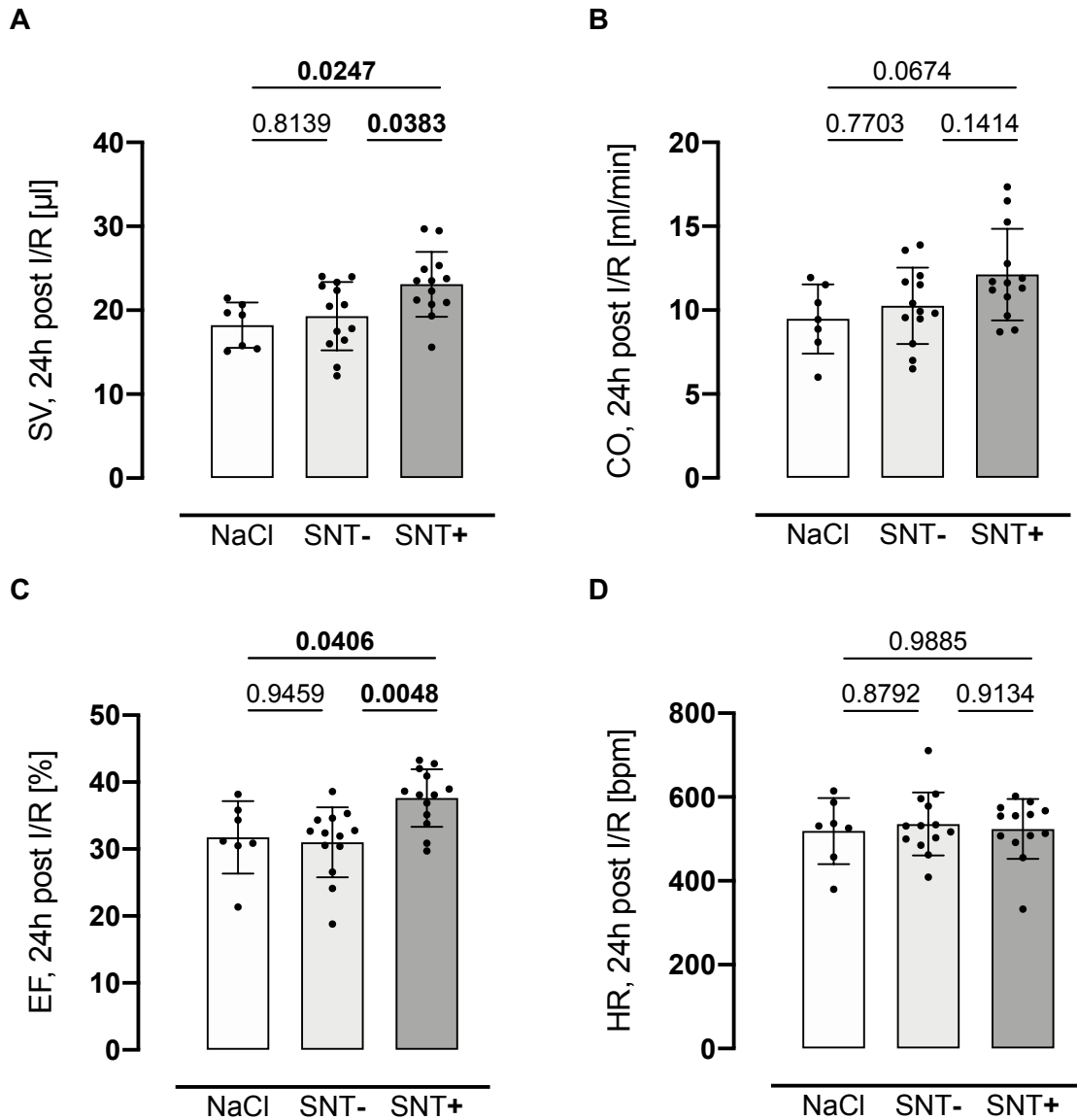


Abbildung 10: Kardiale Funktion der Versuchsgruppen 24 Stunden nach I/R-Versuchen

Dargestellt sind (A) das Schlagvolumen (SV) in [μ l], (B) das Herzminutenvolumen (*cardiac output* CO) in [ml/min], (C) die Ejektionsfraktion (EF) in [%], sowie (D) die Herzfrequenz (HF) pro Minute [*beats per minute* bpm]. (Abb. der EF modifiziert nach Polzin et al. [131]).

NaCl = Isotone Natriumchloridlösung, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

Ebenso konnte bereits 24 Stunden nach den I/R-Versuchen bei ADP aktivierter SNT+ Behandlung eine Reduktion um 55 % von neutrophilen Granulozyten in den immunhistochemischen Untersuchungen über die Ly6G-positiven Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11A-B, Ly6G+ [$100 \mu\text{m}^2$]: SNT-: $10,74 \pm 3,026$ vs. SNT+: $4,825 \pm 1,066$, ungepaarter t-Test, $p=0,0002$). Die Apoptose zeigte eine 41 % geringere Aktivität an Tag fünf

der gleichen Versuchsgruppe über die positiven Caspase-3 Färbungen (Abb. 11C-D, Caspase-3+ [100 µm²]: SNT-: 7,257 ± 1,345 vs. SNT+: 4,257 ± 0,5381, ungepaarter t-Test, p=0,0001).

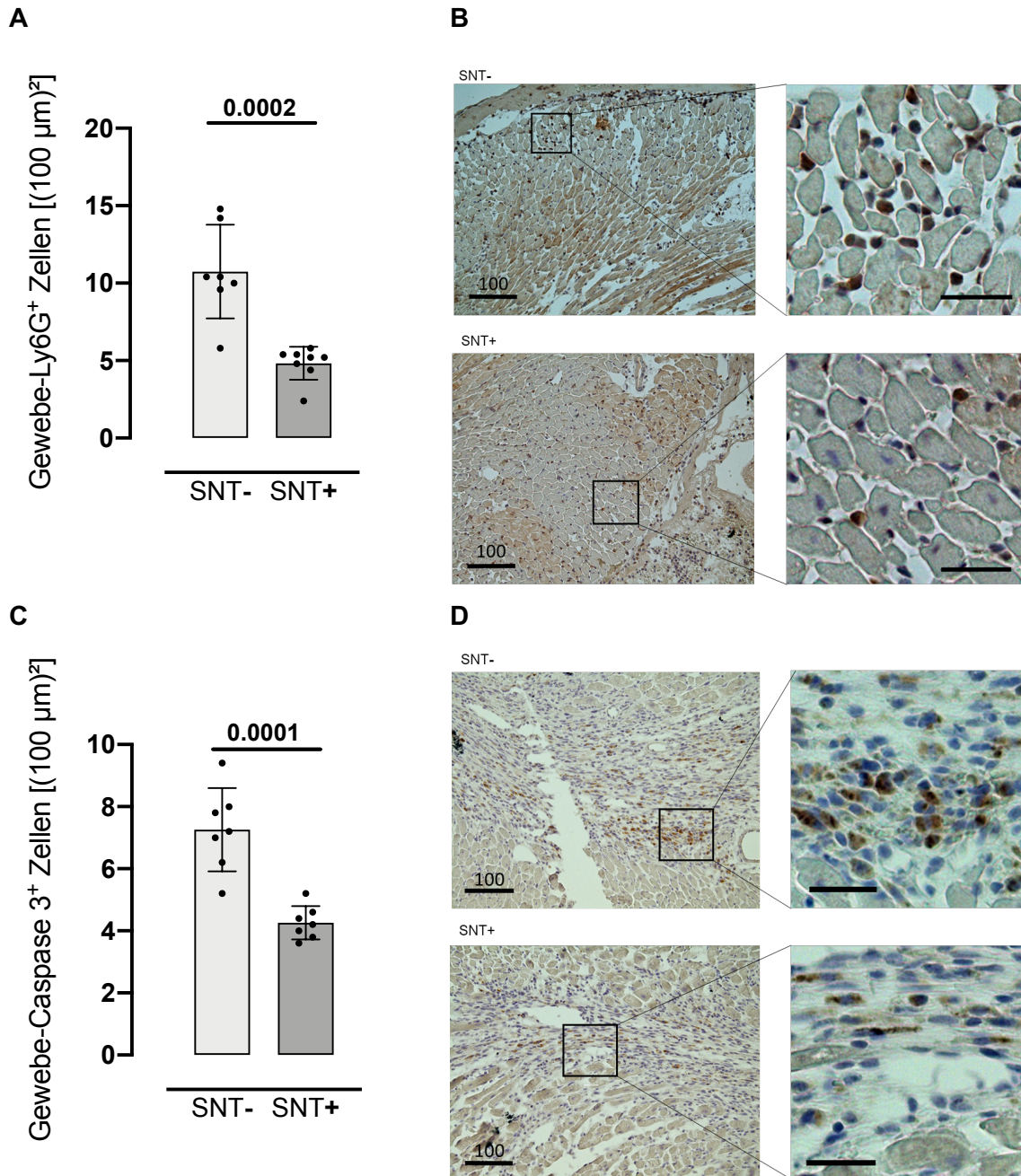


Abbildung 11: Immunhistochemie der Versuchsgruppen nach I/R-Versuchen

Dargestellt sind (A) die Gewebe-Ly6G positiven Untersuchungsergebnisse 24 Stunden nach I/R-Versuchen und (B) die Gewebe-Caspase 3 positiven Untersuchungsergebnisse fünf Tage nach I/R-Versuchen. Beispielhafte Bilder der Färbungen sind jeweils rechts neben den Graphen zu sehen in der Skalierung links von 100 µm und rechts von 30 µm (B: Ly6G+, D: Caspase-3+). (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131])

SNT+ = activated platelet supernant, SNT- = non-activated platelet supernant

21 Tage nach den I/R-Versuchen konnte in der Echokardiographie der ADP aktivierten SNT+ behandelten Gruppe eine Verbesserung der kardialen Funktion nachgewiesen werden. Diese resultierte in 18% höheren SV (SV [μ L]: SNT-: $24,33 \pm 2,021$ vs. SNT+: $28,7 \pm 4,002$, ungepaarter t-Test, $p=0,0342$) (Abb. 12A) und ebenfalls 18 % höheren CO (CO [ml/min]: SNT- : $12,33 \pm 1,749$ vs. SNT+: $14,53 \pm 1,785$, ungepaarter t-Test, $p=0,0464$) (Abb. 12B). Die EF sowie die HR zeigten zwar einen numerischen, aber nicht statistisch signifikanten Unterschied (EF [%]: SNT-: $39,52 \pm 7,633$ vs. SNT+: $46,85 \pm 4,536$, ungepaarter t-test, $p=0,0551$; HR [beats per minute (bpm)]: SNT-: $508,0 \pm 77,29$ vs. SNT+: $508,9 \pm 45,13$, ungepaarter t-Test, $p=0,9811$) (Abb. 12C-D).

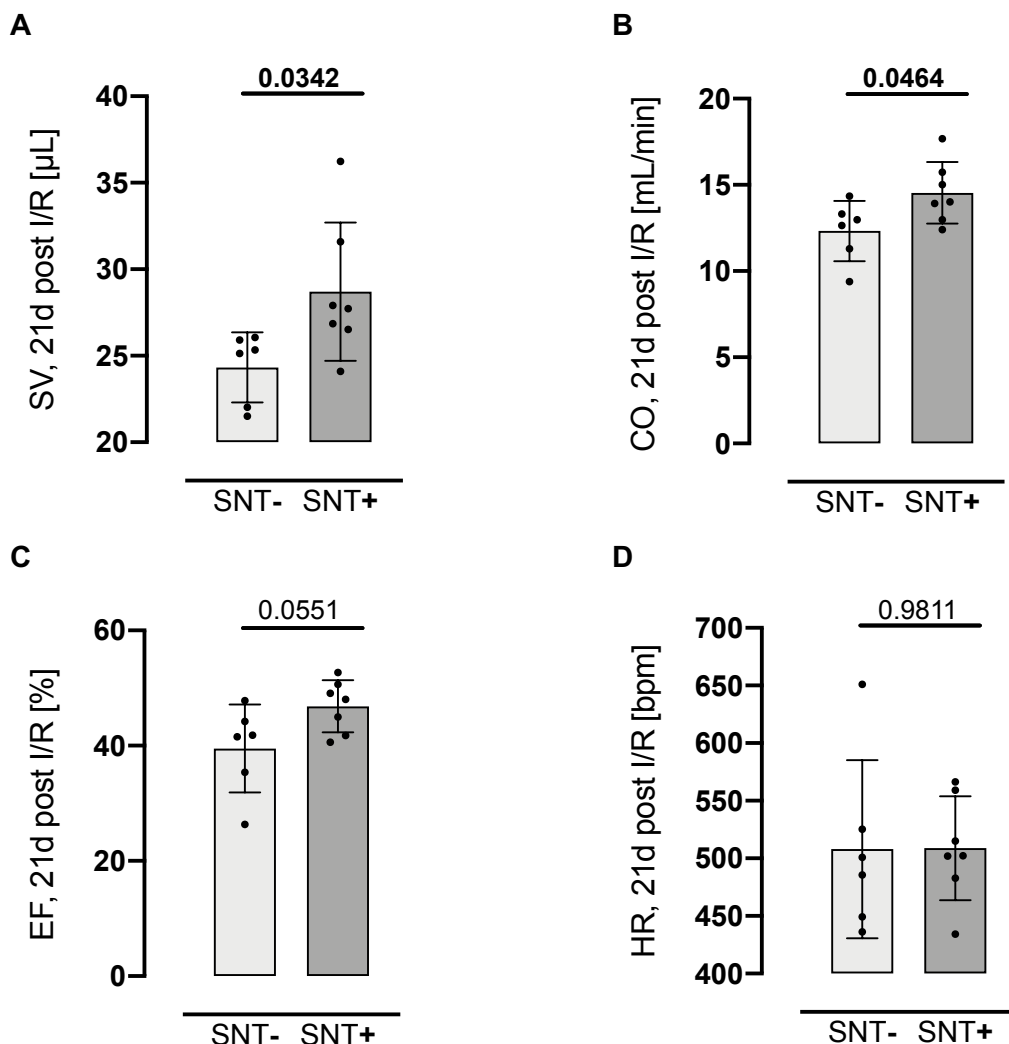


Abbildung 12: Kardiale Funktion der Versuchsgruppen 21 Tage nach I/R-Versuchen

Dargestellt sind (A) das Schlagvolumen (SV) in [μ L], (B) das Herzminutenvolumen (*cardiac output* CO) in [ml/min], (C) die Ejektionsfraktion (EF) in [%], sowie (D) die Herzfrequenz (HF) pro Minute [*beats per minute*]

