

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Sphingosin-1-Phosphat und myokardiale Strain in diabetischen Konditionen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jessica Weber

2025

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. med. Lisa Kristina Dannenberg

Zweitgutachter: PD Dr. med. Julian Kirchner

Für meine Eltern, die den Grundstein für alles gelegt haben, was ich heute erreichen konnte.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

„Targeting sphingosine-1-phosphate signaling to prevent the progression of aortic valve disease” Marcel Benkhoff^{#1 2 3}, Maike Barcik^{#1}, [...] **Jessica Weber**¹, Lisa Dannenberg¹, Payam Akhyari³, Artur Lichtenberg⁶, Christine Quast¹, Norbert Gerdes^{1 7}, Tobias Zeus¹, Oliver Borst^{8 9}, Malte Kelm^{1 7}, Tobias Petzold^{10 11}, Robert Ahrends², Bodo Levkau^{#2}, Amin Polzin^{#1 7 12} Circulation. 2024 Oct 21. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.067270.

Posterpräsentation DGK Herbsttage 2024 - “Enhanced circulating S1P improves remote myocardial strain in mice with diet-induced obesity”; **Jessica Weber**¹, Aylin Celik¹, Leonard Baensch¹, Khatereh Shahjerdi¹, Süreyya Saffak¹, Julia Kielb¹, Sally Gray¹, Nora Farahat¹, Oscar Chavez-Talavera¹, Hao Hu¹, Marcel Benkhoff¹, Tobias Zeus¹, Birgit Donner³, Malte Kelm¹, Amin Polzin¹, Lisa Dannenberg^{1#}, Bodo Levkau^{2#}

Keynote Session DGK Jahrestagung 2023 – “Worsening of remote myocardial function is aggravated in diet-induced obesity mice after acute myocardial infarction; **Jessica Weber^{1*}, Marcel Benkhoff^{1*}, Hao Hu¹, Maike Barcik¹, Stephan Angendohr¹, Khatereh Shahjerdi¹, Leonard Baensch¹, Süreyya Saffak¹, Aylin Celik¹, Julia Kielb¹, Silvana Glugla¹, Tobias Zeus¹, Malte Kelm¹, Bodo Levkau², Sarah Weske², Amin Polzin^{1φ}, Lisa Dannenberg^{1φ}**

Zusammenfassung

Typ-2-Diabetes mellitus (DM2) ist eine Stoffwechselerkrankung, deren Prävalenz in den kommenden Jahrzehnten signifikant zunehmen wird. Die Folgeerkrankungen des DM2 umfassen eine Vielzahl von kardiovaskulären Komplikationen, darunter den akuten Myokardinfarkt (MI). Nach einem Myokardinfarkt zeigen Patienten mit einem DM2 ein schlechtes Auskommen, welches unter anderem auf ein ungünstiges myokardiales Remodeling im nicht infarzierten Bereich zurückzuführen ist. Des Weiteren ist der DM2 mit einem spezifischen kardialen Phänotyp assoziiert, der sich überwiegend als diastolische Dysfunktion äußert. Die Speckle-Tracking-Echokardiographie (STE) erweist sich als sensitiver im Hinblick auf die Detektion einer myokardialen Funktionsstörung als die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF).

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, das kardioprotektive Eigenschaften aufweist. Die Freisetzung von S1P erfolgt unter anderem durch Pannexin-1-Kanäle in den Kardiomyozyten. In klinischen Untersuchungen konnte bereits ein negativer Zusammenhang zwischen dem Body-Mass-Index (BMI) sowie der EF beobachtet werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde der Zusammenhang von globaler longitudinaler Strain (GLS) und frei zirkulierenden S1P-Konzentrationen im Kontext einer DM2-Erkrankung untersucht. Im Anschluss wurde ein möglicher therapeutischer Einsatz von S1P unter Behandlung mit 4-Desoxypridoxine (DOP) in ischämie-/reperusionsbehandelten (I/R) behandelten Mäusen analysiert. Neben zirkulierendem S1P existiert auch myokardial gebundenes S1P, was im Infarkt durch sogenannte Pannexine freigesetzt wird. Daher wurden in einem dritten Teil des Projektes die echokardiographischen Daten von Pannexin-1-Knockout-Mäusen (Panx1^{-/-}) in Hinblick auf die myokardiale Strain analysiert, um Einflüsse zellulär freigesetzten S1Ps zu erforschen.

Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass eine Steigerung der endogenen S1P-Konzentrationen durch DOP im murinen Modell eine Verbesserung der radialen Strain im nicht-infarzierten Remote-Bereich bewirkt. Die Erhöhung der frei zirkulierenden Konzentrationen von S1P konnte durch Analyse der Panx1^{-/-}-Mäuse auf eine Steigerung der endogenen S1P-Konzentrationen zurückgeführt werden, nicht jedoch auf eine Freisetzung von S1P durch Pannexine aus Kardiomyozyten. Im Menschen konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen den endogenen S1P-Konzentrationen und der GLS festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass S1P unter diabetischen Bedingungen im Mausmodell signifikante Auswirkungen auf das kardiale Remodeling nach MI hat. Die pharmakologische Modulation von S1P stellt daher ein vielversprechendes Ziel für die Zukunft dar. Um diese Effekte zu bestätigen und weitere Einblicke zu gewinnen, sind jedoch weitere Forschungsarbeiten erforderlich, insbesondere am Menschen.

Abstract

The prevalence of type 2 diabetes mellitus (DM2) is expected to increase significantly in the coming decades. The complications of DM2 include a variety of cardiovascular complications, including acute myocardial infarction (MI). Patients with DM2 who have experienced a myocardial infarction tend to have a poor outcome, which is attributable, among other factors, to unfavourable myocardial remodelling in the non-infarcted area. Moreover, DM2 is linked to a distinctive cardiac phenotype, which is primarily characterised by diastolic dysfunction. Speckle tracking echocardiography (STE) has been demonstrated to be a more sensitive method than left ventricular ejection fraction (EF) for the detection of myocardial dysfunction.

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid with cardioprotective properties. S1P is released through pannexin-1 channels in the cardiomyocytes. Previous clinical studies have observed a negative correlation between body mass index (BMI) and left ventricular ejection fraction (EF).

This study examined the relationship between global longitudinal strain (GLS) and free circulating S1P concentrations in the context of type 2 diabetes mellitus (DM2) disease. Subsequently, the potential therapeutic use of S1P in conjunction with 4-deoxypridoxine (DOP) in the context of ischaemia/reperfusion (I/R) treatment in mice was investigated. In addition to circulating S1P, myocardial bound S1P also exists, which is released in the infarct by so-called pannexins. Consequently, a third component of the project involved the analysis of echocardiographic data from pannexin-1 knockout mice (Panx1^{-/-}) regarding myocardial strain, with the objective of investigating the influence of cellular-released S1P.

The results demonstrate that elevating endogenous S1P levels through the administration of DOP in the murine model enhances radial strain in the non-infarcted remote region. The observed increase in free circulating S1P concentrations could be attributed to an increase in endogenous S1P concentrations in Panx1^{-/-} mice, but not to a release of S1P by pannexins from cardiomyocytes. However, in humans, no correlation between endogenous S1P concentrations and GLS could be established.

The findings of this study illustrate that S1P exerts considerable influence over cardiac remodelling following MI in diabetic mice. It may therefore be concluded that pharmacological modulation of S1P represents a promising target for future investigation. Nevertheless, further research, particularly in humans, is required to substantiate these findings and gain additional insights.

Abkürzungsverzeichnis

AGE	Advanced-Glycation-End-Products
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
BMI	Body-Mass-Index
CAGB	Koronararterienbypass
DIO	Diabetisches Mausmodell
DM2	Diabetes Mellitus Typ 2
DOP	4-Desoxypyridoxine
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ESV	Endsystolisches Volumen
EDV	Enddiastolisches Volumen
FTY720	Fingolimod
GLS	Global longitudinal Strain
GLUT4	Glukose-Transporter 4
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	High-density-lipoprotein
HF	Herzinsuffizienz
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
I/R	Ischämie/Reperusionsversuch
KHK	Koronare Herzkrankheit
LA-Volumen	Linksatriales Volumen
MI	Myokardinfarkt
Mfsd2b	Major facilitator superfamily transporter
MRT	Magnetresonanztomographie
MV-Flow	Mitralklappenfluss

NYHA	New York Heart Association
Panx1 ^{-/-}	Pannexin-1-Knockout Mäuse
PCI	Perkutane Koronarintervention
PLAX	Parasternale lange Achse
PRP	Plättchenreiches Plasma
ProBNP	Pro-B-Type Natriuretic Peptide
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SPR	Sphingosin-Phosphat-Rezeptor
STE	Speckle-Tracking-Echokardiographie
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
SV	Schlagvolumen
TTE	Transthorakale Echokardiographie

Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
kg	Kilogramm
L	Liter
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
ng	Nanogramm

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Diabetes Mellitus und Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System	2
1.1.1 Diabetes Mellitus	2
1.1.2 Diabetes Mellitus als relevanter Risikofaktor für den akuten Myokardinfarkt	3
1.1.3 Diabetes Mellitus und damit assoziierter kardialer Phänotyp	4
1.2 Sphingosin-1-Phosphat	5
1.2.1 Shingosin-1-Phosphat und seine Wirkung auf das kardiovaskuläre System	6
1.2.2 Pannexin-Kanäle	8
1.2.3 Die Rolle von Pannexin-1-Kanälen und S1P im myokardialen Gewebe...	9
1.3 Transthorakale echokardiografische Untersuchung des Herzens	9
1.3.1 Speckle-Tracking-Strain	10
1.3.2 Speckle-Tracking-Strain bei Patienten mit DM2.....	11
1.3.3 S1P und myokardiale Funktionsanalyse	12
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Studiendesign.....	14
2.2 Genehmigung des Versuchsvorhabens	14
2.3 Patientenstudie	14
2.3.1 Biosampling	15
2.3.2 Echokardiographie mit Ermittlung der Speckle-tracking-Strain	17
2.4 Versuchstiere, Zucht- und Haltungsbedingungen	18
2.4.1 Diabetisches Mausmodell.....	19
2.4.2 Behandlung mit DOP	19
2.4.3 Pannexin-1-Knockout-Maus	19
2.5 Ischämie und Reperfusion.....	20
2.6 Murine Echokardiographie	23
2.7 Statistische Auswertung	26
3. Ergebnisse	28
3.1 Zusammenhang von S1P und myokardialer Strain beim Menschen	28
3.1.1 Patientenrekrutierung	28
3.1.2 Patientencharakteristika	28
3.1.3 Echokardiographische Ergebnisse	31
3.2 Zusammenhang von S1P und Erholung nach AMI im murinen Modell	43
3.2.1 Myokardiale Strain vor und nach AMI im DIO-Modell	43
3.3 Bedeutung der Pannexine als Kanäle zur myokardialen S1P Freisetzung	60

4. Diskussion	69
4.1 Interpretation und Bewertung der Ergebnisse im Rahmen der aktuellen S1P- Forschung	69
4.1.1 Einfluss von S1P auf die myokardiale Funktion beim Menschen.....	69
4.1.2 Verbesserung der Kontraktionsfähigkeit durch DOP Gabe im murinen Modell	73
4.1.3 Fehlende Verschlechterung der Strain durch Knockout der Pannexin-Kanäle	75
4.1.4 Übertragbarkeit muriner Daten auf den Menschen	76
4.2 Einschränkungen der Arbeit	76
4.2.1 Begrenzte Stichprobengröße.....	76
4.2.2 Messfehler und Messungenauigkeiten	77
4.2.3 DIO-Maus-Modell	78
4.3 Zukunftsaussichten	78
5. Tabellenverzeichnis	81
6. Abbildungssverzeichnis.....	82
7. Literaturverzeichnis	86
Danksagung	

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation überwiegend die männliche Sprachform verwendet. Diese Entscheidung dient der sprachlichen Klarheit und Lesefreundlichkeit; sie schließt jedoch ausdrücklich alle Geschlechter ein.

Darüber hinaus wurde im Rahmen der Erstellung dieser Dissertation unterstützend auf moderne KI-Tools (wie beispielsweise für sprachliche Überarbeitungen und Strukturierungshilfen) zurückgegriffen. Die wissenschaftliche Eigenleistung bleibt hiervon unberührt.

1. Einleitung

Die Prävalenz des Typ 2 Diabetes mellitus (DM2) steigt stetig an und wird in den kommenden Jahrzehnten über 20% der Weltbevölkerung betreffen¹. DM2 ist als relevanter Risikofaktor für das Entstehen und Voranschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen bekannt². Zudem zeigen Patienten mit DM2 sowohl ein schlechtes Auskommen nach akutem Myokardinfarkt (MI) als auch höhere Hospitalisierungs- und Todesraten assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen³.

Diese Beobachtung wird in der Entstehung eines spezifischen kardialen Phänotyps durch die DM2 bedingte Hyperglykämie und Insulinresistenz begründet, wobei es unter diabetischen Bedingungen zu einer verminderten Expression des Glukose-Transporter 4 (GLUT4) auf der Zelloberfläche kommt⁴. Dies führt zu einer verminderten insulinabhängigen Glukoseaufnahme in die Zelle. Als Konsequenz kommt es zu verstärkter β -Oxidation und durch die dabei entstehenden Metabolite zu einer Lipotoxizität. Die myokardialen Zellen gehen hierbei in Apoptose, was zur Entstehung einer kontraktilen Dysfunktion führt⁵.

Im Rahmen dieser diabetisch bedingten kontraktilen Dysfunktion kommt es infolge der verminderten Elastizität des Myokards zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz¹⁶. In der klinischen Routine werden zur Charakterisierung der myokardialen Dysfunktion Marker wie die Ejektionsfraktion (EF) verwendet, wobei Studien gezeigt haben, dass die Speckle-Tracking-Echokardiographie (STE) als eine sensitivere Methode eine Verschlechterung der Herzfunktion deutlich früher detektieren kann als die gängigen Funktionsparameter wie die Ejektionsfraktion sowie das endsystolische und enddiastolische Volumen (ESV, EDV)⁶.

Shingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein biologisch aktives Lipid mit kardioprotektiver Funktion¹⁷. Es konnte bereits im murinen Modell gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel einen protektiven Einfluss zu haben scheinen⁷. Darüber hinaus wurde bei Menschen bereits ein Zusammenhang in Form einer U-Kurve zwischen der freien S1P-Konzentration im Plasma und dem Body-Mass-Index (BMI) festgestellt³². Aktuelle Daten lassen darauf schließen, dass erhöhte S1P Plasmakonzentrationen kardioprotektiv wirken

und Patienten mit höheren S1P Spiegeln ein verbessertes Auskommen nach MI zeigen, weshalb S1P derzeit als potenzieller Modulator in der Behandlung von Patienten mit DM2 untersucht wird⁸.

1.1 Diabetes Mellitus und Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System

1.1.1 Diabetes Mellitus

Der Typ-2-Diabetes mellitus gehört zu den am häufigsten auftretenden chronischen Stoffwechselerkrankungen weltweit und ist durch eine steigende Prävalenz gekennzeichnet. Daten aus epidemiologischen Studien aus dem Jahr 2021 belegen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits 529 Millionen Menschen, was einem Anteil von insgesamt 6,1 % der Weltbevölkerung entspricht, an dieser Krankheit litten. Prognosen lassen den Schluss zu, dass bis zum Jahr 2050 über 1,3 Milliarden Menschen betroffen sein werden. Des Weiteren lässt sich eine deutliche sozio-geografische Verteilung dieser pandemischen Entwicklung beobachten. Die höchsten prozentualen Prävalenzen sind insbesondere in Nordafrika, dem Nahen Osten, Lateinamerika sowie den karibischen Inseln zu beobachten^{2,1}.

Diese Entwicklung ist zum einen auf die weltweit steigende Lebenserwartung, zum anderen auf die zunehmende Urbanisierung ehemals wirtschaftlich schwächerer Länder zurückzuführen. In diesen Ländern findet eine Angleichung des Lebensstils an den der Industrienationen statt, während der Zugang zu medizinischer Versorgung weiterhin begrenzt bleibt. In der Konsequenz stellt der Typ-2-Diabetes somit nicht nur eine Herausforderung im Hinblick auf die Gesundheit, sondern auch auf die Gesellschaft und die Wirtschaft dar¹.

Die Ätiologie des DM2 ist multifaktoriell und basiert im Wesentlichen auf einer Insulinresistenz mit einer gestörten Insulinsekretion und daraus folgender Hyperglykämie, wobei die genetische Prädisposition, Adipositas, unzureichende körperliche Aktivität sowie ungesunde Ernährungsgewohnheiten als wesentliche Risikofaktoren gelten⁹. Neben der gängigen klinischen Klassifikation des Diabetes mellitus in Typ 1 und Typ 2 erfährt die Einteilung nach biochemischen Kriterien im klinischen Alltag eine zunehmende Relevanz¹⁰. In der Konsequenz lässt sich der Diabetes mellitus in

vier Gruppen unterteilen: Typ 1, dessen Ursache eine autoimmune Zerstörung der β -Zellen des Pankreas ist, Typ 2, der durch eine zunehmende Insulinresistenz bedingt ist, Typ 3, bei dem andere Faktoren wie Noxen oder Begleiterkrankungen zu einer unzureichenden Insulinausschüttung führen, sowie Typ 4, der in der Schwangerschaft auftritt und in der Klinik als Gestationsdiabetes bezeichnet wird^{11,12}.

Gegenwärtig werden Forschungsarbeiten durchgeführt, welche die Möglichkeit einer Phänotypisierung von Patienten mit Diabetes mellitus in sogenannte Diabetes-Cluster untersuchen. Dabei werden als Kriterien das Alter, der BMI, die Blutzuckerwerte sowie Autoantikörper herangezogen. Die durchgeführte Clusteranalyse ergab eine Einteilung der Patienten mit Typ-1- oder Typ-2-Diabetes in fünf mögliche Cluster: mild altersbedingter Diabetes, mild adipositasbedingter Diabetes, schwerer autoimmuner Diabetes, schwer insulinresistenter Diabetes und schwer insulinmangelbedingter Diabetes. Die hier vorgestellte Clusteranalyse zielt darauf ab, zukünftig eine verbesserte Identifikation von Komplikationen zu ermöglichen, was wiederum eine optimierte Prävention und Behandlung zur Folge haben soll¹³.

1.1.2 Diabetes Mellitus als relevanter Risikofaktor für den akuten Myokardinfarkt

Der DM2 ist als Co-Faktor an der Pathogenese diverser Folgeerkrankungen maßgeblich beteiligt, insbesondere im kardiovaskulären Bereich. Zu den häufigsten Folgeerkrankungen gehört die Entwicklung und Förderung der Atherosklerose, deren Hauptkomplikation u. a. der akute Myokardinfarkt ist, der weltweit immer noch eine der häufigsten Todesursachen darstellt¹⁴.

Die im Rahmen des DM2 bestehende Hyperglykämie und Insulinresistenz bedingt einen erhöhten oxidativen Stress auf die Kardiomyozyten. Ein langfristig erhöhter Blutglukosespiegel trägt zur Bildung von *Advanced Glycation End Products* (AGEs) bei, welche insbesondere die endotheliale Gefäßwand schädigen und gemeinsam mit weiteren physikalischen Faktoren, wie beispielsweise der arteriellen Hypertonie, an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sind. Des Weiteren kommt es zu einer verstärkten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche durch ihre proinflammatorische Wirkung ebenfalls an der Genese der Atherosklerose beteiligt sind¹⁵.

Zu den häufigsten Komplikationen der Atherosklerose zählt die koronare Herzkrankheit (KHK), aus der sich ein akuter Myokardinfarkt entwickeln kann¹⁴. Patienten mit DM2 zeigen ein höheres Risiko einen MI zu erleiden als Patienten ohne DM2. Des Weiteren ist das Auskommen nach einem MI für Menschen mit DM2 deutlich schlechter, bedingt durch die schlechtere Adaption an ischämische Bedingungen und Ausbildung größerer Infarktareale mit konsekutiv verschlechterter myokardialer Funktion^{3,14}.

1.1.3 Diabetes Mellitus und damit assoziierter kardialer Phänotyp

Im Rahmen der Erkrankung des DM2 kommt es in Folge der längerfristig bestehenden Hyperglykämie unter anderem zu einer verminderten Translokation des Glukose-Transporter 4 (GLUT4) an die Zelloberfläche der Kardiomyozyten. Diese insulinabhängigen Transmembranproteine fungieren als primäre Glukosetransporter für die myokardialen Zellen. In Konsequenz der bei DM2 vorliegenden Insulinresistenz erfolgt eine verminderte Expression dieser Transporter⁴. Infolge der unzureichenden Versorgung der Zellen mit Glukose erfolgt eine vermehrte Oxidation von Fettsäuren, β -Oxidation, zur Aufrechterhaltung des Energiehaushalts der Zellen. Im Rahmen dessen werden jedoch toxische Metabolite freigesetzt, wodurch eine Schädigung der Kardiomyozyten bewirkt wird, welche in der Folge durch Apoptose absterben⁵.

Die beschriebenen molekularen Mechanismen resultieren in der Entwicklung eines spezifischen kardiologischen Phänotyps, der bei Patienten mit Typ-2-Diabetes häufig zu beobachten ist⁴. Der myokardiale Phänotyp, der im Rahmen des DM2 auftritt, ist durch eine kontraktile Dysfunktion des Herzens gekennzeichnet, welche sich klinisch als Herzinsuffizienz (HF) manifestiert, jedoch nicht durch koronare Herzkrankheit, Klappenvitien oder arterielle Hypertonie bedingt ist¹⁶. Die Ursachen hierfür werden von Rubler et al. als Kombination aus der zugrunde liegenden Hyperglykämie beschrieben, welche eine Vielzahl nachteiliger Auswirkungen hat. Dazu gehören eine beeinträchtigte Kalziumverarbeitung in den Myozyten, erhöhter oxidativer Stress, eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, Mikroangiopathie und die Myokardfibrose. Im Vergleich zu altersgleichen Patienten ohne DM2 ist das Risiko für eine Herzinsuffizienz bei Patienten mit DM2 zwei- bis fünfmal höher. Im Frühstadium der

diabetisch assoziierten Herzinsuffizienz lassen sich zunächst typischerweise eine Dilatation der Vorhöfe, myokardiale Steifheit, verminderte diastolische Füllung sowie erhöhte diastolische Druckverhältnisse in den linken und rechten Ventrikeln feststellen¹⁶.

Diese mit einem DM2 assoziierten Alterationen, welche in höheren Prävalenzen für eine Herzinsuffizienz resultieren, machen es erforderlich, therapeutische Ansätze zu finden, um den Effekt zu verlangsamen.

1.2 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat ist ein biologisch aktives Lipidprotein, das aus Sphingolipiden gebildet wird und an zahlreichen physiologischen Funktionen beteiligt ist¹⁷. Die Biosynthese von S1P erfolgt biochemisch durch eine Dephosphorylierung des Vorläufermoleküls Sphingomyelin, welches durch das Enzym Sphingomyelinase umgesetzt wird. Im Anschluss erfolgt eine Hydrolysierung des Zwischenproduktes Ceramid durch die Ceramidase. In der Folge entsteht Sphingosin, welches im letzten Schritt durch die Sphingosinkinase zu S1P phosphoryliert wird^{17,18}. Die Regulation des S1P-Haushalts erfolgt durch das Enzym S1P-Lyase, welches S1P zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin spaltet¹⁸.

Die Wirkung im Körper wird durch eine G-Protein-gesteuerte Signaltransduktion über insgesamt fünf Sphingosin-Rezeptoren (SPR) freigesetzt. Diesbezüglich sind insbesondere die Rezeptoren S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 und S1PR5 zu nennen¹⁸. Im kardiovaskulären System finden sich vornehmlich die S1PR1- und S1PR3-Rezeptoren, welche auf Kardiomyozyten, Endothel- und Gefäßmuskelzellen lokalisiert sind und dort die Angiogenese und Zellproliferation beeinflussen¹⁹. S1PR2 ist vornehmlich in den Bronchien lokalisiert, wo es die Degranulation von Mastzellen und folglich die Histaminausschüttung beeinflusst²⁰. Im zentralen Nervensystem ist insbesondere der S1PR5 zu finden, wo er das Überleben von Oligodendrozyten zu beeinflussen scheint²¹.

Aufgrund seiner lipophilen Natur ist freies S1P auf die Präsenz von Trägerproteinen angewiesen, um im Blutkreislauf zirkulieren zu können. Im Anschluss an die Bildung von S1P erfolgt der Transport zu 60–70 % durch das *High-Density-Lipoprotein* (HDL)

sowie zu 30 % durch Albumin. Innerhalb der HDL-Fraktion scheint vorwiegend das Apolipoprotein M als hochaffiner Haupt-S1P-Transporter zu fungieren^{22,23}.

Obgleich bislang keine S1P-Modulatoren für eine medikamentöse Therapie zugelassen sind, finden sich in der Behandlung der Multiplen Sklerose Pharmaka, welche über S1P-Rezeptoren wirken²⁴. Für das Herz-Kreislauf-System sind derartige Therapien bislang nicht verfügbar, obwohl zahlreiche Hinweise auf eine bestehende Kardioprotektion bestehen (siehe oben).

1.2.1 Shingosin-1-Phosphat und seine Wirkung auf das kardiovaskuläre System

Der Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle im kardiovaskulären System, insbesondere für das Zellüberleben, die Apoptose, die Angiogenese sowie die Reaktion auf ischämische Bedingungen^{7,26}.

In verschiedenen tierexperimentellen *in-vivo*-Versuchen konnte dieser Effekt bereits beobachtet werden. So führten S1P Injektionen während Ischämie/Reperusionsversuchen (I/R) zu einer Reduzierung der Infarktgröße im murinen Modell⁷. In einem ähnlichen Versuchsaufbau konnten ähnliche Effekte durch Zugabe von Fingolimod, einem S1P-Rezeptor-Agonisten, erzielt werden²⁵.

In weiteren *in-vivo*-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die pharmakologische Hemmung der S1P-Lyase durch 4-Desoxypyridoxine (DOP) zu einem besseren *Outcome* gemessen an der EF drei Wochen nach Infarkt bei gleicher Infarktgröße führt²⁶. Diese Wirkung basiert vor allem auf einer reduzierten Fibrosierung des myokardialen Herzmuskelgewebes, vermittelt durch die Rezeptoren S1PR1, die vorwiegend auf Kardiomyozyten exprimiert sind, und S1PR3, die hauptsächlich auf Fibroblasten im Herzgewebe vorkommen^{27,28,29}. Die Hemmung entzündlicher Prozesse sowie die vermehrte Expression von *α -smooth muscle actin* sind weitere Effekte, die durch die Rezeptoren vermittelt werden. Diese tragen zur Verringerung der Infarktgröße bei und reduzieren gleichzeitig die Fibrosierung des Herzmuskelgewebes^{7,30}. In der Konsequenz lässt sich ableiten, dass S1P ein potenziell kardioprotektiver Mediator ist, der unabhängig von der Revaskularisierung einen positiven Effekt auf das myokardiale *Remodeling* nach einem ischämischen Ereignis zu haben scheint²⁵.

Des Weiteren konnte bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie nachgewiesen werden, dass niedrige S1P-Spiegel negativ mit der EF und der Symptombelastung im Sinne, der von der *New York Heart Association* Klassifikation zur Erfassung von Herzkrankheiten, assoziiert sind³¹. Darüber hinaus konnte bei Patienten, die einen ST-Hebungsinfarkt (STEMI) erlitten hatten, nachgewiesen werden, dass erhöhte S1P-Plasmakonzentrationen mit einem verbesserten myokardialen *Outcome* nach Myokardinfarkt assoziiert waren. Die Sterblichkeit der Patienten, gemessen an kardiovaskulär bedingter Mortalität nach sechs Monaten, war geringer und auch die Infarktnarbe präsentierte sich verringert⁸.

In den bisher vorliegenden grundlagenwissenschaftlichen Studien wurden jedoch nur Versuchstiere mit physiologischem Glukosestoffwechsel verwendet. Zudem wurden in der STEMI-Kohorte Patienten mit und ohne Typ-2-Diabetes nicht getrennt betrachtet. Vor dem Hintergrund der Erkenntnis, dass Menschen mit Typ-2-Diabetes ein noch ungünstigeres Auskommen nach MI haben, ist die Suche nach therapeutischen Ansätzen zur Verbesserung der Infarktgröße und des *Remodelings* für diese Gruppe von besonderer Bedeutung.

Eine Datenanalyse von über 4000 Patienten, durchgeführt von unserer Kooperationspartnerin Dr. rer. nat. Sarah Weske, zeigt einen U-förmigen Zusammenhang zwischen dem BMI und der S1P-Konzentration. So konnte in dieser Arbeit ein deutlicher Abfall der S1P-Konzentration bei einem BMI von 30 kg/m² beobachtet werden³².

Die Ergebnisse von Forschungsarbeiten, welche den Einfluss von S1P auf den diabetischen Stoffwechsel untersucht haben, lassen den Schluss zu, dass S1P insbesondere für Patienten mit einem DM2 relevante Wirkungen zu haben scheint⁸. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine gesteigerte Aktivierung des S1P-Signalwegs eine Reduzierung des Blutzuckerspiegels durch Protektion und Reduzierung der Apoptose der β -Zellen im Pankreas bewirkt³³. Der schützende Effekt auf das pankreatische Gewebe konnte bereits in diabetischen Mausmodellen durch die Gabe des S1P-Agonisten Fingolimod bestätigt werden³⁴. Darüber hinaus kann S1P die Entzündung der Mesangialzellen über die SphK1- und S1PR2-Wege reduzieren, wodurch Nierenschäden, die im Rahmen des DM2 auftreten, verringert werden können und zudem die Glukoseausscheidung reguliert werden kann^{35,36}. Zusammenfassend lässt sich festhalten,

dass S1P im diabetischen Stoffwechsel sowohl protektiv als auch teils therapeutisch zu wirken scheint. Es dient zum einen dem Schutz der β -Zellen des Pankreas, zum anderen der Verringerung der Insulinresistenz der Skelettmuskulatur. Gleichzeitig verbessert es die hepatische Glukoseaufnahme und Glykolyse sowie den intestinalen Inkretin-Effekt, was zu einer Senkung des Blutzuckerspiegels führt³³.

In Zusammenschau mit den von Rubler et al. beschriebenen Beobachtungen zu myokardialen Veränderungen bei Patienten mit DM2 sowie den Effekten von S1PR1 und S1PR3 auf die Verringerung der Infarktgröße und Fibrosierung nach einem MI lässt sich ableiten, dass S1P für Diabetiker von noch größerer Bedeutung sein könnte als für Nicht-Diabetiker. Des Weiterhin scheint S1P neben seinem protektiven Einfluss auf das kardiovaskuläre System auch eine wichtige Rolle in der Behandlung und Prävention von DM2 und dessen Komplikationen zu spielen. In Anbetracht der Beobachtung, dass Menschen mit erhöhten Blutzuckerspiegeln eine verminderte S1P-Konzentration aufweisen, ist eine weitere Untersuchung dieses Zusammenhangs in diabetischen Zuständen von essenzieller Bedeutung.

1.2.2 Pannexin-Kanäle

Die Gruppe der Pannexine umfasst eine Reihe von Membrankanälen, die im Gegensatz zu den *Gap Junctions* keine typischen synaptischen Verbindungen zwischen Zellen bilden, sondern vielmehr den intrazellulären mit dem extrazellulären Raum verknüpfen³⁷. Die Familie der Pannexine umfasst das weit verbreitete Pannexin-1, das im Körper, einschließlich des Herzens, vorkommt, das hauptsächlich im zentralen Nervensystem lokalisierte Pannexin-2 sowie das vorwiegend in der Haut, im Knorpel und in den Knochen anzutreffende Pannexin-3³⁸.

Insbesondere im Bereich des zentralen Nervensystems konnte bereits nachgewiesen werden, dass Pannexin-1-Kanäle maßgeblich an der Pathogenese von Krankheitsbildern wie dem ischämischen Schlaganfall und der Epilepsie beteiligt sind³⁹. Aufgrund seiner Eigenschaft als Membranprotein spielt Pannexin-1 eine wesentliche Rolle bei der Freisetzung von Adenosintriphosphat, der Regulation von Entzündungsprozessen sowie der Kalziumhomöostase und Zellmigration⁴⁰.

1.2.3 Die Rolle von Pannexin-1-Kanälen und S1P im myokardialen Gewebe

In Bezug auf den Gesamtgehalt an endogenem S1P kann eine Unterteilung in gewebegebundenes und frei zirkulierendes S1P vorgenommen werden. Die Konzentration von S1P im Plasmalager wird im Ruhezustand neben der Bindung an Apolipoprotein vornehmlich von Erythrozyten und Endothelzellen reguliert⁴¹. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass in Thrombozyten größere Mengen an S1P gespeichert werden können, da dort die S1P-Lyase nicht vorhanden ist. Anstelle einer endothelialen Läsion, wie beispielsweise im Rahmen eines atherosklerotischen Geschehens, kann das aus Thrombozyten gewonnene S1P durch Aktivierung von Thrombin eine entscheidende Rolle bei koronaren Ereignissen spielen^{42,43}. In einigen Berichten wird darauf verwiesen, dass sich eine Stunde nach der Ligatur der linken Koronararterie (LAD) im *in-vivo*-Modell die S1P-Konzentrationen in Plasma, Erythrozyten und insbesondere Thrombozyten reduziert⁴⁴. Andere Studien weisen wiederum auf einen langanhaltenden Anstieg bis zu fünf Tagen nach der LAD-Ligatur hin⁴⁵.

Die beschriebenen, dynamischen S1P-Spiegel lassen die Vermutung zu, dass ein weiterer Mechanismus der Freisetzung von S1P in Betracht gezogen werden muss. In einer Studie von Vessey et al. konnte beispielsweise ein schützender Effekt von S1P nachgewiesen werden, welches aus Pannexin-Kanälen freigesetzt wird. In diesem Kontext ist insbesondere der Pannexin-1-Kanal von entscheidender Bedeutung, der überwiegend auf Kardiomyozyten exprimiert wird. Im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung wurde im *ex-vivo* Langendorff-Modell eine unspezifische Hemmung des Pannexin-Kanals beobachtet, was zu einer Verschlechterung der myokardialen Funktion führte. In diesem Kontext wird durch den Pannexin-1-Kanal die Freisetzung kardioprotektiver Metabolite, darunter auch S1P, initiiert, die im Kardiomyozyten protektive Eigenschaften aufweisen⁴⁶. Allerdings stehen bislang keine Daten zur myokardialen I/R ohne ischämische Präkonditionierung zur Verfügung.

