

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

**Charakterisierung eines Langendorff basierten Zelltransfer Modells des
kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sema Kaya

2020

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Christian Jung

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen

Meiner Familie in Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Muessig, J. M., Kaya, S., Moellhoff, L., Noelle, J., Hidalgo Pareja, L., Masyuk, M., Gerdes, N., Pernow, J., Kelm, Jung, C. (2019). A Model of Blood Component–Heart Interaction in Cardiac Ischemia–Reperfusion Injury using a Langendorff-Based Ex Vivo Assay. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*.

Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt und seine Folgen zählen zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Gesellschaft. Die gängige Behandlungsmethode des akuten Myokardinfarktes zielt darauf hin durch frühzeitige Revaskularisation die myokardialen Schäden zu reduzieren. Die angestrebte Reperfusion der ischämischen Areale wiederum führt zusätzlich zur Ausbildung von sogenannten Reperfusionsschäden. Es gibt Hinweise darauf, dass Interaktionen zwischen den verschiedenen Blutzellpopulationen einerseits sowie Endothelzellen und Kardiomyozyten andererseits einen wichtigen Einfluss auf das Infarktgeschehen haben. Nun stellt sich die Frage, welchen Stellenwert die einzelnen Blutbestandteile bei der Entstehung von Ischämie-/Reperfusionsschäden (I/R-Schäden) haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Modellcharakterisierung eines *ex vivo* transfer- Modells an der Langendorff (LD) Anlage, mittels dessen der Einfluss von Erythrozyten junger gesunder Spender und muriner Blutbestandteile (Plasma, plättchenreiches Plasma (PRP), Erythrozyten RBCs)) auf den kardialen I/R-Schaden charakterisiert werden sollte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass 0,4ml murines Vollblut kurz vor Einleitung einer 40-minütigen Globalischämie ausreichend ist, um die koronaren Gefäße des isoliert perfundierten Herzen zu füllen. Die ermittelten histologischen Aufnahmen sowie die Blutzellanzahl konnten beweisen, dass während der 40-minütigen Globalischämie die eingebrachten RBCs in den Koronargefäßen verbleiben. Nach Einsetzen der Reperfusion mit Krebs-Henseleit Puffer (KHB) konnten die RBCs nach einer Dauer von 60min nicht mehr nachgewiesen werden. Nach Bestätigung, des möglichen Ladevorganges, erfolgte das Einbringen muriner Blutbestandteile. Hierbei zeigten die Ergebnisse mit murinem Vollblut, Plasma, PRP und RBCs eindeutig einen positiven Effekt auf die linksventrikuläre Funktion nach 60-minütiger Reperfusion. Außerdem konnten die Versuche mit murinen Blutbestandteilen die Infarktgröße nach 120-minütiger Reperfusion, im Vergleich zur Perfusion mit KHB, signifikant reduzieren. Der Transferversuch mit humanen RBCs erzielte vergleichbare kardio-protektive Effekte wie die Perfusion mit murine RBCs. Durch Variierung des Hämatokrits konnte verdeutlicht werden, dass der positive Effekt auf die Infarktgröße auch in geringeren Konzentrationen nachweisbar ist. Die linksventrikuläre Funktion nach 60-minütiger Reperfusion zeigte nur bei physiologischen Hämatokrit-Werten (30 und 40%) eine Verbesserung auf. Die Blutgasanalysen konnten eine bessere

Sauerstoffversorgung der LD-Herzen mittels RBC-KHB Suspensionen nachweisen als mit einfacher KHB- Lösung.

Durch Charakterisierung des *ex vivo* Modells an der Langendorff-Apparatur konnte eine kostengünstige und zeiteffektive Methode zur Erforschung von Zell-Zell Interaktionen im kardialen I/R-Schaden etabliert werden. Diese Methode ermöglicht die Durchführung von Transferexperimenten mit Blut und Blutbestandteilen verschiedener Patientenkollektive oder genetisch veränderter Mauslinien in WT oder genetisch veränderten Mäuseherzen. Hiermit soll der Einfluss auf den I/R Schaden untersucht und gezielte pharmakologische Behandlungsansätze erforscht werden.