bpm] (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

In der nachstehenden Tabelle 1 befindet sich eine Aufstellung der funktionellen echokardiographischen Daten im zeitlichen Ablauf.

Zeitpunkt	Gruppe	Herzfrequenz [bpm]	Schlagvolumen [μl]	Herzminutenvolumen [ml/min]	Ejektionsfraktion [%]
Vor I/R	NaCl	478.3 ± 66.1	32.0 ± 3.9	15.3 ± 2.4	49.8 ± 4.0
	SNT -	499.9 ± 45.5	31.6 ± 1.9	15.9 ± 2.3	47.9 ± 6.9
	SNT +	456.5 ± 33.4 (0.1)	36.7 ± 2.0 (0.06)	16.7 ± 2.0 (0.55)	45.8 ± 3.8 (0.54)
24h post I/R	NaCl	518.9 ± 79.0	18.2 ± 2.7	9.5 ± 2.1	31.8 ± 5.4
	SNT -	535.8 ± 75.3	19.3 ± 4.1	10.3 ± 2.3	31.0 ± 5.2
	SNT +	523.9 ± 71.2 (0.68)	23.1 ± 3.9 (0.02)	12.1 ± 2.7 (0.07)	37.6 ± 4.3 (0.002)
21d post I/R	NaCl	501.1 ± 24.6	23.1 ± 2.7	11.6 ± 1.4	38.5 ± 5.2
	SNT -	508.0 ± 77.3	24.3 ± 2.0	12.3 ± 1.8	39.5 ± 7.6
	SNT +	508.9 ± 45.1 (0.98)	28.7 ± 4.0 (0.03)	14.5 ± 1.8 (0.05)	46.9 ± 4.5 (0.06)

Tabelle 1: Kardiale Funktionen der Versuchsgruppen nach I/R-Versuchen im zeitlichen Verlauf

Gezeigt wird die deskriptive Statistik des Mittelwerts ± der Standardabweichung. In der Zeile des SNT+ ist ebenfalls der p-Wert des ungepaarten t-Tests zwischen SNT- und SNT+ aufgeführt (Tabelle modifiziert nach Polzin et al. [131]).

I/R = Ischämie/Reperfusion, NaCl = Isotone Natriumchloridlösung, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

In einem weiteren Versuchsansatz wurden durch Kollagen SNT+ im gleichen Modell fünf Minuten vor Induktion eines Herzinfarktes im I/R-Modell appliziert.

Die Thrombozytenaktivierung durch ADP zeigt den Weg, der sich auf die Thrombozytenaktivierung nach Sekretion von ADP aus den *dense*-Granula bezieht. Sie führen zu einer Potenzierung der Thrombozytenaktivierung durch die Bindung an die Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ [50]. Bei Kollagen wird die Thrombozytenaktivierung durch die Bindung an den Thrombozytenrezeptor GPVI und an das Integrin α2β1 initiiert [41, 42]. Die Aktivierung trägt zur Freisetzung löslicher Mediatoren aus α- und *dense*-Granula bei [43, 48].

Auch hier konnte nach 24 Stunden in der histomorphologischen Untersuchung durch Evans-Blau- und TTC-Färbung eine Reduktion der INF um 22 % gemessen werden, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit SNT- (INF/AAR [%]: SNT-: 42,41 ± 8,680 vs. SNT+: 33,24 ± 6,389, ungepaarter t-Test, p=0,0440) (Abb. 13A). Die AAR zeigte ebenfalls keinen statistisch

signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (AAR/LV [%]: SNT-: $55,12 \pm 7,386$ vs. SNT+: $57,59 \pm 8,518$, ungepaarter t-Test, $p=0,5740$) (Abb. 13B).

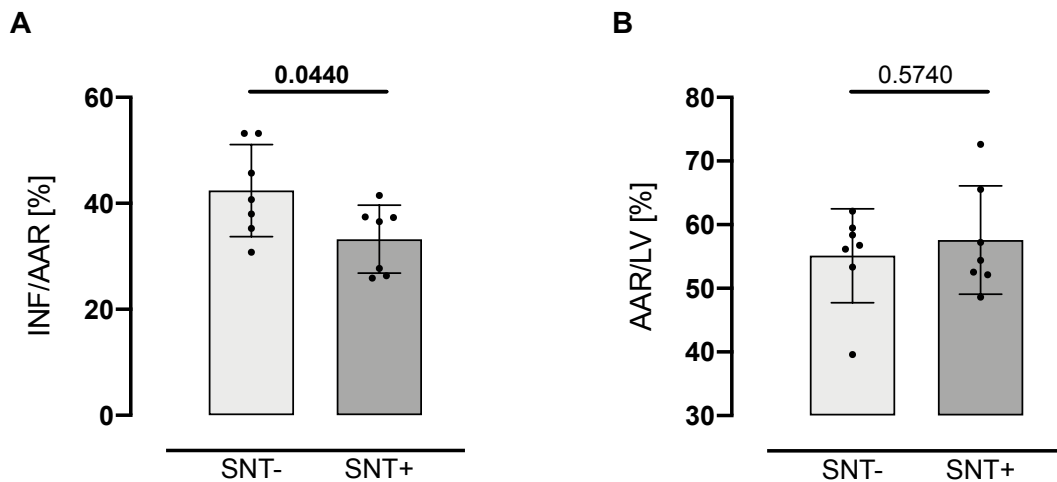


Abbildung 13: Infarktgrößenbestimmung 24 Stunden nach I/R-Versuchen *in vivo* der Gruppen Kollagen SNT+, SNT- und Kontrollen mit NaCl

In (A) ist die Infarktgröße (INF) in Bezug zu der *area at risk* (ARR) dargestellt. In (B) die AAR in Abhängigkeit zum linken Ventrikel (LV) zu sehen (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

NaCl = Isotone Natriumchloridlösung, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

Auch in der Echokardiographie zeigte sich 24 Stunden nach den I/R-Versuchen bei der durch Kollagen aktivierten SNT+ Gruppe eine Verbesserung der linksventrikulären EF um 17 % (EF [%]: SNT-: $41,27 \pm 2,985$ vs. SNT+: $48,44 \pm 1,872$, ungepaarter t-Test, $p=0,0002$) (Abb. 14A). Der S1P-Gehalt bei durch Kollagen aktivierten humanen Plättchen zeigte eine signifikante Steigerung im Vergleich zu SNT- (S1P [μ M]: SNT-: $0,9618 \pm 0,2039$ vs. SNT+: $1,164 \pm 0,2375$, ungepaarter t-Test, $p=0,0450$) (Abb. 14B).

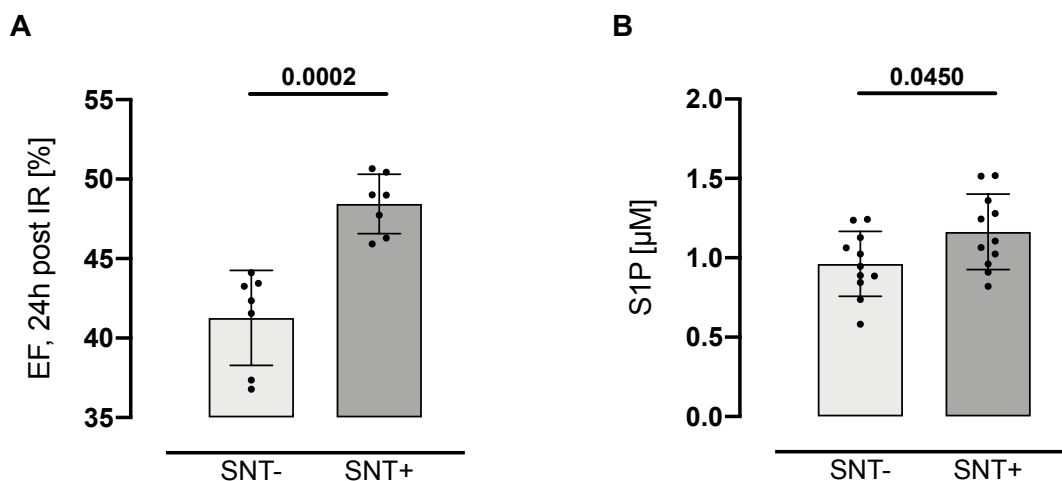


Abbildung 14: Kardiiale Funktion und S1P-Konzentration der Versuchsgruppen Kollagen induzierter SNT+ und SNT- 24 Stunden nach I/R-Versuchen

Dargestellt ist (A) die EF in [%]. Daneben befindet sich in (B) die S1P-Konzentration in [μ M]. (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

EF = Ejektionsfraktion, I/R = Ischämie/Reperfusion, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

3.1.2 Die Kardioprotektion mittels aktivierter Plättchen ist abhängig von Sphingosin-Kinase-1

Um nun die Hypothese zu testen, ob die hier zuvor gezeigte Kardioprotektion von SNT+ durch S1P bedingt sein kann, wurde zunächst der S1P-Gehalt in SNT+ und SNT- Proben gemessen. Dabei zeigte SNT+ einen um 25 % höheren S1P-Gehalt als SNT- (S1P WT [μ M]: SNT-: $1,464 \pm 0,3405$ vs. SNT+: $1,887 \pm 0,3763$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, $p=0,0091$) (Abb. 14A).

Des Weiteren wurde von SphK1^{-/-} Thrombozytenüberstand gewonnen und dessen S1P-Gehalt bestimmt. Hierbei konnte eine um 70 % geringere Menge S1P im Vergleich zu WT-Mäusen (C57BL6/J) festgestellt werden, die auch nach Aktivierung durch ADP nicht anstieg (S1P SphK1^{-/-}: SNT-: $0,5904 \pm 0,172$ vs. SNT+: $0,5971 \pm 0,1695$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, WT SNT- vs. SphK1^{-/-} SNT- $p<0,0001$, WT SNT+ vs. SphK1^{-/-} SNT+ $p<0,0001$) (Abb. 15).

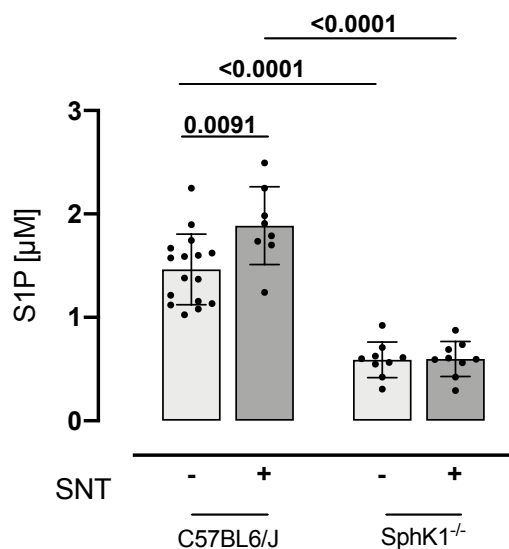


Abbildung 15: Vergleich der S1P-Konzentrationen zwischen C57BL6/J Mäusen und Sphingosin-Kinase-1 defizienten Mäusen

Dargestellt sind die Plasma-S1P-Konzentration in [μ M] beider Versuchstiergruppen der C57BL6/J Mäuse sowie der Sphingosin-Kinase-1 defizienten Mäuse (SphK^{-/-}) (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

Ebenso wurden histomorphologische Untersuchungen mit Evans-Blau- und TTC-Färbungen 24 Stunden nach I/R an SphK1^{-/-}-defizienten Mäusen durchgeführt und mit denen von WT-Mäusen verglichen.