1.3 Transthorakale echokardiografische Untersuchung des Herzens

Die transthorakale Echokardiografie (TTE) stellt eine der am häufigsten zum Einsatz kommenden nicht-invasiven bildgebenden Methoden in der kardiologischen Diagnostik dar. Die Methode erlaubt eine detaillierte Darstellung der Struktur und Funktion des

Herzens. Zu diesem Zweck werden Schallwellen durch die Brustwand gesendet und ihre Echos erfasst. Im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren werden dabei weder Strahlung noch Kontrastmittel verwendet⁸⁹.

Die TTE erlaubt die detaillierte Untersuchung aller vier Herzkammern (linker und rechter Vorhof sowie linke und rechte Herzkammer) sowie aller vier Herzklappen (Mitralklappe, Trikuspidalklappe, Aortenklappe und Pulmonalklappe). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, den Blutfluss über den Klappen mittels Doppler-Ultraschalltechniken zu erfassen. Die Doppler-Funktion ermöglicht zudem die Messung der Geschwindigkeit und Richtung des Blutflusses, wodurch Regurgitationen oder Stenosen der Herzklappen frühzeitig erkannt werden können. In der klinischen Routine findet die TTE überwiegend Anwendung bei der Diagnostik von Klappenvitien und der Herzfunktion⁸⁹.

Die fortlaufende Weiterentwicklung der Ultraschalldiagnostik erlaubt zudem die Detektion myokardialer Dysfunktionen in einem zunehmend frühen Stadium, wodurch eine rechtzeitige Intervention ermöglicht wird. Zu diesen neueren Methoden zählt die Speckle-Tracking-Echokardiographie⁶.

1.3.1 Speckle-Tracking-Strain

Die Speckle-Tracking-Strain stellt eine ergänzende Untersuchungsmethode im Rahmen der 2D-Echokardiographie dar, welche folglich auch als Speckle-Tracking-Echokardiographie bezeichnet wird. Im Rahmen der STE erfolgt eine nicht-invasive Verfolgung und Messung der Herzmuskelbewegung über mehrere Herzaktionszyklen. Die sogenannten "Speckles" stellen dabei eine Mischung aus Interferenzmustern und natürlichen Schallreflexionen dar. Dies bedeutet, dass jeder Bereich des Myokards ein einzigartiges Speckle-Muster aufweist, welches durch das Ultraschallgerät erfasst werden kann. Anschließend erfolgt eine Verfolgung über drei aufeinanderfolgende Herzzyklen, um das Muster in die Analyse miteinbeziehen zu können. Im Rahmen der Untersuchung wird eine sogenannte "Strain" ermittelt, welche die Verkürzung des Myokards beschreibt. Die unterschiedliche Ausrichtung der myokardialen Fasern bedingt die Entstehung von drei Vektoren, auf denen die Verkürzung stattfindet. Dies sind eine longitudinale Achse, eine zirkumferentielle und eine radiale Achse. Die mathematische Darstellung der Strain ist negativ, da die Kontraktion des Myokards in der Systole zu

einer Verringerung der Herzwanddicke führt, während sie in der Diastole, d. h. während der Relaxation, wieder ihre ursprüngliche Dicke erreicht⁶.

Die STE findet bereits in der klinischen Praxis Anwendung bei der Diagnostik einer kardialen Amyloidose, da das entstehende "Bulls-Eye", welches die Kontraktion aller 16 Segmente darstellt, eine eindeutige Darstellung der pathognomonischen Amyloid-Ablagerungen und der damit verbundenen verminderten Kontraktion ermöglicht. Gerade im Frühstadium der Erkrankung ist es mittels konventioneller echokardiographischer Parameter wie beispielsweise der EF nur bedingt möglich eine kardiale Amyloidose zu diagnostizieren. Die STE stellt in diesem Kontext ein wichtiges nicht-invasives diagnostisches Mittel dar⁴⁷.

1.3.2 Speckle-Tracking-Strain bei Patienten mit DM2

Patienten mit DM2 zeigen eine signifikant höhere Prävalenz für eine Herzinsuffizienz. Die molekularen Veränderungen resultieren in einem kardialen Phänotyp, der insbesondere in der Frühphase zu einer diastolischen Dysfunktion führt, noch bevor eine Verschlechterung der Ejektionsfraktion eintritt⁶. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, in der klinischen Diagnostik geeignete Methoden und Marker zu identifizieren, die eine frühzeitige Diagnose und somit auch eine frühzeitige Therapie ermöglichen.

In verschiedenen Arbeiten konnte die STE bereits demonstrieren, dass sie ein sensibler Parameter in der Diagnostik von subklinischen myokardialen Veränderungen ist. In einer Patientengruppe konnte über einen Zeitraum von zwei Jahren eine Verschlechterung der longitudinalen und zirkumferentiellen Strain beobachtet werden, während die EF unverändert blieb⁶. Des Weiteren konnte bei Patienten mit DM2 eine Verschlechterung der longitudinalen Strain bereits vor dem Auftreten erster Symptome einer verminderten linksventrikulären Funktion nachgewiesen werden. Dies ließ sich insbesondere in Korrelation mit der Dauer des DM2 nachweisen⁴⁸. Auch nach Adjustierung von Komorbiditäten, Alter und BMI stellte sich die STE für Patienten mit DM2 sowie normaler EF als bedeutsames diagnostisches Instrument zur Detektion bereits bestehender myokardialer Veränderungen dar⁴⁹. Im Jahr 2019 publizierte die *Heart Failure Association* der *European Society of Cardiology* einen Algorithmus zur Diag-

nostik einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). In diesen Algorithmus wurde die STE integriert, was die diagnostische Relevanz und die Möglichkeit, frühzeitige Veränderungen festzustellen, bestätigt⁵⁰.

1.3.3 S1P und myokardiale Funktionsanalyse

In ersten Publikationen konnte bereits der Zusammenhang zwischen der Konzentration freizirkulierenden S1Ps und einer ischämischen Kardiomyopathie, die sich durch eine Reduktion der Ejektionsfraktion auf unter 35 % kennzeichnet, aufgezeigt werden. Dabei wurde festgestellt, dass die S1P-Konzentration mit Abnahme der EF ebenfalls sinkt³¹. Des Weiteren konnten Subanalysen der *Study of Health in Pomerania* einen Unterschied in der kardialen Struktur und den S1P-Spiegeln aufzeigen. Somit konnten niedrigere S1P-Spiegel bei männlichen Teilnehmern mit einer erhöhten linksventrikulären Wanddicke sowie vergrößerten linksatrialen und linksventrikulären Herzkammern assoziiert werden⁵¹. Weitere klinische Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die genauen Auswirkungen von S1P auf die kardiale Funktion und Struktur zu beschreiben. Die STE stellt ein vielversprechendes Verfahren zur myokardialen Funktionsdiagnostik dar. Bislang gibt es jedoch keine Studien, in denen die Assoziation von frei zirkulierenden S1P-Konzentrationen und STE untersucht wurde.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Die Forschung zum Typ-2-Diabetes mellitus und seinen Konsequenzen ist derzeit ein wichtiger Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Insbesondere im Bereich der Kardiologie nimmt die adäquate Behandlung sowie Prävention diabetesbedingter Folgeerkrankungen einen essenziellen Aspekt für die Zukunft ein. In diesem Zusammenhang kann S1P als eines der möglichen zukünftigen Ziele der Forschung im Bereich der pharmakologischen Therapie genannt werden. Diesbezüglich erfährt der Parameter S1P im Kontext des DM2 eine besondere Relevanz. Die STE stellt in diesem Kontext ein wichtiges diagnostisches Instrument zur Detektion frühzeitig einsetzender myokardialer Veränderungen dar, um eine rechtzeitige Intervention zu ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zunächst zu untersuchen, ob 1) in einer Kohorte von Patienten ein Zusammenhang zwischen den frei zirkulierenden S1P-Plasmaspiegeln und der ermittelten Strain besteht. In einem 2) Schritt sollte im Mausmodell evaluiert werden, ob eine pharmakologische Erhöhung der S1P-Spiegel durch DOP zu einer verbesserten myokardialen Funktion, gemessen an der Strain, nach MI führt. In einem 3) Schritt soll ergänzend analysiert werden, ob die myokardiale Freisetzung von S1P über Pannexine allgemein für die myokardiale Strain nach Infarkt eine Rolle spielt.

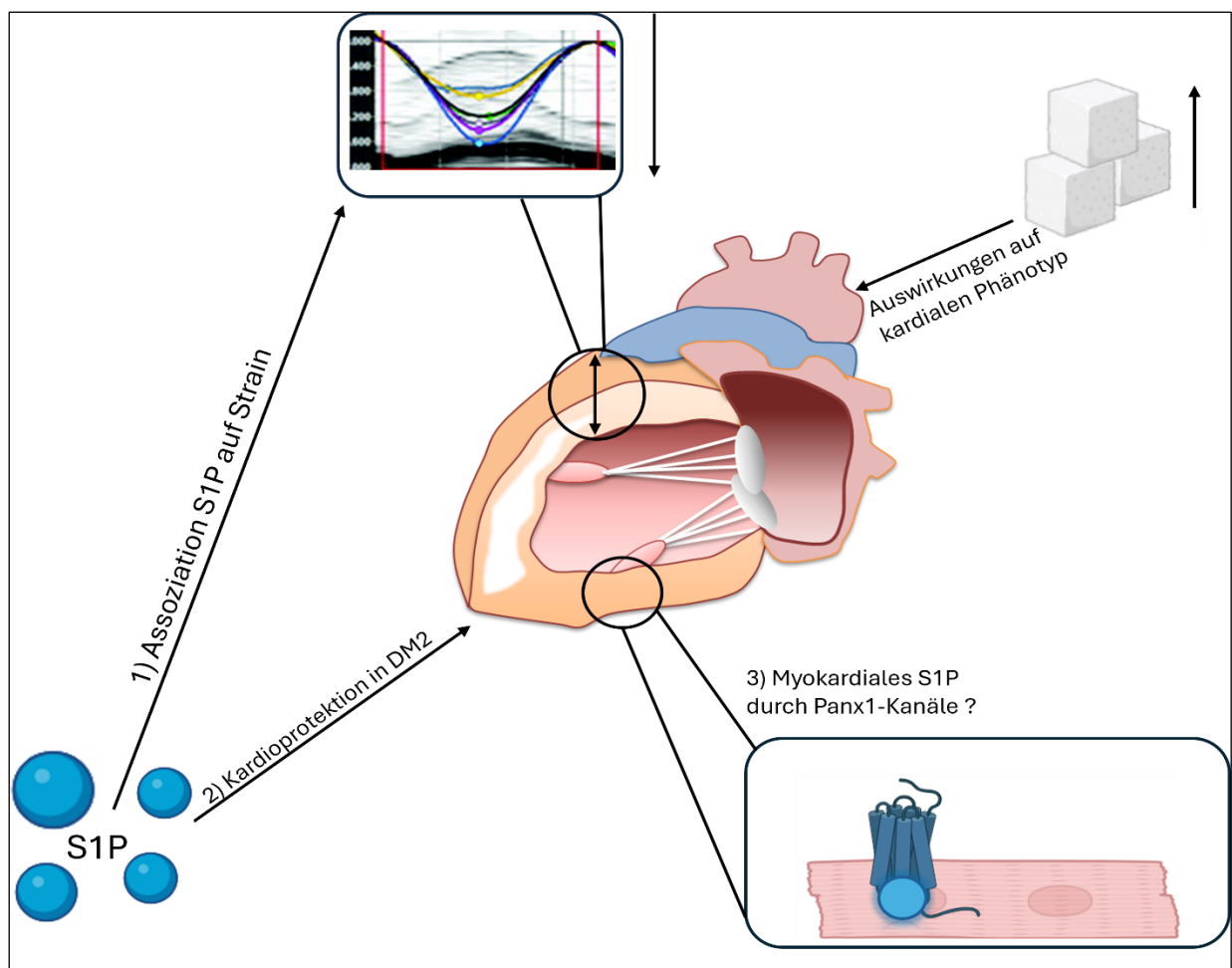


Abbildung 1: Ziele der vorliegenden Arbeit: 1) Assoziation frei zirkulierenden S1Ps auf die myokardiale Strain unter besonderer Betrachtung des diabetisch bedingten kardialen Phänotyps, 2) Ausmaß der kardioprotektiven Eigenschaften erhöhter S1P-Spiegel, 3) Relevanz myokardial freigesetzten S1Ps durch Pannexin-1-Kanäle. Erstellt mit Hilfe von Biorender⁸⁷.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Im Rahmen dieser Dissertation soll der Zusammenhang von S1P auf die myokardiale Strain untersucht werden. Dabei sollen sowohl die strukturellen Veränderungen im Herzen im Kontext einer diabetischen Erkrankung als auch die potenziellen therapeutischen Effekte von DOP bei Tieren mit diabetischen Konditionen untersucht werden. Ferner soll auch betrachtet werden, wie sich zirkulierendes S1P im menschlichen Blutkreislauf auf die myokardiale Strain auswirkt. Es handelt sich um eine kombinierte klinische Beobachtungsstudie mit einer experimentellen Tierstudie. Die Studiendauer umfasste einen Zeitraum von 3 Jahren und umfasste die Rekrutierung der Patienten, Datenerhebung, Durchführung der Tierversuche und Analyse der Ergebnisse.

2.2 Genehmigung des Versuchsvorhabens

Das murine Versuchsvorhaben wurde von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (2021.A218). Für die klinische Patientenstudie liegt ein positives Ethikvotum vor (Studien-Nr.:2021-1714). Das Zertifikat der erfolgreichen Teilnahme am Kurs der „Einführung in die Versuchstierkunde“ befindet sich im Anhang.

2.3 Patientenstudie

Im Rahmen des klinischen Teils dieser Arbeit wurde eine Kohorte von Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf untersucht, die im Rahmen einer klinischen Indikation eine TTE erhalten haben. Die Einschlusskriterien umfassten erwachsene Patienten, die kooperativ und einwilligungsfähig waren und das 18. Lebensjahr erreicht haben. Als Ausschlusskriterien galten eine fehlende Einwilligung, eine laufende chemotherapeutische Behandlung, die Minderjährigkeit der Patienten sowie der Umstand, dass die Patienten bereits isoliert perikardiale Untersuchungen im Rahmen einer Perikarderguss-Diagnostik erhalten hatten. Weiterführend wurden Patienten mit

frischem Myokardinfarkt nicht miteinbezogen. Dies ermöglichte die Untersuchung der S1P-Spiegel unter stabilen Konditionen mit Fokus auf die myokardiale Strain.

Einschlusskriterien	• Alter >18 Jahre • Patienten der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie die eine klinisch indizierte transthorakale Echokardiographie erhalten haben • Personen, die in der Lage sind, die Anweisungen des Studienpersonals zu verstehen sowie ihnen Folge zu leisten • Schriftliche Einwilligungserklärung
Ausschlusskriterien	• Alter <18 Jahre • Fokussierte echokardiographische Untersuchung zum Ausschluss eines Perikardergusses • Aktive Tumorerkrankung die mittels Chemotherapie behandelt wird • Unvermögen den Anweisungen des Studienpersonals Folge zu leisten • Fehlende schriftliche Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien der Patientenkohorte

Im Rahmen des Einschlusses wurde den Patienten eine Blutprobe entnommen, um die S1P-Konzentration zu bestimmen, sowie lebensstilbezogene Fragen gestellt. Diese bezogen sich unter anderem auf den Aktivitätsstatus der Patienten, sowie auf die Ernährung, den Raucherstatus und eine eventuell vorhandene familiäre Disposition für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Des Weiteren wurden Daten zu Vorerkrankungen, Medikation, Laborwerten sowie TTE-Befunden aus dem Kliniksystem *Medico* extrahiert.

2.3.1 Biosampling

Zusätzlich zu klinischen Daten wurde den Patienten als Teil des Projekts eine Blutprobe bestehend aus zwei Heparin- und drei EDTA-Röhrchen (ca. 15ml Gesamtvolumen) entnommen. Die Heparin-Röhrchen wurden anschließend in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 10 Minuten bei 800G zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Plasmaschichten vorsichtig abpipettiert und in separate, beschriftete Eppendorf-Röhrchen überführt.

Die EDTA-Blutproben wurden bei 250g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dabei wurden die Proben in drei Komponenten aufgetrennt: plättchenreiches Plasma (PRP),

Erythrozyten und *Buffy Coat*. Das PRP wurde vorsichtig abpipettiert und in separate Röhrchen überführt. Die Erythrozyten wurden in separate Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Der *Buffy Coat* wurde verworfen. Eines der PRP-Röhrchen wurde erneut bei 1700g für eine Minute bei 4°C zentrifugiert, um Thrombozyten und anderes Zellmaterial abzutrennen. Anschließend wurde das nun plättchenarme Plasma abpipettiert und das verbleibende *Pellet* separiert. Alle Proben wurden gesammelt und bei -80°C gelagert.

Material/Geräte	Typ und Hersteller
Blutentnahmeset mit Halter (BD Vacutainer® Safety-Lok™ 21G/23G)	BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
EDTA-Röhrchen (BD Vacutainer K2E, 3ml)	BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Plasmaröhrchen mit Trenngel (BD VACUTAINER® PST II, 8ml)	BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Einmalhalter aus Kunststoff (BD Vacutainer® Einmalhalter)	BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
Hautantiseptikum kodan® Tinktur forte farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Medimex Venenstauer classic	Medimex GmbH, Limburg, Deutschland
Medizinische Untersuchungshandschuhe (Abena® Classic Nitrile Powder-Free)	Abena GmbH, Zörbig, Deutschland
Pflasterrolle (3M™ Transpore™)	3M Deutschland GmbH Health Care Business, Neuss, Deutschland
Zellstofftupfer (L&R Zelletten®, 5 x 4 cm)	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KGm Rengsdorf, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten, verschieden Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, verschieden Größen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zentrifuge Microstar 17R	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Mikro 2000R	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 2: Material und Geräte für das Biosampling

2.3.1.1 Konzentrationsbestimmung von frei zirkulierendem S1P im Plasma

Um die Plasmaspiegelkonzentration von frei zirkulierendem S1P zu bestimmen, wurden die Proben im Labor von unserem Kooperationspartner Prof. Levkau mittels LC-MS/MS am Institut für Molekulare Medizin III untersucht.

2.3.2 Echokardiographie mit Ermittlung der Speckle-tracking-Strain

Alle eingeschlossenen Patienten erhielten im Rahmen einer klinischen Indikation eine transthorakale Echokardiographie. Diese wurde unter standardisierten Bedingungen von erfahrenen Kardiologen mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät und einem 2,5MHz-Schallkopf durchgeführt (Vivid E95, GE HealthCare).

Um optimale Schallbedingungen zu erhalten, wurden die Patienten in Linksseitenlage positioniert. Nach Anbringung von elektrokardiographischen (EKG)-Elektroden zur gleichzeitigen Erfassung der Herzaktivität wurden mehrere Standardansichten des Herzens aufgenommen, darunter die parasternal lange Achse, die parasternal kurze Achse, die apikale Vierkammeransicht, die apikale Zweikammeransicht und die apikale Dreikammeransicht. Zudem erfolgte die Messung von Blutflussgeschwindigkeit und -richtung innerhalb des Herzens und der angrenzenden Gefäße sowie eine Gewebedoppleruntersuchung zur Beurteilung der myokardialen Bewegung und Funktion.

Im Rahmen der Fragestellung wurde zudem die myokardiale Strain ermittelt. Hier wird die Deformation des Herzmuskels durch Verfolgung spezifischer Bildmuster (Speckles) über den Herzzyklus hinweg analysiert. Diese entstehen durch die Reflexion der Ultraschallwellen durch die mehrschichtige Anordnung der Myokardzellen. Ein „Speckle“ stellt hierbei eine Region von mehreren Pixeln dar. Mit Hilfe der *Automated Function Imaging* und *EchoPAC* (GE HealthCare) Software kann sowohl die longitudinale als auch die zirkumferentielle Strain ermittelt und analysiert werden. Für jede Ansicht werden mindestens drei aufeinanderfolgende Herzzyklen aufgezeichnet und analysiert. In dieser Arbeit wird hauptsächlich die GLS bei Patienten genannt. Diese wird primär aus der apikalen Vierkammeransicht, dem Dreikammerblick und dem Zweikammerblick erstellt, die die Speckles entlang der Längsachse des linken Ventrikels verfolgen. Die erhaltenen Strain-Werte werden in Prozent ausgedrückt, wobei negative

Werte für eine Verkürzung und positive Werte für eine Verlängerung der myokardialen Zellen stehen.

Zusätzlich zu den Strain-Werten wurden auch konventionelle echokardiographische Parameter, die Aussage über die systolische- sowie diastolische Funktion erlauben, erhoben und analysiert.

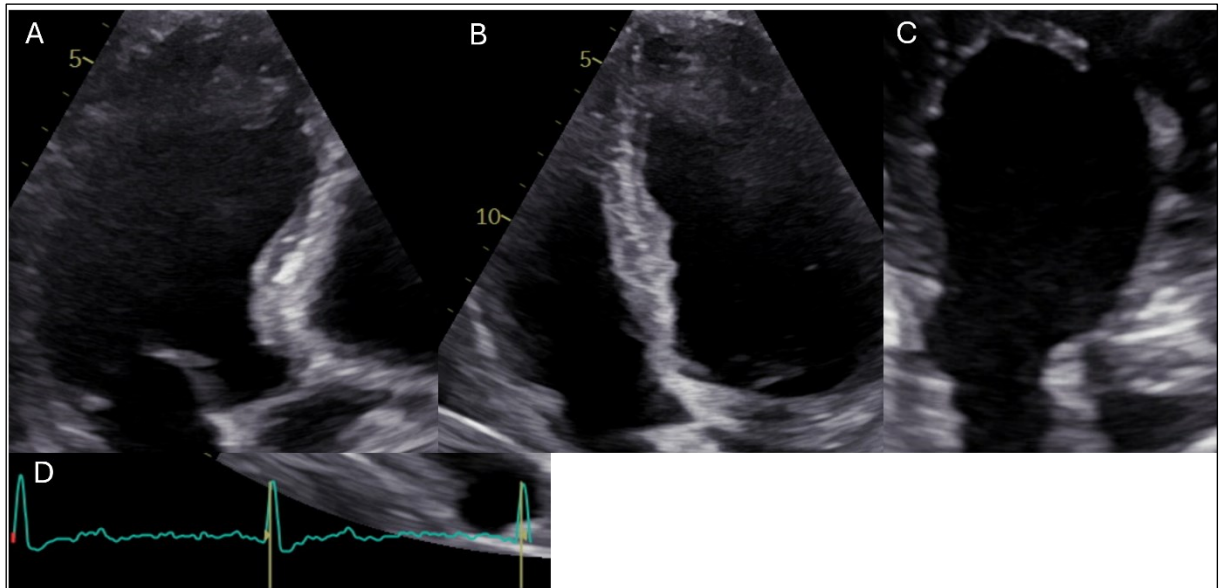


Abbildung 2: Echokardiographische Einstellung zur Bestimmung der myokardialen Strain: A) 3-Kammerblick, B) 4-Kammerblick, C) 2-Kammerblick, D) begleitendes EKG

2.4 Versuchstiere, Zucht- und Haltungsbedingungen

Im Rahmen der murinen Versuche wurden C57BL/6J-Mäuse der Firma Janvier verwendet. Die im Alter von 12 Wochen in die Experimente einbezogenen Tiere wurden während der Zucht in speziellen Käfigen, sogenannte Makrolon-Typ-II-Käfige mit einer Grundfläche von 350 cm² mit entstaubtem Weichholzgranulat als Einstreumaterial, gehalten. Die Tiere wurden mit dem Zuchtfutter M-Zucht von ssniff® sowie mit Wasser, das mit Ozon und Salzsäure angesäuert wurde (pH-Wert = 2,6–3), gefüttert. Die Innentemperatur der Zuchträume wurde konstant auf 22 ± 2 °C reguliert, wobei eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % gewährleistet wurde.

Die Beleuchtung der Räume erfolgte täglich zwischen 07:00 und 19:00 Uhr (mitteleuropäischer Zeit). Zur Schaffung von Rückzugs- und Nestbaumöglichkeiten für die Tiere wurde autoklavierter Zellstoff in die Käfige gelegt.

2.4.1 Diabetisches Mausmodell

Für das diabetische Mausmodell (DIO) wurden männliche C57BL/6J-Mäuse im Alter von 12 Wochen verwendet. Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen wie die *normal-chow-diet* (NCD) Gruppe gehalten. Zur Induktion des diabetischen Zustandes, erfolgte eine *high-fat-diet* (EF Bio-Serv #F1850 mod. 24% sucrose HF 35.85% lard) für 24 Wochen. Die NCD-Gruppe erhielt das reguläre Zuchtfutter. Beide Gruppen erhielten unbegrenzten Zugang zu Wasser.

Im Rahmen der Vorschriften zur Versuchstierhaltung, wurde der Zustand der Mäuse wöchentlich mittels *Score Sheets* überwacht. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf den allgemeinen Zustand, Nahrungs- und Wasseraufnahme, Fellfarbe und Fellbeschaffenheit und allgemeines Verhalten der Tiere gelegt. Zeigte ein Versuchstier starke Belastungszeichen, wurde es mittels zervikaler Dislokation euthanasiert.

2.4.2 Behandlung mit DOP

Im Kontext des Projekts wurde zusätzlich der Nutzen von dem S1P Lyase-Inhibitor 4-deoxypyridoxine auf das myokardiale *Outcome* der Versuchstiere untersucht. Hierfür wurde einer zusätzlichen Gruppe von NCD-Tieren und einer weiteren DIO-Gruppe im Alter von 24 Wochen für 12 Wochen DOP über das Trinkwasser in einer Konzentration von 180mg/L verabreicht. Die übrige Haltung entsprach denen der Kontrolltiere (siehe oben).

2.4.3 Pannexin-1-Knockout-Maus

Im Rahmen dieser Arbeit wurden retrospektiv echokardiographische Bilder von Pannexin-1-defizienten (Pannx1^{-/-}) Mäusen ausgewertet. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit keine neuen Tiere gezüchtet und keine neuen echokardiographischen Bilder angefertigt. Dennoch folgt im Rahmen der Vollständigkeit eine kompakte Erklärung des Mausmodells.

Um das Pannexin-1-Gen auszuschalten, wurde ein Target-Vektor durch homologe Rekombination in das Genom eingebracht, was zu einem Transkriptionsstopp des Pannexin-1-Gens führte. Der eingesetzte Vektor enthielt ein bakterielles Reportergen, welches die Expression der Beta-Galaktosidase ermöglichte. Die Integration eines Stoppsignals innerhalb dieser Sequenz führte zu einer vorzeitigen Beendigung der Transkription. Zur Selektion von Zellen mit korrekt integrierter Zielsequenz wurde ein durch den Phosphoglycerat-Kinase-Promotor gesteuertes Neomycin-Resistenzgen eingesetzt. Nach erfolgreicher Etablierung der transgenen Zelllinie konnte diese Selektionskassette mittels eines Cre/LoxP-basierten Rekombinationssystems wieder entfernt werden. Dabei fungierten die flankierenden loxP-Stellen als Schnittstellen für die Cre-Rekombinase, welche eine gezielte Exzision des Resistenzmarkers ermöglichte. Das DNA-Fragment für den Vektor stammte aus der 129/SvJ Maus-Datenbank von Stratagene. Nach Entfernung der Neomycinkassette wurden die Mäuse wieder mit C57BL/6 Mäusen rückgekreuzt.

2.5 Ischämie und Reperfusion

Nachdem die C57BL/6 Versuchstiere ihre Diät-Behandlung abgeschlossen hatten, wurde ein Ischämie/Reperfusionsversuch durchgeführt. Hierbei wurde die linke Koronararterie für einen Zeitraum von 30 Minuten verschlossen und anschließend wieder eröffnet, um so einen Myokardinfarkt zu simulieren.

Um eine angemessene Schmerzstillung zu gewährleisten, wurde den Mäusen eine halbe Stunde vor der Operation Buprenorphin (0,1 mg/kg, s.c., maximal 10 ml/kg Körpergewicht) verabreicht. Anschließend wurden die Tiere in eine Induktionskammer gesetzt, in der sie mit Isofluran (3 Vol.% in 40 % mit Sauerstoff angereicherter Raumluft) anästhesiert wurden. Nach Erreichen einer vollständigen Anästhesie, erkennbar durch das Ausbleiben der Zwischenzehenreaktion, erfolgte die Intubation der Maus mittels 20G Venenverweilkatheter. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde durch die Gabe von Isofluran (2 Vol.% in 40 % mit Sauerstoff angereicherter Raumluft) über einen speziellen murinen Respirator sichergestellt.

Nach Einleitung der Narkose wurde der Thorax mittels Enthaarungscreme enthaart und anschließend desinfiziert. Zusätzlich wurde eine Augensalbe (Bayer AG) zum

Schutz der Kornea aufgetragen. Die Körpertemperatur wurde mittels einer Rektalsonde kontinuierlich überwacht und durch eine rückgekoppelte Wärmeplatte und Infrarot-Wärmelampe reguliert. Zur Überwachung der Vitalparameter wurde ebenfalls ein Oberflächen-EKG abgeleitet.

Die Eröffnung des Thorax erfolgte mittels lateraler Thorakotomie, 1,5cm Schnittlänge, zwischen der dritten und vierten Rippe. Nach Thoraxeröffnung erfolgte die Freilegung des Herzens und der LAD, welche anschließend mittels 7-0 Prolene Naht angeschlungen wurde. Anschließend erfolgte die Ligatur durch Aufnähen eines 0,6mm Polyethylenschlaues für 30 Minuten. Zur Erfolgskontrolle wurde das Erblassen des distal gelegenen Myokards sowie eine ST-Streckenhebung im EKG gewertet. Nach Ablauf der Zeit, erfolgte die Lösung der Ligatur und Einleitung der Reperfusionsphase. Während dieser wurde der Thorax schichtweise verschlossen. Die Rippen wurden mit einem chirurgischen Nahtmaterial der Stärke 4-0 (Seide) verschlossen. Für den Wundverschluss der darüberliegenden Gewebeschichten kam ein feiner, nicht resorbierbarer Faden (Prolene, 5-0) zum Einsatz. Es erfolgte die Extubation und Beendigung der Narkose mit Rücküberführung der Mäuse in ihre Haltungskäfige, wo sie bis zum vollständigen Erwachen mittels Wärmelampe warmgehalten wurden. Zur postoperativen Analgesie wurde Buprenorphin erneut verabreicht. Während der lichtaktiven Phase erhielten die Tiere eine subkutane Dosis (0,1 mg/kg/4 h). In der Dunkelphase erfolgte die Schmerzmedikation über das Trinkwasser (9 µg/ml). Diese Schmerztherapie wurde drei Tage fortgeführt. Die Gesamtdauer dieses Eingriffs belief sich auf ca. 50 Minuten und wurde von einer erfahrenen Person aus dem kardiologischen Forschungslabor durchgeführt.

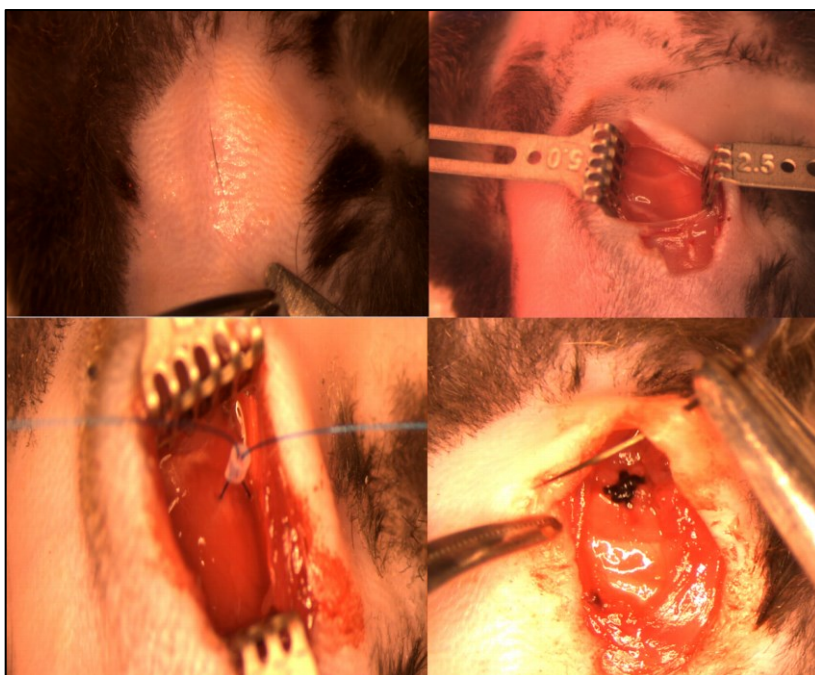


Abbildung 3: Darstellung I/R-OP: Oben links: Freilegung und Präparation der Muskelschicht; oben rechts: Freilegung der Rippen; unten links: Ligatur der LAD; unten rechts: Schließen des Thorax. (Die Abbildung wurde nicht selbst aufgenommen und findet sich so ähnlich in anderen Arbeiten der „AG Dannenberg“)

Gerät/Material/Chemikalie	Typ und Hersteller/Konzentration
Analgesie	Temgesic, 0,1mg/kg, s.c., maximal 10 ml/kg BW
Intubationsmaterial	Vasofix Safety Kanüle 20 G 1,1x25 mm, B.Braun
Isofluran-Sauerstoff-Gemisch	Isofluran 3-4vol% in 40% Sauerstoff angereicherter Raumluft
Muriner Respirator	MiniVent Type 845, Hugo Sachs
OP-Tisch mit Beheizungseinheit	Heated small animal op-table, 50-1247, Hugo Sachs
Oberflächen EKG	Powerlab 8/35, Software: LabChart, ADInstruments
Augensalbe	Bepanthen Augensalbe, Bayer AG
Nahtmaterial	7-0 Prolene, 5-0 Prolene, 4-0 Seide, Ethicon
LAD Ligatur	0,6mm Polyethylenschlauch
Octenidin Desinfektionsmittel	Octenisept, SCHÜLKE & MAYR GmbH
Enthaarungscreme	Veet, Reckitt Benckiser

Tabelle 3: Material und Geräte I/R-Versuch

2.6 Murine Echokardiographie

Vor und nach Infarktinduktion wurde bei den Versuchsmäusen eine TTE durchgeführt. Diese wurde mittels hochauflösenden MS400, VEVO 3100, VisualSonicsInc., Toronto Schallkopf durchgeführt. Die Mäuse wurden in einer Induktionskammer mit 0,3% Isofluran-Sauerstoff-Gemisch für 3 Minuten anästhesiert und anschließend auf einer beheizten Plattform in Rückenlage positioniert. Die Narkose wurde dort mit 0,2% Isofluran-Sauerstoff-Gemisch aufrechterhalten. Die Narkosetiefe wurde über kontinuierliches Aufzeichnen der Vitalzeichen überwacht. Zielwerte waren hier eine Herzfrequenz von 400-550/min, eine Atemfrequenz von 80-120/min und eine Körperkerntemperatur von 36,5-38°C.