Summary

Acute myocardial infarction is one of the most common causes of mortality and morbidity in western society. The main aim of the well-established treatment regarding acute myocardial infarction is the reduction of the myocardial damage by means of percutaneous coronary intervention. The targeted reperfusion of the ischemic areas initiates an additional myocardial damage, a phenomenon called reperfusion injury. There is evidence suggesting that the interaction between different blood cell components along with the interaction between endothelial cells and cardiomyocytes plays a major role in cardiac ischemia reperfusion injury (I/R-injury). However, the question arises to what extent individual blood components contribute to I/R injury.

The main objective of the present dissertation is to refine a Langendorff-based *ex vivo* transfer model to appraise the impact of erythrocytes from young and healthy human volunteers as well as murine whole blood and blood components (plasma, platelet rich plasma (PRP), erythrocytes (RBCs)) on cardiac I/R injury. Furthermore, it is important to investigate the precise meaning of the isolated blood components referring to I/R injury and to examine the consequences on left ventricular function including the ultimate infarct size.

The major results of this dissertation show that 0,4 ml of murine whole blood is sufficient to fill the coronary vessels of isolated perfused hearts before the initiation of 40 minutes of global ischemia. Histological analyses and blood counts confirmed that loaded blood components stayed stable in the coronary system during 40 minutes of global ischemia. Following 60 minutes of reperfusion with Krebs-Henseleit buffer (KHB) there were no detectable red blood cells in the coronary system. After loading with isolated murine blood

components and murine whole blood, hemodynamic parameters and infarct size were measured to evaluate the effects on left ventricular function and infarct size. Loading with murine whole blood or murine blood components improves left ventricular function measured after 60 minutes of reperfusion. Concerning infarct size, after 120 minutes of reperfusion a reduction has been observed compared to buffer-treated controls. Moreover, the temporary reperfusion with human RBCs illustrate a comparable cardio-protective impact as murine RBCs. Variation of hematocrit showed a dose dependent effect of RBCs on left ventricular function but not on infarct size. Only physiological hematocrits (30 % and 40 %) could improve postischemic left ventricular function after 60 minutes of reperfusion. In comparison to left ventricular function all applied concentrations of RBCs significantly reduced infarct size after 120 minutes of reperfusion. Moreover, the blood gas analysis showed a higher oxygen supply delivered by RBC-KHB suspension with a hematocrit of 40% than with KHB alone.

This Langendorff-based *ex vivo* transfer model represent a cost- and time-effective method to investigate cell-to-cell interactions regarding cardiac I/R injury. Though using this model, it is feasible to realize various transfer experiments with blood and blood components of different patient collectives, genetically modified mouse strains or with genetically- modified mouse hearts. Accordingly, the impact on I/R injury should be examined and further targeted pharmacological treatment approaches should be developed.

Abkürzungsverzeichnis

±dp/dt	Maximum und Minimum der ersten Ableitung des linksventrikulären Drucks nach der Zeit
CFR	koronare Flussreserve
cO₂	Sauerstoffgehalt
DO₂	Sauerstoffextraktion
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Hb	Hämoglobin
HKT	Hämatokrit
hRBCs	humane Erythrozyten
I/R-Schaden	Ischämie-/Reperfusionsschaden
KHB	Krebs-Henseleit Puffer
LD	Langendorff
LV	linker Ventrikel
LVDP	<i>left ventricular developed pressure</i> linksventrikulär entwickelte Druck
LVEDP	<i>left ventricular end diastolic pressure</i> linksventrikulär enddiastolische Druck
MI	Myokardinfarkt
min	Minuten
mPlasma	murines Plasma
m-PTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRBCs	murine Erythrozyten
mVB	murines Vollblut
MW	Mittelwert
n.s	nicht signifikant
NO	Stickstoffmonoxid
paO₂	Sauerstoffpartialdruck
PRP	plättchenreiches Plasma
RBCs	Erythrozyten
RIPC	<i>Remote ischemic preconditioning</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standartabweichung
sO₂	Sauerstoffsättigung
TTC	2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid

Die Standardeinheiten des SI-Systems wurden nicht aufgenommen. Weitere Abkürzungen werden im Text erläutert. Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der Myokardinfarkt.....	1
1.2 Kardiale Ischämie- und Reperfusionsschäden	2
1.3 Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens	6
1.4 Die Langendorff Methode	11
1.5 Ziele dieser Dissertation.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Material	20
2.1.1 Chemikalien und Medikamente	20
2.1.2 Verbrauchs- und sonstige Materialien.....	21
2.1.3 Geräte	21
2.1.4 Software	22
2.1.5 Versuchstiere.....	23
2.1.6 Tierbedarf.....	23
2.2 Der Langendorff-Versuch	23
2.2.1 Der Aufbau der Langendorff-Apparatur	23
2.2.2 Präparation der isolierten Mäuseherzen	27
2.2.3 Der allgemeine Versuchsablauf	28
2.2.4 Ausschlusskriterien für die Versuche an der Langendorff-Apparatur	30
2.2.5 Die Perfusionslösung.....	31
2.2.6 Bestimmung des Infarktareals mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	31
2.2.7 Die Herstellung der TTC-Lösung	32
2.2.8 Die Herstellung des TTC- Puffers.....	32
2.2.9 Planimetrische Messung der Infarktgröße.....	32
2.3 Die venöse Blutabnahme.....	33
2.4 Die murine Blutentnahme durch Herzpunktion	34

2.5 Die Aufarbeitung der verschiedenen Blutbestandteile.....	35
2.6 Anfertigung der Paraffinblöcke.....	36
2.7 Hämatoxylin- Eosin Färbung	37
2.8 Die Blutgasanalyse.....	37
2.9 Ermittlung des Hämoglobins und der Zellzahl	39
2.10 Statistik.....	39
3. Ergebnisse	41
3.1. Ermittlung der optimalen Ischämie-Dauer.....	41
3.2. Histologischer Nachweis von Erythrozyten im Koronarsystem der LD-Herzen.....	43
3.3. Ermittlung der Hämoglobin Konzentration.....	45
3.4. Einbringung von murinem Blut und Blutbestandteilen in die LD-Apparatur.....	47
3.4.1. Einbringung von murinem Vollblut in das LD-Herz	47
3.4.2 Einbringung von verschiedenen murinen Blutbestandteilen in das LD-System.....	49
3.5. Transfer- Modell	53
3.5.1 Transfer humaner Erythrozyten in die LD-Apparatur.....	53
3.5.2 Transfer von humanem Plasma in die LD-Apparatur	55
3.5.3. Einfluss verschiedener Hämatokrit-Werte auf den I/R-Schaden	57
3.6. Blutgasanalyse der LD-Herzen	59
4. Diskussion	63
4.1. Die optimale Ischämie-Dauer.....	63
4.2. Histologischer Nachweis der eingebrachten Blutzellen.....	64
4.3 Kardio-protectiver Effekt von Blutbestandteilen	65
4.4. Limitationen der Arbeit.....	76
5. Ausblick	77
Abbildungsverzeichnis.....	80
Tabellenverzeichnis.....	81
Literaturverzeichnis.....	82

1. Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt (MI) stellt ein akutes und lebensbedrohliches Ereignis dar, bei dem es infolge einer anhaltenden lokalen Durchblutungsstörung zum myokardialen Zelltod kommt. Der Myokardinfarkt war im Jahr 2016 in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach der chronischen ischämischen Herzkrankheit (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2016). Trotz Verbesserungen bei der pharmakologischen Behandlung und medizinischen Intervention zählt der MI zu den führenden Todesursachen in den Industrienationen (Benjamin et al., 2017). Die gängige Behandlungsmethode des akuten MI zielt auf eine frühzeitige Revaskularisation mittels perkutaner Koronarintervention (PCI), pharmakologische Thrombolyse oder auf eine koronararterielle Bypassoperation ab, um die myokardialen Schäden zu reduzieren und schließlich das klinische Outcome zu verbessern (Yellon & Hausenloy, 2007, Fröhlich et al., 2013). Sowohl die Dauer als auch der Schweregrad der Minderdurchblutung entscheiden über das Ausmaß der myokardialen Nekrosebildung (Braunwald & Kloner, 1985). Schon eine mehr als 20min anhaltenden Ischämie führt zum myokardialen Zelltod, welcher subendokardial beginnt und sich transmural bis ins Subepikardium ausweitet (Reimer et al., 1977). Demnach ist es von entscheidender Bedeutung das Zeitintervall zwischen dem Verschluss eines Koronargefäßes und der eingeleiteten Reperfusion möglichst kurz zu halten (Braunwald & Kloner, 1985, Piper & Ovize, 1998). Obwohl die Reperfusion essentiell für das Überleben des ischämischen Gewebes ist, kann sie wiederum auch zusätzlich zur Schädigung des Myokards beitragen (Piper et al., 1998, Hausenloy & Yellon, 2013). Schließlich wird die endgültige Infarktgröße nicht nur durch die Ischämie verursacht, sondern mit bis zu 50% durch den Reperfusionsschaden (Yellon & Hausenloy, 2007). Der Reperfusionsschaden ist nicht nur durch mechanische Faktoren bedingt, sondern auch durch die Aktivierung mehrerer Signalwege, die unter anderem zur Apoptose, Autophagie und zur Nekrose des myokardialen Gewebes führen (Hausenloy & Yellon, 2013, E. Murphy & Steenbergen, 2008, Yaoita et al., 1998, Grunenfelder et al., 2001). Das Zusammenspiel von Ischämie und der darauffolgenden Reperfusion führt unter anderem zu zellulären, molekularen und morphologischen Veränderungen. Darunter zählen die Ausbildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Inflammation und der irreversible Zelltod bedingt durch Apoptose und Nekrose (Neri et al., 2017). Die daraus resultierenden Schäden werden unter dem