Hier konnte gezeigt werden, dass SNT+ von SphK^{-/-} Versuchstieren keine Reduktion der INF im Vergleich zu SNT- der gleichen Gruppe hat (INF/ARR [%] SphK1^{-/-}: SNT-: 34,98 ± 5,6 vs. SNT+: 36,19 ± 7,665, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, $p < 0,9896$) (Abb. 16A). Gleiches konnte bei der AAR festgestellt werden (AAR/LV [%] SphK1^{-/-}: SNT-: 49,87 ± 8,231 vs. SNT+: 47,49 ± 8,899, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, $p < 0,9995$) (Abb. 16B).

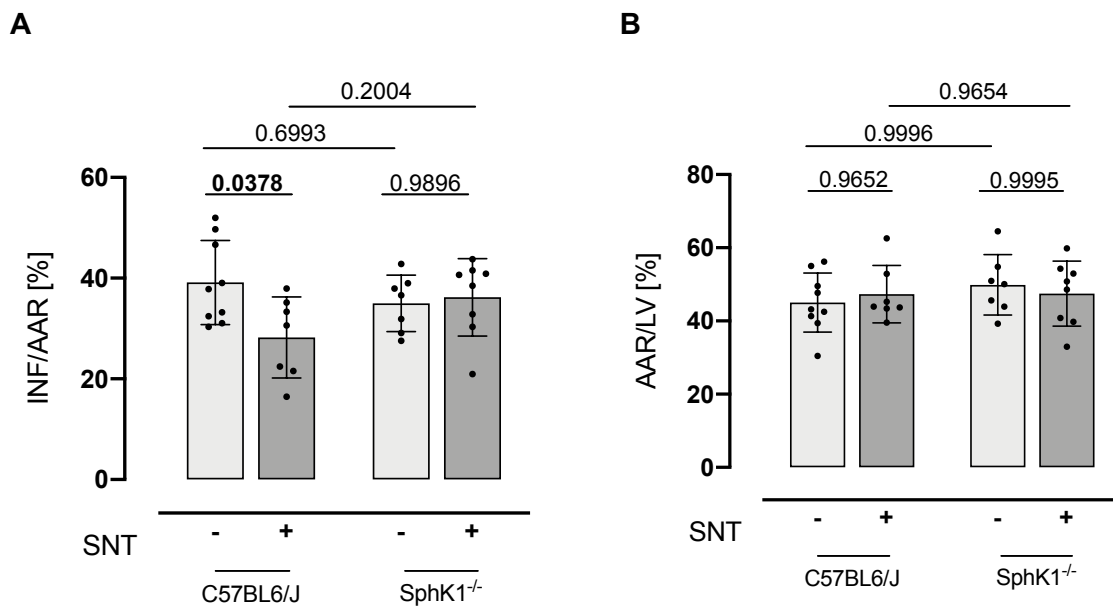


Abbildung 16: Vergleich zwischen C57BL6/J Mäusen und Sphingosin-Kinase-1 defizienten Mäusen
Dargestellt sind die beiden Versuchstiergruppen der C57BL6/J Mäuse sowie der Sphingosin-Kinase-1 defizienten Mäuse (SphK^{-/-}). (A) zeigt die Infarktgröße (INF) in Abhängigkeit zum *area at risk* (AAR) in [%]. In (B) ist die *area at risk* in Abhängigkeit zum linken Ventrikel (LV) in [%] dargestellt (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).
SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

3.1.3 Die Sphingosin-1-Phosphat Freisetzung bleibt bei Gabe von Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten erhalten und wird bei Gabe von P2Y₁₂-Antagonisten gehemmt

Zur Standardtherapie des AMI zählt die Thrombozytenaggregationshemmung. Der Einfluss auf die Inhibierung der S1P-Sekretion ist jedoch nicht in Gänze klar. In Vorstudien wurde bereits gezeigt, dass ASS zu einer Reduktion der S1P-Sekretion führt [132]. Da ASS über die Inhibierung der COX ihre antikoagulatorische Wirkung ausübt, stellt sich nun die Frage, ob auch andere Medikationen der plättchenspezifischen Aggregationshemmung zu einer Inhibierung der S1P-Ausschüttung führen.

Im Folgenden wurde der Effekt von Cangrelor als Inhibitor des ADP-abhängigen Rezeptors P2Y₁₂ getestet sowie Tirofiban als Rezeptorantagonist des GPIIb/IIIa. Hier konnte bei *in vivo* Mausversuchen gezeigt werden, dass Cangrelor zu einer signifikanten S1P-Inhibierung führte, während Tirofiban diese Wirkung nicht zeigte (S1P [μ M]: *Vehicle* SNT-: $1,103 \pm 0,2368$ vs. *Vehicle* SNT+: $1,537 \pm 0,3449$ vs. Cangrelor SNT+: $0,9563 \pm 0,2214$ vs. Tirofiban SNT+: $1,332 \pm 0,2172$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, *Vehicle* SNT- vs. *Vehicle* SNT+ $p=0,0066$, *Vehicle* SNT+ vs. Cangrelor SNT+ $p=0,0002$, Cangrelor SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p=0,0219$) (Abb. 17).

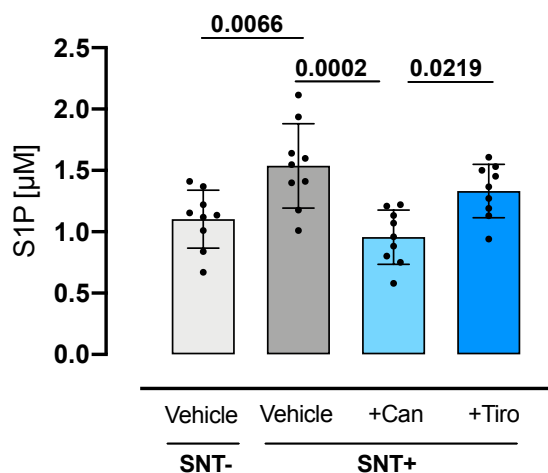


Abbildung 17: S1P-Gehalt des Plättchenüberstandes verschiedener Versuchsgruppen

Dargestellt ist der S1P-Gehalt in [μ M] des Plättchenüberstandes im aktivierten und nicht aktivierten Zustand der *Vehicle* Gruppe sowie im aktivierten Zustand der Tirofiban und Cangrelor Gruppe. (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

Des Weiteren konnte im I/R-Modell 24 Stunden nach Induktion eines MI in der histomorphologischen Untersuchung gezeigt werden, dass bei der Versuchstiergruppe unter Tirofibanmedikation die kardioprotektive Wirkung in Bezug auf die INF erhalten bleibt. Dieser Effekt ließ sich unter Cangrelor nicht nachweisen und zeigte keinen signifikanten Unterschied (INF/AAR [%]: *Vehicle* SNT-: $42,26 \pm 6,834$ vs. *Vehicle* SNT+: $28,68 \pm 3,893$ vs. Cangrelor SNT+: $38,62 \pm 5,799$ vs. Tirofiban SNT+: $29,25 \pm 6,521$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, *Vehicle* SNT- vs. *Vehicle* SNT+ $p=0,0004$, *Vehicle* SNT+ vs. Cangrelor SNT+ $p=0,0108$, Cangrelor SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p=0,0173$) (Abb. 18A).

Die AAR in Abhängigkeit zum LV zeigte keinen Unterschied (AAR/LV [%]: *Vehicle* SNT-: $46,94 \pm 10,81$ vs. *Vehicle* SNT+: $46,97 \pm 7,550$ vs. Cangrelor SNT+: $42,88 \pm 6,212$ vs. Tirofiban SNT+: $45,23 \pm 7,724$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, *Vehicle* SNT- vs. *Vehicle* SNT+ $p=>0,9999$, *Vehicle* SNT+ vs. Cangrelor SNT+ $p=0,7550$, Cangrelor SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p=0,9405$) (Abb. 18B).

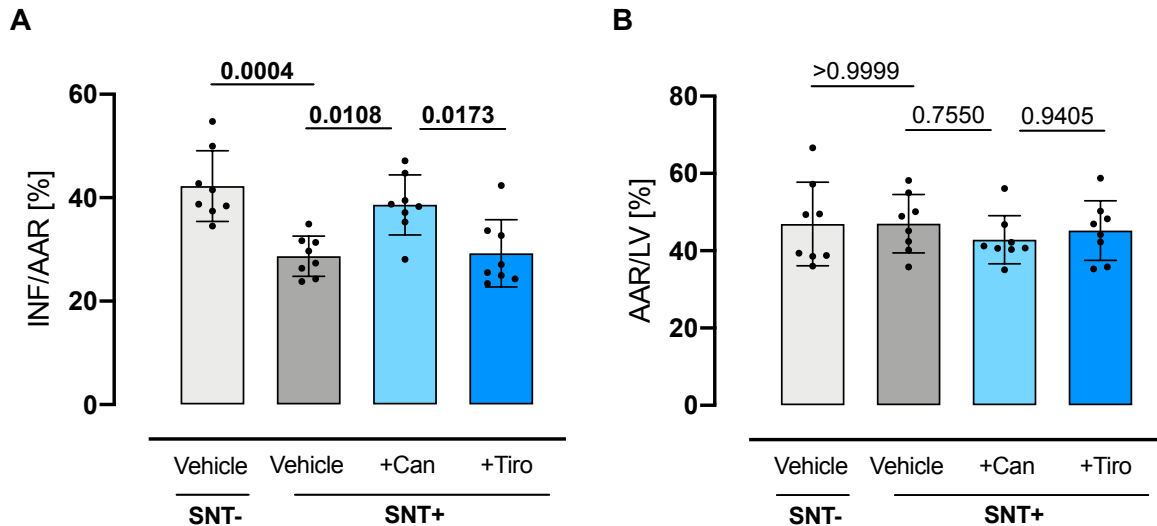


Abbildung 18: Infarktgrößen ADP induzierter SNT+ sowie SNT+ mit 570 nM Tirofiban und 1 nM Cangrelor 24 Stunden nach I/R-Versuchen *in vivo*

In (A) ist die Ischämiegröße in Abhängigkeit zur *area at risk* (ARR) dargestellt. In (B) ist die AAR in Abhängigkeit zum linken Ventrikel (LV) zu sehen. (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131])

ADP = Adenosindiphosphat, INF = Infarktgröße, I/R = Ischämie/Reperfusion, SNT+ = *activated platelet supernant*, SNT- = *non-activated platelet supernant*

Um zu zeigen, dass die Plättchenaggregationshemmung vergleichbar zwischen beiden Medikationen ist, wurden bei *in vitro*-Versuchen von 6 Proband*innen nach Inkubation des SNT+ mit Cangrelor 1 nM oder Tirofiban 570 nM die LTA durchgeführt. Dabei zeigte sich eine vergleichbare Aggregationszeit (MoA [%]: *Vehicle* SNT+: $86,65 \pm 8,295$ vs. Cangrelor SNT+: $12,01 \pm 8,285$ vs. Tirofiban SNT+: $0,8067 \pm 0,2738$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, *Vehicle* SNT+ vs. Cangrelor SNT+ $p < 0,0001$, *Vehicle* SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p < 0,0001$, Cangrelor SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p = 0,0299$) (Abb. 19).

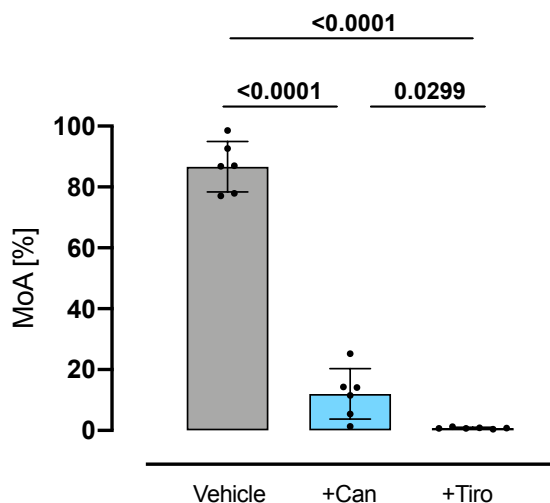


Abbildung 19: Darstellung der Plättchenaggregation mittels LTA von SNT+ Kontrollgruppe (*Vehicle*) zu zusätzlich mit 1 nM Cangrelor und 570 nM Tirofiban behandelten Gruppen *in vitro*

Dargestellt ist die Plättchenaggregation über das *maximum of aggregation* (MoA) in [%]. (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

Im gleichen Versuchsansatz und Proband*innenkollektiv wurde nach SNT+ Inkubation mit Tirofiban oder Cangrelor eine durchflusszytometrische Untersuchung zur Messung der CD62P-Ausschüttung durchgeführt.

Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion durch Cangrelor, die im Ansatz mit Tirofiban nicht erreicht wurde (P-Selektin [MFI]: *Vehicle* SNT+: $1179 \pm 450,8$ vs. Cangrelor SNT+: $455,0 \pm 133,4$ vs. Tirofiban SNT+: $1355 \pm 418,7$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, *Vehicle* SNT+ vs. Cangrelor SNT+ $p=0,0094$, *Vehicle* SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p=0,6860$, Cangrelor SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p=0,0018$) (Abb. 20).

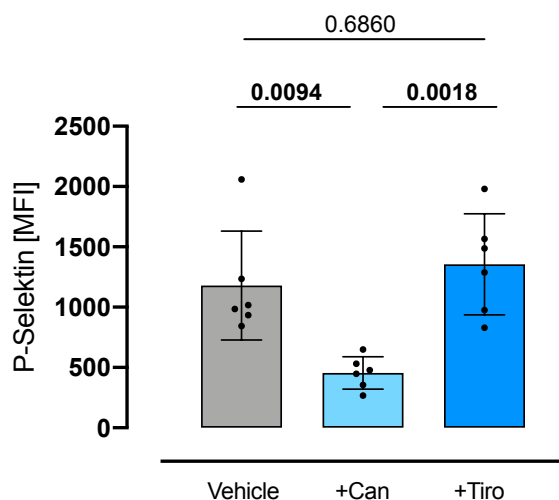


Abbildung 20: Messergebnisse der P-Selektin Freisetzung mittels FACS der SNT+ Kontrollgruppe (*Vehicle*) und zusätzlich mit 1 nM Cangrelor und 570 nM Tirofiban behandelten Gruppen *in vitro*
Dargestellt ist die mittlere Fluorochromintensität der P-Selektin Freisetzung (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

Um die Freisetzung von Substanzen aus den *dense*-Granula der Thrombozyten analysieren zu können, wurde vom Proband*innenkollektiv eine Messung der ATP-Freisetzung durchgeführt. Hier konnte eine signifikante Reduktion unter Cangrelor gezeigt werden. Ebenfalls war dieser Effekt unter Tirofiban nicht ersichtlich (ATP-Freisetzung [nmol]: *Vehicle* SNT+: $91,22 \pm 21,81$ vs. Cangrelor SNT+: $43,57 \pm 14,04$ vs. Tirofiban SNT+: $78,68 \pm 10,97$, *one-way ANOVA Tukey's-post-hoc*, *Vehicle* SNT+ vs. Cangrelor SNT+ $p=0,0004$, *Vehicle* SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p=0,3983$, Cangrelor SNT+ vs. Tirofiban SNT+ $p=0,0053$) (Abb. 21).

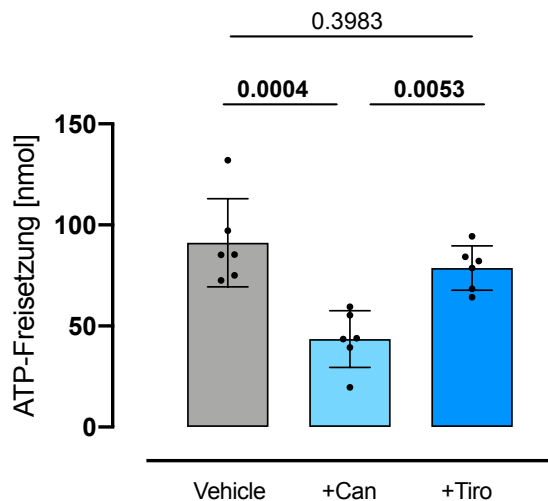


Abbildung 21: Darstellung der ATP-Freisetzung der SNT+ Kontrollgruppe (*Vehicle*) und zusätzlich mit 1 nM Cangrelor und 570 nM Tirofiban behandelten Gruppen *in vitro*

Dargestellt ist die ATP-Freisetzung in [nmol] (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

ATP = Adenosintriphosphat

3.2 Translationale Versuchsergebnisse

3.2.1 Patient*innencharakteristika

Um die Relevanz von verschiedenen S1P-Konzentrationen in Patient*innen bei vorliegendem MI festzustellen, wurde ein Kollektiv von 127 Patient*innen mit diagnostiziertem STEMI eingeschlossen. Bei diesem Kollektiv wurden sowohl bei Aufnahme in der Klinik als auch bei einer Kontrolle nach 12 Monaten die S1P-Plasmakonzentrationen bestimmt. Um eine Stratifizierung vorzunehmen, wurden die Patient*innen anhand ihrer S1P-Plasmakonzentration in Terzile unterteilt (1. Terzile: Niedrige S1P-Konzentration: < 1,556 pmol/ml, 2. Terzile: Mittlere S1P-Konzentration: 1,556-2,072 pmol/ml und 3. Terzile: Hohe S1P-Konzentration: 2,072 pmol/ml). Die Charakteristika der Patient*innen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Sie zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb ihrer Parameter.

Charakteristika bei Aufnahme	<1,556 pmol/ml S1P N=42	1,556-2,072 pmol/ml S1P N=43	2,072 pmol/ml S1P N=42	P-Wert
Geschlecht - weiblich/männlich (%/%)	9/33 (21.4/78.6)	12/31 (27.9/72.1)	13/29 (31.0/69.0)	0.608
Alter - Jahre (mean ± SD)	63.76 ± 13.7	62.28 ± 13.6	62.76 ± 13,5	0.878
Gewicht - kg (mean ± SD)	84.36 ± 15.1	86.42 ± 14.4	80.03 ± 16.9	0.179

BMI - (mean $\pm$ SD)	27.48 $\pm$ 4.5	28.71 $\pm$ 4.1	25.93 $\pm$ 4.3	0.021
Adipositas - no. (%)	7 (16.7%)	11 (27.5%)	6 (15.0%)	0.310
Rauchen - no. (%)	12 (29.3%)	20 (46.5%)	14 (34.1%)	0.238
Positive Familienanamnese- no. (%)	5 (12.2%)	6 (14.0%)	3 (7.3%)	0.610
Diabetes - no. (%)	9 (22.0%)	9 (20.9%)	11 (26.2%)	0.831
Z.n. MI - no. (%)	3 (7.3%)	2 (4.7%)	4 (9.8%)	0.664
Z.n. TIA - no. (%)	0 (0.0%)	2 (4.7%)	0 (0.0%)	0.144
Z.n. Stroke - no. (%)	3 (7.5%)	2 (4.7%)	4 (9.8%)	0.664
Z.n. PCI - no. (%)	4 (9.8%)	4 (9.3%)	9 (21.4%)	0.182
Z.n. CABG - no. (%)	1 (2.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.356
COPD - no. (%)	2 (4.9%)	3 (7.0%)	1 (2.5%)	0.637
Pulmonale Hypertonie- no. (%)	8 (19.0%)	5 (11.65)	5 (11.9%)	0.639
Arterielle Hypertonie - no. (%)	27 (65.9%)	32 (74.4%)	29 (69.0%)	0.687
PAVK - no. (%)	1 (2.4%)	1 (2.3%)	1 (2.4%)	0.999
Vorhofflimmern - no. (%)	10 (24.4%)	4 (9.3%)	7 (17.1%)	0.181
HLP - no. (%)	11 (26.8%)	15 (35.7%)	11 (26.8%)	0.592
LVEF - no. (%)				0.383
Normalbefund (♀ $\geq$ 54%, ♂ $\geq$ 52%)	16 (38.1%)	17 (39.5%)	10 (25%)	
Geringgradig reduziert (♀ 41-53%, ♂ 41-51%)	15 (35.7%)	17 (39.5%)	14 (35%)	
Mittelgradig reduziert (30-40%)	5 (12.0%)	3 (7.0%)	12 (30%)	
Hochgradig reduziert (< 30%)	6 (14.3%)	6 (14.0%)	4 (10%)	

Tabelle 2: Aufführung und Vergleich der Patient*innencharakteristika

BMI = Body Mass Index, CABG = Koronararterienbypass, COPD = Chronische obstruktive Lungenerkrankung, HLP = Hyperlipoproteinämie, LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, MI = Myokardinfarkt, PAVK = Periphere arterielle Verschlusskrankheit, PCI = Perkutane koronare Intervention, TIA = Transiente ischämische Attacke. (Tabelle modifiziert nach Polzin et al. [131]).

Die Medikationen des Patient*innenkollektivs sind anhand der gleichen Einteilung in Tabelle 3 aufgeführt. Sie zeigen ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb ihrer Parameter.

Komedikation – no. (%)	<1,556 pmol/mL S1P N=42	1,556-2,072 pmol/mL S1P N=43	2,072 pmol/mL S1P N=42	P-Wert
ASS	41 (97.6 %)	41 (95.3 %)	39 (92.9 %)	0.652
Prä-MI ASS	7 (16.7 %)	7 (16.3 %)	5 (11.9 %)	0.965
Orale Antikoagulation	8 (19.0 %)	5 (11.6 %)	5 (11.9 %)	0.822
L-Thyroxin	4 (9.5 %)	4 (9.3 %)	7 (16.7 %)	0.756
ACE-Inhibitoren	31 (73.8 %)	34 (79.1 %)	25 (59.5 %)	0.312
AT- II -Rezeptor- Antagonisten	8 (19.0 %)	3 (7.0 %)	11 (26.2 %)	0.140
Beta-Blocker	40 (95.2 %)	37 (86.0 %)	36 (85.7 %)	0.622
Calcium-Antagonisten	9 (21.4 %)	7 (16.3 %)	9 (21.4 %)	0.932
Diuretika	15 (35.7 %)	12 (27.9 %)	21 (50.0 %)	0.273
Aldosteron Antagonisten	4 (9.5 %)	4 (9.3 %)	6 (14.3 %)	0.890
PPI	35 (83.3 %)	35 (81.4 %)	29 (69.0 %)	0.509
Statine	36 (85.7 %)	40 (93.0 %)	39 (92.9 %)	0.267
Orale Antidiabetika	3 (7.1 %)	8 (18.6 %)	7 (16.7 %)	0.621
Insuline	2 (4.8 %)	3 (7.0 %)	5 (11.9 %)	0.730
Metamizol	4 (9.5 %)	1 (2.3 %)	2 (4.8 %)	0.644
Ibuprofen	1 (2.4 %)	2 (4.7 %)	2 (4.8 %)	0.818
Paracetamol	0 (0.0 %)	1 (2.3 %)	0 (0.0 %)	0.665
Opiate	0 (0.0 %)	2 (4.7 %)	2 (4.8 %)	0.642
Antiarrhythmika	1 (2.4 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	0.661
Inhalative Beta-2- Agonisten	6 (14.3 %)	6 (14.0 %)	3 (7.1 %)	0.797
Inhalative Glukokortikoide	0 (0.0 %)	1 (2.3 %)	0 (0.0 %)	0.665

Tabelle 3: Komedikationen der Patient*innen

AT = Angiotensin, ACE = Angiotensin-converting-enzyme, ASS = Acetylsalicylsäure, PPI = Protonenpumpen-Inhibitoren. (Tabelle modifiziert nach Polzin et al. [131]).

38 der 127 Patient*innen erhielten 6 Monate nach STEMI ein cMRT. Die Ausschlusskriterien der restlichen Patient*innen sind im Folgenden aufgeführt:

- Kontrastmittelallergie (8)
- Schrittmacherimplantat (12)
- Klaustrophobie (17)
- Chronische Niereninsuffizienz (10)
- Mechanische Herzklappe (8)
- Andere Implantate (8)
- Nicht Wahrnehmung der Kontrolluntersuchung (13)
- Tod (13)

3.2.2 Die Höhe der Sphingosin-1-Phosphat-Konzentration im Plasma von Patient*innen mit ST-Hebungsinfarkt korreliert mit der Mortalität

Bei dem Patient*innenkollektiv wurde initial bei Aufnahme die S1P-Konzentration gemessen. Die S1P-Plasmakonzentrationen wurden in Terzile unterteilt und im Anschluss anhand der Patient*innen-Überlebensraten nach 12 Monaten analysiert und dargestellt. Dabei zeigte sich eine signifikant geringere Mortalität bei Patient*innen mit höheren S1P-Konzentrationen im Plasma (Abb. 22, Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse: Logrank-Test, Chi square = 4,182, df = 1, p = 0,0409).