Zur Überwachung der Herzaktivität wurden die Pfoten während der Untersuchung auf Elektroden angebracht, mit derer dann ein EKG abgeleitet werden konnte. Die Kerntemperatur der Tiere wurde mittels rektaler Sonde gemessen. Zum Schutz vor Auskühlung wurden die Versuchsmäuse während der Untersuchung mittels Infrarotlampe gewärmt.

Anschließend wurde zur Verbesserung der Schallbedingungen das Fell der Tiere mit handelsüblicher Enthaarungscreme entfernt. Die Gesamtvorbereitung dauerte ungefähr drei Minuten und diente zudem zum Erreichen einer stabilen Narkosetiefe. Zusätzlich wurde Kontaktultraschallgel verwendet, um die Untersuchung durchzuführen.

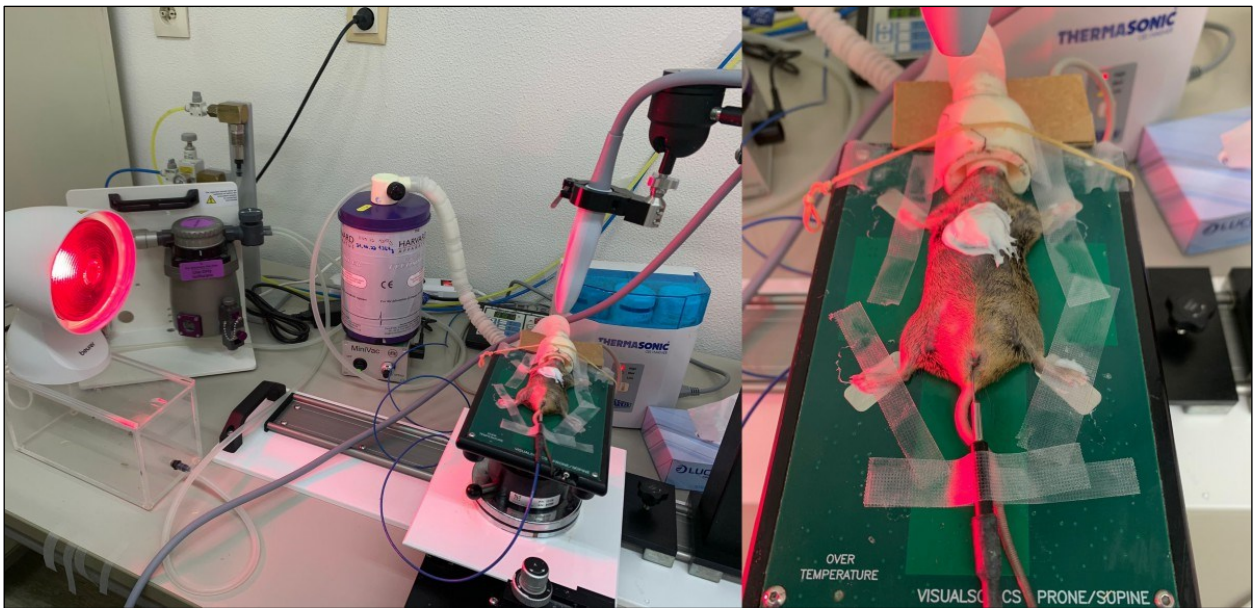


Abbildung 4: Versuchsaufbau zur murinen Echokardiographie: Die Versuchstiere werden auf einer beheizten Plattform in Rückenlage positioniert und mittels Isofluran-Sauerstoff-Gemisch anästhesiert. Zur Überwachung der Herzaktivität werden die Pfoten mittels Elektroden angebracht. Mittels Rektalsonde wird die Körperkerntemperatur gemessen. Das Fell wird mittels Enthaarungscreme entfernt.

Es erfolgten standardisierte Aufnahmen des Herzens; parasternale lange Achse (PLAX) in B- und M-Mode, parasternale kurze Achse in B- und M-Mode, Vierkammerblick mit Bestimmung des Flusses über die Mitralklappe, Gewebe-Doppler-Aufnahmen zur Beurteilung der diastolischen Funktion und suprasternale Aufnahmen zur Ermittlung des Aortenklappenflusses.

Nach Beendigung der Untersuchung wurde die Narkose ausgeschlichen und die Mäuse in ihren Käfig zurück überführt und bis zum vollständigen Erwachen mittels Wärmelampe gewärmt. Die Gesamtdauer der Untersuchung belief sich auf ca. 15 Minuten pro Maus.

Die erhobenen Bilder wurden digital gespeichert und mit *Vevo Lab* analysiert. Neben konventionellen echokardiographischen Parametern wurde auch die myokardiale Deformation mittels Speckle-Tracking-Strain ermittelt. Zur Auswertung der konventionellen echokardiographischen Parameter (ESV, EDV, *fractional shortening* [FS], Mitralklappenfluss [MV-Flow]) wurde zunächst die Auswertung der PLAX-Bilder in der Systole und Diastole durchgeführt (s. Abbildung 5). Anschließend wurden der MV-Flow analysiert. Hierbei wurde der E/A-Quotient ermittelt, der das Verhältnis von passivem

Blutestrom in den linken Ventrikel zu der aktiven Vorhofkontraktion wiedergibt. Dieser Parameter dient gemeinsam mit dem E'-Parameter, der in der Gewebedoppleranalyse erhoben wird, als Kernparameter in der Diagnostik einer diastolischen Dysfunktion. Im Rahmen der Fragestellung der Arbeit wurde zusätzlich die myokardiale Strain ermittelt, in welcher das Myokard in der Endsystole gezirkelt wird und anschließend durch das Programm die Verkürzung über die Herzzyklen berechnet und als Verkürzungsdiagramm veranschaulicht wird.

Die gesammelten Daten wurden mit statistisch geeigneten Methoden wie dem T-Test oder in diesem Fall mittels ANOVA ausgewertet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu identifizieren.

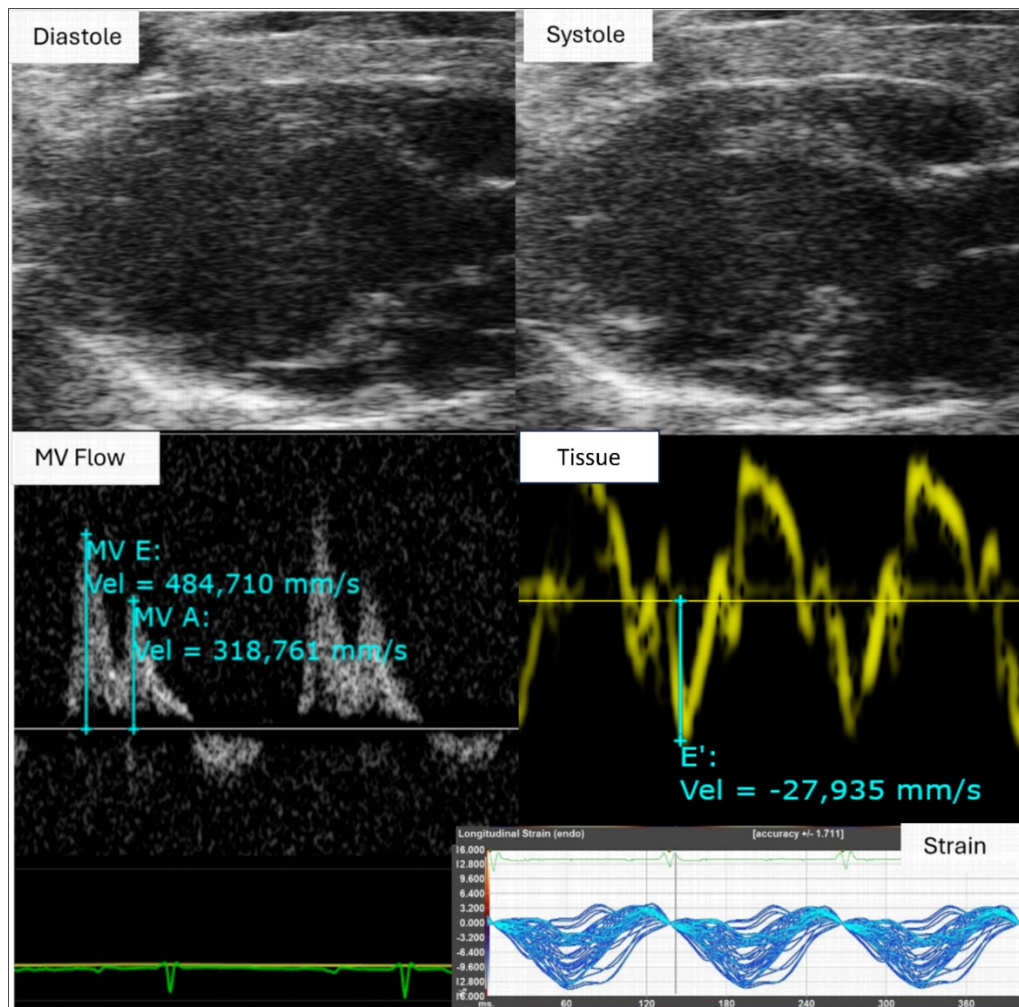


Abbildung 5: Auswertung muriner Echokardiographie. Auswertung der Grundparameter in Systole und Diastole, sowie Bestimmung des Mitralklappenflusses und der Wandbewegung mittels Gewebedoppler. Globale longitudinale Strain wird als Verkürzungsdiagramm angezeigt.

Gerät/Material	Typ und Hersteller/Konzentration
Ultraschallgerät	Vevo 3100, Visual Sonics, Fujifilm
Ultraschallschallkopf	18-38 MHz Schallkopf MS400 (Visual Sonics, Fujifilm)
Isofluran-Sauerstoff-Gemisch	3% Isofluran (Piramal), 40% Sauerstoff und 57% Raumluft
Ultraschallgel	Aquasonic, Roeser Mecica
Beheizte Kontaktplatte	Heated small animal op-table, 50-1247, Hugo Sachs
Enthaarungscreme	Veet, Reckitt Benckiser
Elektrodengel	Gello GmbH Geltechnik

Abbildung 6: Geräte und Materialien für murine Echokardiographie.

2.7 Statistische Auswertung

Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte mittels statistischer Tests, welche unter Zuhilfenahme der Software GraphPad Prism® sowie SPSS Statistics® durchgeführt wurden. In einem ersten Schritt wurde mittels Shapiro-Wilk-Tests überprüft, ob die jeweilige Gruppe einer Normalverteilung folgt. Insbesondere bei kleineren Stichprobengrößen hat sich dieser Test als besonders sensitiv erwiesen⁸³. Je nach Art der Merkmale und Fragestellung wurden verschiedene Tests verwendet, darunter der parametrische t-Test, der Mann-Whitney-U-Test, der Pearson-, der Spearman-, der Chi-Quadrat-Test oder der Fisher-Yates-Test^{84, 85}. Sofern nicht anders vermerkt, erfolgte der Vergleich zwischen unabhängigen Gruppen mittels eines zweiseitigen parametrischen t-Tests. Die statistische Signifikanz wurde dabei mittels Vergleiches der Mittelwerte ermittelt⁸⁶. Darüber hinaus wurde zur grafischen Darstellung das Programm RStudio verwendet.

Im Ergebnisteil wurden zur besseren Vergleichbarkeit, unabhängig vom verwendeten Test, die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der jeweiligen Anzahl von Patienten und Tieren (n) angegeben. Die Annahme der statistischen Signifikanz erfolgte mit einem p-Wert unter 0,05. Eine stärkere Evidenz wurde bei $p < 0,01$ angenommen. Bei $p < 0,001$ konnte hochgradige Signifikanz beobachtet werden.

Software	Hersteller
GraphPad-Prism® 5 for Windows	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037 USA
SPSS Statistics 29 for Windows	IBM
RStudio	Posit PBC

Tabelle 4: Verwendete Software zur statistischen Analyse

3. Ergebnisse

3.1 Zusammenhang von S1P und myokardialer Strain beim Menschen

3.1.1 Patientenrekrutierung

Im Rahmen des Rekrutierungsprozesses wurden insgesamt 311 Patienten eingeschlossen, die die Auswahlkriterien erfüllt haben (s. Abbildung 7). Nicht in die Analyse einbezogen wurden Patienten, die einen Typ-1-Diabetes Mellitus aufwiesen (n=3), sowie Patienten, welche einen erhöhten Hämoglobin A1c (HbA1c)-Wert zeigten, jedoch noch keine definitive Diagnose eines Typ-2-Diabetes Mellitus erlaubten (n=30).

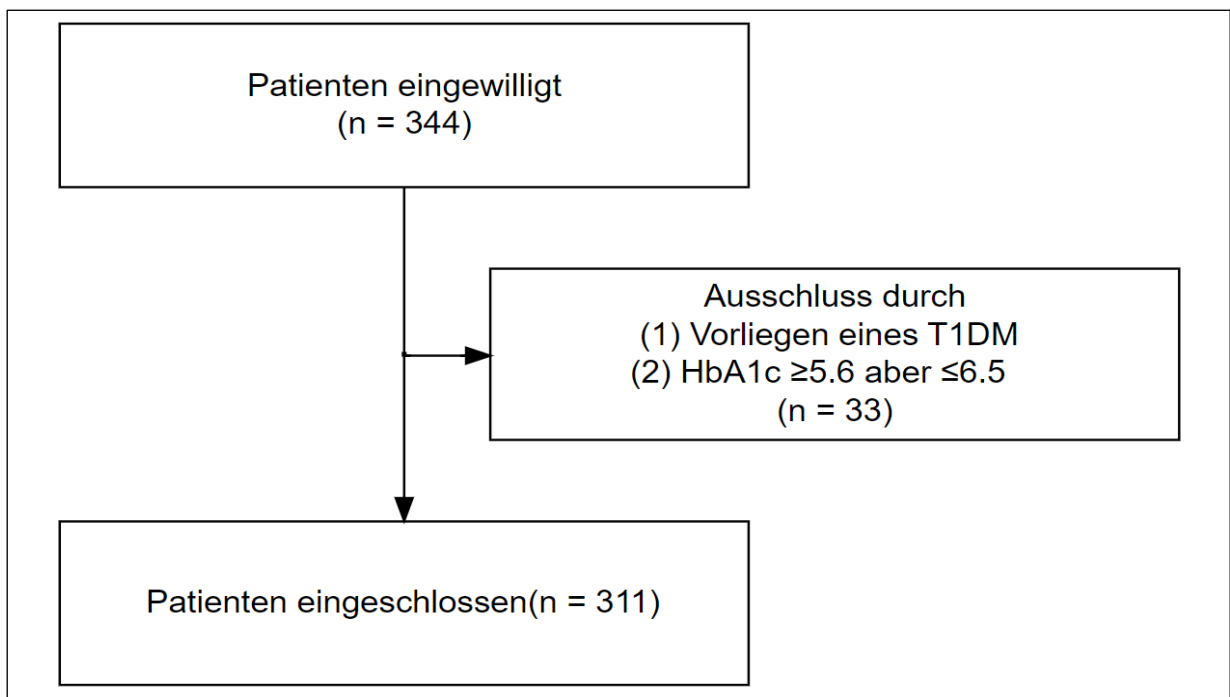


Abbildung 7: Ablauf der Patientenrekrutierung

3.1.2 Patientencharakteristika

Nach Aufnahme in die Studie wurden die Charakteristika der Patienten erfasst. Eine Übersicht der wichtigsten Charakteristika der Patienten ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Insgesamt wurden 193 Patienten ohne manifesten Typ-2-Diabetes mellitus und

118 Patienten mit dieser Diagnose eingeschlossen. Das durchschnittliche Alter differierte hochsignifikant zwischen den beiden Gruppen (No DM $68,68 \pm 17,39$ vs. DM2 $76,85 \pm 10,34$, $p < 0,001$). Ebenso war der BMI in der Gruppe der Typ-2-Diabetiker signifikant erhöht (No DM $25 \pm 6,0$ vs. DM2 $29 \pm 6,1$, $p < 0,001$). Patienten mit manifestem Typ-2-Diabetes wiesen zudem eine signifikant höhere Prävalenz von Adipositas und arterieller Hypertonie auf (Adipositas – No DM 24 (12,43%) vs. DM2 37 (31,35%), $p = 0,001$; arterielle Hypertonie – No DM 96 (49,74%) vs. DM2 99 (83,90%), $p < 0,001$).

Darüber hinaus war das Vorliegen einer KHK bei Patienten mit Typ-2-Diabetes signifikant höher, was sich auch in einer höheren Rate bereits erfolgter Koronararterienbypässe (CABG) oder perkutane Koronarinterventionen (PCI) in dieser Gruppe widerspiegelte (KHK: No DM 95 (49,22 %) vs. DM2 81 (68,64 %), $p = 0,001$; CABG: No DM 4 (2 %) vs. DM2 16 (14,16 %), $p < 0,001$; PCI: No DM 34 (17,61 %) vs. DM2 43 (36,47 %), $p < 0,001$).

Laborchemisch zeigten die Typ-2-Diabetiker häufiger eine Anämie und signifikant erhöhte Kreatininwerte (Hb – No DM $12,84 \pm 1,98$ vs. DM2 $12,32 \pm 1,9$, $p = 0,025$; Kreatinin – No DM $1,13 \pm 0,64$, vs. DM2 $1,43 \pm 0,89$, $p = 0,001$). Eine Betrachtung der Lipidparameter zeigte, dass Patienten mit Typ-2-Diabetes niedrigere Gesamtcholesterin- und Low-Density-Lipoprotein-Werte (Cholesterin - No DM $163,52 \pm 44,21$ vs. DM2 $151,26 \pm 36,23$, $p = 0,028$; Low-Density-Lipoprotein - No DM $97,38 \pm 35,21$ vs. DM2 $79,32 \pm 27,34$, $p < 0,001$), jedoch erhöhte Triglyzeridspiegel aufwiesen (No DM $114,37 \pm 60,2$ vs. DM2 $142,31 \pm 85,90$, $p = 0,016$). Diese Unterschiede lassen sich vor allem auf die höhere Prävalenz der Statintherapie in der Gruppe der Typ-2-Diabetiker zurückführen (No DM 91 (48,14 %) vs. DM2 86 (72,88 %)).

In der medikamentösen Therapie der Patienten mit Typ-2-Diabetes fiel insbesondere die signifikant höhere Verwendung von Medikamenten zur Behandlung der Herzinsuffizienz auf. Hierzu zählten Hemmer des *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE), AT-I-Blocker, Betablocker, Sodium-Glucose-Cotransporter-2 (SGLT2)-Inhibitoren, Aldosteronantagonisten sowie Schleifendiuretika (ACE-Hemmer: No DM 47 (24,87 %) vs. DM2 43 (36,44 %), $p = 0,030$; AT-I-Blocker: No DM 44 (23,28 %) vs. DM2 49 (41,52 %), $p < 0,001$; Betablocker: No DM 99 (52,38 %) vs. DM2 89 (75,42 %), $p < 0,001$;

SGLT2-Inhibitoren: No DM 13 (6,74 %) vs. DM2 32 (27,12 %), $p < 0,001$; Aldosteronantagonisten: No DM 22 (11,64 %) vs. DM2 27 (22,88 %), $p = 0,009$; Schleifendiuretika: No DM 71 (37,57 %) vs. DM2 69 (58,47 %), $p < 0,001$, s. Tabelle 6).

Patientencharakteristika	No DM (n=193)		DM2 (n=118)		p-Wert
Alter (Jahre) - mean $\pm$ SD	68,68	$\pm 17,39$	76,85	$\pm 10,34$	<0,001
BMI - mean $\pm$ SD	25,00	$\pm 6,0$	29,00	$\pm 6,1$	<0,001
Frauen (%)	82	42,48%	47	39,83%	0,645
Frauen nach Menopause	64	33,06%	43	36,44%	0,003
Männer	111	57,51%	71	60,17%	0,645
<u>Lebensstilfaktoren (%)</u>					
Nikotinabusus	48	24,87%	20	16,95%	0,110
<u>Komorbiditäten (%)</u>					
Adipositas	24	12,43%	37	31,35%	0,001
Z.n. CABG	4	2,0%	16	14,16%	<0,001
Z.n. Apoplex	19	9,84%	12	10,17%	0,877
Z.n. PCI	34	17,61%	43	36,47%	<0,001
COPD	21	10,88%	16	13,56%	0,707
CCS	82	42,48%	69	58,47%	0,011
Z.n. MI	20	10,36%	20	16,95%	0,096
Vorhofflimmern	74	38,34%	50	44,25%	0,893
Art. Hypertonie	96	49,74%	99	83,90%	<0,001
Hypercholersterinämie	58	30,01%	15	13,27%	<0,001
KHK	95	49,22%	81	68,64%	0,001
Pulmonale Hypertonie	115	59,58%	63	53,34%	0,046
pAVK	16	8,29%	17	14,40%	0,143
<u>Laborparameter mean$\pm$SD</u>					
Hämoglobin [g/dl]	12,84	$\pm 1,98$	12,32	$\pm 1,9$	0,025
Thrombozyten [x1000 μ l-l]	229,82	$\pm 112,74$	227,13	$\pm 82,58$	0,815
Cholesterin [mg/dl]	163,52	$\pm 44,21$	151,26	$\pm 36,23$	0,028
Triglyceride [mg/dl]	114,37	$\pm 60,2$	142,31	$\pm 85,90$	0,016
Low-Density-Lipoprotein[mg/dl]	97,38	$\pm 35,21$	79,32	$\pm 27,34$	<0,001
High-Density-Lipoprotein[mg/dl]	52,36	$\pm 14,78$	48,48	$\pm 16,04$	0,126
Kreatinin [mg/dl]	1,13	$\pm 0,64$	1,43	$\pm 0,89$	0,001
HbA1c [%]	5,42	$\pm 0,36$	6,85	$\pm 1,04$	<0,001
Leukozyten [x1000/nl]	8,17	$\pm 4,31$	8,82	$\pm 4,32$	0,198
LDH [U/l]	287,32	$\pm 150,75$	297,59	$\pm 160,45$	0,617

Tabelle 5: Patientencharakteristika: Es werden der Durchschnittswert, die Standardabweichung und die Anzahl sowie der prozentuale Anteil der Patienten mit vorliegenden Erkrankungen angegeben. Dabei wurden folgende Komorbiditäten betrachtet: Zustand nach (Z.n.) Koronararterienbypass (CABG), Perkutaner Koronarangiografie (PCI), chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Myokardinfarkt (MI) sowie das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit (KHK), peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) und pektanginöse Beschwerden gemessen an dem Score Canadian Cardiovascular Society (CCS).

<u>Medikation</u>	No DM (n=193)		DM2 (n=118)		p-Wert
Marcumar	13	6,87%	13	11,00%	0,205
DOAK	56	29,62%	43	38,98%	0,214
P2Y12-Inhibitoren	24	12,70%	28	23,73%	0,016
ACE-Hemmer	47	24,87%	43	36,44%	0,030
AT-I-Blocker	44	23,28%	49	41,52%	<0,001
AT-II-Blocker	2	1,06%	1	5,55%	0,855
β-Blocker	99	52,38%	89	75,42%	<0,001
Calcium-Antagonisten	18	9,52%	28	23,73%	<0,001
Digitalis	8	4,76%	5	4,24%	0,830
Hydrochlorthiazid	8	4,23%	15	12,72%	0,006
Xipamid	5	2,65%	5	4,24%	0,445
Schleifendiuretika	71	37,57%	69	58,47%	<0,001
Aldosterone-Antagonisten	22	11,64%	27	22,88%	0,009
Statine	91	48,14%	86	72,88%	<0,001
Metformin	0	0,00	46	40,7%	<0,001
SGLT2-Hemmer	13	2,8%	32	27,12%	<0,001
GLP-1-RA	0	0%	14	11,96%	<0,001

Tabelle 6: Medikation der Patienten: Angegeben werden Anzahl und prozentualer Anteil der Patienten, die die vorliegenden Medikamente einnehmen.

3.1.3 Echokardiographische Ergebnisse

Systolische Parameter:

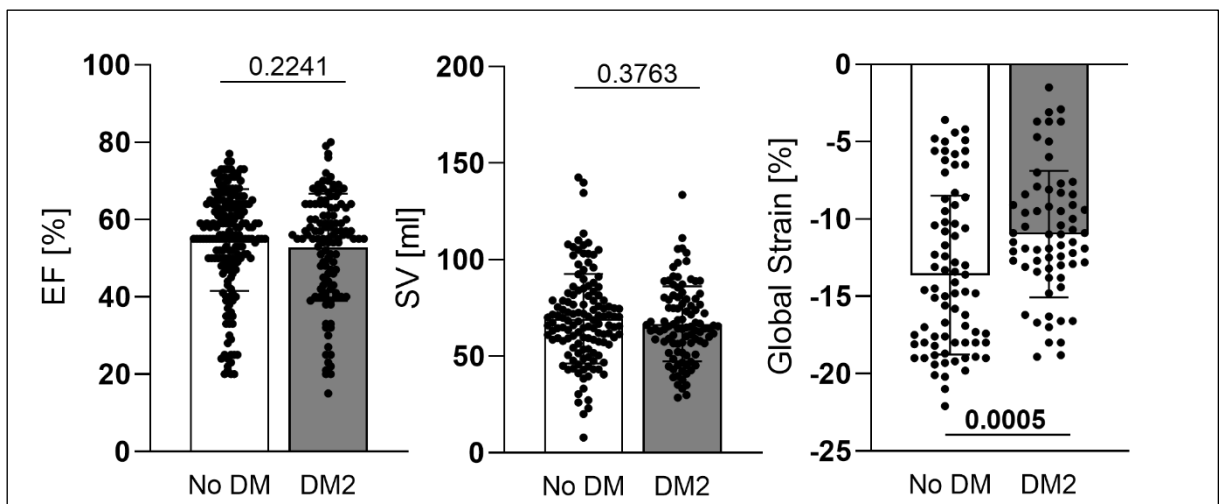


Abbildung 8: Systolische Echoparameter der Kohorte: Es werden die Gruppe der Nicht-Diabetiker und die Gruppe der Typ-2-Diabetiker verglichen. Es werden die Ejektionsfraktion (EF), das Schlagvolumen (SV) und die globale longitudinale Strain betrachtet.

Alle eingeschlossenen Patienten erhielten im Rahmen einer klinischen Fragestellung eine transthorakale Echokardiographie des Herzens. Dabei wurde die myokardiale Funktion in die Gruppen der Diabetiker und Nicht-Diabetiker unterteilt. Für die systolischen Parameter, dargestellt in Abbildung 8, konnten mittels U-Tests, keine signifikanten Unterschiede in der Ejektionsfraktion und dem Schlagvolumen (SV) zwischen den beiden Gruppen (EF - No DM (n=189) $54,70 \pm 13,16$ vs. DM2 (n=118) $52,81 \pm 13,89$, $p = 0,2241$; SV: No DM (n=129) $69,45 \pm 23,18$ vs. DM2 (n=98) $66,83 \pm 19,49$, $p = 0,3763$) festgestellt werden. Allerdings wiesen die Typ-2-Diabetiker eine hochsignifikant schlechtere GLS auf (No DM (n=75) $-13,63 \pm 5,131$ vs. DM2 (n=65) $-10,98 \pm 4,088$, $p = 0,0005$).

Diastolische Funktion:

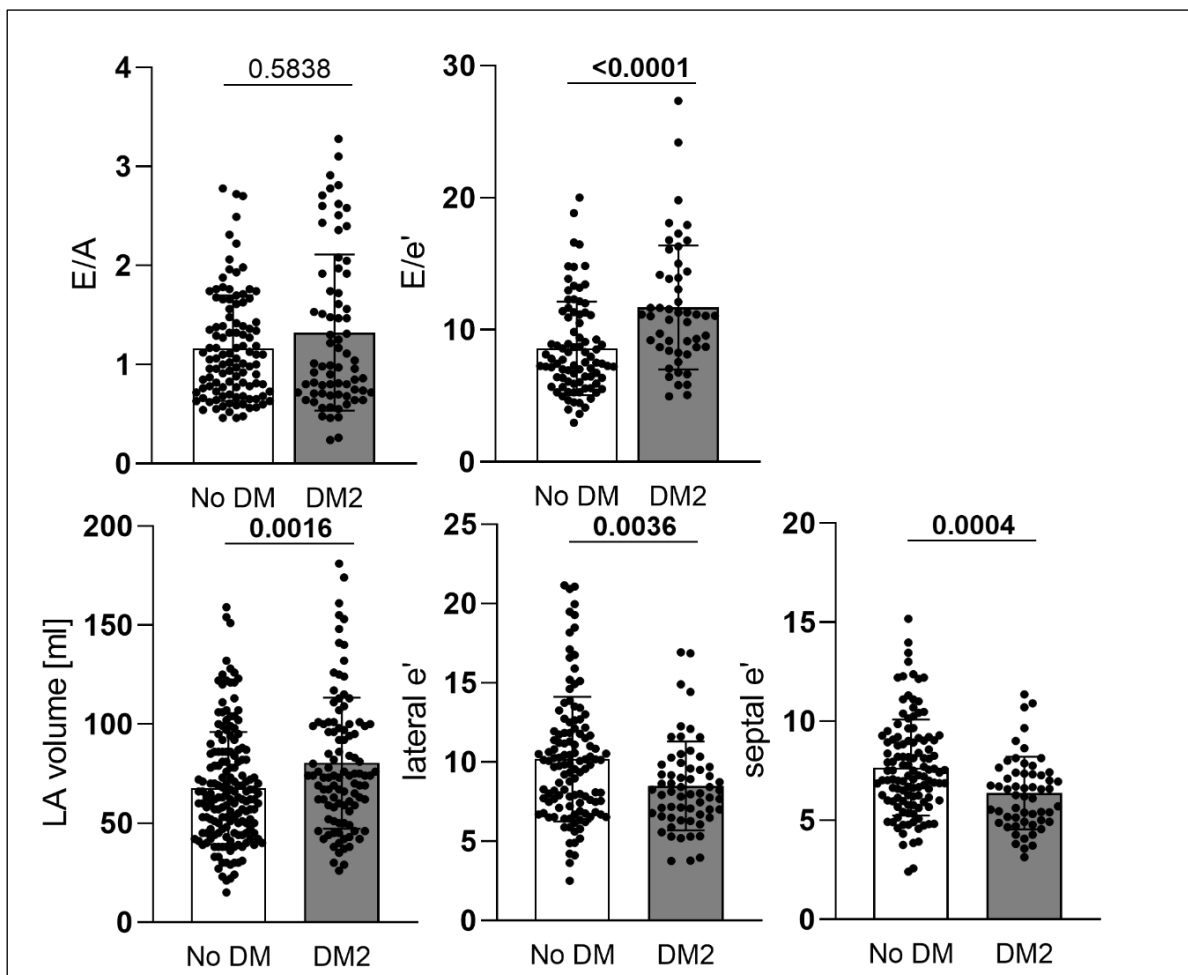


Abbildung 9: Diastolische Echoparameter der Kohorte: Es werden die Gruppe der Nicht-Diabetiker und die Gruppe der Typ-2-Diabetiker verglichen. Im Rahmen der Untersuchung werden die diastolischen Funktionsparameter E/A- und E/e'-Verhältnis, gemessen am Blutfluss über der Mitralklappe, das linksatriale (LA) Volumen sowie das laterale und septale e' betrachtet.

Analog zur systolischen Funktion wurde auch die diastolische Herzfunktion der Patienten mittels U-Test bestimmt und ausgewertet. Das Verhältnis von passiver Ventrikelfüllung zu aktiver Füllung durch Vorhofkontraktion (E/A) war für die Gruppe der Diabetiker nicht signifikant schlechter (E/A – No DM (n=108) $1,165 \pm 0,5337$ vs. DM2 (n=71) $1,323 \pm 0,7885$, $p = 0,5838$). Jedoch zeigten die Gewebeanalyse (E/e'), das linksatriale Volumen (LA-Volumen), das laterale e' und das septale e' hochsignifikante Unterschiede, die auf eine verminderte diastolische Funktion des Herzens bei Diabetikern hinweisen (E/e' – No DM (n=86) $8,609 \pm 3,535$ vs. DM2 (n=50) $11,69 \pm 4,694$, $p < 0,0001$; LA-Volumen – No DM (n=169) $67,77 \pm 28,31$ vs. DM2 (n=103) $80,34 \pm 33,01$, $p = 0,0016$; laterales e' – No DM (n=118) $10,19 \pm 3,924$ vs. DM2 (n=61) $8,500 \pm 2,798$, $p = 0,0036$; septales e' – No DM (n=117) $7,663 \pm 2,426$ vs. DM2 (n=56) $6,373 \pm 1,828$, $p = 0,004$, Abbildung 9).

Auch die strukturellen echokardiographischen Parameter präsentierten sich bei Patienten mit DM2 verschlechtert verglichen zu Patienten ohne DM2. So litten die Patienten mit DM2 signifikant häufiger an einer diastolischen Dysfunktion (No DM 38 (19,69%) vs. DM2 41 (34,74%), $p = 0,009$) und ebenfalls häufiger unter Klappenvitien wie beispielsweise einer Aortenklappenstenose oder einer Trikuspidalklappeninsuffizienz (Aortenklappenstenose - No DM 46 (23,83%) vs. DM2 45 (38,14%), $p = 0,043$; Trikuspidalklappeninsuffizienz - No DM 104 (53,88%) vs. DM2 82 (69,49%), $p = 0,028$, Tabelle 7).