Begriff Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) zusammengefasst. Da die Pathophysiologie der I/R-Schäden nicht vollständig geklärt ist und die Übertragung der experimentellen Tierversuche auf die klinische Praxis noch Schwierigkeiten aufweist und auch keine präventiven Therapiemöglichkeiten vorliegen, ist es von Interesse aktueller Forschung den I/R-Schaden genauer zu untersuchen und hierbei kardio-protektive Maßnahmen für den klinischen Nutzen zu entwickeln (Fröhlich et al., 2013, Neri et al., 2017).

1.2 Kardiale Ischämie- und Reperfusionsschäden

Im folgenden Kapitel sollen die pathophysiologischen Prozesse im Rahmen des I/R-Schadens genauer beschrieben und veranschaulicht werden.

Durch die Ischämie kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen dem Sauerstoff-Angebot und dem Sauerstoffbedarf, wodurch es schließlich zu einer Funktionsbeeinträchtigung der Kardiomyozyten kommt. Dabei wird eine Kaskade von biochemischen und metabolischen Veränderungen vorangetrieben (Hausenloy & Yellon, 2013). Zum einen erfolgt die Energiebereitstellung über die anaerobe Glykolyse, wodurch es zu einer Laktat- und Protonenakkumulation, mit einer daraus resultierenden intrazellulären pH Abnahme unter 7,0, kommt (Pike et al., 1990, L. Zhou et al., 2005). Durch die Protonenakkumulation und die Produktion ischämischer Metabolite innerhalb der Zelle wird sowohl der Natrium-Protonen- Antiporter (NPA) als auch der Natrium-Bikarbonat Symporter aktiviert, wodurch der Natrium-Einstrom in die Zelle vorangetrieben wird (Pike et al., 1990). Dabei kommt die oxidative Phosphorylierung durch die anaeroben Bedingungen innerhalb der Zelle zum Erliegen. Dies führt zur Depolarisation der mitochondrialen Membran, zum Abbau des Adenosin Triphosphats (ATP) und schließlich zur Hemmung der kontraktile Funktion des Myokards. Sowohl der ATP-Mangel als auch der Ischämie bedingte oxidative Stress und die Bildung des löslichen Inhibitors sorgen dafür, dass die Natrium- Kalium ATPase in der Funktion gehemmt wird (Cross et al., 1995, Fuller et al., 2003). Durch den Ausfall der Natrium- Kalium ATPase (NKA) akkumuliert Natrium innerhalb der Zelle und kann nicht aktiv ins Extrazelluläre befördert werden. Dies führt über den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), welcher bedingt durch den transsarkolemmalen Natrium und Calcium Gradienten im „reverse mode“ umschaltet, zum intrazellulären Calcium-„Overload“ (Pott et al., 2011). Die Bedeutung des intrazellulären Natriumanstiegs während der Ischämie konnte durch verschiedene Versuche, bei denen der Natrium- und Calciumanstieg durch den Block des

NPA abgeschwächt wurde, verdeutlicht werden (Hartmann & Decking, 1999, E. Murphy et al., 1991, Gumina et al., 1999). Hierbei konnte unter anderem der kardio-protektive Effekt des NPA Blocks während der Ischämie- und Reperfusionsphase nachgewiesen werden (Hartmann & Decking, 1999, Gumina et al., 1999).