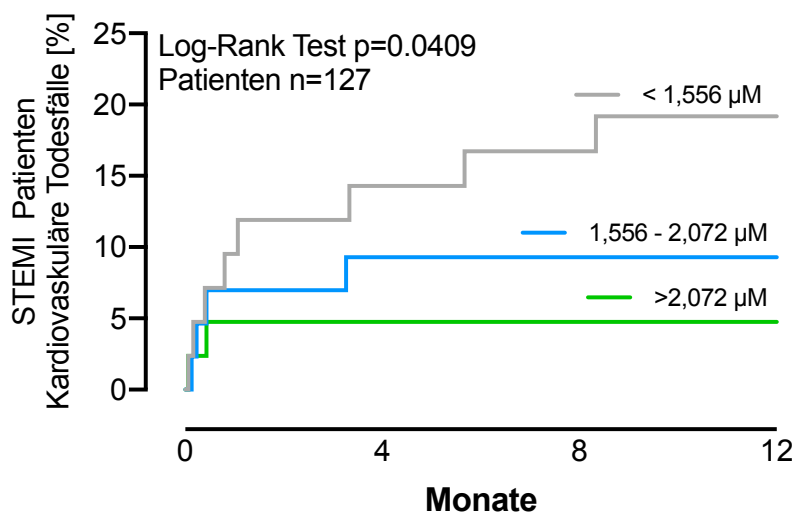


Abbildung 22: Kaplan-Meier Kurven zum Gesamtüberleben des STEMI Patient*innenkollektivs nach 12 Monaten

Das Patient*innenkollektiv ist gruppiert in Terzile nach ihrer initialen S1P-Konzentration. Als statistischer Test wurde der Log-Rank Test durchgeführt (Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131]).

Um die INF im zeitlichen Verlauf der Patient*innen bestimmen zu können, wurde ein cMRT nach sechs Monaten durchgeführt. Die INF wurde anschließend mit der S1P-Plasmakonzentration der initialen Klinikaufnahme verglichen. Es zeigte sich eine negative Korrelation der initialen S1P-Plasmakonzentration mit der INF (Pearson Korrelation, $r=0,3335$, $p=0,0408$) (Abb. 23).

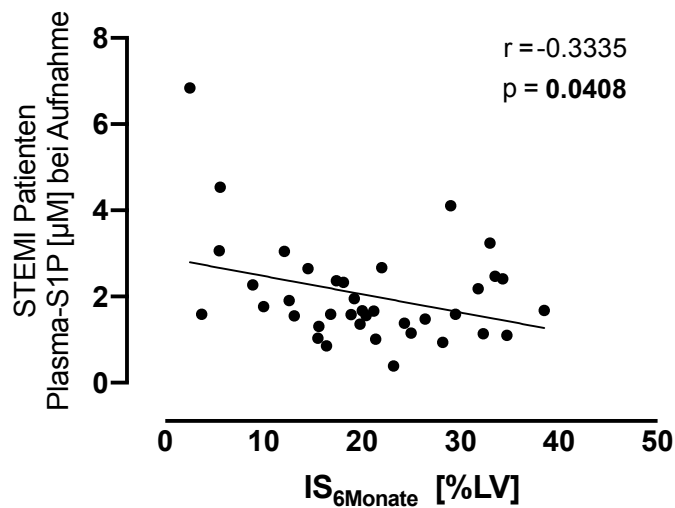


Abbildung 23: Pearson Korrelation der Infarktgröße (INF) in STEMI Patient*innen nach sechs Monaten mit der initialen Plasma-S1P-Konzentration bei Aufnahme
(Abb. modifiziert nach Polzin et al. [131])

4 Diskussion

4.1 Hauptergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten im AMI durch die Freisetzung von S1P zur Kardioprotektion beitragen. Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

1. Aktivierter Thrombozyten setzen S1P während eines AMI frei.
2. Das aus Thrombozyten freigesetzte S1P während eines AMI ist kardioprotektiv.
3. Die Sekretion von S1P aus Thrombozyten bleibt unter dem Einfluss von GPIIb/IIIa-Antagonisten bestehen, wird jedoch unter einer Medikation mittels P2Y₁₂-Antagonisten inhibiert.
4. Höhere Plasma-S1P-Konzentrationen sind negativ assoziiert mit kardiovaskulärer Mortalität und der INF in Patient*innen mit STEMI.

4.2 Der Einfluss des thrombozytären Sphingosin-1-Phosphat im akuten Myokardinfarkt

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle im Rahmen von ischämischen Events. Daher ist die Einführung der Thrombozytenaggregationshemmung einer der großen Meilensteine der kardiovaskulären Medizin und bei der Therapie des AMI mittlerweile ein Hauptpfeiler [61, 62]. Jedoch hat die Einführung auch diskrete, aber dennoch wichtige Funktionen von Thrombozyten vernachlässigt. Thrombozyten sekretieren unter Aktivierung verschiedene bioaktive Moleküle, die unterschiedliche Effekte an benachbarten Zellen und Gewebe haben [76-79, 133-135]. Hierzu gehört auch die Sekretion des Sphingolipids S1P unter Aktivierung [116].

In der Literatur gibt es konträre Daten zur Wirkungsweise von S1P auf Thrombozyten. Einerseits konnte unter Thrombozytenaktivierung durch Thrombin eine COX-abhängige S1P-Sekretion gezeigt werden [132, 136]. Bei weiteren Studien stellte sich heraus, dass S1P in Kombination mit Thrombin zur Ausschüttung des Gewebefaktors aus Thrombozyten führt [137, 138]. Diese Daten geben eher einen Hinweis darauf, dass S1P als Marker der Thrombozytenaktivierung gelten könne sowie zu einer Aggravierung des AMI beitragen könnte.

Andere Studien zeigen dagegen einen positiven Effekt. Durch eine exogene Administration von S1P wurden protektive Eigenschaften auf Endorgane im I/R-Modell festgestellt [118-120]. Die von Theilmeier et al. veröffentlichte Studie zeigte bereits 2006 eine protektive Funktion von S1P und HDL im I/R-Modell auf das Herz [118]. Ergänzend dazu zeigte die Studie von

Bandhuvula et al. im I/R-Modell ein vergrößertes Infarktareal bei erhöhten S1P-Lyase-Werten [120]. Die Funktion von S1P-Lyasen ist, genauso wie von S1P-Phosphatasen, die Degradierung von S1P [100, 101]. Auch auf das Hirngewebe konnte ein protektiver Effekt von S1P im Schlaganfall durch die Studie von Nitzsche et al. gezeigt werden [119]. Jedoch wurde in vorangegangenen Studien noch nicht die genaue Ausschüttungsquelle von S1P im MI adressiert und identifiziert.

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Injektion von aktiviertem Thrombozytenüberstand unmittelbar vor I/R-Versuchen zu einer kleineren INF sowie zu einer gebesserten Herzfunktion führt.

Dabei wurde zunächst SNT+ aus Spendermäusen gewonnen und dieser fünf Minuten vor der transienten Ligatur der RIVA injiziert. 24 Stunden nach I/R-Versuchen erfolgte eine Infarktgrößenbestimmung mittels histologischer Untersuchung, die ein signifikant kleineres Infarktareal zeigte. Die Messung der Herzfunktion erfolgte durch die Echokardiographie, in der bereits 24 Stunden nach den I/R-Versuchen eine Verbesserung der linksventrikulären EF um 21 % sowie ein um 20 % gebessertes SV gezeigt werden konnte. Auch 21 Tage nach I/R-Versuchen konnte echokardiographisch eine gebesserte Herzfunktion gezeigt werden. Diese zeigte sich in einem 18 % höheren SV und CO.

Um der Hypothese nachzugehen, dass der positive Effekt des SNT+ durch S1P ausgelöst werden könnte, wurde zunächst der S1P-Gehalt der Proben mittels HPLC analysiert. Dabei zeigte sich ein um 25 % höherer S1P-Gehalt des SNT+ im Vergleich zu SNT-.

Im nächsten Schritt wurden die Versuche an Sph1K defizienten Mäusen durchgeführt. Sphingosinkinasen sind an der Bildung von S1P beteiligt. Thrombozyten exprimieren eine hohe Menge an Sphingosinkinasen [132]. Dabei sind zwei verschiedene SphK bekannt (SphK-1 sowie SphK-2): SphK-1 ist generell in vielen Gewebearten vertreten, dabei in größeren Mengen in Herz-, Lungen-, Gehirn- und Milzgewebe [100, 101, 139, 140]. Bei einer Aktivierung von SphK kommt es zu einem schnellen Anstieg der S1P-Konzentration [141].

In Publikationen mit Versuchen an Sph1K-defizienten Mäusen wurden die Funktionen von SphK-1 sowie deren Rolle für S1P untersucht. Eine Studie von Allende et al. zeigte, dass SphK^{-/-} überlebensfähig sind und, im Gegensatz zu S1P-Rezeptor defizienten Mäusen, eine geringe Restaktivität an SphK, vermutlich durch SphK-2, erhalten bleibt. Des Weiteren zeigte diese Studie, dass sich das S1P-Level innerhalb des SphK-1-defizienten Gewebes sich nicht signifikant reduziert zeigte. Dagegen konnte im Serum und Plasma ein um über 50% reduzierter S1P-Gehalt gezeigt werden [142]. Eine weitere Studie von Jin et al. zeigte an SphK^{-/-} ähnliche Ergebnisse. Als Unterschied konnte auch eine reduzierte Menge an S1P im Herzgewebe nach I/R-Versuchen gemessen werden [143].

In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich die S1P-Konzentration im Plasma an SphK^{-/-} um 70 % niedriger als bei den WT-Mäusen, ähnlich zu den bisher publizierten Studien. Auch nach

der Thrombozytenaktivierung zeigte sich kein signifikanter Anstieg der S1P-Konzentration. In weiteren Versuchen der Infarktgrößenbestimmung konnte gezeigt werden, dass SNT+ von SphK^{-/-} keine Reduktion der INF im Vergleich zu SNT- der gleichen Gruppe hat. Die Ergebnisse lassen darauf deuten, dass der protektive Effekt von SNT+ durch S1P bedingt ist, da bei Sph1K defizienten Mäusen deutlich weniger S1P gebildet werden kann, welches durch den 70 % niedrigen Wert des S1P und durch den fehlenden protektiven Effekt des SNT+ zu deuten ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass S1P aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird und diese im Rahmen eines AMI im Mausmodell protektive Eigenschaften zeigt. Die genauen molekularen Mechanismen von S1P wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht in Gänze untersucht. Fraglich ist, über welchen Rezeptor S1P diese Wirkung beeinflusst. Im kardiovaskulären System befinden sich die S1P-Rezeptoren 1-3 auf Kardiomyozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen sowie Endothelzellen [103]. S1P-Rezeptor 3 ist auf Zellen der Hämatopoese sowie lymphatischen Zellen exprimiert. S1P-Rezeptor 5 befindet sich im Nervensystem [104]. Im Nagetier befindet sich der S1P-1-Rezeptor 4–6-mal häufiger am Herzen als die anderen beiden Rezeptoren [144]. Im Menschen befindet sich in kleinerer Menge der S1P-2-Rezeptor am Herzen, die anderen beiden Rezeptoren dagegen in ungefähr gleicher Menge [145].

Je nach Rezeptor unterscheiden sich auch die G-Proteine und deren folgenden Aktivierungswege. Im kardiovaskulären System ist der S1P-1-Rezeptor an G_{i/o} gekoppelt, der S1P-2-Rezeptor an G_{i/o} G_{12/13} und G_q und letztlich der S1P-3-Rezeptor an G_{i/o} G_{12/13} oder G_q [146, 147].

In Studien wurde anhand von S1P-Rezeptor-defizienten Mäusen gezeigt, dass es zu einer größeren Infarktgröße kommt. Die Studie von Means et al. zeigte dies für die S1P-Rezeptoren 2 und 3 [148]. Die Studie von Theilmeier et al. konnte dies an dem S1P-Rezeptor-3 nachweisen [118].

Um festzustellen, ob der experimentelle Ansatz auch eine Relevanz im Menschen zeigt, wird hier zunächst auf die Studienlage eingegangen.

Es ist bekannt, dass die S1P-Level von Mensch zu Mensch variieren. Die genauen Gründe sind bisher aber noch unklar. Ethnizität, Körperfettanteil und Übergewicht scheinen einen Einfluss zu haben [149-151]. Auch das Geschlecht und Alter beeinflussen S1P, jedoch zeigt sich die Datenlage dahingehend nicht einheitlich [152-154]. Auch im Rahmen pathologischer Prozesse konnte eine Veränderung der S1P-Level gesehen werden. Hierzu zählen kardiovaskuläre Erkrankungen, renale Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen und Inflammationsprozesse [100, 155].

Bei Patient*innen mit einer KHK wurde in der Studie von Deutschman et al. festgestellt, dass sich S1P-Werte erhöht zeigten und in dem Zusammenhang einen prädiktiven Wert für das Vorliegen und für das Ausmaß einer KHK darstellten [156]. In weiteren Studien wurden die Menge an Plasma S1P und die Menge an S1P in HDL in Gruppen gesunder Proband*innen, Patient*innen mit CAD und mit AMI verglichen. Es zeigte sich das meiste HDL-normalisierte Plasma S1P in AMI, gefolgt von CAD [121, 157].