Echokardiographische Funktion	No DM (n=193)		DM2 (n=118)		p-Wert
IVSd [mm]	11,82	±3,10	12,01	±2,82	0,623
SV index [ml/mm2]	37,27	±11,48	34,07	±9,79	0,042
int. Diameter [LVIDd]	50,08	±9,48	49,91	±10,27	0,897
Diastolische Hinterwanddicke [LVPWd]	10,79	±2,19	11,50	±5,03	0,136
Diameter LVOT	21,01	±1,97	20,99	±1,89	0,018
Dezelerationszeit [ms]	216,05	±89,99	226,40	±83,69	0,416
TAPSE	20,40	±4,81	19,97	±3,83	0,416
MK_dpmean [mmHg]	2,37	±1,59	2,62	±1,56	0,237
PISA [mm]	13,16	±23,49	20,78	±33,68	0,323
RV Mitte [mm]	24,81	±6,99	25,27	±6,19	0,161
AK Vmax [mm]	1,99	±1,17	2,19	±1,01	0,178
AK Vmax LVOT [m/s]	1,36	±2,74	0,92	±0,21	0,067
AK dPmean [mmHg]	14,53	±17,83	14,85	±13,71	0,883
AK dPmax [mmHg]	22,46	±26,84	23,88	±21,63	0,656
AK KÖF VTI [cm2]	1,88	±0,91	1,66	±0,79	0,068
AK KÖF Vmax [cm2]	1,97	±0,90	1,67	±0,75	0,011
PaSys_TR-dPmax [+ZVD]	29,09	±13,46	29,65	±14,26	0,420
Wandbewegungsstörungen	24	12,44%	25	21,19%	0,143
Linksventrikuläre Dilatation	34	17,62%	27	22,88%	0,489
distolische Dysfunktion	38	19,69%	41	34,74%	0,009
Mitralklappenstenose	24	12,44%	24	20,34%	0,445
Mitralklappeninsuffizienz	111	57,51%	85	72,03%	0,082
Aortenklappeninsuffizienz	85	44,04%	41	34,75%	0,180
Aortenklappenstenose	46	23,83%	45	38,14%	0,043
Trikuspidalklappeninsuffizienz	104	53,88%	82	69,49%	0,028

Tabelle 7: Strukturelle echokardiographische Funktion der Kohorte. Diameter LVOT: Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstrakts. Dezelerationszeit [ms]: Zeit des Blutflussabfalls in der frühen Diastole. TAPSE: Systolische Funktion des rechten Ventrikels. PISA [cm]: Fläche zur Quantifizierung von Regurgitationen. RV Mitte [mm]: Durchmesser des rechten Ventrikels in der Mitte. AK maxAK: Maximale Geschwindigkeit über der Aortenklappe. AK_Vmax LVOT [m/s]: Maximale Blutflussgeschwindigkeit im LVOT. AK_dpmean [mmHg]: Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe. AK_dPmax [mmHg]: Maximaler Druckgradient über der Aortenklappe. AK_KÖF VTI [cm²]: Klappenöffnungsfläche basierend auf VTI. AK_KÖF Vmax [cm²]: Klappenöffnungsfläche basierend auf Vmax. PaSysTR-dPmax [+ ZVD]: Maximaler systolischer Druckgradient der TR mit ZVD.

Globale longitudinale Strain als Parameter:

Die Speckle-Tracking-Strain-Analyse ist eine sensitive Untersuchungsmethode zur Beurteilung der myokardialen Funktion. Um dies zu belegen, wurden die systolischen Echoparameter EF und SV sowie die diastolischen Parameter E/A-Verhältnis, E/e'-Verhältnis, linksatriales Volumen und die lateralen sowie septalen e'-Werte mit der myokardialen Strain korreliert. Zudem wurde das *Pro-B-Type Natriuretic Peptide* (proBNP) mit der GLS korreliert. Diese Analyse wurde zunächst mittels Pearson- oder Spearman-Test für alle Patienten durchgeführt und anschließend für Diabetiker und Nicht-Diabetiker separat ausgewertet.

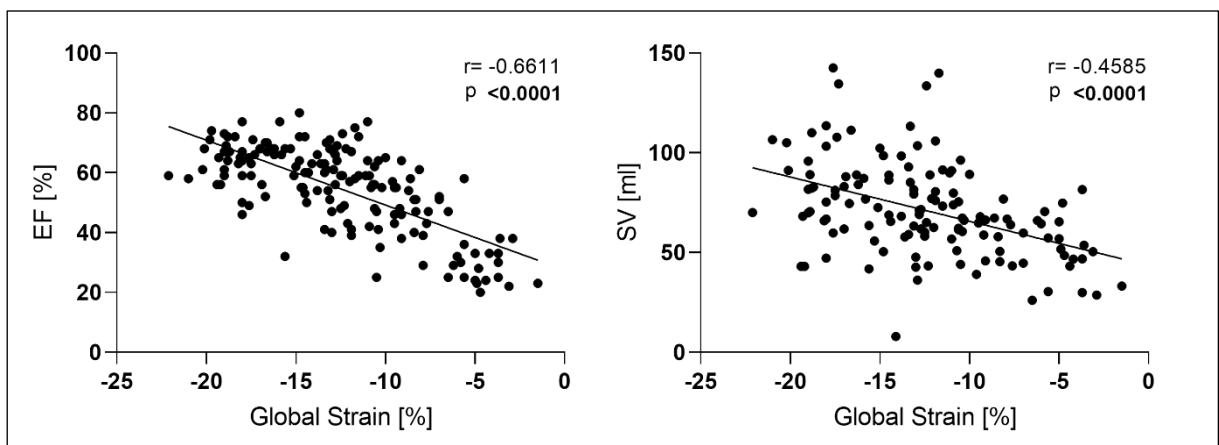


Abbildung 10: Korrelation der globalen Strain und systolischen Funktionsparametern

Es konnte ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Ejektionsfraktion und der globalen Strain sowie zwischen dem Schlagvolumen und der globalen Strain festgestellt werden (EF – $r = -0,6611$, $p < 0,0001$; SV – $r = -0,4585$, $p < 0,0001$, s. Abbildung 10). In der gesamten Patientengruppe wiesen fast alle diastolischen Parameter, mit Ausnahme des lateralen e' und des proBNP und des EA Verhältnisses, welches sich jedoch nahezu signifikant darstellte, ebenfalls einen hochsignifikanten Zusammenhang mit der GLS auf (E/A – $r = 0,1842$, $p = 0,0530$; E/e' – $r = 0,4251$, $p < 0,0001$; proBNP – $r = 0,03307$, $p = 0,7970$; septales e' – $r = -0,5086$, $p < 0,0001$; laterales e' – $r = -0,1802$, $p = 0,0839$; LA-Volumen – $r = 0,3150$, $p = 0,0002$, s. Abbildung 11).

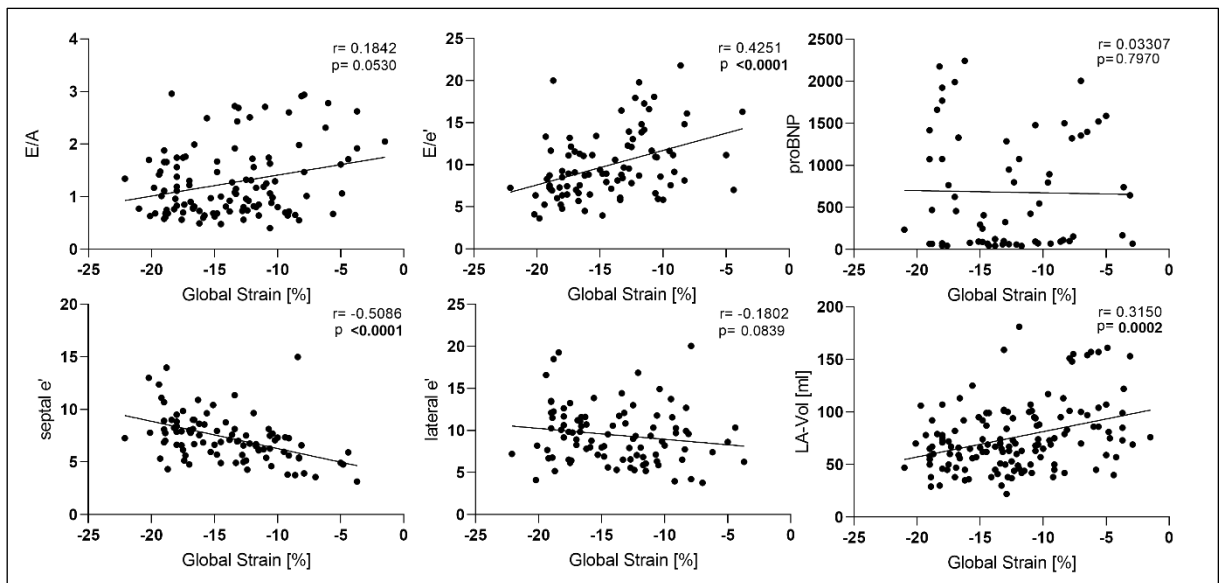


Abbildung 11: Korrelation globale Strain mit diastolischen Funktionsparametern

Nach der Korrelation der echokardiographischen Parameter für die gesamte Kohorte wurden die Werte erneut gegeneinander korreliert, nun nach Diabetikern und Nicht-Diabetikern aufgetrennt. Anschließend wurde bei allen Parametern der Fischer's Z-Test angewandt, um die Vergleichbarkeit der Korrelationen zu überprüfen.

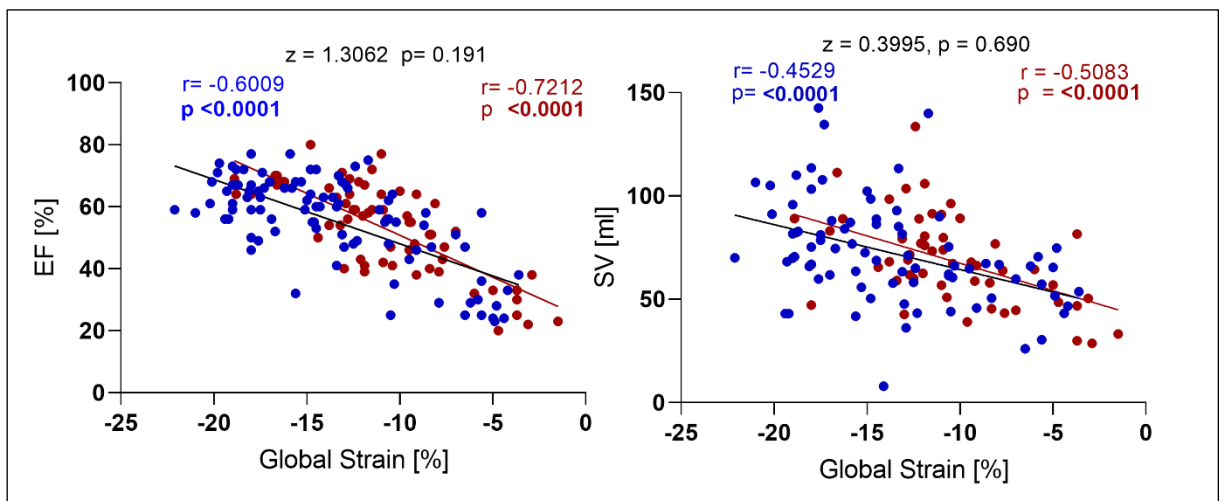


Abbildung 12: Korrelation globaler Strain und systolische Funktionsparameter nach Gruppen: blau - Patienten ohne DM2, rot - Patienten mit DM2.

Zunächst wurden die Korrelationen der Ejektionsfraktion und des Schlagvolumens mit der GLS betrachtet und in Abbildung 12 dargestellt. Hier zeigten beide Gruppen hochsignifikante Korrelationen, allerdings konnte mittels Fischer's Z-Test kein Unterschied

zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (EF – No DM $r = -0,6009$, $p < 0,0001$; DM2 $r = -0,7212$, $p < 0,0001$; Fischer's $z = 1,3062$, $p = 0,191$; SV – No DM $r = -0,4529$, $p = <0,0001$; DM2 $r = -0,5083$, $p = <0,0001$; Fischer's $z = 0,3995$, $p = 0,690$).

Anschließend erfolgte die Auswertung der diastolischen Funktionsparameter nach dem gleichen Prinzip. Für das E/A-Verhältnis zeigte die Gruppe der Typ-2-Diabetiker eine stark signifikante Korrelation zur globalen Strain, während die Nicht-Diabetiker keinen Zusammenhang zeigten. Das Fischer's Z-Verhältnis deutet auf einen möglichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen hin (No DM $r = 0,03892$, $p = 0,7563$; DM2 $r = 0,3656$, $p = 0,0147$; Fischer's $z = -1,7163$, $p = 0,086$, s. Abbildung 13). Das diastolische E/e' zeigte bei den Nicht-Diabetikern eine signifikante Korrelation, allerdings ohne signifikanten Unterschied zur Gruppe der Diabetiker. Das proBNP korrelierte in beiden Gruppen signifikant mit der globalen Strain. Das laterale e' zeigte in keiner der beiden Gruppen eine signifikante Korrelation, während das septale e' in beiden Gruppen hochsignifikant mit der globalen Strain korrelierte. Ebenfalls zeigte das linksatriale Volumen eine signifikante Korrelation zur globalen Strain für beide Gruppen. Es konnte jedoch für keinen Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Korrelationen der Nicht-Diabetiker und der Diabetiker nachgewiesen werden (E/e' – No DM $r = 0,3918$, $p = 0,0022$; DM2 $r = 0,2509$, $p = 0,1812$; Fischer's $z = -0,6724$, $p = 0,501$; proBNP – No DM $r = 0,3984$, $p = 0,0042$; DM2 $r = 0,5405$, $p = 0,0010$; Fischer's $z = 0,7914$, $p = 0,429$; laterales e' – No DM $r = -0,1004$, $p = 0,4492$; DM2 $r = -0,2908$, $p = 0,0853$; Fischer's $z = 0,9054$, $p = 0,365$; septales e' – No DM $r = -0,5002$, $p < 0,0001$; DM2 $r = -0,5966$, $p = 0,0002$; Fischer's $z = 0,6092$, $p = 0,542$; LA-Volumen – No DM $r = 0,3026$, $p = 0,0064$; DM2 $r = 0,3059$, $p = 0,0185$; Fischer's $z = 0,0207$, $p = 0,983$, s. Abbildung 13).

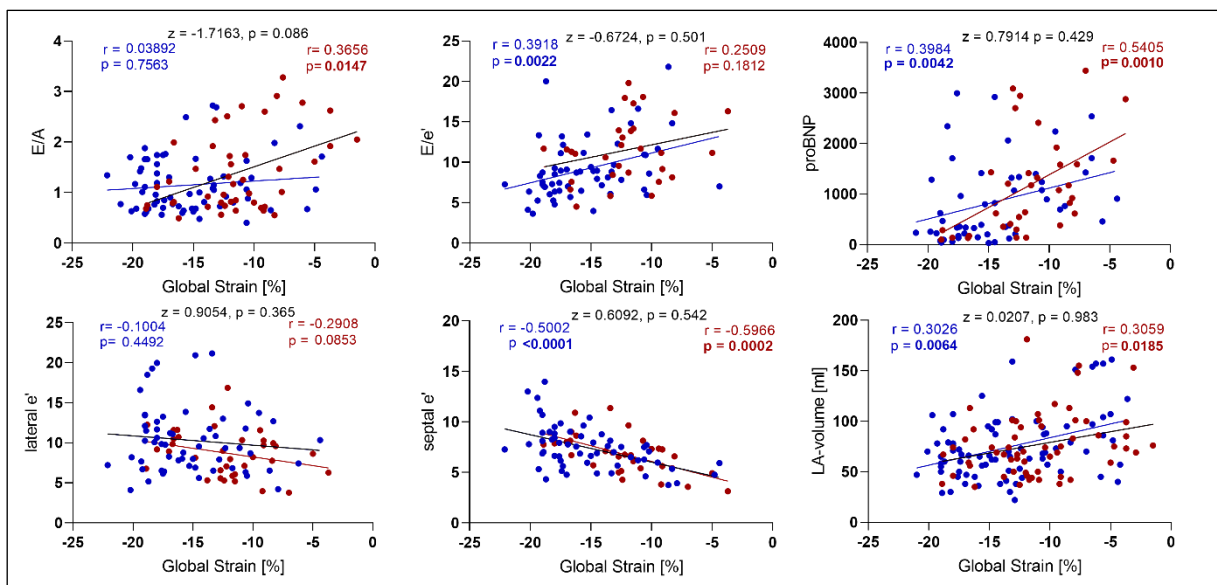


Abbildung 13: Korrelation globaler Strain und diastolischer Funktionsparameter nach Gruppen: blau - Patienten ohne DM2, rot - Patienten mit DM2.

Korrelation von frei zirkulierenden S1P und globaler Strain:

Im Rahmen der Fragestellung wurde bei den Patienten die Menge des frei zirkulierenden Sphingosin-1-Phosphates bestimmt. Um eine mögliche Korrelation zwischen den S1P-Plasmaspiegeln und der GLS festzustellen, wurde eine Regressionsanalyse für alle Patienten sowie getrennt für Patienten mit und ohne Typ-2-Diabetes mellitus durchgeführt. Anschließend wurde betrachtet, ob eine Korrelation zwischen den zirkulierenden S1P-Spiegeln und weiteren funktionalen Echoparametern besteht.

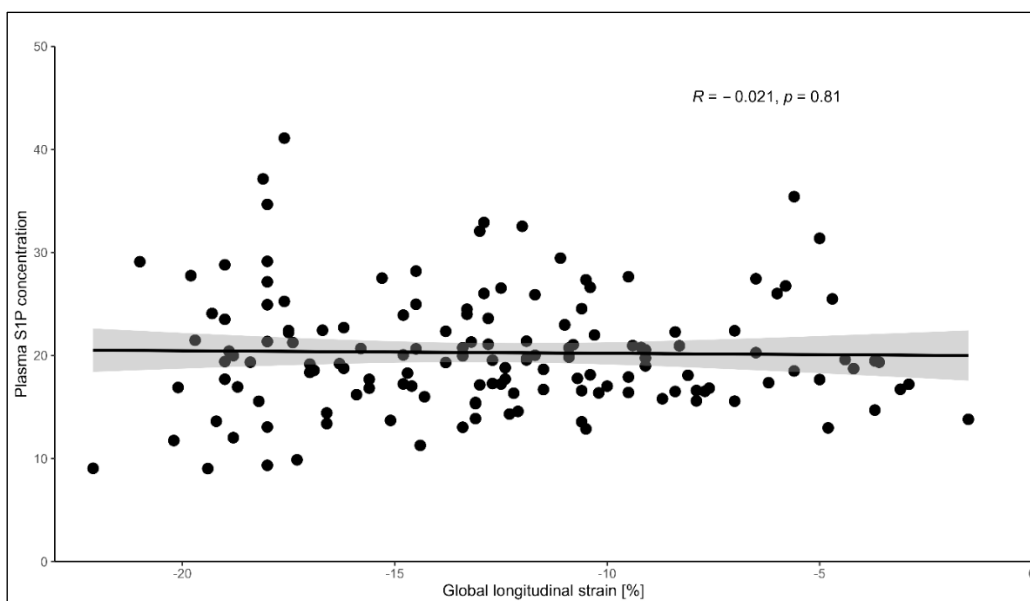


Abbildung 14: Korrelation freier S1P Konzentration und globaler Strain für beide Gruppen

In der Korrelation von S1P und GLS über die gesamte auswertbare Kohorte konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($r=-0,021$, $p=0,81$, s. Abbildung 14).

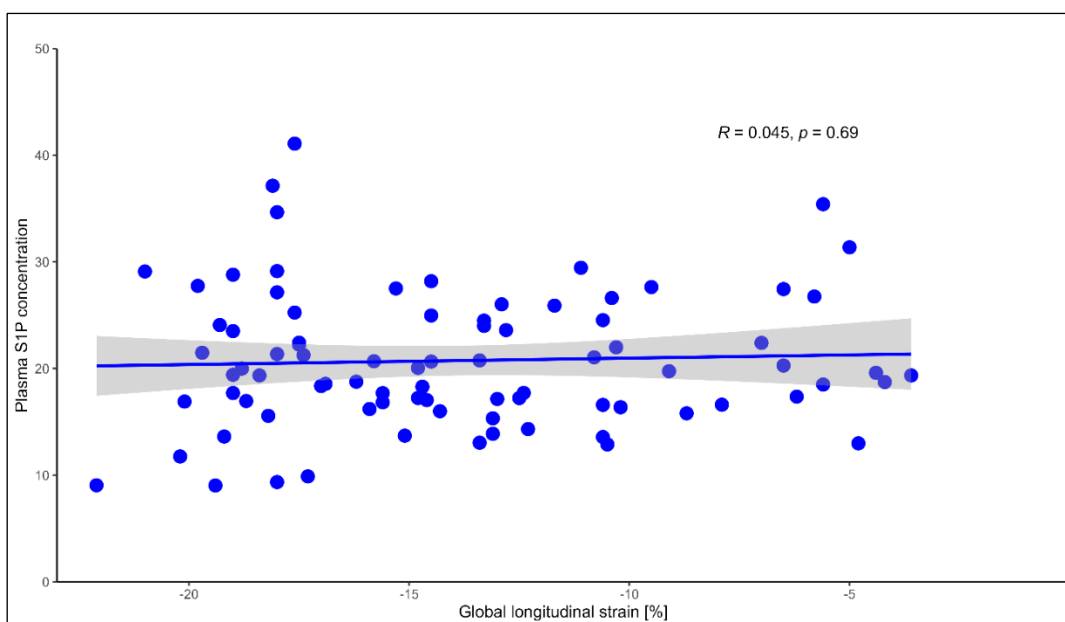


Abbildung 15: Korrelation freier S1P Konzentration und globaler Strain für Patienten ohne DM2

Bei separater Betrachtung für die Gruppe der nicht-Diabetiker zeigte sich weiterhin keine signifikante Korrelation für die globale Strain und der freien S1P-Konzentration

($r=0,045$, $p=0,69$, s. Abbildung 15). Es zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz in der Gruppe der Typ-2-Diabetiker ($r=-0,074$, $p=0,57$, s. Abbildung 16)

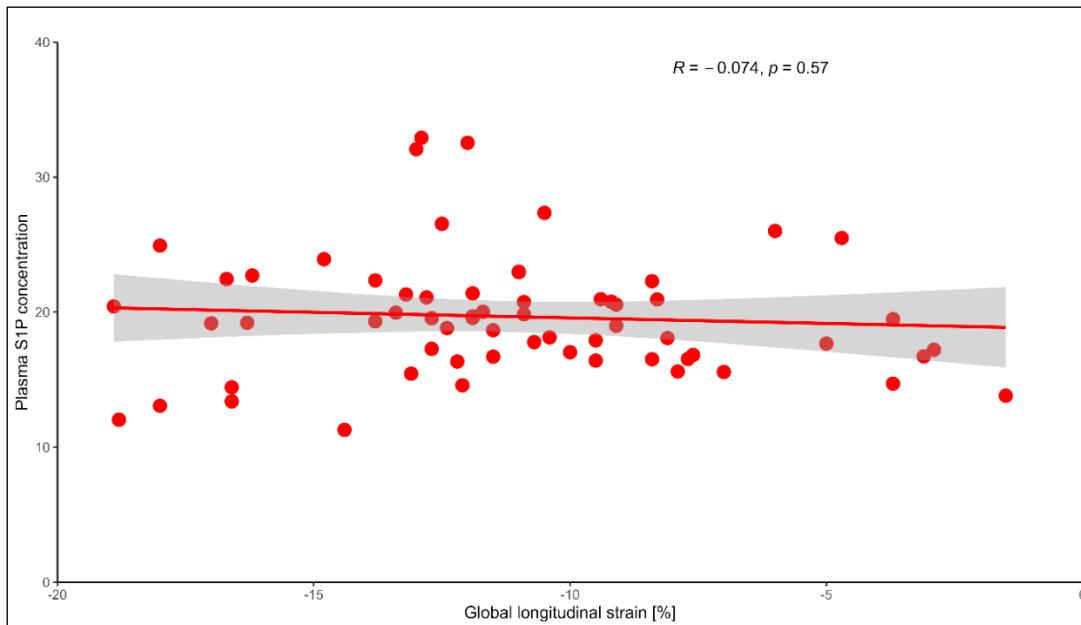


Abbildung 16: Korrelation freier S1P Konzentration und globaler Strain für Patienten mit DM2

Im Rahmen einer Korrelationsanalyse konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen der freien S1P-Konzentration und einigen klinischen Laborparametern sowie echokardiographischen Funktionen nachgewiesen werden. Hierbei wies insbesondere die glomeruläre Filtrationsrate einen engen Zusammenhang mit dem Harnstoffspiegel auf (s. Abbildung 17). Des Weiteren konnte in der Gruppe der Patienten mit DM2 eine negative Korrelation zwischen dem lateralen e' und den frei zirkulierenden S1P-Mengen beobachtet werden (s. Abbildung 18).

	All (n=311)	No DM (n=193)	DM2 (n=118)
S1P Korrelation	<i>r-Wert</i>	<i>r-Wert</i>	<i>r-Wert</i>
BMI	-0,01702	0,03165	-0,01769
Hb	0,141	0,09252	0,1698
Hämatokrit	0,1619	0,1204	0,1876
Thrombozytenzahl	0,08558	0,0828	0,08611
HbA1C %	0,1506	-0,03957	0,05062
Gesamt-Cholesterin	0,07425	0,06332	0,05563
Triglyzeride	0,08629	0,05678	0,06756
High-density-lipoprotein	0,158	0,01764	0,05238
Low-density-lipoprotein	0,162	0,08777	0,0514
Lipoprotein (a)	0,1405	0,01047	0,1785
Kreatinin im Serum	-0,09053	-0,1185	-0,03899
Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min)	0,1984	0,2319	0,07437
Harnstoff	-0,09295	-0,1521	0,03242
Harnsäure	0,1422	-0,1531	0,1084
GOT	-0,003627	-0,006193	-0,09653
GPT	0,06485	0,1238	-0,1769
Glukose im Serum	0,04599	-0,01762	0,04769
CRP	0,06936	0,003746	0,17
Leukozytenzahl	-0,1291	-0,114	-0,1373
Kreatinkinase	-0,003493	-0,01546	0,01993
Troponin T	-0,07609	-0,1414	-0,02912
LDH	-0,07326	-0,1127	0,0005176
proBNP	-0,1269	-0,1414	-0,08453
Quick	-0,04943	-0,01638	-0,1347
PTT	0,07058	0,04094	0,1041

Abbildung 17: Korrelation der S1P Konzentration und gängiger Laborparameter dargestellt als *Heatmap*.

Signifikante ($p < 0,005$) *r*-Werte wurden dick hervorgehoben.

	All (n=311)	No DM (n=193)	DM2 (n=118)
S1P-Korrelation	<i>r-Wert</i>	<i>r-Wert</i>	<i>r-Wert</i>
EF [%]	0,008143	0,08768	-0,04443
SV [ml]	0,03464	0,08976	-0,06357
SV-Index [ml/mm ²]	0,07614	0,232	0,006671
E/A	-0,05718	-0,07965	0,04865
E/e'	-0,0625	-0,001627	0,05839
septal e'	-0,05695	-0,06947	-0,0788
lateral e'	-0,05687	0,009891	-0,2739
LA-Volumen	-0,02671	-0,08521	0,01441
Diastolische Septumdicke [IVSd]	0,04431	-0,02273	0,002958
Interner Diameter [LVIDd]	0,01653	-0,03623	-0,01862
Diastolische Hinterwanddicke [LVPWd]	-0,1131	0,02614	-0,03369
Diameter LVOT	-0,09296	-0,08092	-0,1304
Dezelerationszeit [ms]	-0,06036	0,04272	-0,09384
TAPSE	0,04547	0,06048	0,001268
PISA [cm]	0,101	0,1525	0,6269
RV Mitte [mm]	-0,02136	-0,04367	0,0234
AK maxAK	0,02316	0,05566	-0,01587
AK_Vmax LVOT [m/s]	-0,135	-0,193	0,04061
AK_dPmean [mmHg]	0,07698	0,1311	-0,03893
AK_dPmax [mmHg]	0,05235	0,08866	-0,02582
AK_KÖF VTI [cm ²]	0,02745	-0,009524	-0,06656
AK_KÖF Vmax [cm ²]	0,006754	0,01915	-0,06546
PaSysTR-dPmax [+ ZVD]	-0,05137	-0,08252	0,1654

Abbildung 18: Korrelation der S1P Konzentration und struktureller Echokardiographischer Parameter dargestellt als *Heatmap*. Signifikante r-Werte ($p < 0,005$) wurden dick hervorgehoben. Diameter LVOT: Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstrakts. Dezelerationszeit [ms]: Zeit des Blutflussabfalls in der frühen Diastole. TAPSE: Systolische Funktion des rechten Ventrikels. PISA [cm]: Fläche zur Quantifizierung von Regurgitationen. RV Mitte [mm]: Durchmesser des rechten Ventrikels in der Mitte. AK maxAK: Maximale Geschwindigkeit über der Aortenklappe. AK_Vmax LVOT [m/s]: Maximale Blutflussgeschwindigkeit im LVOT. AK_dPmean [mmHg]: Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe. AK_dPmax [mmHg]: Maximaler Druckgradient über der Aortenklappe. AK_KÖF VTI [cm²]: Klappenöffnungsfläche basierend auf VTI. AK_KÖF Vmax [cm²]: Klappenöffnungsfläche basierend auf Vmax. PaSysTR-dPmax [+ ZVD]: Maximaler systolischer Druckgradient der TR mit ZVD.

3.2 Zusammenhang von S1P und Erholung nach AMI im murinen Modell

3.2.1 Myokardiale Strain vor und nach AMI im DIO-Modell

Globale Myokardiale Strain:

Um den potenziell therapeutischen Nutzen von S1P überprüfen zu können, wurde zunächst im diabetischen Mausmodell die myokardiale Strain vor- und nach Induktion eines myokardialen Infarktes untersucht. Hierzu erfolgte 24h vor und nach Infarkt eine echokardiographische Untersuchung mit anschließender Ermittlung der globalen longitudinalen und zirkumferentiellen Strain.

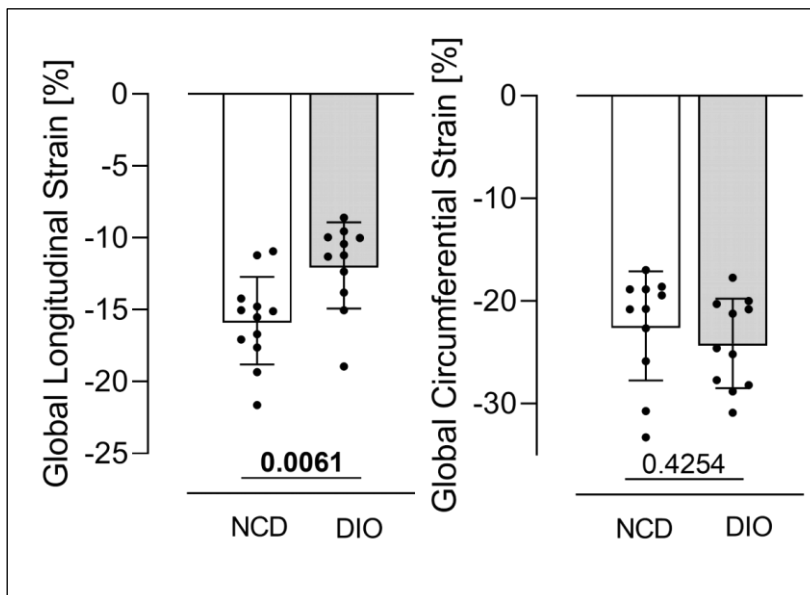


Abbildung 19: Globale longitudinale und zirkumferentielle Strain im NCD- und DIO-Modell vor Infarkt.

Hierbei zeigte sich, dass die Tiere mit gestörter Glucosetoleranz (n=11) im Vergleich zu Tieren, die Standardfutter erhalten haben (n=12), bereits vor Infarkt eine hoch signifikant schlechtere globale longitudinale Strain aufwiesen, während die zirkumferentielle Strain keinen Unterschied zeigte (Longitudinal - DIO $-11,93 \pm 2,99$ vs. NCD $-15,77 \pm 3,039$, $p = 0,0061$; Zirkumferentiell - DIO $-24,14 \pm 4,36$ vs. NCD $-22,46 \pm 5,31$, $p = 0,4254$, s. Abbildung 19).

Strain im nicht-infarzierten Remote Bereich:

Neben der Beurteilung der globalen Strain, wurden, zur genaueren Beurteilung einer möglichen Beeinflussung von DOP, die echokardiographischen Bilder der Versuchstiere im Rahmen der Auswertung zusätzlich in zwei Bereiche unterteilt: den infarzierten Infarktbereich und den gegenüberliegenden Bereich, die sogenannte Remote-Zone. Ziel unserer Untersuchung war es herauszufinden, ob die Gabe von DOP die kardiale Funktion im Remote-Bereich verbessern und somit zu einem verbesserten myokardialen Umbau und Überleben nach einem ischämischen Ereignis führen kann. Für die jeweiligen Bereiche wurde anschließend die longitudinale, zirkumferentielle und radiale Strain ermittelt. Zur statischen Auswertung der Versuchsgruppen wurde eine A-NOVA-Analyse verwendet.

Für Betrachtung der longitudinalen Strain ergab sich nach dem Infarkt keine Verbesserung der Kontraktion oder der Kontraktionszeit in der Gruppe der mit DOP behandelten Versuchstiere (Baseline: T2P - NCD-DOP $63,89 \pm 7,544$ vs. NCD+DOP $59,04 \pm 6,925$ vs. DIO-DOP $66,48 \pm 10,75$ vs. DIO+DOP $59,83 \pm 8,097$, $p = 0,2718$; Pk - NCD-DOP $-13,31 \pm 2,772$ vs. NCD+DOP $-13,47 \pm 3,394$ vs. DIO-DOP $-13,30 \pm 4,107$ vs. DIO+DOP $-10,54 \pm 1,827$, $p = 0,4228$; Post-IR: T2P - NCD-DOP $58,44 \pm 9,547$ vs. NCD+DOP $63,67 \pm 15,18$ vs. DIO-DOP $60,71 \pm 13,28$ vs. DIO+DOP $72,96 \pm 41,51$, $p = 0,8591$; Pk - NCD-DOP $-7,762 \pm 3,728$ vs. NCD+DOP $-9,090 \pm 5,162$ vs. DIO-DOP $-7,720 \pm 3,288$ vs. DIO+DOP $-7,160 \pm 2,197$, $p = 0,8214$, $n = 6-8$, s. Abbildung 20).