Zusammenfassend, wie auch in der Abbildung 1 vereinfacht dargestellt, führen der verringerte Calciumefflux, die verringerte Calcium Wiederaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum durch die SERCA ATPase, die durch Protonen Akkumulation aktivierte NPA sowie der durch den ATP-Mangelzustand bedingte Ausfall der NKA zum zellulären Calcium-*Overload* (Murphy & Steenbergen, 2008). Folge der zellulären Calcium-Anhäufung ist die Hyperkontraktur, die Aktivierung der zur Autophagie vorantreibenden Protease Calpain sowie die Zellnekrose (Murphy et al., 1991, Murphy & Steenbergen, 2008). Der ATP-Mangelzustand, welcher sich während der Ischämie entwickelt, führt unter anderem zur myokardialen Kontraktur vom Rigor-Typ. Dies führt bei lang anhaltender Ischämie zur Störung des myokardialen Zytoskeletts (Piper et al., 2003). Folge sind unter anderem eine Abnahme der ventrikulären Compliance und eine Zunahme des enddiastolisch ventrikulären Drucks (Piper et al., 2003). Die schwere Kontraktur kann schließlich zur Ausbildung einer sogenannten „*contaction band necrosis*“ führen (Ganote, 1983). Dies kann sich sowohl unabhängig vom Calcium in der frühen Reperfusionsphase entwickeln, als auch bedingt durch den Calcium-*Overload* und der verstärkten Energiebereitstellung im Verlauf der Reperfusion entwickeln (Piper et al., 2003). Außerdem bedingt der zytoplasmatische Calcium-*Overload*, dass die Mitochondrien über den Uniporter vermehrt Calcium aufnehmen (Khalaf & Babiker, 2016). Der entstehende mitochondriale Calcium-*Overload* begünstigt die Öffnung der Mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (m-PTP). Die Öffnung der m-PTP wird wiederum während der Ischämie durch den niedrigen pH-Wert inhibiert (Halestrap, 1991, Murphy & Steenbergen, 2008) und spielt eine wichtige Rolle in der Reperfusionsphase. Die in der Reperfusion herrschenden Bedingungen wie die Bereitstellung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Crompton et al., 1987) bedingt durch den ineffizienten Elektronentransport, die Normalisierung des pH-Wertes sowie die hohe anorganische Phosphat-, die niedrige Adenosintriphosphat- (ATP) und Adenosindiphosphat- (ADP) Konzentrationen sind Triggerfaktoren für die Öffnung der m-PTP (Crompton et al., 2002).