In der Studie von Egom et al. konnte bereits eine Dynamik des S1P bei Patient*innen mit AMI detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass Sphingolipide unter Aktivierung zunächst schnell ausgeschüttet werden und es anschließend zu einer Normalisierung der Ausschüttungsrate kommt. [158]. Die Daten der Arbeit passen zu der bekannten kurzen Halbwertszeit von S1P, die zwischen 1 und 15 Minuten beschrieben wird [112, 113].

In dem translationalen Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Höhe der S1P-Ausschüttung eine Relevanz für STEMI-Patient*innen hat. Dabei wurde ein Kollektiv von 127 Patient*innen mit diagnostiziertem STEMI eingeschlossen. Bei Aufnahme in die Klinik wurden die S1P-Plasmakonzentrationen bestimmt und anhand ihrer S1P-Plasmakonzentration in Terzile unterteilt (1. Terzile: Niedrige S1P-Konzentration: < 1,556 pmol/ml, 2. Terzile: Mittlere S1P-Konzentration: 1,556-2,072 pmol/ml und 3. Terzile: Hohe S1P-Konzentration: 2,072 pmol/ml). 38 der 127 Patient*innen erhielten 6 Monate nach STEMI eine cMRT.

Die Höhe der S1P-Ausschüttung bei Aufnahme war positiv assoziiert mit dem 1-Jahres-Überleben und negativ assoziiert mit der INF. Dabei zeigten bereits kleinere Mengen an S1P einen Beitrag zur Kardioprotektion.

Ein genauer Grund hierfür konnte nicht ermittelt werden. Jedoch könnte die Wahl der Thrombozytenaggregationshemmung der STEMI-Patient*innen von Relevanz sein.

4.3 Thrombozytenaggregationshemmung im akuten Myokardinfarkt

Die Thrombozytenaggregationshemmung wird als Standardtherapie eines AMI eingesetzt, um prothrombotischen Prozessen entgegenzuwirken. Dazu zählen einerseits die Therapie mittels ASS und andererseits die erweiterte Therapie als DAPT mit P2Y₁₂-Antagonisten, sowie GP-IIb/IIIa-Antagonisten während Koronarangiographien [64, 80].

In dieser Arbeit wurde die Frage adressiert, ob die S1P-Ausschüttung durch die Thrombozytenaggregationshemmung beeinflusst wird.

Bereits die Daten der Studie von Knapp et al. zeigten einen erniedrigten S1P-Spiegel nach MI und stellten bereits die Hypothese einer potenziellen Inhibierung der Ausschüttung durch Thrombozytenaggregationshemmer [123]. In der Studie von Polzin et al. wurde dieser

Inhibierungseffekt der S1P-Ausschüttung unter der Thrombozytenaggregationshemmung mittels Aspirin festgestellt [122].

Hier wurden die Auswirkungen der S1P-Ausschüttung der Thrombozytenaggregationshemmer Cangrelor, ein P2Y₁₂-Antagonist, sowie Tirofiban, ein GP-IIb/IIIa-Antagonist, untersucht.

Die P2Y₁₂-Antagonisten wirken über die selektive Blockierung des ADP-Rezeptors, die über eine Hemmung der ADP-vermittelnden Aktivierung des GP-IIb/IIIa-Rezeptors und sequenziell zum Ausbleiben der Vernetzung von Thrombozyten über Fibrinogen führt [83]. Dabei wirkt Cangrelor reversibel und direkt ohne einen weiteren Metabolisierungsschritt, sodass es zu einem schnellen Wirkungseintritt kommt. In der Gruppe der P2Y₁₂-Antagonisten ist Cangrelor der einzige i.v. Vertreter. Nach dem Wirkungseintritt kommt es zu einer *steady-state*-Konzentration innerhalb von Minuten und wird anschließend bei einer Halbwertszeit von etwa 2-5 Minuten deaktiviert. Die volle Thrombozytenfunktion tritt innerhalb von etwa 60 Minuten wieder ein [64, 80, 87, 159].

GP-IIb/IIIa-Antagonisten wirken über eine direkte Blockierung des GP-IIb/IIIa-Rezeptors an der Thrombozytenzelloberfläche, bei der es ebenfalls zum Ausbleiben der Vernetzung von Thrombozyten über Fibrinogen kommt. Tirofiban hat eine Halbwertszeit von ungefähr 2 Stunden und weist dabei eine höhere Affinität als andere Vertreter der Gruppe auf [88, 89].

Zunächst wurde *in vitro* Versuchen mittels der LTA gezeigt, dass die Thrombozytenaggregationshemmung von Cangrelor und Tirofiban unter Aktivierung vergleichbar ist. Jedoch waren bei weiteren *in vitro* Studien Unterschiede beider Thrombozytenaggregationshemmer festzustellen: Die P2Y₁₂-Inhibierung führte unter Aktivierung zu einer signifikanten Reduktion von P-Selektin und der ATP-Freisetzung. Dagegen zeigte sich dieser Effekt unter GP-IIb/IIIa-Inhibierung nicht.

Die P-Selektin Messungen wurden mittels durchflusszytometrischen Verfahrens gemessen. P-Selektin dient dabei als Marker der Thrombozytenaggregation und der α -Granula-Freisetzung. Es wird bei Aktivierung an die Thrombozytenzelloberfläche freigegeben, bindet an den zugehörigen Rezeptor und sorgt für eine Verstärkung der Thrombozytenaggregation sowie Thrombozyten-Fibrin-Bindung [49].

Die ATP-Freisetzung wurde mittels Biolumineszenz gemessen und dient als Marker der Thrombozytenaktivierung sowie der *dense*-Granula-Freisetzung.

Des Weiteren wurden die S1P-Konzentrationen im gleichen Setting gemessen. Unter der P2Y₁₂-Inhibierung war die S1P-Ausschüttung signifikant reduziert, unter GP-IIb/IIIa-Inhibierung jedoch nicht.

Letztlich konnte im I/R-Modell 24 Stunden nach Induktion eines Herzinfarktes in der histomorphologischen Untersuchung gezeigt werden, dass bei der Versuchstiergruppe unter Tirofibanmedikation die kardioprotektive Wirkung in Bezug auf die INF erhalten bleibt. Dieser Effekt ließ sich unter Cangrelor nicht nachweisen.

Aus den aufgeführten Daten lässt sich ableiten, dass es signifikante Unterschiede der beiden Thrombozytenaggregationshemmer in Bezug auf die Ausschüttung von S1P und folglich des kardioprotektiven Effektes in Bezug auf die Größe des Infarktareals gibt. Als Konklusion der Studiendaten wäre es empfehlenswert, eine Thrombozytenaggregationshemmung im AMI einzusetzen, die eine S1P-Ausschüttung nicht hemmen würde. Als vielversprechend zeigen sich dabei die GP-IIb/IIIa-Antagonisten.

In AMI-Patient*innen ist derzeit die primäre medikamentöse Therapie mittels DAPT durch ASS und P2Y₁₂-Antagonisten empfohlen.

GP-IIb/IIIa-Antagonisten werden derzeit nur mit den Indikationen eines *bail-out* bei Hinweisen auf einen reduzierten oder stagnierenden Blutfluss oder eine thrombotische Komplikation eingesetzt [64]. Als Begründung für die eingeschränkten Indikationen zählt das hohe Blutungsrisiko. Dieses ist aber ebenfalls bei anderen antithrombotischen Substanzen erhöht [92-94]. Hierzu ist anzumerken, dass bisher die GPIIb/IIIa-Antagonisten nicht ausreichend untersucht wurden, da anstatt dessen die potenteren P2Y₁₂-Antagonisten eingesetzt wurden [95, 96]. Bisher gibt es zwei große klinische Studien, die den Effekt von GPIIb/IIIa-Antagonisten im AMI untersucht haben. Die erste Studie, der *RESTORE Investigators*, wurde im Jahre 1997 veröffentlicht und zeigte eine signifikante Reduktion des kardiovaskulären Risikos unter der Verwendung von Tirofiban ohne erheblich größere Blutungskomplikationen [160]. Im Jahr 2004 wurde von Valgimigli et al. das *ADVANCE Trial* veröffentlicht. Hier konnte gezeigt werden, dass in einer hohen Dosierung von Tirofiban während einer PCI sowohl die ischämischen als auch die thrombotischen Komplikationen signifikant vermindert wurden als auch sicher eingesetzt werden konnten [161].

Seit den durchgeführten großen Studien gibt es auch schon weitere experimentelle Studien, die die Wirksamkeit sowie Komplikationen von Tirofiban evaluierten. In der Studie von Dannenberg et al. wurden 610 Patient*innen mit STEMI in einer nicht randomisierten *single-center*-Studie eingeschlossen. Dabei zeigten sich das Blutungsrisiko und schwere kardiale und zerebrovaskuläre Komplikationen zwischen Tirofiban und einer Kontrollgruppe gleichbleibend [94]. In der Studie von ten Berg et al. wurden 1398 Patient*innen eingeschlossen und randomisiert. Es zeigte sich ein verbessertes klinisches Ergebnis bei Patient*innen, die während einer PCI neben der Hochdosis Clopidogrel auch eine Hochdosis an Tirofiban erhielten [97]. Des Weiteren konnte eine andere Studie eine Minimierung des

periprozeduralen Blutungsrisikos unter GPIIb/IIIa-Antagonisten durch die Anwendung eines radialen Zugangsweges feststellen [98].

Neben der gezielten Thrombozytenaggregationshemmung wäre eine weitere pharmakologische Option zur Erhöhung der S1P-Aktivität der Einsatz von S1P-Rezeptor-Agonisten interessant. Eingesetzt werden sie vor allem in der Behandlung der multiplen Sklerose. Für den S1P-Rezeptor-Agonist FTY720, auch Fingolimod genannt, zeigten Tierversuchsstudien an Schweinen bereits eine positive Wirkung auf die INF sowie auf die LV-Funktion beim AMI sowie auf das *Remodelling*. Als Mechanismus für das *Remodelling* konnten eine Reduktion der Apoptose an Kardiomyozyten sowie die Reduktion an oxidativem Stress ausgemacht werden [107]. Fingolimod ist ein S1P-Rezeptor-Agonist, der nach Phosphorylierung durch Sphingosinkinasen bis auf S1P-Rezeptor-2 an alle S1P-Rezeptoren bindet [162]. Daneben gibt es noch weitere S1P-Rezeptor-Agonisten, die selektiver auf Rezeptoren wirken [163-167]. Weitere Studien sind vonnöten, um den Einsatz und die Wirkungsweise der Pharmakotherapeutika im kardiovaskulären System und im AMI zu evaluieren.

4.4 Limitationen der Arbeit, Schlussfolgerungen und Ausblick

Es konnte ein protektiver Effekt von SNT+ auf das Ausmaß des Infarktareals und der Herzfunktion nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich der S1P-Level in SNT+ im Gegensatz zu SNT- signifikant erhöht. Jedoch ist unklar, ob der Effekt von SNT+ auf lokaler oder auf systemischer Ebene erzielt wird. Die Auswahl der Methodik im I/R-Modell lässt nur eine systemische Darstellung des Effektes zu.

Des Weiteren wird in der Studie nicht aufgezeigt, über welchen Weg die Ausschüttung durch S1P initiiert wird und ob auch andere S1P-Ausschüttungsquellen im AMI neben den Thrombozyten identifiziert werden könnten.

Ebenfalls ist nicht klar zu unterscheiden, ob der positive Effekt nur durch S1P ausgelöst wird, da neben S1P auch weitere Stoffe ausgeschüttet werden.

In der publizierten Arbeit von Polzin et al., in der Teile dieser Arbeit veröffentlicht wurden, wird bereits auf einige der oben genannten Punkte genauer eingegangen. Die lokale Versuchsebene wurde im Langendorff-Modell getestet. Des Weiteren wurden auch S1P-Werte im AMI von Erythrozyten und Kardiomyozyten gemessen und zeigten keine signifikant erhöhten Messwerte für S1P. Ebenfalls wurden Versuche unter dem Einfluss eines S1P-Rezeptor-1-Inhibitors, an S1P-1-Rezeptor-defizienten Mäusen und an Mfsd2b-defizienten Mäusen durchgeführt. Zusammenfassend zeigten die Daten, dass der S1P-Rezeptor-1 und

der Mfsd2b-Transporter einen signifikanten Einfluss auf die S1P-Ausschüttung im AMI haben [131].

Eine weitere Limitation der Arbeit bezieht sich auf die Auswahl der Thrombozytenaggregationshemmung. Unter der Gruppe der P2Y₁₂-Antagonisten wurde der reversible Vertreter Cangrelor getestet. Ein irreversibler Vertreter der Gruppe wurde hierbei nicht getestet.

Da die meisten Patient*innen eine DAPT erhalten, wäre es auch hier interessant zu sehen, ob die Kombination der getesteten Thrombozytenaggregationshemmer auch in der Kombination mittels ASS ähnliche Ergebnisse aufweisen, um einem klinischen Szenario näherzukommen. Bereits in Vorstudien zeigte sich ein negativer Einfluss der S1P-Ausschüttung unter ASS [122].