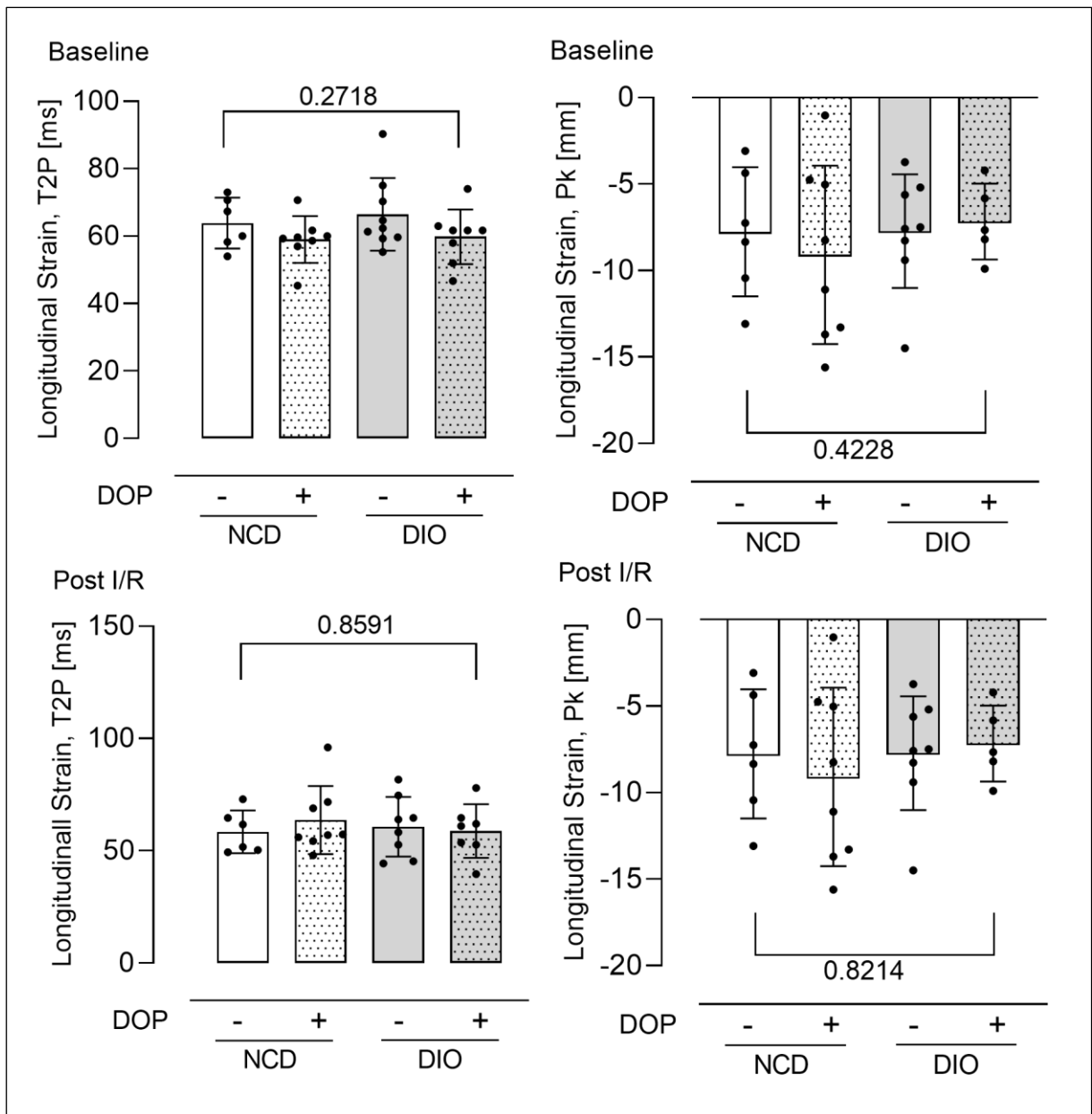


Abbildung 20: Longitudinale Strain vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

Für die zirkumferentielle Strain zeigte sich nach Infarkt ebenfalls keine Verbesserung der Kontraktion oder der Kontraktionszeit für die Gruppe der behandelten Versuchstiere (Baseline: T2P - NCD-DOP $58,96 \pm 8,530$ vs. NCD+DOP $65,13 \pm 5,768$ vs. DIO-DOP $70,22 \pm 5,164$ vs. DIO+DOP $77,80 \pm 30,31$, $p = 0,1023$; Pk - NCD-DOP $-20,10 \pm 3,784$ vs. NCD+DOP $-24,89 \pm 4,025$ vs. DIO-DOP $-27,20 \pm 6,156$ vs. DIO+DOP $-23,02 \pm 5,086$, $p = 0,0464$; Post-IR: T2P - NCD-DOP $56,60 \pm 5,292$ vs. NCD+DOP $59,00 \pm 6,429$ vs. DIO-DOP $64,63 \pm 14,50$ vs. DIO+DOP $85,00 \pm 49,72$, $p = 0,1542$; Pk - NCD-

DOP $-19,59 \pm 6,313$ vs. NCD+DOP $-17,56 \pm 6,441$ vs. DIO-DOP $-18,17 \pm 6,462$ vs. DIO+DOP $-12,85 \pm 2,713$, $p = 0,2707$, $n=6-8$, s. Abbildung 21)

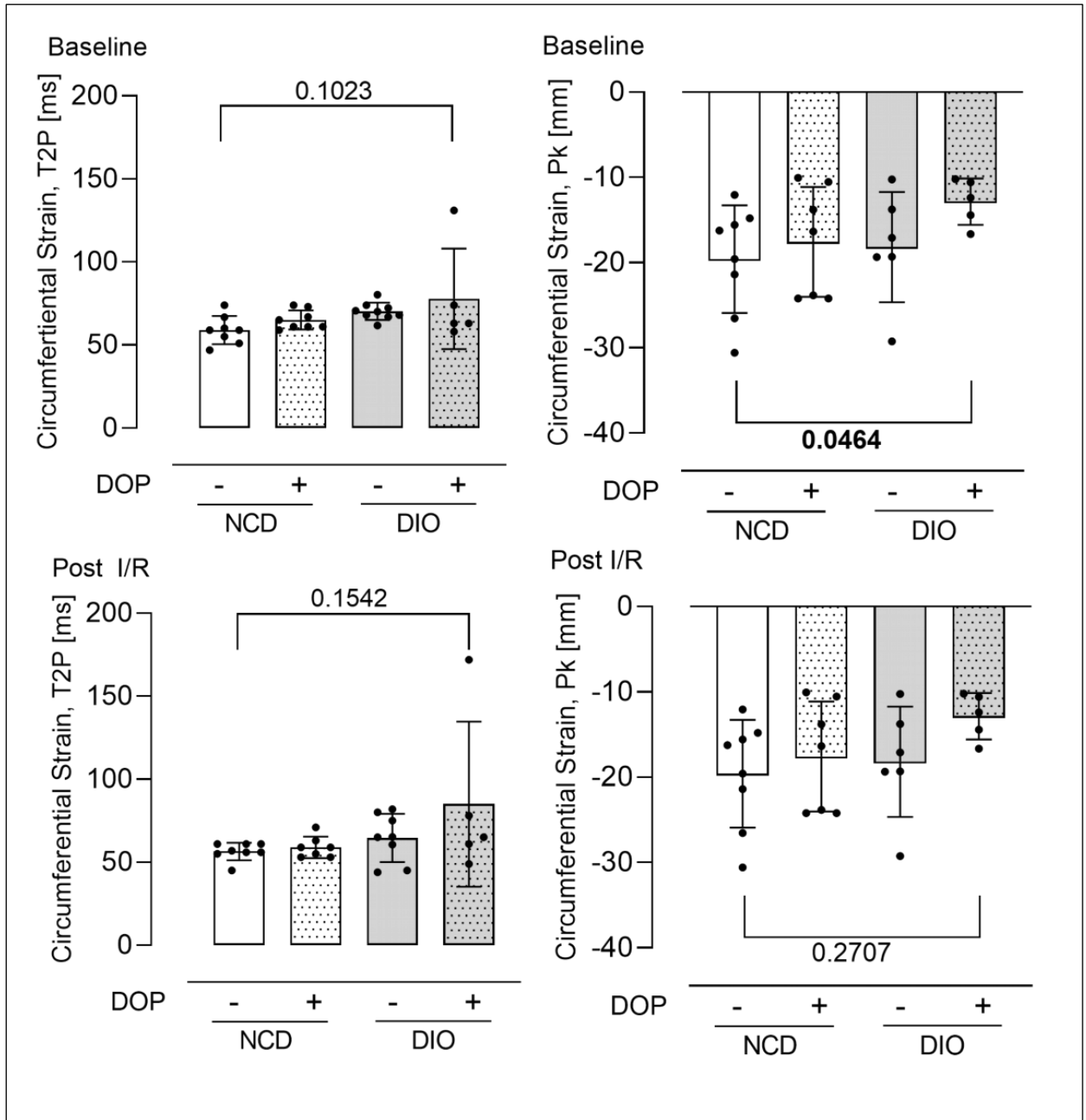


Abbildung 21: Zirkumferentielle Strain vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

Für die radialen Verschiebung sowie für die Verschiebungszeit zeigte sich im Remote-Bereich eine hochsignifikante Verbesserung durch die DOP-Behandlung (Baseline: T2P - NCD-DOP $57,75 \pm 4,773$ vs. NCD+DOP $68,86 \pm 5,080$ vs. DIO-DOP $67,15 \pm 5,697$ vs. DIO+DOP $62,75 \pm 4,787$, $p = 0,0016$; Displacement - NCD-DOP $0,4294 \pm$

0,07054 vs. NCD+DOP $0,2291 \pm 0,02178$ vs. DIO-DOP $0,4763 \pm 0,1032$ vs. DIO+DOP $0,1715 \pm 0,05243$, $p < 0,0001$; Post-IR: T2P - NCD-DOP $56,75 \pm 5,825$ vs. NCD+DOP $58,29 \pm 5,908$ vs. DIO-DOP $56,33 \pm 10,86$ vs. DIO+DOP $69,20 \pm 8,497$, $p = 0,0405$; Displacement - NCD-DOP $0,3594 \pm 0,1352$ vs. NCD+DOP $0,1707 \pm 0,04552$ vs. DIO-DOP $0,2983 \pm 0,1634$ vs. DIO+DOP $0,1701 \pm 0,04423$, $p = 0,0088$, $n=5-8$, s. Abbildung 22).

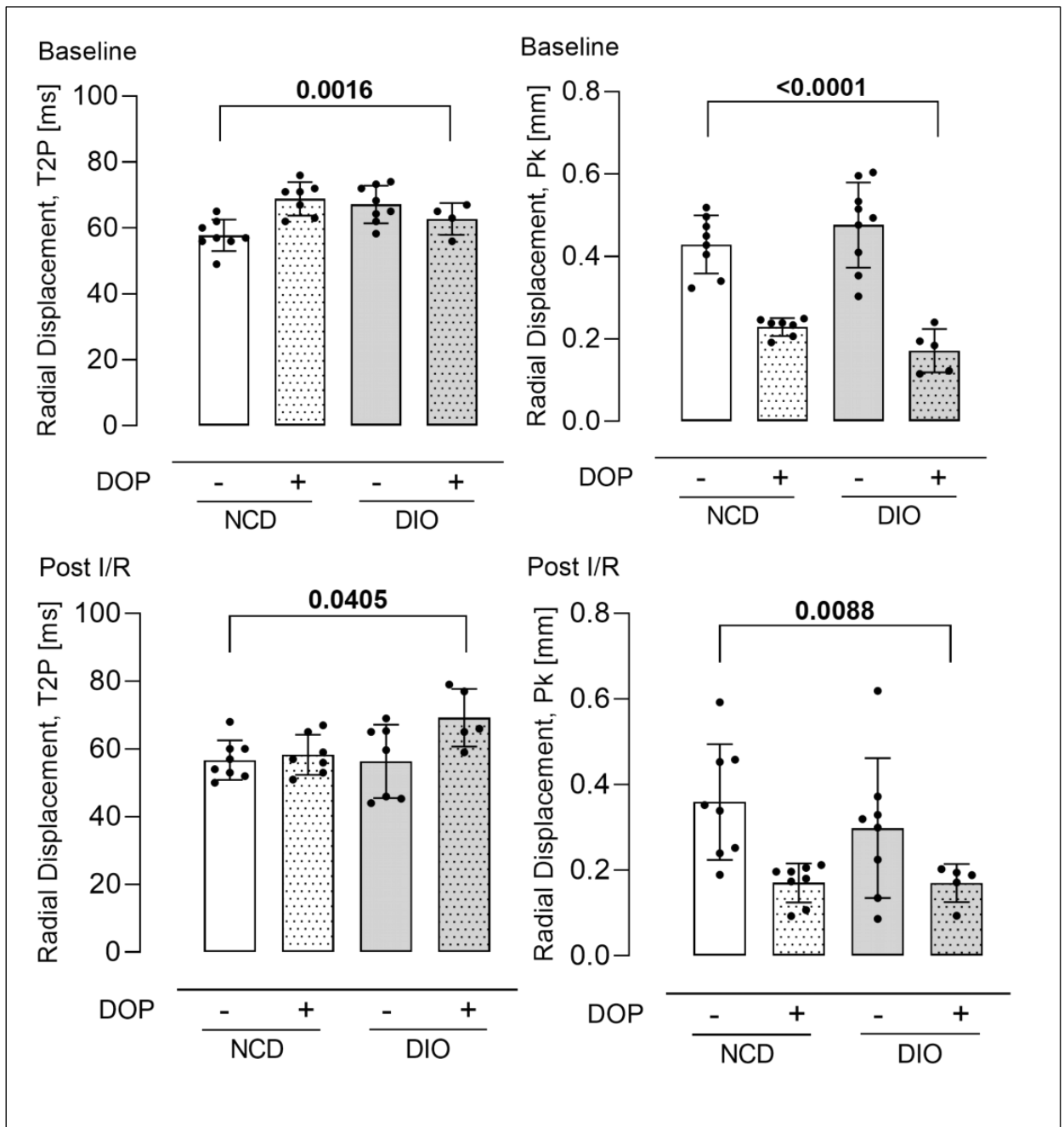


Abbildung 22: Radiale Verkürzung vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

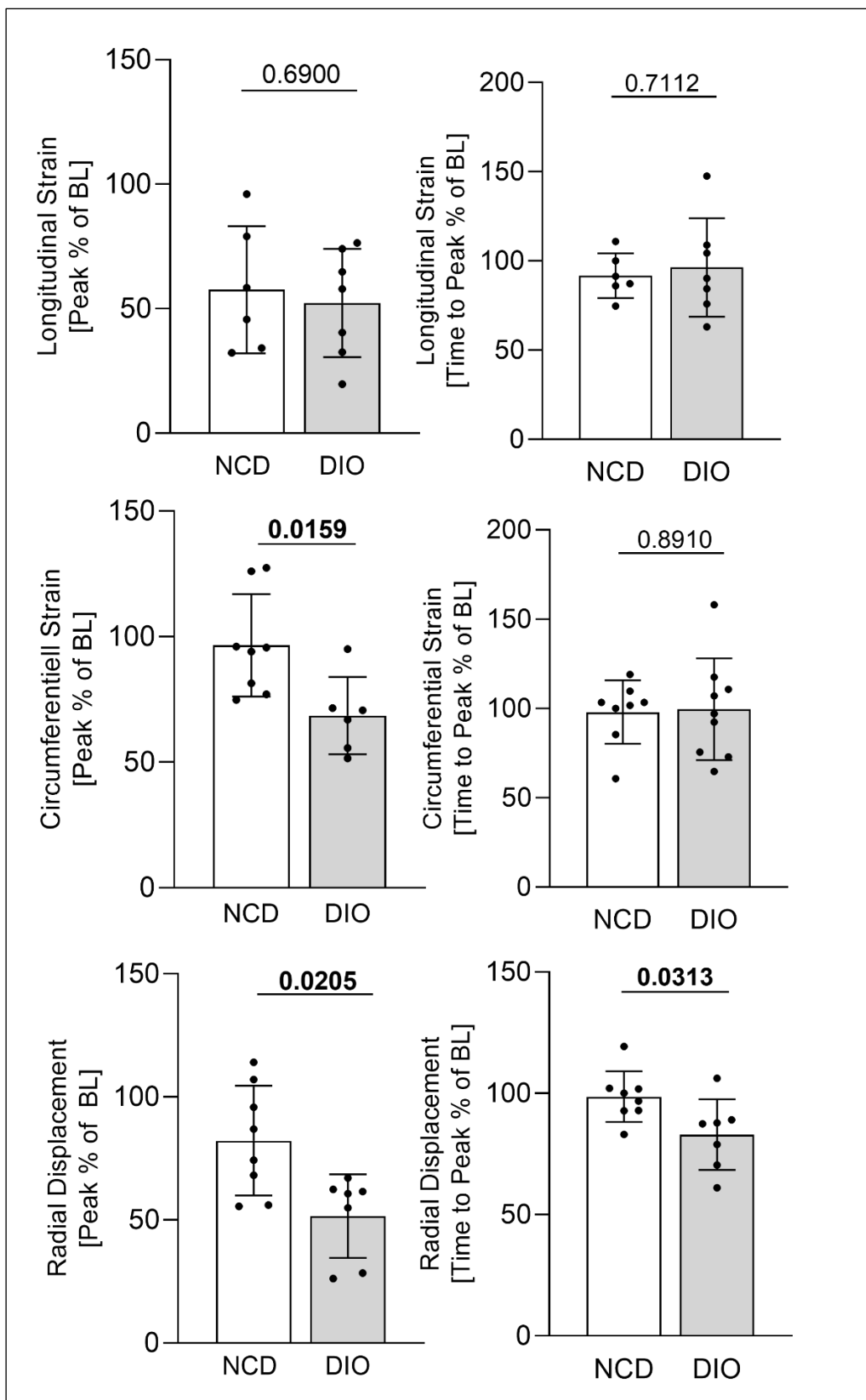


Abbildung 23: Prozentuale Veränderung der Strain im Remote-Bereich von NCD- und DIO-Tieren. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.

Zusätzlich zu einer ANOVA-Analyse wurde das prozentuale Verhältnis vor und nach dem Infarkt in den Gruppen der NCD-Versuchstiere und DIO-Tiere ohne DOP-Behandlung berechnet und in Abbildung 23 dargestellt. Dabei zeigte sich in der Remote-Zone bei den überlebenden DIO-Mäusen (n=6) im Vergleich zu den verbliebenen NCD-Tieren (n=8) eine signifikant schlechtere Myokardverkürzung sowohl in der zirkumferentiellen als auch in der radialen Verkürzung (Pk: zirkumferentiell - NCD $96,5 \pm 20,4$ % vs. DIO $68,58 \pm 15,35$ %, $p = 0,0159$; radial – NCD $82,23 \pm 22,3$ % vs. DIO $51,62 \pm 17,0$ %, $p = 0,0205$). Ferner zeigte sich bei den diabetischen Mäusen eine verringerte Kontraktionszeit in der radialen Verkürzung (T2P: DIO $82,99$ % $\pm 14,55$ vs. NCD $98,60$ % $\pm 10,43$, $p = 0,0313$). Die longitudinale Strain zeigte weder für die Verkürzung noch für die Verkürzungszeit signifikante Unterschiede (Pk: NCD $57,65 \pm 25,6$ % vs. DIO $52,3$ %, $p = 0,6900$; T2P: NCD $91,72 \pm 12,44$ % vs. DIO $96,38 \pm 27,55$ %, $p = 0,7112$). Auch die zirkumferentielle Verkürzungszeit zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen (T2P: NCD $97,96 \pm 17,74$ % vs. DIO $99,59 \pm 28,49$ %, $p = 0,8910$).

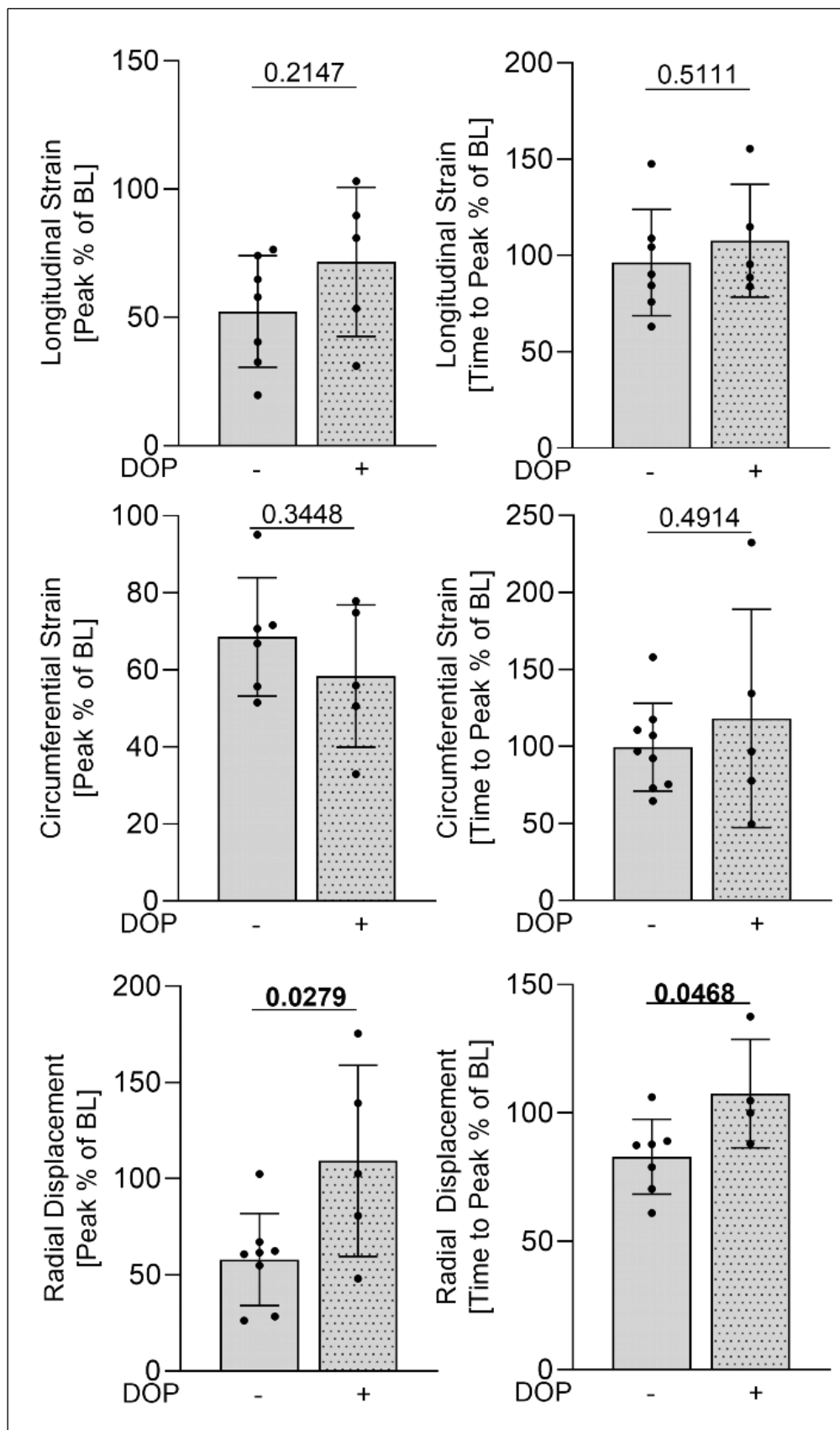


Abbildung 24: Prozentuale Veränderung der Strain im Remote-Bereich von DIO-Tieren mit- und ohne DOP-Behandlung. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.

Letztlich erfolgte der prozentuale Vergleich der Verkürzung vor- und nach Infarkt für die Gruppe der DIO-Tiere mit und ohne DOP Behandlung, um einen potenziellen Nutzen für das Auskommen im diabetischen Modell zu sehen. Diese Ergebnisse werden in Abbildung 24 präsentiert. Im Remote-Bereich des Myokards zeigte sich bei den mit DOP behandelten Tieren eine signifikante Verbesserung der radialen Verkürzung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, allerdings zu einer verlängerten Gesamtkontraktionszeit (Displacement – DIO $57,97 \pm 23,90$ % vs. DIO+DOP $109,0 \pm 49,64$ %, $p = 0,0279$; T2P – DIO $82,99 \pm 14,55$ % vs. DIO+DOP $107,6 \pm 21,15$ %, $p = 0,0468$, $n = 4-7$). Im Bereich der longitudinalen sowie der zirkumferentiellen Strain konnte jedoch keine signifikante Verbesserung der Kontraktion festgestellt werden (longitudinal: Pk – DIO $52,28 \pm 21,77$ % vs. DIO+DOP $71,63 \pm 29,07$ %, $p = 0,2147$; T2P – DIO $96,38 \pm 27,55$ % vs. DIO+DOP $107,6 \pm 29,23$ %, $p = 0,5111$, $n = 5-7$; zirkumferentiell: Pk – DIO $68,58 \pm 15,35$ % vs. DIO+DOP $58,44 \pm 18,45$ %, $p = 0,3448$; T2P – DIO $99,59 \pm 28,49$ % vs. DIO+DOP $118,2 \pm 70,90$ %, $p = 0,4914$, $n = 5-9$).

Strain im Infarktbereich:

Analog zu der Auswertung des Remote-Bereichs, erfolgte auch eine statistische Analyse der Strain im Infarktgebiet, ebenfalls mittels ANOVA. Hier zeigte sich für die longitudinale Strain keine signifikante Verbesserung durch DOP-Behandlung (Baseline: T2P - NCD-DOP $62,94 \pm 13,62$ vs. NCD+DOP $59,96 \pm 7,263$ vs. DIO-DOP $69,57 \pm 20,33$ vs. DIO+DOP $57,87 \pm 9,008$, $p = 0,4173$; Pk - NCD-DOP $-11,40 \pm 4,464$ vs. NCD+DOP $-13,47 \pm 3,394$ vs. DIO-DOP $-11,20 \pm 4,383$ vs. DIO+DOP $-8,454 \pm 2,654$, $p = 0,1914$; Post-IR: T2P - NCD-DOP $61,11 \pm 3,643$ vs. NCD+DOP $57,14 \pm 8,524$ vs. DIO-DOP $57,79 \pm 17,06$ vs. DIO+DOP $53,67 \pm 15,62$, $p = 0,8113$; Pk - NCD-DOP $-7,332 \pm 2,090$ vs. NCD+DOP $-9,090 \pm 5,162$ vs. DIO-DOP $-7,051 \pm 1,832$ vs. DIO+DOP $-5,589 \pm 2,589$, $p = 0,1914$, $n = 5-8$, s. Abbildung 25). In der zirkumferentiellen Strain präsentierte sich die Verkürzung für die behandelte Gruppe signifikant verbessert. Die Verkürzungszeit war dabei unverändert (Baseline: T2P - NCD-DOP $55,88 \pm 4,912$ vs. NCD+DOP $62,75 \pm 4,018$ vs. DIO-DOP $65,19 \pm 6,258$ vs. DIO+DOP $80,00 \pm 43,83$, $p = 0,1617$; Pk - NCD-DOP $-19,64 \pm 3,080$ vs. NCD+DOP $-24,54 \pm 5,820$ vs. DIO-DOP $-22,51 \pm 6,106$ vs. DIO+DOP $-18,13 \pm 7,399$, $p = 0,1785$; Post-IR: T2P - NCD-DOP $65,13 \pm 6,833$ vs. NCD+DOP $53,86 \pm 4,018$ vs. DIO-DOP $65,41 \pm 18,43$ vs. DIO+DOP $66,25 \pm 3,202$, $p = 0,1756$; Pk - NCD-DOP $-11,33 \pm 4,538$ vs. NCD+DOP -

23,08 ± 6,175 vs. DIO-DOP -14,55 ± 6,604 vs. DIO+DOP -14,18 ± 9,795, p = 0,0100, n = 5-9, s. Abbildung 26). Für das radiale Displacement zeigte sich im Infarktgebiet keine signifikante Verbesserung der Kontraktion sowie der Kontraktionszeit durch Gabe von DOP nach MI (Baseline: T2P - NCD-DOP 57,13 ± 3,720 vs. NCD+DOP 66,05 ± 4,152 vs. DIO-DOP 66,26 ± 7,038 vs. DIO+DOP 62,75 ± 7,274, p = 0,0109; Displacement - NCD-DOP 0,4070 ± 0,05792 vs. NCD+DOP 0,2405 ± 0,03591 vs. DIO-DOP 0,4364 ± 0,1016 vs. DIO+DOP 0,1870 ± 0,05819, p < 0,0001; Post-IR: T2P - NCD-DOP 60,50 ± 6,990 vs. NCD+DOP 56,43 ± 5,350 vs. DIO-DOP 60,33 ± 14,09 vs. DIO+DOP 70,60 ± 8,820, p = 0,1133; Displacement - NCD-DOP 0,2649 ± 0,08428 vs. NCD+DOP 0,2405 ± 0,03591 vs. DIO-DOP 0,4364 ± 0,1016 vs. DIO+DOP 0,2061 ± 0,1024, p = 0,1156, n = 5-8, s. Abbildung 27).

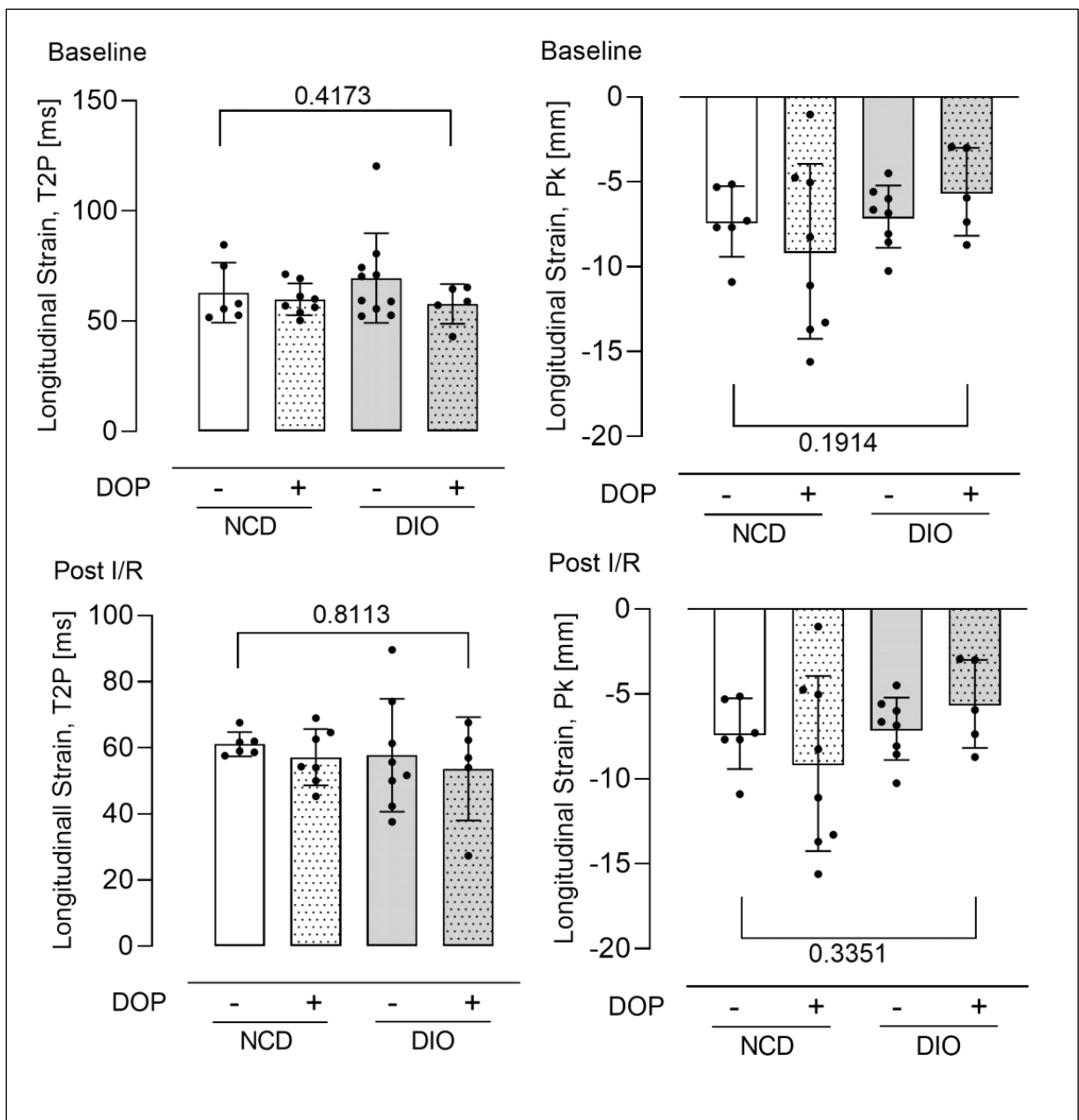


Abbildung 25: Longitudinale Strain vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

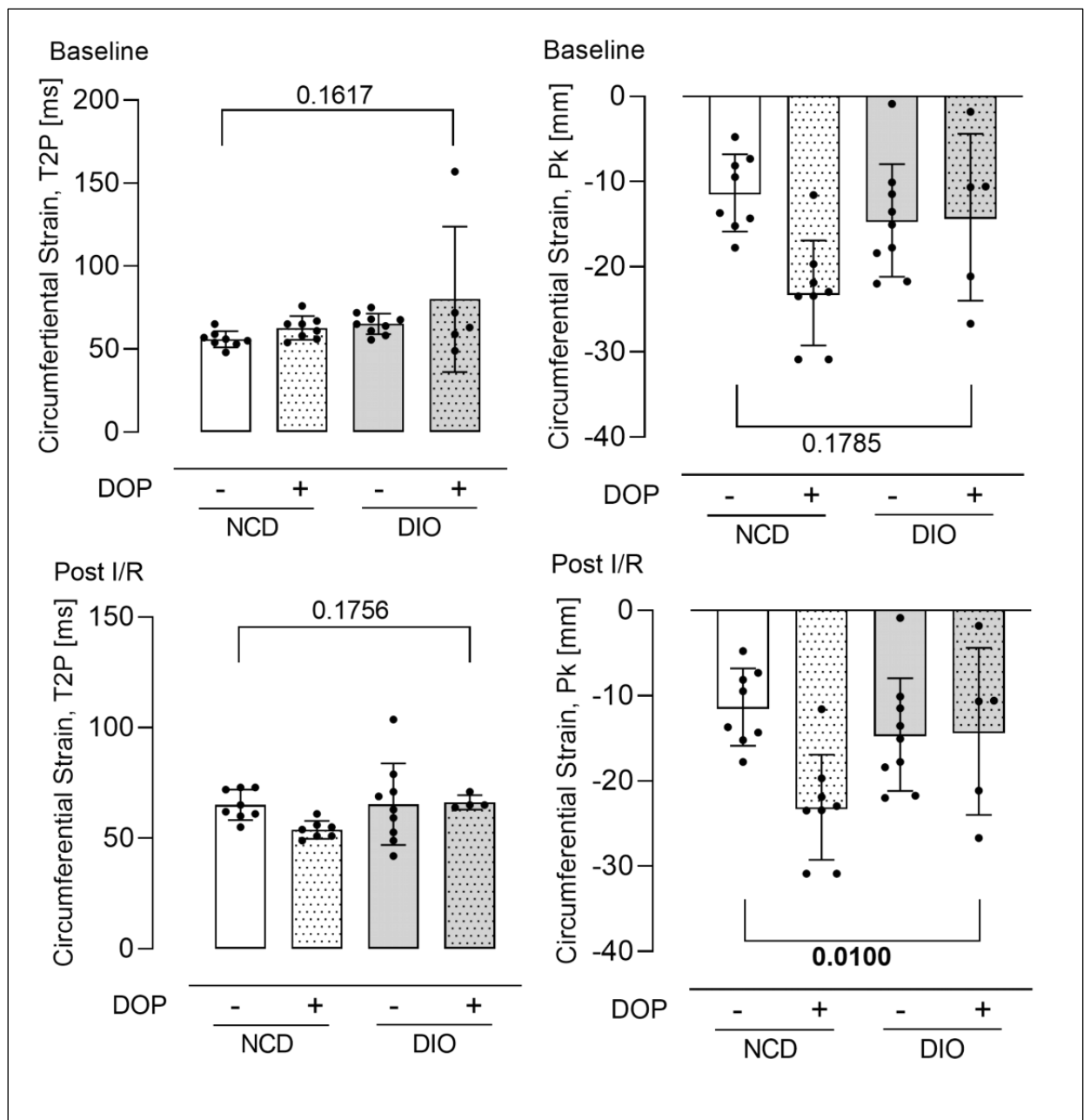


Abbildung 26: Zirkumferentielle Strain vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