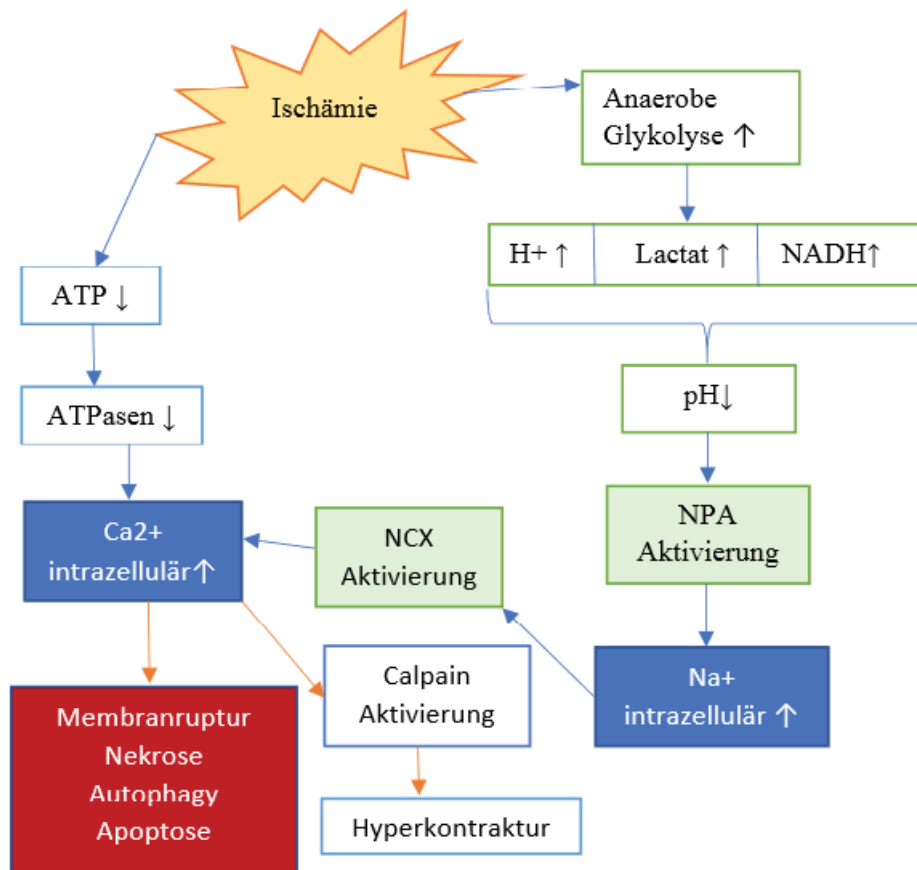


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge der myokardialen Ischämie

Bei anhaltender myokardialer Ischämie nimmt der ATP-Gehalt der Zelle ab. Die anaerobe Glykolyse wird vorangetrieben und es kommt innerhalb der Zelle zur Laktat-, Protonen- und NADH-Akkumulation. Dies führt zum pH Abfall der Zelle. Durch die NPA-Aktivierung werden die Protonen aus der Zelle gegen Natriumionen ausgetauscht und somit die Azidose reduziert. Dies sorgt wiederum zum Anstieg des intrazellulären Natriumgehalts, zur Depolarisation der Plasmamembran und hieraus bedingt zur Aktivierung der NCX. Dabei werden die Natriumionen gegen Calciumionen ausgetauscht, wodurch es zu einem intrazellulären Calciumanstieg kommt. Der bei der Ischämie entstehende ATP-Mangel sorgt dafür, dass die ATPasen in ihrer Funktion eingeschränkt werden, wodurch es zur Zunahme des intrazellulären Calciumanstiegs kommt. Der Calciumanstieg kann unter anderem zur Zellnekrose, Apoptose, Autophagie und zur Entstehung von Membranschäden führen. Auch werden Proteasen wie Calpain aktiviert, die ursächlich für Zellnekrosen, Hyperkontraktur und für die Einleitung des programmierten Zelltodes sein können. NPA= Natrium-Protonen- Antiporter, NCX= Natrium-Calcium-Austauscher. Quelle: eigenes Design erstellt mit Power point.

Folgen der m-PTP Öffnung sind unter anderem die Beeinträchtigung der ATP-Synthese, die Zellschwellung und der Zelltod (Halestrap, 2006). Die ROS-Bildung in der Reperfusionsphase spielt eine wichtige Rolle, da die freien Radikale unter anderem durch die m-PTP Öffnung eine weitere ROS Bildung induzieren, welches als „ROS-induced ROS release“ (vgl. Zorov et al., 2000, S.1002.) bezeichnet wird. Die Bildung der freien

Sauerstoffradikale im ischämischen Gewebe hat verschiedene Quellen. Dazu gehören unter anderem: die Xanthin-Oxidase, die NADPH-Oxidase, die Entkopplung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), die mitochondriale Elektronentransportkette und Cytochrom P450 (Granger & Kvietys, 2015). Die ROS Akkumulation vor allem in der Reperfusion führt zur direkten Schädigung von DNA, Lipiden, Proteinen und zur Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, die unter anderem Zytokin gesteuerte Kaskaden antreiben (Frank et al., 2012). Schließlich führt der durch oxidativen Stress bedingte mitochondriale Schaden zur Beeinträchtigung wichtiger metabolischer Funktionen (Murphy, 2009). Der in den Kardiomyozyten verursachte ROS Anstieg wird vor allem durch die bereits in der Ischämie vorgeschädigte mitochondriale Elektronentransportkette verursacht (Kaminski et al., 2002, Lesnefsky et al., 2004). Die exzessive Produktion freier Radikale führt letztlich zur Erschöpfung des endogenen antioxidativen Schutzsystems (Steare & Yellon, 1995). Zum antioxidativen Schutzsystem gehören unter anderem die Enzyme Superoxiddismutase, Glutathion Peroxidase, Katalase, sowie die Glutathion Reduktase (Dipak et al., 1994). Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle im I/R-Schaden (Chen & Davis, 1998, Yoshida et al., 1996). Die resultierende Dysbalance zwischen der gesteigerten ROS Produktion und den ausgeschöpften antioxidativen Schutzmechanismen innerhalb der geschädigten Zelle trägt zum Aggravieren des I/R-Schadens bei (Steare & Yellon, 1995).