Jedoch wurde der Effekt auf S1P nicht in der DAPT untersucht.

Des Weiteren ist als Limitation aufzuführen, dass im translationalen Teil der Studie nur 38 Patient*innen ein cMRT nach 6 Monaten erhielten, was eine kleine Fallgröße darstellt.

Um die klinische Anwendung der optimalen Thrombozytenaggregationshemmung im AMI, unter Berücksichtigung der positiven Effekte von Thrombozyten, zu evaluieren, sind weitere Studien von Relevanz. Der Einsatz von GPIIb/IIIa-Antagonisten unter dem Punkt einer erhalten bleibenden Kardioprotektion sollte auch im Rahmen klinischer Studien weiter untersucht werden. Hierzu gibt es mehrere mögliche Szenarien des Einsatzes von GPIIb/IIIa-Antagonisten, die sowohl in der Variation des Anwendungszeitpunktes, in einer Monotherapie, in der Deeskalation mittels anderer Thrombozytenaggregationshemmer oder auch als Ergänzung über DAPT zu bedenken sind.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Mortality, G.B.D. and C. Causes of Death, *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): p. 1459-1544.
2. Statistisches Bundesamt (Destatis). *Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen*. 2022 [cited 2024 03.08.2024]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
3. Gosswald, A., et al., *[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): p. 650-5.
4. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. Circulation, 2018. **138**(20): p. e618-e651.
5. Weijmans, M., et al., *Paternal or maternal history of cardiovascular disease and the risk of cardiovascular disease in offspring. A systematic review and meta-analysis*. Int J Cardiol, 2015. **179**: p. 409-16.
6. Thomas, H., et al., *Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control*. Glob Heart, 2018. **13**(3): p. 143-163.
7. Group, E.U.C.C.S., et al., *Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes*. Eur Heart J, 2016. **37**(1): p. 24-34.
8. Rodgers, J.L., et al., *Cardiovascular Risks Associated with Gender and Aging*. J Cardiovasc Dev Dis, 2019. **6**(2).
9. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
10. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK), E.S.o.C.E. *ESC Pocket Guidelines, Vierte Definition des Myokardinfarktes*. 2018; Available from: https://leitlinien.dgk.org/files/26_2018_pocket_leitlinien_4_definition_mi.pdf.
11. Werner Böcker, H.D., Philipp U Heitz, Holger Moch, Gerald Höfler, Hans Kreipe, *Pathologie. Herz - Myokardinfarkt*. Vol. 5. Auflage. 2012: Elsevier.
12. Sayen, J.J., et al., *Polarographic oxygen, the epicardial electrocardiogram and muscle contraction in experimental acute regional ischemia of the left ventricle*. Circ Res, 1958. **6**(6): p. 779-98.
13. Kübler, W. and P.G. Spieckermann, *Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1970. **1**(4): p. 351-77.
14. Frangogiannis, N.G., *Pathophysiology of Myocardial Infarction*. Compr Physiol, 2015. **5**(4): p. 1841-75.
15. Elliott, A.C., et al., *Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts*. J Physiol, 1992. **454**: p. 467-90.
16. Solaro, R.J., et al., *Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats*. Circ Res, 1988. **63**(4): p. 779-87.
17. Jennings, R.B., et al., *Development of cell injury in sustained acute ischemia*. Circulation, 1990. **82**(3 Suppl): p. II2-12.
18. Steenbergen, C., et al., *Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart*. Circ Res, 1977. **41**(6): p. 849-58.
19. Burke, A.P. and R. Virmani, *Pathophysiology of acute myocardial infarction*. Med Clin North Am, 2007. **91**(4): p. 553-72; ix.
20. Stanley, W.C., *Cardiac energetics during ischaemia and the rationale for metabolic interventions*. Coron Artery Dis, 2001. **12 Suppl 1**: p. S3-7.

21. Abbate, A., et al., *Infarct-related artery occlusion, tissue markers of ischaemia, and increased apoptosis in the peri-infarct viable myocardium*. Eur Heart J, 2005. **26**(19): p. 2039-45.
22. Heusch, G. and B.J. Gersh, *The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge*. Eur Heart J, 2017. **38**(11): p. 774-784.
23. Redfors, B., Y. Shao, and E. Omerovic, *Myocardial infarct size and area at risk assessment in mice*. Exp Clin Cardiol, 2012. **17**(4): p. 268-72.
24. Moens, A.L., et al., *Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process*. Int J Cardiol, 2005. **100**(2): p. 179-90.
25. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
26. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. Circulation, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
27. Krishnegowda, M. and V. Rajashekaraiah, *Platelet disorders: an overview*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2015. **26**(5): p. 479-91.
28. Ross, D.W., et al., *Stability of hematologic parameters in healthy subjects. Intraindividual versus interindividual variation*. Am J Clin Pathol, 1988. **90**(3): p. 262-7.
29. Kaushansky, K., *Thrombopoiesis*. Semin Hematol, 2015. **52**(1): p. 4-11.
30. Lefrançois, E., et al., *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. Nature, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
31. Lebois, M. and E.C. Josefsson, *Regulation of platelet lifespan by apoptosis*. Platelets, 2016. **27**(6): p. 497-504.
32. Kaplan, J.E. and T.M. Saba, *Platelet removal from the circulation by the liver and spleen*. Am J Physiol, 1978. **235**(3): p. H314-20.
33. Goto, S., T. Hasebe, and S. Takagi, *Platelets: Small in Size But Essential in the Regulation of Vascular Homeostasis - Translation From Basic Science to Clinical Medicine*. Circ J, 2015. **79**(9): p. 1871-81.
34. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
35. Elzey, B.D., et al., *Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 9-19.
36. Jenne, C.N., R. Urrutia, and P. Kubes, *Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity*. Int J Lab Hematol, 2013. **35**(3): p. 254-61.
37. Hoffman, M. and D.M. Monroe, 3rd, *A cell-based model of hemostasis*. Thromb Haemost, 2001. **85**(6): p. 958-65.
38. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
39. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 1**(Suppl 1): p. S5-9.
40. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 403-12.
41. Yip, J., et al., *Primary platelet adhesion receptors*. IUBMB Life, 2005. **57**(2): p. 103-8.
42. Emsley, J., et al., *Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1*. Cell, 2000. **101**(1): p. 47-56.
43. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 191-204.
44. Morgenstern, E., K. Neumann, and H. Patscheke, *The exocytosis of human blood platelets. A fast freezing and freeze-substitution analysis*. Eur J Cell Biol, 1987. **43**(2): p. 273-82.
45. Escolar, G. and J.G. White, *The platelet open canalicular system: a final common pathway*. Blood Cells, 1991. **17**(3): p. 467-85; discussion 486-95.

46. Feng, D., et al., *Subcellular distribution of 3 functional platelet SNARE proteins: human cellubrevin, SNAP-23, and syntaxin 2*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4006-14.
47. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
48. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Blood Rev, 2015. **29**(3): p. 153-62.
49. Andre, P., *P-selectin in haemostasis*. Br J Haematol, 2004. **126**(3): p. 298-306.
50. Mills, D.C., *ADP receptors on platelets*. Thromb Haemost, 1996. **76**(6): p. 835-56.
51. Hanasaki, K. and H. Arita, *Characterization of thromboxane A₂/prostaglandin H₂ (TXA₂/PGH₂) receptors of rat platelets and their interaction with TXA₂/PGH₂ receptor antagonists*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(20): p. 3923-9.
52. Erkan, L.G., et al., *The effects of centrally injected arachidonic acid on respiratory system: Involvement of cyclooxygenase to thromboxane signaling pathway*. Respir Physiol Neurobiol, 2016. **225**: p. 1-7.
53. Aslan, J.E., et al., *Platelet shape change and spreading*. Methods Mol Biol, 2012. **788**: p. 91-100.
54. Clemetson, K.J., *Platelets and primary haemostasis*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 220-4.
55. Rumbaut RE, T.P. *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. Chapter 6, Arterial, Venous, and Microvascular Hemostasis/Thrombosis*. 2010; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53453/>.
56. Smith, S.A., R.J. Travers, and J.H. Morrissey, *How it all starts: Initiation of the clotting cascade*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(4): p. 326-36.
57. Dahlbäck, B., *Blood coagulation*. Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1627-32.
58. Silverberg, M., et al., *Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate*. J Biol Chem, 1980. **255**(15): p. 7281-6.
59. Macfarlane, R.G., *AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER*. Nature, 1964. **202**: p. 498-9.
60. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Platelets: Physiology and Biochemistry*. Semin Thromb Hemost, 2023.
61. Gawaz, M., et al., *Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty*. Circulation, 1996. **93**(2): p. 229-37.
62. Gobbi, G., et al., *Sighting acute myocardial infarction through platelet gene expression*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 19574.
63. Gidlöf, O., et al., *Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression*. Blood, 2013. **121**(19): p. 3908-17, s1-26.
64. Byrne, R.A., et al., *2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes: Developed by the task force on the management of acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC)*. European Heart Journal, 2023. **44**(38): p. 3720-3826.
65. Liu, Y., et al., *Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(4): p. 834-41.
66. Duerschmied, D., et al., *Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice*. Blood, 2013. **121**(6): p. 1008-15.
67. Halucha, K., A. Rak-Pasikowska, and I. Bil-Lula, *Protective Role of Platelets in Myocardial Infarction and Ischemia/Reperfusion Injury*. Cardiol Res Pract, 2021. **2021**: p. 5545416.
68. Mause, S.F., et al., *Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(7): p. 1512-8.
69. Witte, A., et al., *Platelets as a Novel Source of Pro-Inflammatory Chemokine CXCL14*. Cell Physiol Biochem, 2017. **41**(4): p. 1684-1696.

70. Gleissner, C.A., P. von Hundelshausen, and K. Ley, *Platelet chemokines in vascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(11): p. 1920-7.
71. Yabanoglu, S., et al., *Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT_{2A} receptors*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(4): p. 518-25.
72. Meyer, A., et al., *Platelet TGF-beta1 contributions to plasma TGF-beta1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload*. *Blood*, 2012. **119**(4): p. 1064-74.
73. Sonmez, O. and M. Sonmez, *Role of platelets in immune system and inflammation*. *Porto Biomedical Journal*, 2017. **2**(6): p. 311-314.
74. Geisler, T., et al., *Association of platelet-SDF-1 with hemodynamic function and infarct size using cardiac MR in patients with AMI*. *Eur J Radiol*, 2012. **81**(4): p. e486-90.
75. Rath, D., et al., *Platelet expression of transforming growth factor beta 1 is enhanced and associated with cardiovascular prognosis in patients with acute coronary syndrome*. *Atherosclerosis*, 2014. **237**(2): p. 754-9.
76. Frangogiannis, N.G., et al., *Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts*. *Circulation*, 2005. **111**(22): p. 2935-42.
77. Brancialeone, V., et al., *A vasculo-protective circuit centered on lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 operative in murine microcirculation*. *Blood*, 2013. **122**(4): p. 608-17.
78. Basil, M.C. and B.D. Levy, *Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(1): p. 51-67.
79. Abdulnour, R.E., et al., *Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(46): p. 16526-31.
80. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK), E.S.o.C.E. *ESC Pocket Guidelines, Therapie des akuten Herzinfarktes bei Patienten mit ST-Streckenhebung (STEMI)*. 2018; Available from: https://leitlinien.dgk.org/files/2018_Pocket_Leitlinie_STEMI_Internetversion_Neu.pdf.
81. Fitzgerald, R. and M. Pirmohamed, *Aspirin resistance: effect of clinical, biochemical and genetic factors*. *Pharmacol Ther*, 2011. **130**(2): p. 213-25.
82. Clissold, S.P., *Aspirin and related derivatives of salicylic acid*. *Drugs*, 1986. **32 Suppl 4**: p. 8-26.
83. Al-Abcha, A., et al., *Genotype-Guided Use of P2Y₁₂ Inhibitors: A Review of Current State of the Art*. *Front Cardiovasc Med*, 2022. **9**: p. 850028.
84. Pereillo, J.M., et al., *Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel*. *Drug Metab Dispos*, 2002. **30**(11): p. 1288-95.
85. Wallentin, L., et al., *Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(11): p. 1045-57.
86. Wiviott, S.D., et al., *Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(20): p. 2001-15.
87. Bhatt, D.L., et al., *Effect of platelet inhibition with cangrelor during PCI on ischemic events*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(14): p. 1303-13.
88. Hashemzadeh, M., et al., *Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers: A review*. *Exp Clin Cardiol*, 2008. **13**(4): p. 192-7.
89. Schrör, K. and A.A. Weber, *Comparative pharmacology of GP IIb/IIIa antagonists*. *J Thromb Thrombolysis*, 2003. **15**(2): p. 71-80.
90. Smit, J.J., et al., *Prehospital triple antiplatelet therapy in patients with acute ST elevation myocardial infarction leads to better platelet aggregation inhibition and clinical outcome than dual antiplatelet therapy*. *Heart*, 2010. **96**(22): p. 1815-20.
91. Kloner, R.A., *Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction*. *Circ Res*, 2013. **113**(4): p. 451-63.
92. Diaz, J.F., et al., *Safety and efficacy of tirofiban as adjunctive therapy for patients with ST-elevation myocardial infarction: a comparison versus placebo and abciximab*. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2011. **9**(3): p. 147-53.