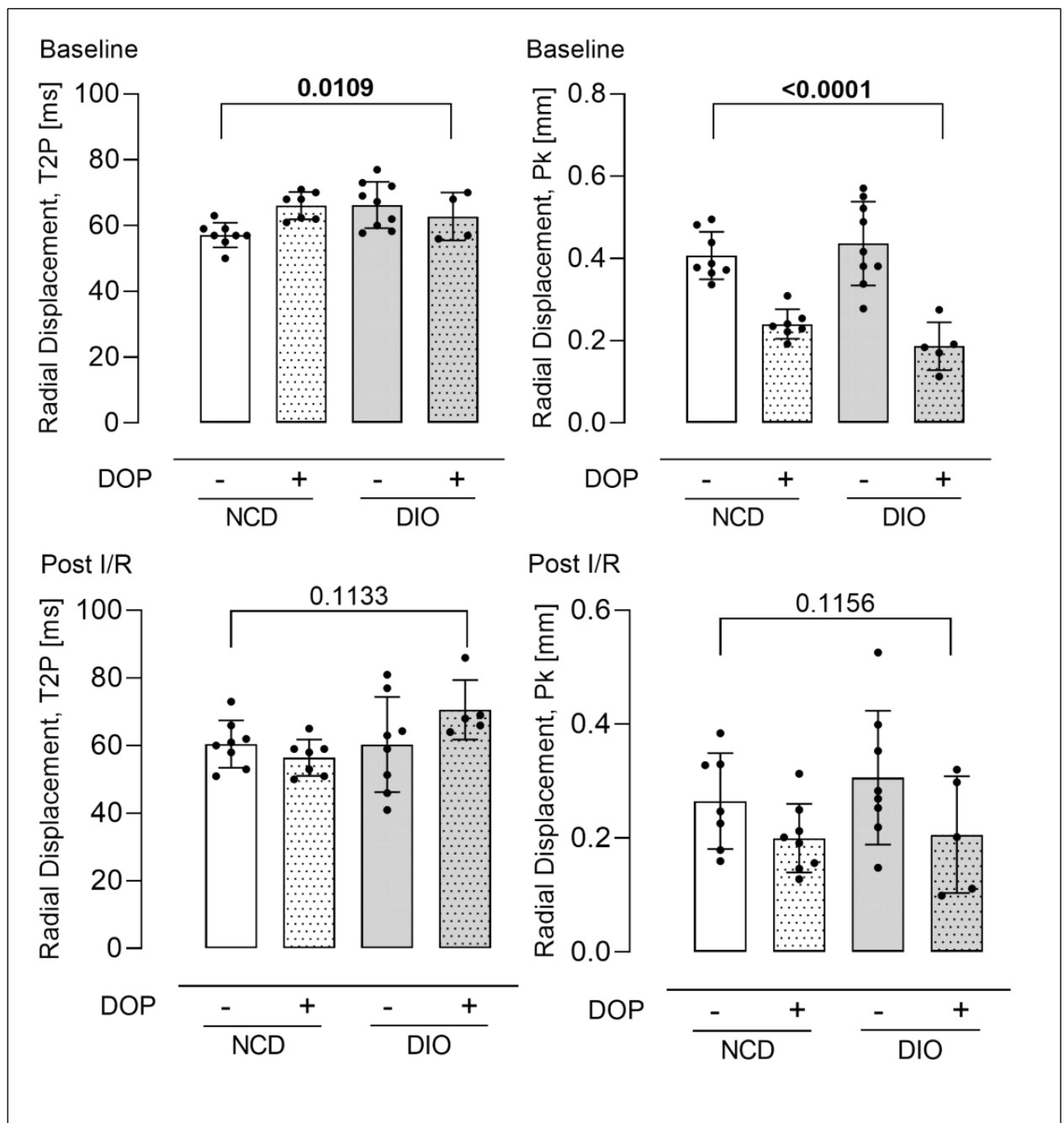


Abbildung 27: Radiale Verkürzung vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

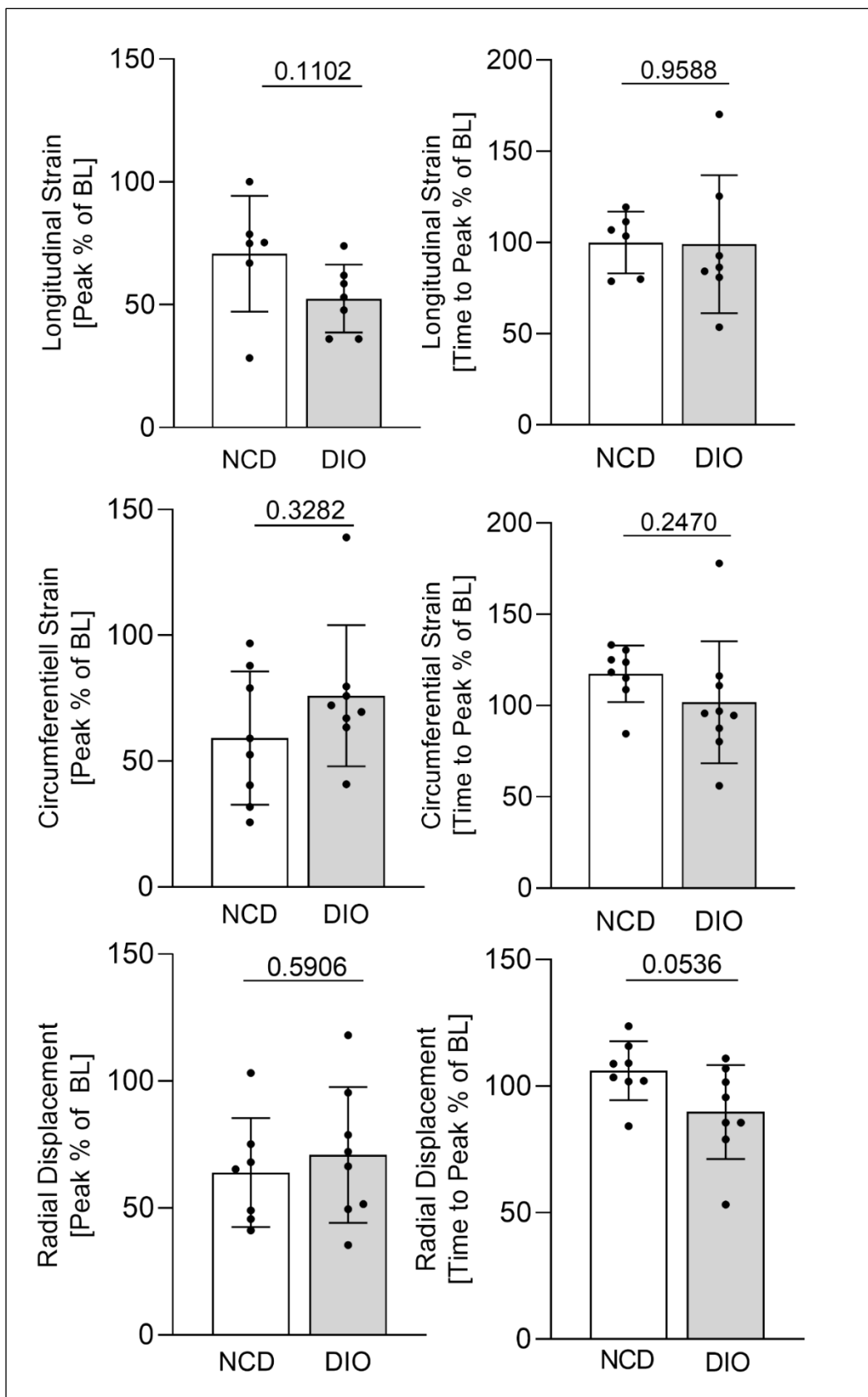


Abbildung 28: Prozentuale Veränderung der Strain im Infarkt-Bereich von NCD- und DIO-Tieren. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.

Wie in der Remote-Zone erfolgte auch für die Infarktzone ein prozentualer Vergleich der NCD- und DIO-Tiere vor- und nach MI. Hier zeigte sich bei keinem Segment ein signifikanter Unterschied (Longitudinal – T2P: NCD $99,97 \pm 17,87\%$ vs. DIO $99,08 \pm 37,82\%$, $p = 0,9588$; Pk: NCD $70,72 \pm 23,6\%$ vs. DIO $52,5\%$, $p = 0,1102$; zirkumferentiell – T2P: NCD $117,4 \pm 15,47\%$ vs. DIO $101,8 \pm 33,45\%$, $p = 0,2470$; Pk: NCD $59,17 \pm 26,46\%$ vs. DIO $75,96 \pm 28,05\%$, $p = 0,3282$; radial – T2P: NCD $106,1 \pm 11,63\%$ vs. DIO $89,78 \pm 18,54\%$, $p = 0,0536$; Displacement: NCD $63,96 \pm 21,45\%$ vs. DIO $70,93 \pm 26,7\%$, $p = 0,5906$, $n = 8-9$, s. Abbildung 28).

Zudem wurde auch der Vergleich zwischen den DIO-Tieren mit und ohne DOP Behandlung für den Infarktbereich analysiert. Hier zeigte sich keine Verbesserung durch DOP-Behandlung in der longitudinalen sowie der zirkumferentiellen Strain (longitudinal: Pk – DIO $52,47 \pm 13,81\%$ vs. DIO+DOP $70,69 \pm 37,08\%$, $p = 0,2553$; T2P – DIO $99,08 \pm 37,82\%$ vs. DIO+DOP $93,98 \pm 28,57\%$, $p = 0,8053$; zirkumferentiell: Pk – DIO $75,96 \pm 28,05\%$ vs. DIO+DOP $57,98 \pm 45,95\%$, $p = 0,2828$; T2P – DIO $94,25 \pm 35,41\%$ vs. DIO+DOP $88,40 \pm 33,70\%$, $p = 0,7793$, $n = 4-11$, Abbildung 29). Im radialen Bereich zeigten mit DOP-behandelte Tiere eine verlängerte Kontraktionszeit, während die Verkürzung keine Signifikanz zeigte (Displacement – DIO $70,93 \pm 26,71\%$ vs. DIO+DOP $92,11 \pm 54,49\%$, $p = 0,3756$; T2P – DIO $89,78 \pm 18,54\%$ vs. DIO+DOP $113,8 \pm 11,50\%$, $p = 0,0412$, $n = 4-8$, s. Abbildung 29).

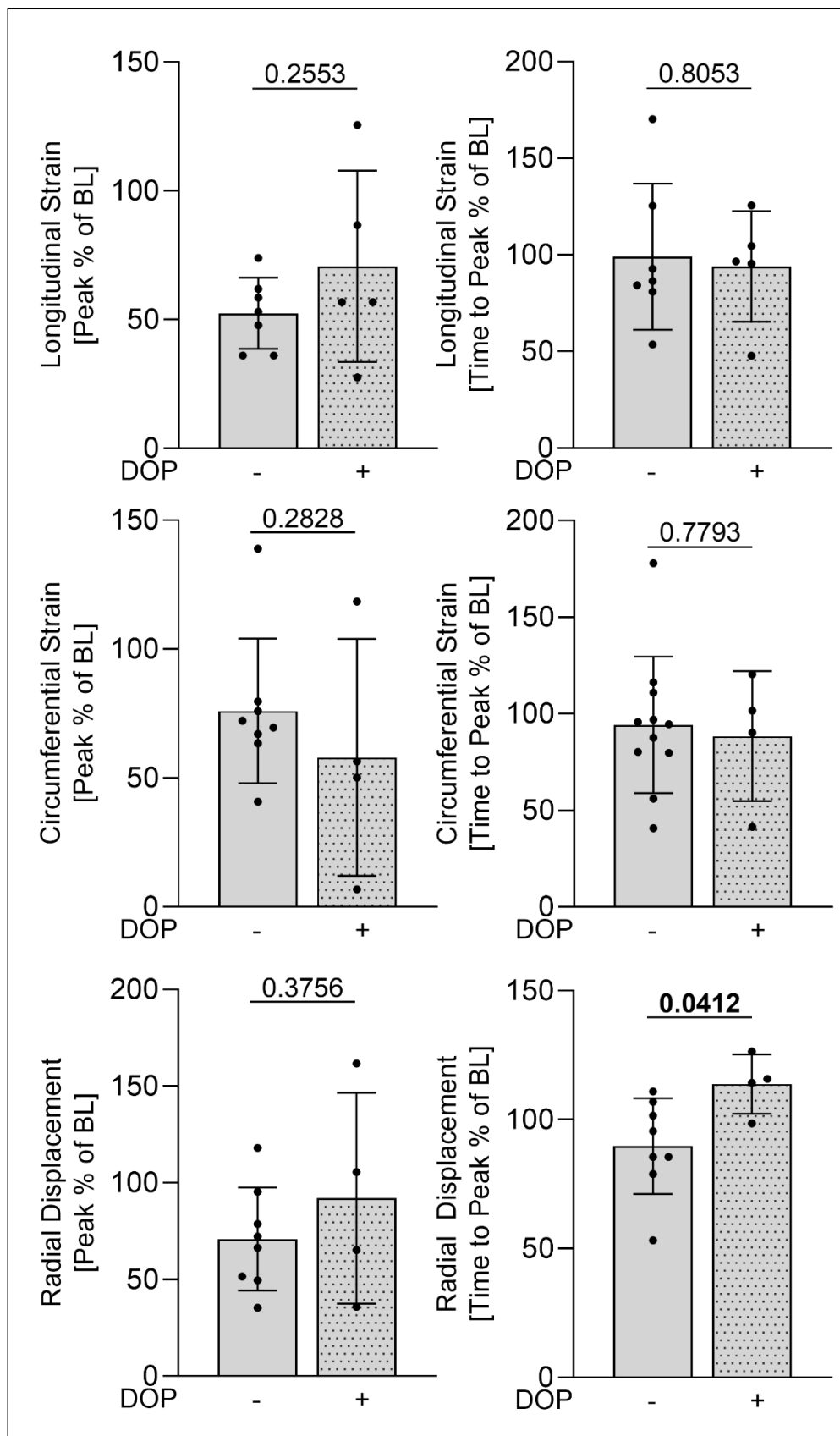


Abbildung 29: Prozentuale Veränderung der Strain im Infarkt-Bereich von DIO-Tieren mit- und ohne DOP-Behandlung. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.

	Longitudinal	Radial	Zirkumferentiell
Basal Global	DIO verschlechtert	///	DIO kein signifikanter Unterschied
Post IR Remote	DIO kein signifikanter Unterschied	DIO signifikant verschlechtert	DIO signifikant verschlechtert
Post IR Infarkt	DIO kein signifikanter Unterschied	DIO kein signifikanter Unterschied	DIO kein signifikanter Unterschied

Tabelle 8: Zusammenfassung der myokardialen Strain Analyse von NCD- und DIO-Tieren.

Abschließend lässt sich feststellen, dass Mäuse unter diabetischen Bedingungen bereits vor einem Infarkt eine schlechtere longitudinale Strain aufweisen, während die zirkumferentielle Strain im Vergleich zu den NCD-Tieren keinen Unterschied zeigt. Nach einem MI weisen die DIO-Tiere im Remote-Bereich eine schlechtere radiale und zirkumferentielle Strain auf, während diese im Infarktgebiet den Werten der NCD-Tiere entspricht (Tabelle 8). Die Behandlung mit DOP verbessert die myokardiale Funktion insbesondere im Bereich der radialen Verkürzung. Hier zeigten die diabetischen Tiere eine verbesserte Kontraktion, allerdings auf Kosten einer verlängerten Kontraktionszeit.

3.3 Bedeutung der Pannexine als Kanäle zur myokardialen S1P Freisetzung

Um zu untersuchen ob myokardial freigesetztes S1P aus Pannexin-Kanälen Auswirkungen auf die myokardiale Strain hat, wurden retrospektiv echokardiographische Daten von *Panx1*^{-/-}-Mäusen analysiert. Die Auswertung erfolgte analog zu denen der DIO-Tiere.

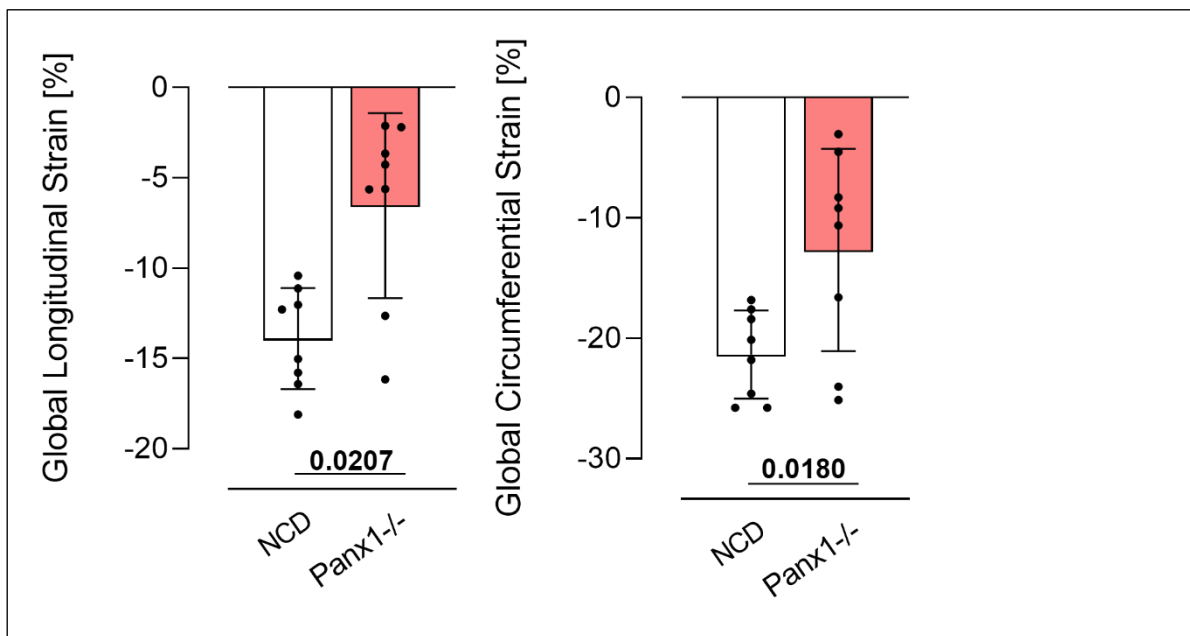


Abbildung 30: Globale longitudinale und zirkumferentielle Strain von *Panx1*^{-/-} Mäusen.

Zunächst wurde die globale longitudinale sowie zirkumferentielle Strain betrachtet und in Abbildung 30 dargestellt. Hier zeigte sich für die longitudinale Strain eine hochsignifikant schlechtere Verkürzung der Mäuse verglichen zu den genetisch unveränderten Tieren. Auch in der zirkumferentiellen Verkürzung präsentieren sich die genetisch veränderten Mäuse signifikant schlechter (Longitudinal: NCD (n=8) vs. *Panx1*^{-/-} (n=8); $-13,90 \pm 2,793$ vs. $-6,536 \pm 5,118$, $p = 0,0207$; Zirkumferentiell: NCD (n=8) vs. *Panx1*^{-/-} (n=8); $-21,35 \pm 3,671$ vs. $-12,76 \pm 8,400$, $p = 0,0180$).

Strain im Remote-Bereich:

Anschließend unterliefen diese Versuchstiere ebenfalls den I/R-Versuch. Auch in diesem Versuchsaufbau erfolgte vor und nach Infarktinduktion eine echokardiographische Untersuchung sowie die Aufteilung des Myokards in den infarzierten und nicht-infarzierten Remote-Bereich. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test.

In der longitudinalen Strain im Remote-Bereich zeigte sich keine Veränderung in der Verkürzungszeit. Die Verkürzung war hier für die Gruppe der Pannexin-defizienten Tiere jedoch signifikant besser im Vergleich zu den NCD-Tieren (T2P: NCD post IR (n = 8) $63,58 \pm 20,73$ vs. Panx1^{-/-} post IR (n = 9) $60,56 \pm 8,98$, p = 0,0767; Pk: NCD post IR (n = 8) $-6,66 \pm 4,89$ vs. Panx1^{-/-} post IR (n = 10) $-7,17 \pm 2,96$, p = 0,0015, s. Abbildung 31).

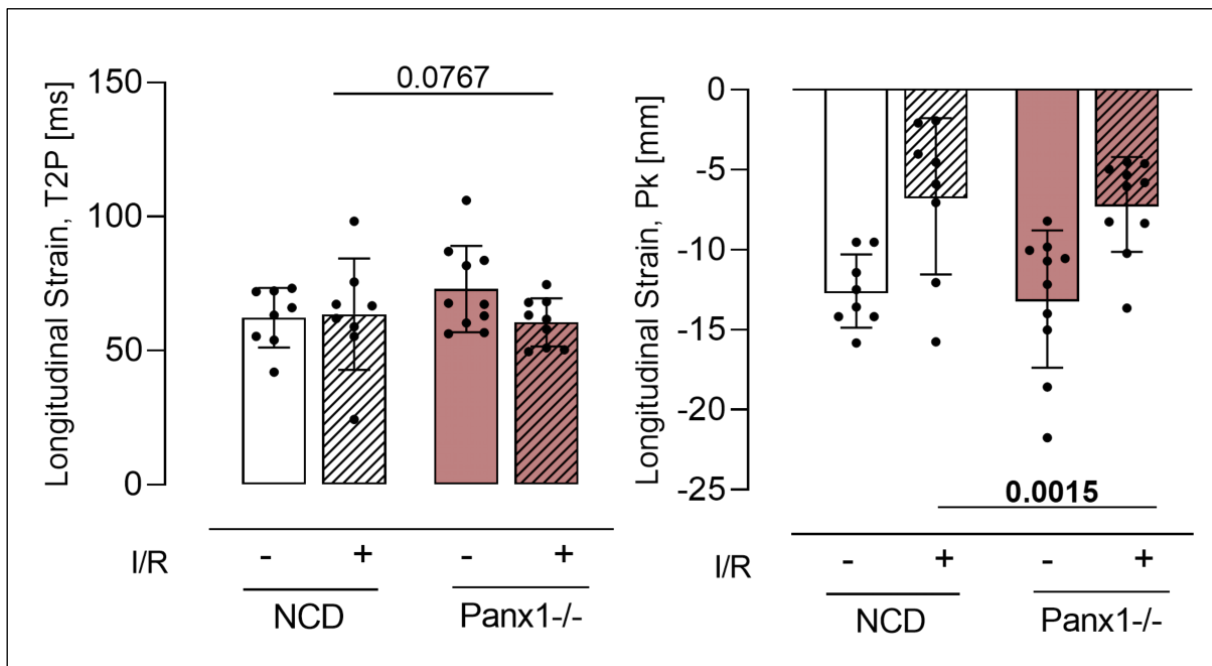


Abbildung 31: Longitudinale Strain vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich, Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

Die zirkumferentielle Strain zeigte eine tendenziell verlängerte Verkürzungszeit für die Gruppe der Pannexin-defizienten Mäuse, während die Verkürzung hoch signifikant besser im Vergleich zu den NCD-Tieren nach Infarkt war (T2P: NCD post IR (n = 8) $62,58 \pm 10,93$ vs. Panx1^{-/-} post IR (n = 8) $65,67 \pm 6,66$, p = 0,0568; Pk: NCD post IR

(n = 8) $-11,42 \pm 8,42$ vs. *Panx1*^{-/-} post IR (n = 10) $-14,92 \pm 4,38$, p = 0,0014, s. Abbildung 32).

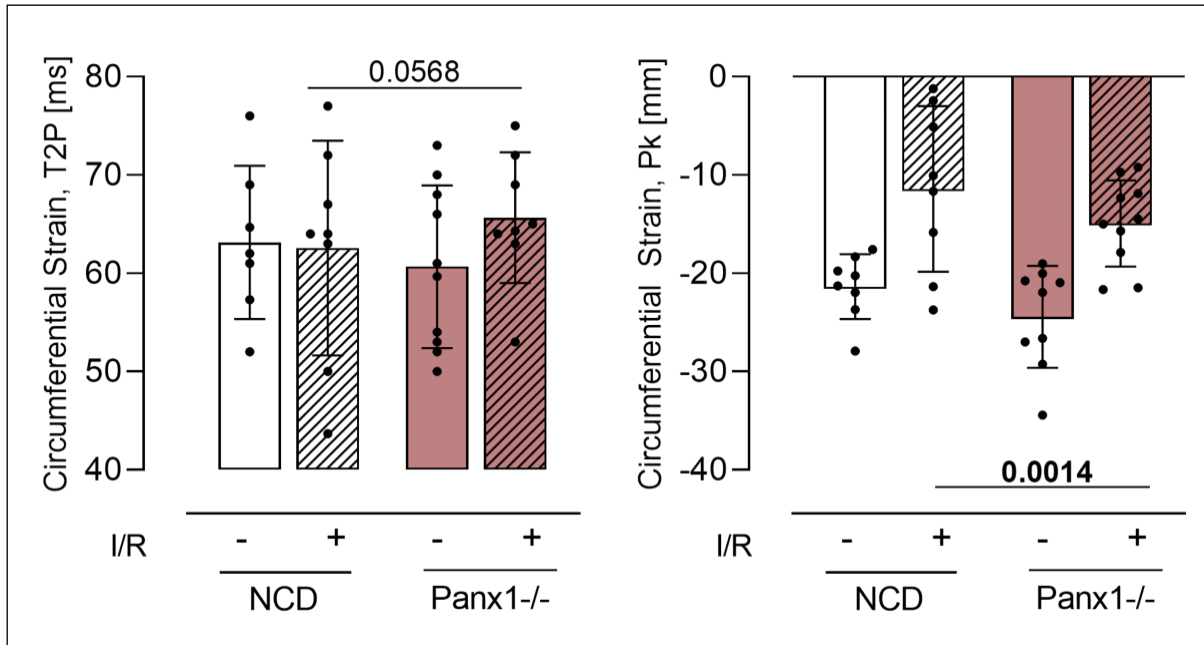


Abbildung 32: Zirkumferentielle Strain vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

In der radialen Verkürzung zeigte sich im Vergleich der NCD zu den *Panx1*^{-/-} Tieren eine tendenziell verlängerte Verkürzungszeit in der Gruppe der transgenen Mäuse bei einer hoch signifikant besseren Gesamtverkürzung im radialen Remote Bereich (T2P: NCD post IR (n=8) $60,77 \pm 6,815$ vs. *Panx1*^{-/-} post IR (n=9) $79,15 \pm 24,70$, p = 0,0613; Pk: NCD post IR (n=8) $13,91 \pm 10,12$ vs. *Panx1*^{-/-} post IR (n=10) $16,93 \pm 9,0$, p = 0,0045, s. Abbildung 33).

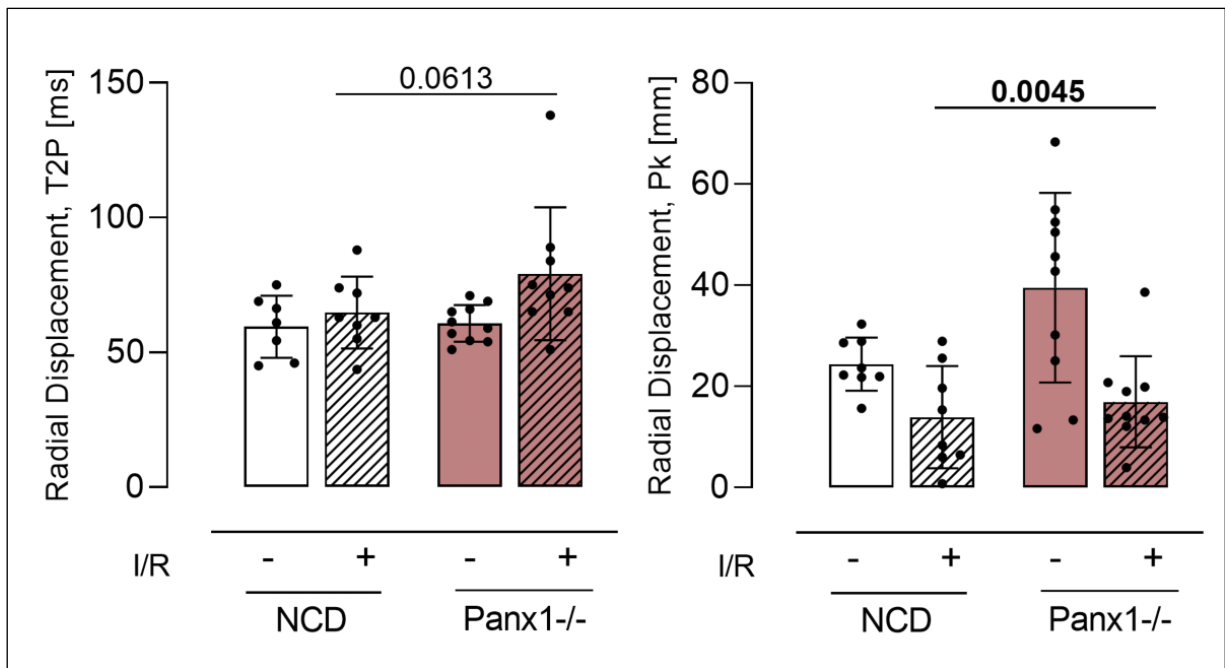


Abbildung 33: Radiale Verkürzung vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

Zuletzt wurden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen prozentual berechnet und in Abbildung 34 dargestellt. Es zeigte sich kein prozentualer Unterschied zwischen den prä- und post-IR-Daten im radialen, zirkumferentiellen und longitudinalen Remote Bereich (Radial - T2P % of BL: NCD (n = 8) $101,2 \pm 39,26\%$ vs. Panx1-/- (n = 10) $146,5 \pm 60,21\%$, $p = 0,0852$; Pk % of BL: NCD (n = 8) $55,44 \pm 35,42\%$ vs. Panx1-/- (n = 9) $44,3 \pm 27,25$, $p = 0,4688$; Zirkumferentiell - T2P % of BL: NCD (n = 8) $90,83 \pm 32,88\%$ vs. Panx1-/- (n = 8) $111,2 \pm 12,81\%$, $p = 0,1243$; Pk % of BL: NCD (n = 8) $54,41 \pm 41,06\%$ vs. Panx1-/- (n = 8) $61,97 \pm 20,16$, $p = 0,6304$; Longitudinal - T2P % of BL: NCD (n = 8) $105,3 \pm 35,68\%$ vs. Panx1-/- (n = 9) $85,10 \pm 22,58\%$, $p = 0,1784$; Pk % of BL: NCD (n = 8) $52,95 \pm 35,07\%$ vs. Panx1-/- (n = 10) $56,51 \pm 16,66$, $p = 0,7793$). Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte keine Verbesserung der myokardialen Remote-Funktion nach einem Infarkt durch Pannexin-Kanäle nachgewiesen werden. Pannexindefiziente Tiere hätten gemäß der Hypothese eine schlechtere Strain als die Wildtyp-Mäuse aufweisen müssen.

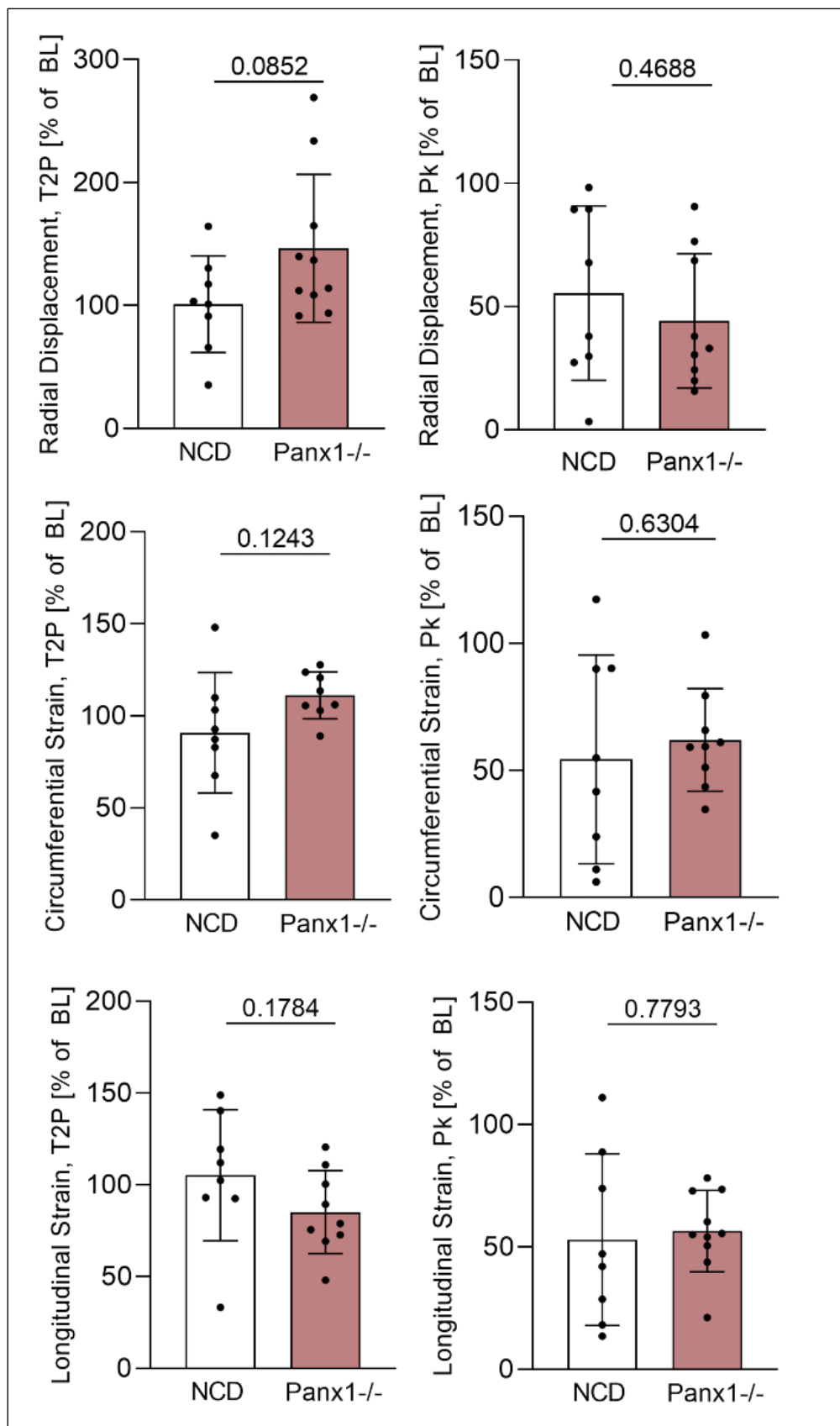


Abbildung 34: Prozentuale Veränderung der Strain im Remote-Bereich von NCD-Tieren und Panx1-/- Tieren. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.

Strain im Infarkt-Bereich:

Die longitudinale Verkürzungszeit präsentierte sich nicht verändert zwischen den beiden Gruppen, während sich die Strain in der Gruppe der Pannexin-defizienten Tiere hochsignifikant besser nach AMI zeigte (T2P: NCD post IR (n=8) $64,00 \pm 19,82$ vs. Panx1-/- post IR (n=9) $64,85 \pm 10,83$, $p = 0,5441$; Pk: NCD post IR (n=8) $-6,517 \pm 4,612$ vs. Panx1-/- post IR (n=10) $-6,868 \pm 3,100$, $p = 0,0021$, s. Abbildung 35).

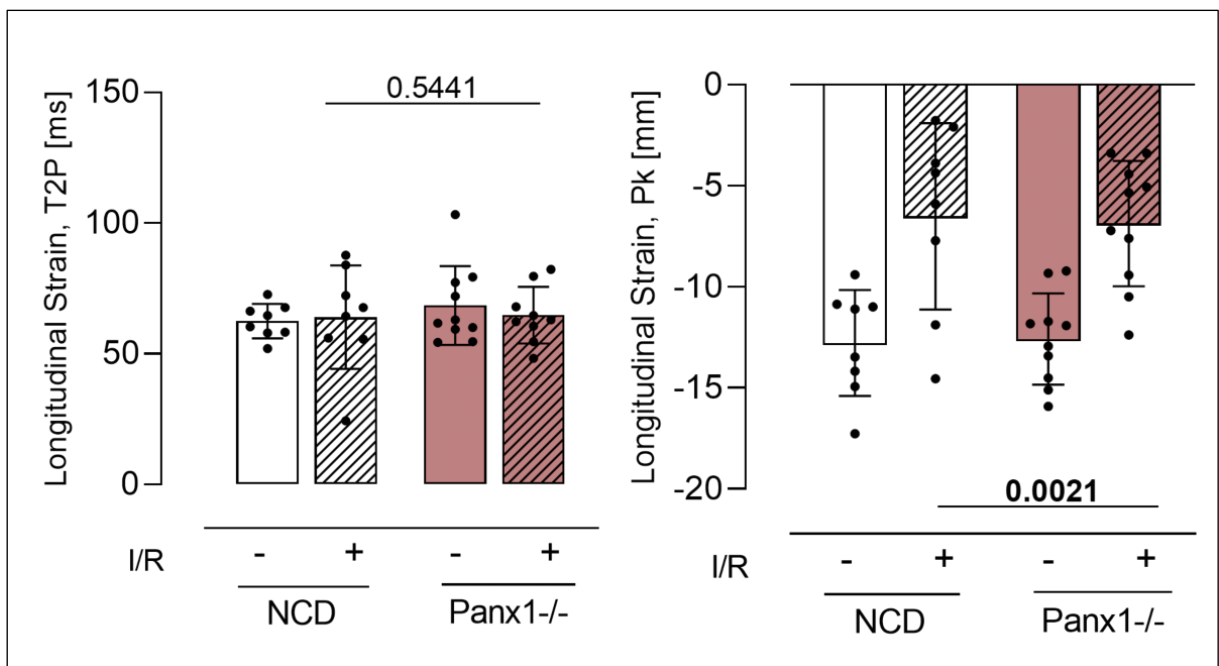


Abbildung 35: Longitudinale Strain vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich, Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

Auch in der zirkumferentiellen Strain zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Verkürzungszeit und die Strain (T2P: NCD post IR (n=8) $60,83 \pm 14,02$ vs. Panx1-/- post IR (n=8) $59,38 \pm 8,450$, $p = 0,1281$; Pk: NCD post IR (n=8) $-13,08 \pm 7,904$ vs. Panx1-/- post IR (n=10) $-18,09 \pm 7,044$, $p = 0,2133$, s. Abbildung 36).

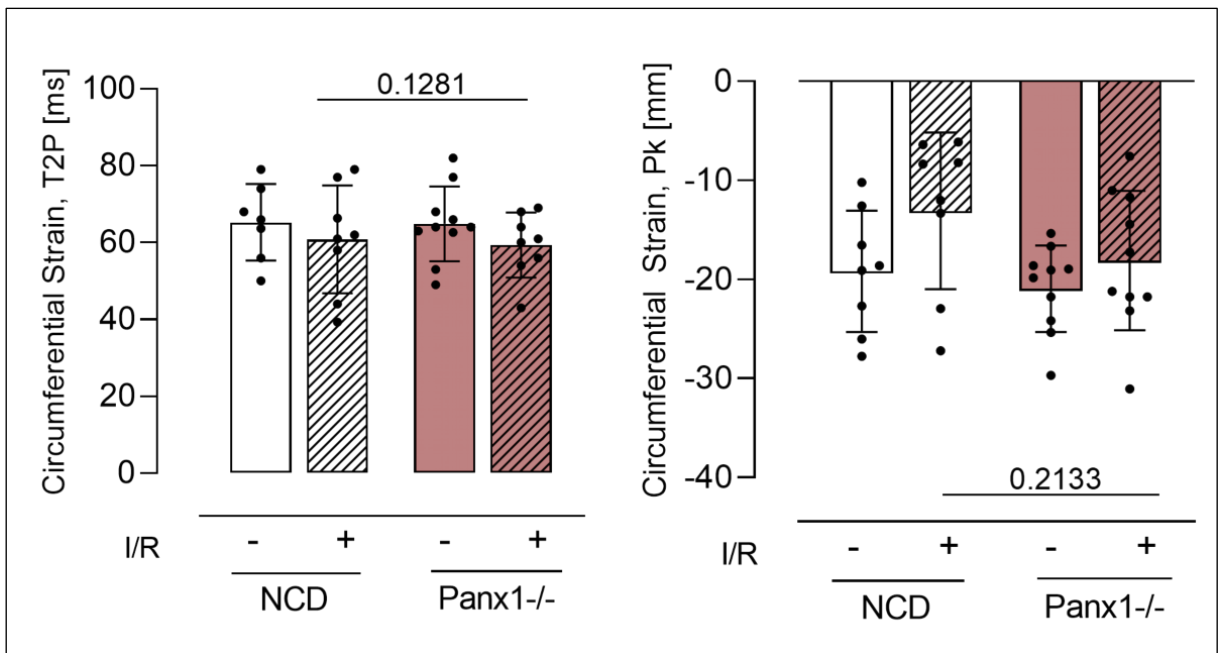


Abbildung 36: Zirkumferentielle Strain vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich, Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

Im infarzierten Bereich des Myokards zeigte sich weder für die radiale Verschiebungszeit noch für die radiale Verschiebung ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der NCD-Tiere und denen der Panx1-/- Tieren (T2P: NCD post IR (n=8) $36,71 \pm 15,36$ vs. Panx1-/- post IR (n=8) $60,83 \pm 7,286$, $p = 0,4498$; Pk: NCD post IR (n=8) $10,92 \pm 9,077$ vs. Panx1-/- post IR (n=10) $20,32 \pm 12,86$, $p = 0,2966$, s. Abbildung 37).

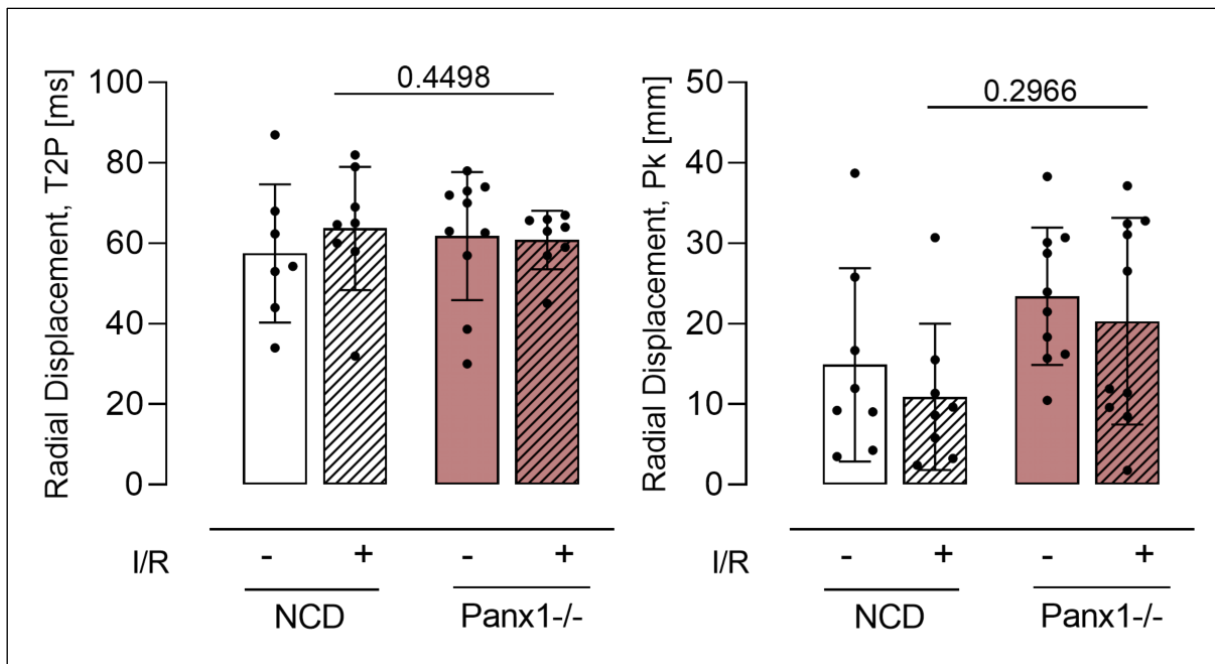


Abbildung 37: Radiale Verkürzung vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich, Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).

Auch in dem Infarkt-Bereich wurden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen prozentual berechnet und in Abbildung 38 dargestellt. Es zeigte sich kein prozentualer Unterschied zwischen den prä- und post-I/R-Daten in dem radialen und longitudinalen Infarkt Bereich (Radial - T2P % of BL: NCD (n=8) $109,9 \pm 62,62\%$ vs. Panx1-/- (n=8) $97,99 \pm 24,20\%$, $p = 0,6244$; Pk % of BL: NCD (n=8) $133,4 \pm 126,2\%$ vs. Panx1-/- (n= 10) $84,84 \pm 46,73$, $p = 0,2750$; Longitudinal - T2P % of BL: NCD (n=8) $102,3 \pm 29,39\%$ vs. Panx1-/- (n=9) $97,76 \pm 24,77\%$, $p = 0,7355$; Pk % of BL: NCD (n=8) $49,96 \pm 33,22\%$ vs. Panx1-/- (n= 10) $57,67 \pm 32,34$, $p = 0,3599$). Lediglich in der zirkumferentiellen Strain zeigte die Gruppe der Pannexin-KO-Tiere eine signifikante Verbesserung der Kontraktion im Vergleich zu den Ausgangswerten (Zirkumferentiell - T2P % of BL: NCD (n=8) $83,77 \pm 28,66\%$ vs. Panx1-/- (n=8) $91,35 \pm 16,10\%$, $p = 0,5249$; Pk % of BL: NCD (n=8) $50,08 \pm 7,132\%$ vs. Panx1-/- (n=10) $87,61 \pm 33,80$, $p = 0,0191$). Ebenfalls lässt sich für die Betrachtung der Ergebnisse kein Zusammenhang zwischen myokardialen Pannexin-Kanälen und einer Verbesserung der Strain feststellen.

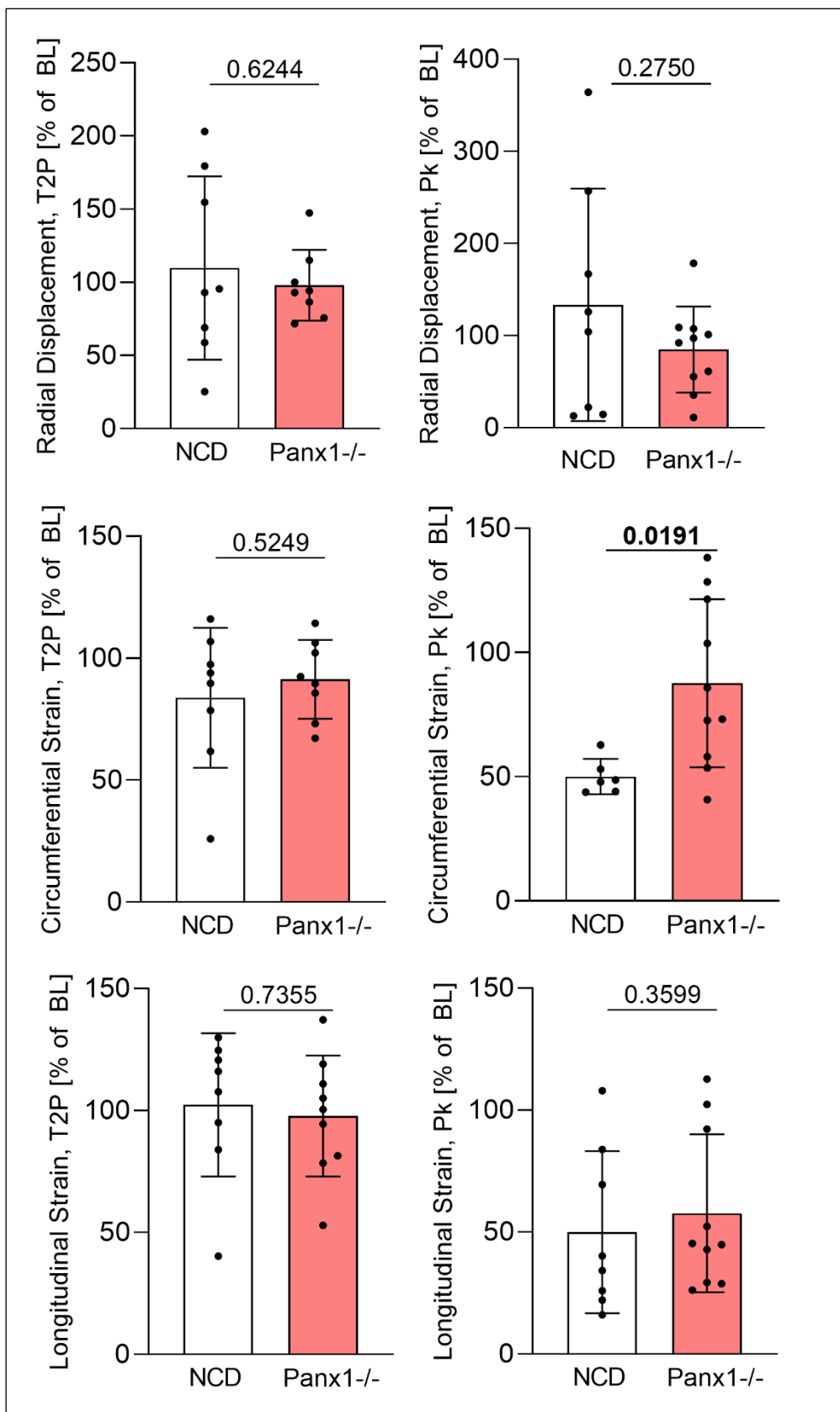


Abbildung 38: Prozentuale Veränderung der Strain im Infarkt-Bereich von NCD-Tieren und Panx1-/-Tieren. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.

4. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der myokardialen Strain und den frei zirkulierenden Spiegeln von Sphingosin-1-Phosphat unter besonderer Fokussierung auf die Gruppe der Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus. Im humanen Modell konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den S1P-Spiegeln im Plasma und der myokardialen Strain festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu konnte im murinen Modell, unter diabetischen Konditionen, durch eine gezielte Erhöhung der S1P-Spiegel eine signifikante Verbesserung der myokardialen Funktion nachgewiesen werden. Die Erhöhung der S1P-Spiegel resultierte in einer gesteigerten kardialen Kontraktilität sowie einem verbesserten myokardialen *Remodeling* nach Induktion eines akuten Myokardinfarktes.

In einem dritten Schritt haben wir orientierend untersucht, ob auch lokal kardiales S1P freigesetzt durch Pannexine hierbei eine relevante Rolle spielt. Hierzu haben wir die myokardiale Funktion im Pannexin-defizienten Modell nach MI untersucht. Wir konnten hier keinen Effekt herausstellen.

Die Resultate legen nahe, dass eine Steigerung der zirkulierenden S1P-Spiegel potenziell kardioprotektive Effekte entfalten und die myokardiale Funktion unter diabetischen Konditionen und Infarkt verbessern könnte.

4.1 Interpretation und Bewertung der Ergebnisse im Rahmen der aktuellen S1P- Forschung

4.1.1 Einfluss von S1P auf die myokardiale Funktion beim Menschen

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass S1P als protektiver Marker mit der Myokardfunktion assoziiert ist. So konnte unter anderem bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie ein Zusammenhang zwischen der Ejektionsfraktion und der S1P-Konzentration beobachtet werden³¹. Ergänzend konnte in einer Studie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit eine negative Korrelation der Plasma-S1P- und

HDL-gebundenen S1P-Konzentration mit der Zunahme schwerer pektanginöser Beschwerden, gemessen nach den Kriterien des *Canadian Cardiovascular Score*, gezeigt werden⁵². Knapp et al. konnten ebenfalls eine erniedrigte Plasma-S1P-Konzentration bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zu Patienten mit normaler Herzfunktion unabhängig von der Genese feststellen⁵³.

Eine Subanalyse der *Study of Health in Pomerania* analysierte die Konzentration von frei zirkulierendem S1P sowie der Myokard-Funktion und -Struktur in der Herz-Magnetresonanztomographie (MRT). Hier zeigten sich bei männlichen Probanden strukturelle Unterschiede in Abhängigkeit von der S1P-Plasmakonzentration. Erniedrigte Serumplasmakonzentrationen korrelierten mit einer Erweiterung des linken Atriums und des Ventrikels und einer Zunahme der linksventrikulären Wanddicke⁵¹.

In diesen Studien wurde jedoch nur die Ejektionsfraktion als Parameter für die linksventrikuläre systolische Funktion betrachtet. Klinische Studien bei Patienten mit diastolischer Dysfunktion oder Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion wurden bisher nicht durchgeführt. Schielke et al. erweiterte die Beobachtung um die Analyse der myokardialen Struktur und Funktion mittels kardialer MRT⁵¹. Eine Studie, die funktionelle und strukturelle Unterschiede im Zusammenhang mit der Plasmaspiegelkonzentration von S1P mittels Echokardiographie untersuchte, liegt bisher jedoch nicht vor.

In der klinischen Diagnostik hat sich die STE bereits als ein sensitiverer Parameter zur Detektion myokardialer Veränderungen insbesondere bei Patienten mit DM2 erwiesen⁶. Diese Patienten präsentieren sich darüber hinaus häufig asymptomatisch. Besonders verglichen mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion konnten verschiedene Arbeiten die GLS als einen prognostisch sensitiveren Messparameter als die EF herausstellen. In einer Studie mit 700 Teilnehmern konnten Russo et al. lediglich bei 4 % der Teilnehmenden eine verminderte EF feststellen, während die GLS bereits bei 16% der teilnehmenden Personen eine Verschlechterung aufwies. Nach multivariater Analyse konnte die GLS darüber hinaus als unabhängiger Faktor für kardiale Ereignisse identifiziert werden⁵⁴. Da sich die längsgerichteten myokardialen Fasern hauptsächlich im Subendokard befinden, ist die GLS besonders empfindlich gegenüber subendokardialer Ischämie, hämodynamischer Überlastung sowie frühen Myokardschäden, während die EF noch nicht beeinträchtigt ist⁵⁵.

Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass ein Zusammenhang zwischen der S1P-Konzentration und der STE bestehen könnte. Innerhalb dieser Studie konnte ein solcher Zusammenhang im Menschen jedoch nicht nachgewiesen werden.

Für diese Beobachtung können verschiedene Ursachen identifiziert werden. Unter anderem könnten patientenspezifische sowie molekulare Faktoren wie Dauer und Schweregrad des Diabetes, HbA1c oder die Anzahl oraler Antidiabetika die Wirkung von S1P auf die Myokardfunktion modulieren. Möglicherweise ist ein Effekt nur bei Patienten mit unbehandeltem oder unbekanntem DM2 und entsprechend erhöhtem HbA1c und konsekutiv größerer myokardialer Schädigung zu beobachten. Unsere Kooperationspartnerin Dr. rer. nat. Sarah Weske vom Institut für Molekulare Medizin 3 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf konnte bei Menschen unter diabetischen Bedingungen eine Verringerung der S1P-Plasmakonzentrationen beobachten (Weske et al. unveröffentlichte Daten zur SHIP-Study). Infolge einer effektiven antidiabetischen Therapie, wie sie in dieser Arbeit bei der überwiegenden Anzahl von Patienten stattgefunden hat (vgl. HbA1c-Wert, s. Tabelle 5), könnten die frei zirkulierenden S1P-Spiegel in Folge denen von Nicht-Diabetikern ähneln. Darüber hinaus konnten Weske et. al. einen U-förmigen Zusammenhang zwischen dem BMI und der S1P-Konzentration feststellen. Die Daten zeigen einen signifikant stärkeren S1P-Abfall bei einem BMI von über 30 kg/m² ³². Der durchschnittliche BMI in der vorliegenden Kohorte betrug jedoch 25–29 kg/m² (s. Tabelle 5). Infolgedessen lässt sich vermuten, dass die S1P-Dynamik in der vorliegenden Studie nicht ausreichend ausgeprägt war, um Unterschiede in der S1P-Konzentration zu zeigen. Des Weiteren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit lediglich die Plasmaspiegelkonzentration des S1P ermittelt, wobei zu berücksichtigen ist, dass diese nicht proportional zur Wirkung und Expression der S1PR auf den Kardiomyozyten steht. Eine Erfassung der Unterschiede in der Rezeptorexpression auf Kardiomyozyten wurde nicht, hätte aber in diesem Zusammenhang signifikante Unterschiede zeigen können.

Schließlich könnten, neben personenspezifischen Faktoren, auch funktionell-methodische Ursachen die beobachteten Phänomene erklären. Die STE ist eine sensitive Untersuchungsmethode in der kardiologischen Ultraschalldiagnostik⁶. In Konsequenz der bereits erwähnten Gründe für die fehlende S1P-Dynamik innerhalb der Versuchs-

gruppe ist anzunehmen, dass die vorliegenden S1P-Konzentrationen nicht ausreichend waren, um myokardiale Veränderungen zu bewirken, welche durch die STE hätten erfasst werden können. Schielke et al. untersuchte die Assoziation der S1P-Plasmakonzentration mit der myokardialen Funktion im kardialen MRT⁵¹. Allerdings wurde in dieser Untersuchung keine Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 vorgenommen. In der Konsequenz lässt sich annehmen, dass nicht die STE, sondern andere Einflussfaktoren, wie beispielsweise die antidiabetische Therapie, die Einnahme weiterer Medikamente oder eine zu große Heterogenität der Vorerkrankungen der Patienten dem fehlenden Effekt zu Grunde liegen.

Darüber hinaus konnten in der Auswertung der vorliegenden Kohorte jedoch andere relevante Zusammenhänge festgestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Patientengruppe von 311 Patientinnen und Patienten untersucht. Das entscheidende Einschlusskriterium bildete das Vorhandensein einer TTE-Untersuchung im klinischen Kontext, sodass eine heterogene Gruppe von Patienten mit unterschiedlichen Vorerkrankungen, Medikationen und Lebensstilfaktoren eingeschlossen wurde (s. Tabelle 5). Die vorliegende Arbeit konnte die vorherrschende Literatur bestätigen, indem aufgezeigt wurde, dass Patienten mit einem DM2 keine schlechtere EF im Vergleich zu Patienten ohne DM2 aufweisen⁶. Allerdings ist eine deutliche Verschlechterung der GLS zu verzeichnen (s. Abb. 8). Auch bei Betrachtung der diastolischen Funktionsparameter (vgl. Abb. 9) waren diese bei Patienten mit DM2 deutlich schlechter, sodass das von Rubler et al. postulierte Bild des diabetischen kardialen Phänotyps, der vorwiegend auf dem Boden einer diastolischen Dysfunktion beruht, bestätigt werden kann¹⁶.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass patientenspezifische Faktoren für den fehlenden Zusammenhang zwischen der GLS und der Plasma-S1P-Konzentration verantwortlich sind. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse bestätigen die bereits in der Literatur verfügbaren Daten und zeigen, dass die GLS ein sensitiveres diagnostisches Mittel zur Ermittlung der myokardialen Funktion ist. In künftigen Studien sollte daher unter anderem die Rezeptorexpression und -aktivität auf Kardiomyozyten untersucht werden, um die komplexen Zusammenhänge zwischen S1P und der Myokardfunktion, insbesondere bei Patienten mit DM2, besser zu verstehen. Des

Weiteren kann die myokardiale Funktion durch den Einsatz weiterer bildgebender Verfahren, wie beispielsweise der kardialen Magnetresonanztomographie (MRT), untersucht werden.

4.1.2 Verbesserung der Kontraktionsfähigkeit durch DOP Gabe im murinen Modell

Die Verabreichung des S1P-Lyase-Inhibitors DOP resultierte in der vorliegenden Arbeit in einer Verbesserung der myokardialen Strain im nicht infarzierten Remote-Bereich nach einem Myokardinfarkt. Die Beobachtung lässt sich durch verschiedene molekularmechanische Faktoren erklären.

Im kardiovaskulären System werden vorwiegend die S1PR1-, S1PR2- und S1PR3-Rezeptoren exprimiert⁵⁶. Aufgrund der verschiedenen Signalkaskaden lassen sich sowohl Effekte auf das vaskuläre System, das Immunsystem als auch auf die Kardiomyozyten selbst durch eine Erhöhung der S1P-Konzentration beobachten. In Endothelzellen führt die Aktivierung der S1PR1-3-Rezeptoren über den Rac/Cdc42- oder den PI3K/ERK-Weg zu einer Verbesserung der endothelialen Barrierefunktion⁵⁷. Des Weiteren wirkt der im Knochenmark exprimierte S1PR3-Rezeptor antiinflammatorisch, indem er die Differenzierung antiinflammatorischer Makrophagen fördert⁵⁸.

Auf Kardiomyozyten ist überwiegend die Expression des S1PR1 zu beobachten, während auf den Fibroblasten des myokardialen Gewebes eine vermehrte Präsenz des S1PR3 festzustellen ist¹⁹. In vorangehenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass eine Aktivierung dieser Rezeptoren zu einer negativ inotropen Wirkung führt. Die G_i-gekoppelte Induktion einer verminderten cAMP-Aktivierung resultiert in einer Inhibition der L-Typ-Calcium-Kanäle, welche durch die Aktivierung der Rezeptoren vermittelt wird⁵⁹. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen des S1PR1 zu einem schlechterem Ergebnis nach MI im *ex-vivo*-Langendorff-Modell führt. Im akuten Infarktgeschehen scheint es unter physiologischen Bedingungen zu einem „S1P-Sturm“ zu kommen, welcher den Zelluntergang und die damit verbundene Infarktgröße vermindert⁸. Durch Steigerung der endogenen S1P-Plasmakonzentration durch Hemmung der S1P-Lyase, können diese positiven Effekte der S1PR positiv beeinflusst werden, was folglich zu einem besserem myokardialem Remodeling nach MI führen kann.

In Bezug auf weitere mögliche protektive Faktoren von S1P, abseits der direkt agonistischen Wirkung an den S1PR, kann zudem eine vermehrte Expression des GLUT4-Kanals angenommen werden⁸⁸. GLUT4 Kanäle führen zu einer insulinabhängigen Aufnahme von Glukose in die Zellen⁶⁰. In der Konsequenz resultiert dies in einer verbesserten Nutzung von Glukose in den Kardiomyozyten. Dies führt wiederum in einer Reduktion der Inflammation durch Metabolite der β -Oxidation. Diesen Effekt konnten in anderen Projekten innerhalb der Arbeitsgrupp bereits beobachtet werden. So konnte beispielsweise im Rahmen einer Behandlung von DIO-Tieren mit DOP eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion durch vermehrte Expression des GLUT4-Kanals gezeigt werden. Mechanistisch wird vermutet, dass dieser Effekt durch eine gesteigerte ERK-Expression vermittelt wird, dessen Signalkaskade anschließend für eine gesteigerte Synthese und Expression des GLUT4-Kanals führt⁶¹.

Die genannten Faktoren sind von entscheidender Bedeutung für die Rolle von S1P im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts. Die verbesserte endotheliale Barriere erlaubt eine effektivere Kontrolle der Inflammation im Anschluss an ein ischämisches Ereignis. Es konnte in Zuge dessen eine Reduktion der Infarktgröße durch die Aktivierung des RhoA-Signalweges des S1PR3 nachgewiesen werden⁶². Zudem ist die Wirkung von S1P auf die Fibroblasten von entscheidender Bedeutung im Rahmen eines Myokardinfarkts. Die Aktivierung kleiner GTPasen und Rho-Kinasen führte zu einer verringerten Hypertrophie der Kardiomyozyten nach Infarkt⁶³. In diesem Kontext führt die Aktivierung der S1P-Rezeptoren zu einer Transformation der Fibroblasten in Myofibroblasten, wodurch das kardiale Remodeling gefördert wird^{64,65}.

In Zusammenfassung lassen sich verschiedene molekulare Mechanismen für das verbesserte myokardiale *Outcome* nach MI im diabetischen Mausmodell unter DOP-Therapie verantwortlich ausmachen⁷. S1P und die assoziierten Kanäle bewirken im kardiovaskulären System eine Reduktion der Atherosklerose, eine antiinflammatorische Wirkung, einen verbesserten endothelialen Schutz sowie eine erleichterte Migration von Immunzellen. Zudem wird die Glukoseverwertung optimiert und das zelluläre Remodeling nach MI gefördert^{25,30}.

4.1.3 Fehlende Verschlechterung der Strain durch Knockout der Pannexin-Kanäle

In *ex-vivo*-Arbeiten konnten Vessey et al. zeigen, dass myokardial freigesetztes S1P aus Pannexin-1-Kanälen als Metabolit eine kardioprotektive Funktion besitzt⁴⁰. Daher wurde für die vorliegende Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass im *in-vivo*-Modell bei Versuchstieren mit *Knock-out* des Pannexin-1-Kanals die Myokardfunktion im Vergleich zu genetisch normalen Tieren signifikant verschlechtert ist. Dieser Effekt konnte allerdings nicht bestätigt werden. Mögliche Ursachen könnten andere relevante Membrankanäle sein, durch die S1P freigesetzt werden kann. Neuere Untersuchungen konnten den *major facilitator superfamily transport 2b* (Mfsd2b) als relevanten Membrankanäle identifizieren, der bis zu 50% des aus Thrombozyten und Erythrozyten freigesetzten Plasma-S1Ps ausmacht⁶⁶. In *ex-vivo*-Experimenten mit Mäusen konnte eine signifikant größere Infarktgröße in Mfsd2b-defizienten Mäusen beobachtet werden⁸. Weitere bereits untersuchte S1P-Transmembrankanäle sind der *Spinster homolog 2* und der *ATP-binding cassette transporter A1*, die vor allem im Endothel- und Immunsystem vorkommen^{67,68}. Eine kompensatorische Erhöhung der S1P-Sekretion durch diese Kanäle könnte den Effekt des myokardial freigesetzten S1P durch die Pannexin-Kanäle maskieren und für die fehlende Verschlechterung der Pannexin-Knockout-Mäuse verantwortlich sein. In Bezug auf die genaue Auswirkung von myokardialem S1P auf die kardiale Funktion besteht weiterhin Unklarheit. Vessey et al. untersuchten den Einfluss der Pannexin-1-Kanäle im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung, während sich die vorliegende Arbeit mit dem langfristigen *in-vivo*-Effekt von fehlenden Pannexin-Kanälen befasst. Obgleich die *Panx1*^{-/-}-defizienten Mäuse vor Induktion eines Infarktes bereits eine schlechtere GLS und GCS aufwiesen, konnte 24 Stunden nach dem Infarkt kein Einfluss auf das myokardiale Remodeling beobachtet werden (s. Abbildung 30). In Anbetracht der Effekte, die durch die Steigerung von frei zirkulierendem S1P durch Inhibition der S1P-Lyase beobachtet werden konnten, lässt sich annehmen, dass der Einfluss von myokardial freigesetztem S1P zu gering ist, um relevante Effekte herbeizuführen.

4.1.4 Übertragbarkeit muriner Daten auf den Menschen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein protektiver Einfluss von erhöhten S1P-Konzentrationen im murinen Modell nachgewiesen werden. Allerdings ist eine unmittelbare Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen nicht immer möglich. Aufgrund der unterschiedlichen genetischen Disposition sowie der Vielfalt an Einflussfaktoren, wie beispielsweise Co-Erkrankungen, Medikation und Lebensstil, können Tiermodelle die komplexen Zusammenhänge, wie sie bei Patienten vorliegen, nicht adäquat abbilden. Darüber hinaus gibt es Unterschiede im S1P-Haushalt zwischen Menschen und Mäusen. Die durchschnittliche Plasmakonzentration von S1P liegt beim Menschen zwischen 0,1 und 1,0 μM , während sie bei Mäusen zwischen 0,5 und 1,4 μM liegt⁶⁴. Zudem scheint der Einfluss des aus Erythrozyten und Thrombozyten freigesetzten S1P im Mausmodell eine geringere Rolle zu spielen als beim Menschen⁶⁹. So zeigten in einem Mausversuch schwere Hämolyse oder schwerer Blutverlust keinen Einfluss auf die S1P-Konzentration⁷⁰.

4.2 Einschränkungen der Arbeit

4.2.1 Begrenzte Stichprobengröße

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden insgesamt 311 Patientinnen und Patienten aus der Klinik für Kardiologie eingeschlossen. Bei allen Patienten wurde eine transthorakale Echokardiographie des Herzens durchgeführt, eine standardmäßige Erhebung der Speckle-Tracking-Strain erfolgte jedoch nicht, sodass die entsprechenden Daten nicht für alle Patienten zur Verfügung standen. In der Konsequenz war eine Korrelation der Daten mit den S1P-Konzentrationen nicht für alle eingeschlossenen Patientinnen und Patienten möglich. Bei geringeren Stichprobengrößen besteht das Risiko, dass wesentliche Zusammenhänge nicht abgebildet werden können. Eine Auswertung derselben Studiendaten bei einer größeren Kohortengröße könnte daher einen bestehenden Unterschied eher aufzeigen⁹⁰.