93. Geeganage, C., R. Wilcox, and P.M. Bath, *Triple antiplatelet therapy for preventing vascular events: a systematic review and meta-analysis*. BMC Med, 2010. **8**: p. 36.
94. Dannenberg, L., et al., *Safety and efficacy of Tirofiban in STEMI-patients*. Int J Cardiol, 2019. **274**: p. 35-39.
95. Boersma, E., et al., *Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials*. Lancet, 2002. **359**(9302): p. 189-98.
96. Neumann, F.J., et al., *2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization*. Eur Heart J, 2019. **40**(2): p. 87-165.
97. ten Berg, J.M., et al., *Effect of early, pre-hospital initiation of high bolus dose tirofiban in patients with ST-segment elevation myocardial infarction on short- and long-term clinical outcome*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(22): p. 2446-55.
98. Bhardwaj, B., et al., *Radial versus femoral access for left main percutaneous coronary intervention: An analysis from the Veterans Affairs Clinical, Reporting, and Tracking Program*. Catheter Cardiovasc Interv, 2022. **99**(2): p. 480-488.
99. Karliner, J.S., *Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in the heart: a decade of progress*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(1): p. 203-12.
100. Hait, N.C., et al., *Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(12): p. 2016-26.
101. Yatomi, Y., *Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(3): p. 606-11.
102. Blaho, V.A. and T. Hla, *An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors*. J Lipid Res, 2014. **55**(8): p. 1596-608.
103. Means, C.K. and J.H. Brown, *Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(2): p. 193-200.
104. Fan, X., et al., *Recent advances of the function of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor S1P3*. J Cell Physiol, 2021. **236**(3): p. 1564-1578.
105. Constantinescu, V., et al., *S1P receptor modulators and the cardiovascular autonomic nervous system in multiple sclerosis: a narrative review*. Ther Adv Neurol Disord, 2022. **15**: p. 17562864221133163.
106. Roy, R., A.A. Alotaibi, and M.S. Freedman, *Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for Multiple Sclerosis*. CNS Drugs, 2021. **35**(4): p. 385-402.
107. Santos-Gallego, C.G., et al., *Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonist Fingolimod Increases Myocardial Salvage and Decreases Adverse Postinfarction Left Ventricular Remodeling in a Porcine Model of Ischemia/Reperfusion*. Circulation, 2016. **133**(10): p. 954-66.
108. Schwab, S.R. and J.G. Cyster, *Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1295-301.
109. Hammad, S.M., et al., *Sphingosine 1-phosphate distribution in human plasma: associations with lipid profiles*. J Lipids, 2012. **2012**: p. 180705.
110. Murata, N., et al., *Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions*. Biochem J, 2000. **352 Pt 3**(Pt 3): p. 809-15.
111. Okajima, F., *Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator?* Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 132-7.
112. Salous, A.K., et al., *Mechanism of rapid elimination of lysophosphatidic acid and related lipids from the circulation of mice*. J Lipid Res, 2013. **54**(10): p. 2775-84.
113. Venkataraman, K., et al., *Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate*. Circ Res, 2008. **102**(6): p. 669-76.
114. Hanel, P., P. Andreani, and M.H. Graler, *Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood*. FASEB J, 2007. **21**(4): p. 1202-9.
115. Pappu, R., et al., *Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate*. Science, 2007. **316**(5822): p. 295-8.

116. Ksiazek, M., et al., *Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate*. J Lipid Res, 2015. **56**(7): p. 1271-81.
117. Lucke, S. and B. Levkau, *Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate*. Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(1): p. 87-96.
118. Theilmeyer, G., et al., *High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor*. Circulation, 2006. **114**(13): p. 1403-9.
119. Nitzsche, A., et al., *Endothelial S1P(1) Signaling Counteracts Infarct Expansion in Ischemic Stroke*. Circ Res, 2021. **128**(3): p. 363-382.
120. Bandhuvula, P., et al., *S1P lyase: a novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury of the heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1753-61.
121. Sattler, K.J., et al., *Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(6): p. 821-32.
122. Polzin, A., et al., *Aspirin inhibits release of platelet-derived sphingosine-1-phosphate in acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2013. **170**(2): p. e23-4.
123. Knapp, M., et al., *Plasma sphingosine-1-phosphate concentration is reduced in patients with myocardial infarction*. Med Sci Monit, 2009. **15**(9): p. CR490-3.
124. Tsai, P.P., et al., *Effects of different blood collection methods on indicators of welfare in mice*. Lab Anim (NY), 2015. **44**(8): p. 301-10.
125. Pitt, J.J., *Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry*. Clin Biochem Rev, 2009. **30**(1): p. 19-34.
126. De Villiers, C. and P.R. Riley, *Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion*. Dis Model Mech, 2020. **13**(11).
127. Altman, F.P., *Tetrazolium salts and formazans*. Prog Histochem Cytochem, 1976. **9**(3): p. 1-56.
128. Cattaneo, M., et al., *Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(6): p. 1029.
129. Mourikis, P., *Plättchenreaktivität und Aspirinmedikation bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Hämodialyse*. 2020, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
130. Cho, J.H., et al., *Functional Assessment of Platelet Dense Granule ATP Release*. Am J Clin Pathol, 2021. **155**(6): p. 863-872.
131. Polzin, A., et al., *Revealing concealed cardioprotection by platelet Mfsd2b-released S1P in human and murine myocardial infarction*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 2404.
132. Ulrych, T., et al., *Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(4): p. 790-8.
133. Yang, B.C. and J.L. Mehta, *Platelet-derived adenosine contributes to the cardioprotective effects of platelets against ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart*. J Cardiovasc Pharmacol, 1994. **24**(5): p. 779-85.
134. Mehta, J.L., et al., *Role of TGF-beta1 in platelet-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion in isolated rat hearts*. Growth Factors, 1999. **16**(3): p. 179-90.
135. Chen, D., et al., *Crosstalk between SDF-1/CXCR4 and SDF-1/CXCR7 in cardiac stem cell migration*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16813.
136. Davaille, J., et al., *Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34628-33.
137. Takeya, H., et al., *Synergistic effect of sphingosine 1-phosphate on thrombin-induced tissue factor expression in endothelial cells*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1693-700.
138. Liu, H., et al., *Sphingosine-1-phosphate modulates PAR1-mediated human platelet activation in a concentration-dependent biphasic manner*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 15308.
139. Kohama, T., et al., *Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23722-8.
140. Liu, H., et al., *Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19513-20.

141. Olivera, A., et al., *Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 545-58.
142. Allende, M.L., et al., *Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52487-92.
143. Jin, Z.Q., et al., *A sphingosine kinase 1 mutation sensitizes the myocardium to ischemia/reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2007. **76**(1): p. 41-50.
144. Alewijnse, A.E., S.L. Peters, and M.C. Michel, *Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(6): p. 666-84.
145. Mazurais, D., et al., *Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(5): p. 661-70.
146. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 139-50.
147. Rivera, R. and J. Chun, *Biological effects of lysophospholipids*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2008. **160**: p. 25-46.
148. Means, C.K., et al., *Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(6): p. H2944-51.
149. Buie, J.N.J., et al., *Differences in plasma levels of long chain and very long chain ceramides between African Americans and whites: An observational study*. PLoS One, 2019. **14**(5): p. e0216213.
150. Kowalski, G.M., et al., *Plasma sphingosine-1-phosphate is elevated in obesity*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e72449.
151. Ito, S., et al., *Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes*. Coron Artery Dis, 2013. **24**(8): p. 642-50.
152. Weir, J.M., et al., *Plasma lipid profiling in a large population-based cohort*. J Lipid Res, 2013. **54**(10): p. 2898-908.
153. Hammad, S.M., et al., *Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology*. J Lipid Res, 2010. **51**(10): p. 3074-87.
154. Nikkilä, J., et al., *Gender-dependent progression of systemic metabolic states in early childhood*. Mol Syst Biol, 2008. **4**: p. 197.
155. Levkau, B., *HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 243.
156. Deutschman, D.H., et al., *Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate*. Am Heart J, 2003. **146**(1): p. 62-8.
157. Yeboah, J., et al., *Association of plasma sphingomyelin levels and incident coronary heart disease events in an adult population: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(3): p. 628-33.
158. Egom, E.E., et al., *Serum sphingolipids level as a novel potential marker for early detection of human myocardial ischaemic injury*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 130.
159. Angiolillo, D.J., et al., *Advances in antiplatelet therapy: agents in clinical development*. Am J Cardiol, 2009. **103**(3 Suppl): p. 40a-51a.
160. *Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. The RESTORE Investigators. Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and REstenosis*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1445-53.
161. Valgimigli, M., et al., *The additive value of tirofiban administered with the high-dose bolus in the prevention of ischemic complications during high-risk coronary angioplasty: the ADVANCE Trial*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(1): p. 14-9.
162. Billich, A., et al., *Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 47408-15.

163. Kappos, L., et al., *Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study*. Lancet, 2018. **391**(10127): p. 1263-1273.
164. Scott, F.L., et al., *Ozanimod (RPC1063) is a potent sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) and receptor-5 (S1P5) agonist with autoimmune disease-modifying activity*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(11): p. 1778-92.
165. Bolli, M.H., et al., *2-imino-thiazolidin-4-one derivatives as potent, orally active S1P1 receptor agonists*. J Med Chem, 2010. **53**(10): p. 4198-211.
166. Sugahara, K., et al., *Amiselimod, a novel sphingosine 1-phosphate receptor-1 modulator, has potent therapeutic efficacy for autoimmune diseases, with low bradycardia risk*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(1): p. 15-27.
167. Komiya, T., et al., *Efficacy and immunomodulatory actions of ONO-4641, a novel selective agonist for sphingosine 1-phosphate receptors 1 and 5, in preclinical models of multiple sclerosis*. Clin Exp Immunol, 2013. **171**(1): p. 54-62.

Danksagungen

Als Abschluss dieser Arbeit möchte ich einigen Personen danken, ohne die die Realisation dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Beginnen möchte ich mit Prof. Dr. med. Malte Kelm, der mir als Klinikdirektor die Forschung im kardiovaskulären Labor und in der Klinik ermöglicht hat. Ebenfalls möchte ich allen Kooperationspartner*innen danken, die mit der Arbeit und den Analysen zu wichtigen Daten der Dissertation beigetragen haben. Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. med. Amin Polzin danken, der mich über all die Jahre begleitet hat und mein Potenzial von Anfang an gesehen, gefördert und weiterentwickelt hat. Durch ihn konnte ich Zutritt zur wissenschaftlichen Arbeit erlangen und mich durch besonders viel Motivation, Enthusiasmus und Ideenreichtum inspirieren und anstecken lassen. Auch ein besonderes Dankeschön geht an PD Dr. med. Lisa Dannenberg, die mich über die gesamte Zeit motiviert hat, für jegliche Fragen und Probleme zu jeder Tageszeit bereitstand und mir ganz besonders die Begeisterung für Wissenschaft gezeigt hat.

Ein großes Dankeschön gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Polzin. Nicht nur die gemeinsame Zeit im Labor und in der Klinik, sondern auch jede Zeit außerhalb davon möchte ich nicht missen! Insbesondere möchte ich aus der AG Sam, Maike, Marcel, Caro und Philipp für den besten kollegialen und vielmehr auch freundschaftlichen Beistand hervorheben. Danke auch für euren Input, eure Motivation und Korrekturen für diese Arbeit!

Auch gilt ein großes Dankeschön dem gesamten CVRL-Team, die mich über all die Jahre begleitet und unterstützt haben.

Der herzlichste und größte Dank ist ganz besonderen Personen in meinem Leben gewidmet: Meiner Familie, ohne die sowieso all dies nicht möglich gewesen wäre: Mama, Papa, Enikő und Mancimama: Nun ein Abschnitt auf Ungarisch für euch: Mindig feltétlen szeretetet mutattál nekem. Támogattál minden álmomban és vágyamban, függetlenül attól, hogy hol voltam az életben!

Weiterhin gilt ein Dank Lenny, der mich vor allem auf den letzten Metern der Arbeit unterstützt hat. Auch ein besonderer Dank gilt all meinen Freund*innen, die mich begleitet haben und viel Verständnis für jegliche Situation aufgebracht haben. Darunter möchte ich sowohl meinen Liebsten der 32x aufzählen als auch alle weiteren Freund*innen aus diversesten Lebensabschnitten, ob aus Osnabrück, Köln, Düsseldorf, Cluj oder jeglichen anderen Ort dieser Welt.