Obgleich die Gruppe hinsichtlich der Einschlusskriterien als sehr heterogen zu bezeichnen ist, lässt sich ein *Selection-Bias* in der Stichprobe nicht gänzlich ausschließen⁹¹. Es sei an dieser Stelle bemerkt, dass die eingeschlossenen Patienten sämtlich

an einem Universitätsklinikum betreut wurden. Dieses unterscheidet sich sowohl hinsichtlich des Spektrums angebotener Behandlungen als auch hinsichtlich der Schwere und Komplexität der behandelten Erkrankungen deutlich von einem Krankenhaus der primären oder sekundären Versorgungsstufe. Wie bereits dargelegt, könnte die Poly-medikation und das Vorliegen komorbider Erkrankungen der Patienten zu veränderten Plasmaspiegeln von S1P geführt haben. Des Weiteren wurden Patienten mit mangelnder *Compliance* aus ethischen sowie versuchstechnischen Gründen nicht in die Studie inkludiert. Allerdings wurden auf diese Weise auch Patienten ausgeschlossen, bei denen möglicherweise eine weniger streng eingestellte Typ-2-Diabetes vorlag. Auch hier hätten andere Ergebnisse erwartet werden können.

Im Rahmen der murinen Versuche wurden die Messungen lediglich innerhalb einer Gruppengröße von sechs Tieren durchgeführt. Diese wurde insbesondere aus Gründen des Tierschutzes festgelegt⁹². Zudem wurde die benötigte Gruppengröße zur Erlangung einer statistischen Signifikanz mittels G*Power ermittelt. Trotz der limitierten Stichprobengröße ist eine Untersuchung der Effekte dennoch möglich, da es weniger Störfaktoren von außen gibt und die Versuchstiere identische Grundkonditionen aufweisen.

4.2.2 Messfehler und Messungenauigkeiten

Sphingosin-1-Phosphat unterliegt einem streng regulierten Metabolismus, was zu einer geringen Halbwertszeit bis zu seiner Spaltung durch Sphingosin-1-Phosphat-Kinasen führt⁶⁹. Aus diesem Grund war eine umgehende Asservierung der Blutproben von essenzieller Bedeutung, um den Zerfall von S1P möglichst gering zu halten. Allerdings konnte eine unmittelbare Konservierung der Proben nach deren Erhalt aus logistischen Gründen nicht realisiert werden. Folglich können zeitliche Diskrepanzen zwischen dem Zeitpunkt der Probenahme und dem Einfrieren der Proben zu Konzentrationsunterschieden des S1P zwischen den einzelnen Proben führen. Dies kann zu einer Beeinträchtigung der Messgenauigkeit beitragen.

Obwohl das TTE-Untersuchungsprotokoll innerhalb des Universitätsklinikums standardisiert ist, lässt sich aufgrund von Schwankungen in der Tagesverfassung des Patienten, Abweichungen in der Compliance sowie erschwerten Ultraschallbedingungen

keine hundertprozentige Reproduzierbarkeit der echokardiographischen Daten gewährleisten.

4.2.3 DIO-Maus-Modell

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde das DIO-Mausmodell verwendet. Das genannte Modell dient der Nachahmung der DM2-Entstehung im Menschen, welche durch eine hochkalorische Diät über einen längeren Zeitraum induziert wird. Analog zum Menschen manifestiert sich bei den Versuchstieren nach einigen Wochen ein Bild eines metabolischen Syndroms, welches unter anderem durch Übergewicht, gestörte Glukosetoleranz und erhöhte Cholesterinspiegel gekennzeichnet ist. Allerdings entspricht das DIO-Modell in seiner Ausprägung eher dem Zustand des Prädiabetes bzw. dem Frühstadium eines klassischen DM2^{71,72}. Das Vollbild bzw. das Spätstadium ist durch eine Destruktion der β -Zellen des Pankreas gekennzeichnet. Ein entsprechend adaptierter Versuchsaufbau ermöglicht die Induktion einer Insulinresistenz durch Injektion von Streptomycin im Anschluss an eine 24-wöchige *high-fat-diet*⁷³.

Eine weitere Limitation besteht in der fehlenden Untersuchung des weiblichen Geschlechts, sodass diesbezüglich keine Aussagen getroffen werden können. In diesem Kontext sind Versuche an weiblichen Tieren innerhalb unserer Arbeitsgruppe in Planung, um den Einfluss diabetischer Konditionen auf das weibliche Geschlecht zu ermitteln. Des Weiteren werden Aspekte der Menopause und der damit einhergehende Abfall der Östrogenkonzentration im Blut betrachtet. Es sei abschließend bemerkt, dass die Verabreichung des DOP über das Trinkwasser erfolgte, sodass eine homogene und gleich große Aufnahme für jedes Tier nicht gewährleistet werden kann.

4.3 Zukunftsaussichten

Eine der zentralen Erkenntnisse dieser Arbeit ist, dass die Konzentration frei zirkulierender S1P-Spiegel im menschlichen Modell, insbesondere bei Patienten mit Diabetes, keinen signifikanten Einfluss auf die myokardiale Strain oder andere echokardiographische Parameter hatten. Dennoch lassen die positiven Effekte der S1P-Erhöhung

im murinen Modell, insbesondere unter diabetischen Konditionen, auf vorhandene kardioprotektive Eigenschaften schließen, die bei weiteren Studien von großem Interesse sein könnten.

Für künftige Forschungsarbeiten ist es daher von entscheidender Bedeutung, die komplexen Mechanismen, die der S1P-Wirkung im menschlichen Herzgewebe zugrunde liegen, besser zu verstehen. Es wäre daher empfehlenswert, dass zukünftige klinische Studien versuchen, spezifische Untergruppen von Patienten zu identifizieren, die möglicherweise stärker auf S1P-Änderungen ansprechen. Des Weiteren sollte die Rolle von S1P-Rezeptoren und deren unterschiedliche Expressionsmuster in Kardiomyozyten weiterer eingehenderen Betrachtung unterzogen werden.

In diesem Kontext erweist sich die Untersuchung gezielter therapeutischer Interventionen, die auf eine Erhöhung der S1P-Spiegel abzielen, insbesondere im Zusammenhang mit dem diabetischen kardialen Phänotyp, als vielversprechender weiterer Ansatz. Zu den S1P-Rezeptor-Analoga zählt auch das bereits für die Behandlung der Multiplen Sklerose zugelassene Medikament Fingolimod⁷⁴. Aufgrund der umfangreichen Forschungsarbeiten zum S1P-Haushalt und dessen Einfluss auf das kardiovaskuläre System wurden bereits zahlreiche Versuche an Mäusen durchgeführt, bei denen FTY720 zum Einsatz kam. Im Rahmen eines Modells einer hypertrophen Kardiomyopathie konnte das Ausmaß der diastolischen Dysfunktion durch eine Modulation der S1P-Rezeptoren mittels FTY720 signifikant reduziert werden⁷⁵. *In-vivo*-Studien belegen eine Verringerung der Inflammation und des zellulären Stresses in Kardiomyozyten, was zu einer verbesserten Leistung im Rahmen einer extrakorporalen Zirkulation nach kardialen Arrest führt⁷⁶. In einem I/R-Versuch an Nagetieren konnte eine Reduktion der Infarktgröße durch die Verabreichung von Fingolimod nachgewiesen werden⁷⁷.

Des Weiteren konnte in den vergangenen Jahren eine Korrelation zwischen der S1P-Konzentration und dem Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen festgestellt werden. S1P ist ein Bestandteil der HDL-Fraktion im peripheren Blut⁷⁸. Es konnte bereits in Tierversuchen mit Mäusen, denen das *Low-density-lipoprotein*-Rezeptor-Gen fehlt, nachgewiesen werden, dass die Verabreichung von Spk1-Inhibitoren mit einem Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen einhergeht, was auf eine Verringerung der

S1P-Konzentration im Plasma zurückzuführen ist⁷⁹. Die Ergebnisse von Studien, in denen die Wirkung des S1PR1-Agonisten Fingolimod (FTY720) auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Leukozytenmigration untersucht wurde, weisen darauf hin, dass FTY720 eine antiatherosklerotische Wirkung haben könnte⁸⁰.

Erste klinischen Studien, welche den Einfluss von FTY720 auf das kardiovaskuläre System am Menschen untersuchen, wurden bereits publiziert. Diese Studien fokussierten sich jedoch in erster Linie auf die Beobachtung potenziell negativer kardialer Effekte, darunter ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer relevanten Bradykardie sowie eine Reduktion der Herzfrequenzvariabilität^{81,82}. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren keine Langzeitstudien, welche das myokardiale *Outcome* und die Eventraten untersuchen. Daher sind zukünftig kontrollierte, randomisierte Studien erforderlich, um zu untersuchen, ob eine anhaltende Erhöhung der S1P-Spiegel bzw. S1P-Rezeptoragonisten positive Auswirkungen auf das kardiale Remodeling und die Funktion des Herzens nach ischämischen Ereignissen hat.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse legen nahe, dass das S1P-System ein potenziell vielversprechendes therapeutisches Ziel ist, dessen Bedeutung für die kardiovaskuläre Gesundheit, insbesondere bei diabetischen Patienten, weiter erforscht werden sollte.

5. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien der Patientenkohorte	15
Tabelle 2: Material und Geräte für das Biosampling	16
Tabelle 3: Material und Geräte I/R-Versuch	22
Tabelle 4: Verwendete Software zur statistischen Analyse.....	27
Tabelle 5: Patientencharakteristika: Es werden der Durchschnittswert, die Standardabweichung und die Anzahl sowie der prozentuale Anteil der Patienten mit vorliegenden Erkrankungen angegeben. Dabei wurden folgende Komorbiditäten betrachtet: Zustand nach (Z.n.) Koronararterienbypass (CABG), Perkutaner Koronarangiografie (PCI), chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Myokardinfarkt (MI) sowie das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit (KHK), peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) und pektanginöse Beschwerden gemessen an dem Score Canadian Cardiovascular Society (CCS).....	30
Tabelle 6: Medikation der Patienten: Angegeben werden Anzahl und prozentualer Anteil der Patienten, die die vorliegenden Medikamente einnehmen.	31
Tabelle 7: Strukturelle echokardiographische Funktion der Kohorte. Diameter LVOT: Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstrakts. Dezelerationszeit [ms]: Zeit des Blutflussabfalls in der frühen Diastole. TAPSE: Systolische Funktion des rechten Ventrikels. PISA [cm]: Fläche zur Quantifizierung von Regurgitationen. RV Mitte [mm]: Durchmesser des rechten Ventrikels in der Mitte. AK maxAK: Maximale Geschwindigkeit über der Aortenklappe. AK_Vmax LVOT [m/s]: Maximale Blutflussgeschwindigkeit im LVOT. AK_dPmean [mmHg]: Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe. AK_dPmax [mmHg]: Maximaler Druckgradient über der Aortenklappe. AK_KÖF VTI [cm ²]: Klappenöffnungsfläche basierend auf VTI. AK_KÖF Vmax [cm ²]: Klappenöffnungsfläche basierend auf Vmax. PaSysTR-dPmax [+ ZVD]: Maximaler systolischer Druckgradient der TR mit ZVD.....	34
Tabelle 8: Zusammenfassung der myokardialen Strain Analyse von NCD- und DIO-Tieren.	59

6. Abbildungssverzeichnis

Abbildung 1: Ziele der vorliegenden Arbeit: 1) Assoziation frei zirkulierenden S1Ps auf die myokardiale Strain unter besonderer Betrachtung des diabetisch bedingten kardialen Phänotyps, 2) Ausmaß der kardioprotektiven Eigenschaften erhöhter S1P-Spiegel, 3) Relevanz myokardial freigesetzten S1Ps durch Pannexin-1-Kanäle.....	13
Abbildung 2: Echokardiographische Einstellung zur Bestimmung der myokardialen Strain: A) 3-Kammerblick, B) 4-Kammerblick, C) 2-Kammerblick, D) begleitendes EKG.....	18
Abbildung 3: Darstellung I/R-OP: Oben links: Freilegung und Präparation der Muskelschicht; oben rechts: Freilegung der Rippen; unten links: Ligatur der LAD; unten rechts: Schließen des Thorax.....	22
Abbildung 4: Versuchsaufbau zur murinen Echokardiographie: Die Versuchstiere werden auf einer beheizten Plattform in Rückenlage positioniert und mittels Isofluran-Sauerstoff-Gemisch anästhesiert. Zur Überwachung der Herzaktivität werden die Pfoten mittels Elektroden angebracht. Mittels Rektalsonde wird die Körperkerntemperatur gemessen. Das Fell wird mittels Enthaarungscreme entfernt.	24
Abbildung 5: Auswertung muriner Echokardiographie. Auswertung der Grundparameter in Systole und Diastole, sowie Bestimmung des Mitralklappenflusses und der Wandbewegung mittels Gewebedoppler. Globale longitudinale Strain wird als Verkürzungsdiagramm angezeigt.....	25
Abbildung 6: Geräte und Materialien für murine Echokardiographie.	26
Abbildung 7: Ablauf der Patientenrekrutierung	28
Abbildung 8: Systolische Echoparameter der Kohorte: Es werden die Gruppe der Nicht-Diabetiker und die Gruppe der Typ-2-Diabetiker verglichen. Es werden die Ejektionsfraktion (EF), das Schlagvolumen (SV) und die globale longitudinale Strain betrachtet.....	31
Abbildung 9: Diastolische Echoparameter der Kohorte: Es werden die Gruppe der Nicht-Diabetiker und die Gruppe der Typ-2-Diabetiker verglichen. Im Rahmen der Untersuchung werden die diastolischen Funktionsparameter E/A- und E/e'-Verhältnis, gemessen am Blutfluss	

über der Mitralklappe, das linksatriale (LA) Volumen sowie das laterale und septale e' betrachtet	32
Abbildung 10: Korrelation der globalen Strain und systolischen Funktionsparametern	35
Abbildung 11: Korrelation globale Strain mit diastolischen Funktionsparametern	36
Abbildung 12: Korrelation globaler Strain und systolische Funktionsparameter nach Gruppen: blau - Patienten ohne DM2, rot - Patienten mit DM2.	36
Abbildung 13: Korrelation globaler Strain und diastolischer Funktionsparameter nach Gruppen: blau - Patienten ohne DM2, rot - Patienten mit DM2.	38
Abbildung 14: Korrelation freier S1P Konzentration und globaler Strain für beide Gruppen	39
Abbildung 15: Korrelation freier S1P Konzentration und globaler Strain für Patienten ohne DM2.....	39
Abbildung 16: Korrelation freier S1P Konzentration und globaler Strain für Patienten mit DM2	40
Abbildung 17: Korrelation der S1P Konzentration und gängiger Laborparameter dargestellt als <i>Heatmap</i> . Signifikante ($p < 0,005$) r-Werte wurden dick hervorgehoben.....	41
Abbildung 18: Korrelation der S1P Konzentration und struktureller Echokardiographischer Parameter dargestellt als <i>Heatmap</i> . Signifikante r-Werte ($p < 0,005$) wurden dick hervorgehoben. Diameter LVOT: Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstrakts. Dezelerationszeit [ms]: Zeit des Blutflussabfalls in der frühen Diastole. TAPSE: Systolische Funktion des rechten Ventrikels. PISA [cm]: Fläche zur Quantifizierung von Regurgitationen. RV Mitte [mm]: Durchmesser des rechten Ventrikels in der Mitte. AK maxAK: Maximale Geschwindigkeit über der Aortenklappe. AK_Vmax LVOT [m/s]: Maximale Blutflussgeschwindigkeit im LVOT. AK_dPmean [mmHg]: Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe. AK_dPmax [mmHg]: Maximaler Druckgradient über der Aortenklappe. AK_KÖF VTI [cm ²]: Klappenöffnungsfläche basierend auf VTI. AK_KÖF Vmax [cm ²]: Klappenöffnungsfläche basierend auf Vmax. PaSysTR-dPmax [+ ZVD]: Maximaler systolischer Druckgradient der TR mit ZVD.	42

Abbildung 19: Globale longitudinale und zirkumferentielle Strain im NCD- und DIO-Modell vor Infarkt.	43
Abbildung 20: Longitudinale Strain vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	45
Abbildung 21: Zirkumferentielle Strain vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	46
Abbildung 22: Radiale Verkürzung vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	47
Abbildung 23: Prozentuale Veränderung der Strain im Remote-Bereich von NCD- und DIO-Tieren. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.	48
Abbildung 24: Prozentuale Veränderung der Strain im Remote-Bereich von DIO-Tieren mit- und ohne DOP-Behandlung. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.	50
Abbildung 25: Longitudinale Strain vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	53
Abbildung 26: Zirkumferentielle Strain vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	54
Abbildung 27: Radiale Verkürzung vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	55
Abbildung 28: Prozentuale Veränderung der Strain im Infarkt-Bereich von NCD- und DIO-Tieren. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.	56
Abbildung 29: Prozentuale Veränderung der Strain im Remote-Bereich von DIO-Tieren mit- und ohne DOP-Behandlung. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.	58
Abbildung 30: Globale longitudinale und zirkumferentielle Strain von Panx1 ^{-/-} Mäusen.....	60

Abbildung 31: Longitudinale Strain vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich, Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	61
Abbildung 32: Zirkumferentielle Strain vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	62
Abbildung 33: Radiale Verkürzung vor- und nach Infarkt im Remote-Bereich. Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	63
Abbildung 34: Prozentuale Veränderung der Strain im Remote-Bereich von NCD-Tieren und Panx1-/-Tieren. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.	64
Abbildung 35: Longitudinale Strain vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich, Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	65
Abbildung 36: Zirkumferentielle Strain vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich, Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	66
Abbildung 37: Radiale Verkürzung vor- und nach Infarkt im Infarkt-Bereich, Darstellung der Verkürzungszeit (T2P) und der Verkürzung in Millimetern (Pk).	67
Abbildung 38: Prozentuale Veränderung der Strain im Infarkt-Bereich von NCD-Tieren und Panx1-/-Tieren. Darstellung der prozentualen Veränderung von Baseline nach Infarkt.	68

7. Literaturverzeichnis

1. Collaborators GBDD. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet*. 2023;402(10397):203-234.
2. Rawshani A, Rawshani A, Franzen S, et al. Risk Factors, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2018;379(7):633-644.
3. Rawshani A, Rawshani A, Franzen S, et al. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017;376(15):1407-1418.
4. Dannenberg L, Weske S, Kelm M, et al. Cellular mechanisms and recommended drug-based therapeutic options in diabetic cardiomyopathy. *Pharmacol Ther*. 2021;228:107920.
5. Murtaza G, Virk HUH, Khalid M, et al. Diabetic cardiomyopathy - A comprehensive updated review. *Prog Cardiovasc Dis*. 2019;62(4):315-326.
6. Roos CJ, Scholte AJ, Kharagjitsingh AV, et al. Changes in multidirectional LV strain in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus: a 2-year follow-up study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014;15(1):41-47.
7. Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, 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):1403-1409.
8. Polzin A, Dannenberg L, Benkhoff M, et al. Revealing concealed cardioprotection by platelet Mfsd2b-released S1P in human and murine myocardial infarction. *Nat Commun*. 2023;14(1):2404.
9. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87(1):4-14.
10. Harreiter J, Roden M. [Diabetes mellitus: definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023)]. *Wien Klin Wochenschr*. 2023;135(Suppl 1):7-17.
11. American Diabetes Association Professional Practice C. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022;45(Suppl 1):S17-S38.
12. Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*. 2019;576(7785):51-60.
13. Zaharia OP, Strassburger K, Strom A, et al. Risk of diabetes-associated diseases in subgroups of patients with recent-onset diabetes: a 5-year follow-up study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(9):684-694.
14. Donahoe SM, Stewart GC, McCabe CH, et al. Diabetes and mortality following acute coronary syndromes. *JAMA*. 2007;298(7):765-775.
15. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep*. 2014;14(1):453.
16. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol*. 1972;30(6):595-602.
17. Ihlefeld K, Claas RF, Koch A, et al. Evidence for a link between histone deacetylation and Ca(2)+ homeostasis in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts. *Biochem J*. 2012;447(3):457-464.
18. Chen K, Wang Z, Liu C, et al. Sphingosine-1-phosphate Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-induced Cardiomyocyte Apoptosis Through Sphingosine-1-phosphate Receptor 1. *Arch Med Res*. 2022;53(6):562-573.
19. Fan X, Liu L, Shi Y, et al. Recent advances of the function of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor S1P3. *J Cell Physiol*. 2021;236(3):1564-1578.
20. Price MM, Oskeritzian CA, Milstien S, et al. Sphingosine-1-phosphate synthesis and functions in mast cells. *Future Lipidol*. 2008;3(6):665-674.
21. Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, et al. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci*. 2005;25(6):1459-1469.
22. Murata N, Sato K, Kon J, 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):809-815.
23. Obinata H, Hla T. Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *Int Immunol*. 2019;31(9):617-625.
24. Ontaneda D, Cohen JA. Potential mechanisms of efficacy and adverse effects in the use of fingolimod (FTY720). *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2011;4(5):567-570.
25. Nagral SS, Patel CV, Pathare PT, et al. Actinomycotic pseudo-tumour of the mid-cervical region (a case report). *J Postgrad Med*. 1991;37(1):62-64.
26. Polzin A, Dannenberg L, Benkhoff M, et al. Sphingosine-1-phosphate improves outcome of no-reflow acute myocardial infarction via sphingosine-1-phosphate receptor 1. *ESC Heart Fail*. 2023;10(1):334-341.
27. Zhang J, Honbo N, Goetzl EJ, et al. Signals from type 1 sphingosine 1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(5):H3150-3158.

28. Means CK, Miyamoto S, Chun J, et al. S1P1 receptor localization confers selectivity for Gi-mediated cAMP and contractile responses. *J Biol Chem.* 2008;283(18):11954-11963.
29. Landeen LK, Aroonsakool N, Haga JH, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor expression in cardiac fibroblasts is modulated by in vitro culture conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(6):H2698-2711.
30. Keller CD, Rivera Gil P, Tolle M, et al. Immunomodulator FTY720 induces myofibroblast differentiation via the lysophospholipid receptor S1P3 and Smad3 signaling. *Am J Pathol.* 2007;170(1):281-292.
31. Polzin A, Piayda K, Keul P, et al. Plasma sphingosine-1-phosphate concentrations are associated with systolic heart failure in patients with ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;110:35-37.
32. Weske S, Vaidya M, Reese A, et al. Targeting sphingosine-1-phosphate lyase as an anabolic therapy for bone loss. *Nat Med.* 2018;24(5):667-678.
33. He Q, Bo J, Shen R, et al. S1P Signaling Pathways in Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res.* 2021;2021:1341750.
34. Zhao Z, Choi J, Zhao C, et al. FTY720 normalizes hyperglycemia by stimulating beta-cell in vivo regeneration in db/db mice through regulation of cyclin D3 and p57(KIP2). *J Biol Chem.* 2012;287(8):5562-5573.
35. Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry.* 2001;40(16):4893-4903.
36. Bekpinar S, Yenidunya G, Gurdol F, et al. The effect of nephropathy on plasma sphingosine 1-phosphate concentrations in patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem.* 2015;48(18):1264-1267.
37. Shestopalov VI, Panchin Y. Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(3):376-394.
38. Kienitz MC, Bender K, Dermietzel R, et al. Pannexin 1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2011;286(1):290-298.
39. Bargiotas P, Krenz A, Hormuzdi SG, et al. Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(51):20772-20777.
40. Vessey DA, Li L, Kelley M. Ischemic preconditioning requires opening of pannexin-1/P2X(7) channels not only during preconditioning but again after index ischemia at full reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 2011;351(1-2):77-84.
41. Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1295-1301.
42. Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, et al. Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood.* 1995;86(1):193-202.
43. Tani M, Sano T, Ito M, et al. Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2458-2467.
44. Knapp M, Zendzian-Piotrowska M, Blachnio-Zabielska A, et al. Myocardial infarction differentially alters sphingolipid levels in plasma, erythrocytes and platelets of the rat. *Basic Res Cardiol.* 2012;107(6):294.
45. Klyachkin YM, Nagareddy PR, Ye S, et al. Pharmacological Elevation of Circulating Bioactive Phosphosphingolipids Enhances Myocardial Recovery After Acute Infarction. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(11):1333-1343.
46. Vessey DA, Li L, Kelley M. Pannexin-1/P2X 7 purinergic receptor channels mediate the release of cardioprotectants induced by ischemic pre- and postconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2010;15(2):190-195.
47. Stricagnoli M, Cameli M, Incampo E, et al. Speckle tracking echocardiography in cardiac amyloidosis. *Heart Fail Rev.* 2019;24(5):701-707.
48. Nakai H, Takeuchi M, Nishikage T, et al. Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration. *Eur J Echocardiogr.* 2009;10(8):926-932.
49. Ernande L, Rietzschel ER, Bergerot C, et al. Impaired myocardial radial function in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus: a speckle-tracking imaging study. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010;23(12):1266-1272.
50. Pieske B, Tschope C, de Boer RA, et al. How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA-PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2019;40(40):3297-3317.
51. Schielke J, Ittermann T, Gross S, et al. Sphingosine-1-phosphate levels are inversely associated with left ventricular and atrial chamber volume and cardiac mass in men : The Study of Health in Pomerania (SHIP). *Clin Res Cardiol.* 2023;112(11):1587-1599.
52. Sattler KJ, Elbasan S, Keul P, et al. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):821-832.
53. Knapp M, Baranowski M, Lisowska A, et al. Decreased free sphingoid base concentration in the plasma of patients with chronic systolic heart failure. *Adv Med Sci.* 2012;57(1):100-105.

54. Russo C, Jin Z, Elkind MS, et al. Prevalence and prognostic value of subclinical left ventricular systolic dysfunction by global longitudinal strain in a community-based cohort. *Eur J Heart Fail.* 2014;16(12):1301-1309.
55. Chan J, Hanekom L, Wong C, et al. Differentiation of subendocardial and transmural infarction using two-dimensional strain rate imaging to assess short-axis and long-axis myocardial function. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(10):2026-2033.
56. Means CK, Brown JH. Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2009;82(2):193-200.
57. Anwar M, Mehta D. Post-translational modifications of S1PR1 and endothelial barrier regulation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(9):158760.
58. Keul P, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ Res.* 2011;108(3):314-323.
59. Landeen LK, Dederko DA, Kondo CS, et al. Mechanisms of the negative inotropic effects of sphingosine-1-phosphate on adult mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(2):H736-749.
60. Antonescu CN, Foti M, Sauvonnnet N, et al. Ready, set, internalize: mechanisms and regulation of GLUT4 endocytosis. *Biosci Rep.* 2009;29(1):1-11.
61. Wende AR, Schell JC, Ha CM, et al. Maintaining Myocardial Glucose Utilization in Diabetic Cardiomyopathy Accelerates Mitochondrial Dysfunction. *Diabetes.* 2020;69(10):2094-2111.
62. Yung BS, Brand CS, Xiang SY, et al. Selective coupling of the S1P(3) receptor subtype to S1P-mediated RhoA activation and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;103:1-10.
63. Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2004;109(18):2234-2239.
64. Wang N, Li JY, Zeng B, et al. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Cardiovascular Diseases. *Biomolecules.* 2023;13(5).
65. Gellings Lowe N, Swaney JS, Moreno KM, et al. Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor-beta-stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2009;82(2):303-312.
66. Le TNU, Nguyen TQ, Kalailingam P, et al. Mfsd2b and Spns2 are essential for maintenance of blood vessels during development and in anaphylactic shock. *Cell Rep.* 2022;40(7):111208.
67. Chen H, Ahmed S, Zhao H, et al. Structural and functional insights into Spns2-mediated transport of sphingosine-1-phosphate. *Cell.* 2023;186(12):2644-2655 e2616.
68. Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, et al. Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem.* 2007;103(6):2610-2619.
69. Ksiazek M, Chacinska M, Chabowski A, et al. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res.* 2015;56(7):1271-1281.
70. Dong A, Sunkara M, Panchatcharam M, et al. Synergistic effect of anemia and red blood cells transfusion on inflammation and lung injury. *Adv Hematol.* 2012;2012:924042.
71. Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 3:S215-219.
72. Nguyen-Phuong T, Seo S, Cho BK, et al. Determination of progressive stages of type 2 diabetes in a 45% high-fat diet-fed C57BL/6J mouse model is achieved by utilizing both fasting blood glucose levels and a 2-hour oral glucose tolerance test. *PLoS One.* 2023;18(11):e0293888.
73. Islam MS, Loots du T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2009;31(4):249-261.
74. Langer-Gould AM, Smith JB, Gonzales EG, et al. Multiple Sclerosis, Disease-Modifying Therapies, and Infections. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2023;10(6).
75. Ryba DM, Warren CM, Karam CN, et al. Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulator, FTY720, Improves Diastolic Dysfunction and Partially Reverses Atrial Remodeling in a Tm-E180G Mouse Model Linked to Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 2019;12(11):e005835.
76. Ahmed N, Laghari AH, AlBkhood B, et al. Fingolimod Plays Role in Attenuation of Myocardial Injury Related to Experimental Model of Cardiac Arrest and Extracorporeal Life Support Resuscitation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24).
77. Rana A, Sharma S. Mechanism of sphingosine-1-phosphate induced cardioprotection against I/R injury in diabetic rat heart: Possible involvement of glycogen synthase kinase 3beta and mitochondrial permeability transition pore. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(2):166-173.
78. Keul P, Polzin A, Kaiser K, et al. Potent anti-inflammatory properties of HDL in vascular smooth muscle cells mediated by HDL-S1P and their impairment in coronary artery disease due to lower HDL-S1P: a new aspect of HDL dysfunction and its therapy. *FASEB J.* 2019;33(1):1482-1495.
79. Poti F, Ceglarek U, Burkhardt R, et al. SKI-II--a sphingosine kinase 1 inhibitor--exacerbates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient (LDL-R^{-/-}) mice on high cholesterol diet. *Atherosclerosis.* 2015;240(1):212-215.

80. Imeri F, Blanchard O, Jenni A, et al. FTY720 and two novel butterfly derivatives exert a general anti-inflammatory potential by reducing immune cell adhesion to endothelial cells through activation of S1P(3) and phosphoinositide 3-kinase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015;388(12):1283-1292.
81. Vehoff J, Haegele-Link S, Humm A, et al. Heart rate variability decreases after 3 months of sustained treatment with fingolimod. *J Neurol*. 2017;264(11):2313-2317.
82. Schmouder R, Hariry S, David OJ. Placebo-controlled study of the effects of fingolimod on cardiac rate and rhythm and pulmonary function in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012;68(4):355-362.
83. Mishra P, Pandey CM, Singh U, et al. Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Ann Card Anaesth*. 2019;22(1):67-72.
84. StatistikGuru. (2025). *Rechner zur Signifikanzprüfung von Korrelationskoeffizienten*. Abgerufen am 17. Juni 2025, von <https://statistikguru.de/rechner/korrelationen-vergleichen.html>
85. Bortz J, Schuster C. *Statistik verstehen: Grundlagen – Deskriptive Statistik – Induktive Statistik – Wahrscheinlichkeitsrechnung*. 7. Aufl. Berlin: Springer; 2023.
86. Kim TK. T test as a parametric statistic. *Korean J Anesthesiol*. 2015;68(6):540-546.
87. BioRender. BioRender – Science Illustration Software. Toronto, Canada: BioRender; 2024. Available from: <https://biorender.com>
88. Thomas N, Schröder NH, Nowak MK, Wollnitzke P, Ghaderi S, Von Wnuck Lipinski K, et al.. Sphingosine-1-phosphate suppresses GLUT activity through PP2A and counteracts hyperglycemia in diabetic red blood cells. *Nature Communications* 2023;14(1).
89. Lancellotti P, Price S, Edvardsen T, Cosyns B, Delgado V, Donal E, et al. The use of echocardiography in acute cardiovascular care: Recommendations of the European Association of Cardiovascular Imaging and the Acute Cardiovascular Care Association. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;16(2):119–46. PMID: 25378470. doi:10.1093/ehjci/jeu210.
90. Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, Munafò MR. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(5):365–76. doi:10.1038/nrn3475. PMID: 23571845.
91. Smith LH, VanderWeele TJ. Bounding bias due to selection. *Epidemiology*. 2019 Jul;30(4):509–16. doi:10.1097/EDE.0000000000001032. PMID:31033690.
92. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen; 1959.

Danksagung

Am Ende dieser Dissertation möchte ich die Gelegenheit nutzen, all den Menschen meinen tief empfundenen Dank auszusprechen, die mich auf diesem langen Weg begleitet und unterstützt haben.

Ich danke dem gesamten Team des kardiologischen Labors und der Abteilung für Kardiologie für die tatkräftige Unterstützung während meiner Forschung. Die Zusammenarbeit, der fachliche Austausch und die Arbeitsumgebung waren maßgeblich für den Fortschritt verantwortlich. Insbesondere meiner Arbeitsgruppe danke ich für die tatkräftige Unterstützung.

Mein tiefster und größter Dank gilt meiner Doktormutter. Ihre kontinuierliche Unterstützung, klare fachliche Anleitung und Ermutigung waren wesentliche Faktoren für den Fortschritt dieser Arbeit. Sie förderte nicht nur die wissenschaftliche Entwicklung, sondern ermöglichte auch persönliches Wachstum. Das in mich gesetzte Vertrauen schaffte die notwendige Basis, um den Herausforderungen dieser Dissertation erfolgreich zu begegnen. Als herausragende Mentorin zeichnete sie sich durch großes Engagement und fundiertes Wissen aus, was stets motivierte, das Beste zu leisten. Für all dies besteht tiefer Dank.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Verlobten, der mich während dieser intensiven Zeit kontinuierlich unterstützt hat. Seine Geduld und sein Verständnis haben wesentlich dazu beigetragen, dass ich mich voll auf meine Arbeit konzentrieren konnte. Durch seine beständige Unterstützung war es möglich, die Herausforderungen dieses Projekts erfolgreich zu meistern. Für die Balance, die er mir zwischen Forschung und Alltag ermöglichte, und die Rückendeckung in schwierigen Phasen bin ich ihm sehr dankbar.

Den größten Dank möchte ich jedoch meiner Familie und insbesondere meinen Eltern aussprechen. Ohne ihre Aufopferung, Liebe und Unterstützung würde ich nicht hier stehen. Ich widme diese Dissertation meinen Eltern, besonders meiner Mutter, die immer an meiner Seite war und ohne die dieser Weg nicht möglich gewesen wäre.