Alles in allem ist zu betonen, dass die Reperfusion einen sehr komplexen Vorgang darstellt, bei welcher mehrere Prozesse gleichzeitig ablaufen und sich gegenseitig beeinflussen. Bisher sind nicht alle Vorgänge des I/R-Schadens untersucht und geklärt worden, sodass die weitere Erforschung von wesentlicher Bedeutung für die Entwicklung effektiver therapeutischer Maßnahmen im klinischen Setting darstellt.

1.3 Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens

Sowohl die Ischämie als auch die anschließende Reperfusion bedingen den Ablauf verschiedener interzellulärer Prozesse. Dabei beeinflusst die Inflammation getriggerte Reaktion seitens der Leukozyten und die thrombozytäre Adhäsion die endothelialen Barrierefunktion. Diese Vorgänge führen unter anderem über Beeinflussung der endothelialen Schlussleisten-Komplexe zur Permeabilitätssteigerung (Rodrigues & Granger, 2010). Hierbei führen verschiedene interzelluläre Vorgänge zur gegenseitigen Aktivierung und Verstärkung der endothelialen Dysfunktion und der Inflammation. Die Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen der I/R-Phase führt durch Freisetzung proinflammatorischer Faktoren und Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel: P-Selektin, Fibrinogen und von Willebrand Faktor (vWF), zur Verstärkung der systemischen und myokardialen Inflammation (Massberg et al., 1998, Schanze et al., 2019). Des Weiteren interagieren aktivierte Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen. Hierbei wird die Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen sowie zwischen Thrombozyten und Leukozyten im I/R-Schaden vor allem über P-Selektin vermittelt (Massberg et al., 1998). Über die Interaktion zwischen Thrombozyten und aktivierten Immunzellen wie den neutrophilen Granulozyten und Monozyten wird die Transmigration dieser ins Gewebe verstärkt (Zarbock et al., 2007, von Hundelshausen & Weber, 2007). Die Bedeutung der thrombozytären Funktion im Rahmen des Myokardinfarktes konnte in einem Maus-Modell verdeutlicht werden. Dabei konnten Liu et al (2011) nachweisen, dass die Thrombozyten zu den ersten Blutzellen gehören, die im postischämischen Myokard eintreffen und dass diese über die Bindung von P-Selektin mit P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 Komplexe mit Leukozyten bilden (Liu et al., 2011). Mit dem P2Y₁₂ Rezeptor-Antagonisten Clopidogrel konnten die Thrombozyten-Leukozyten Aggregate im Blut und die inflammatorische Reaktion im Bereich des infarzierten Myokards gesenkt werden (Liu et al., 2011). Zudem ist die Thrombozyten-Aktivierung abhängig von der Ischämie-Dauer und verhält sich proportional zur Infarktgröße und Thrombozyten-Ablagerung (Xu et al., 2005). Die schädigende Wirkung der Thrombozyten induzierten Leukozyten-Adhäsion über P-Selektin und Glykoprotein IIb/IIIa im Rahmen des myokardialen Reperfusionsschaden konnte durch *in vivo* Versuche an Mäusen verdeutlicht werden (Kupatt et al., 2002). Dabei ist hervorzuheben, dass die Inhibition der thrombozytären Aggregation über Glykoprotein IIb/IIIa im myokardialen I/R-Setting zur Verringerung der Infarktgröße (Kingma et al., 2000) und Verbesserung des mikrovaskulären Flusses führt

(Kunichika et al., 2004). Die Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen in den postischämischen Gefäßen ist vergleichbar mit der Interaktion der Leukozyten mit den Endothelzellen. Auch hier kommt es im Rahmen der Reperfusionsphase erst zum *rolling* und anschließend zur Adhäsion der Thrombozyten via P-Selektin (Massberg et al., 1998). Dabei wird P-Selektin seitens der Endothelzellen durch Hypoxie sowie durch Re-Oxygenierung getriggelter Exozytose mobilisiert (Pinsky et al., 1996). Durch die Akkumulation der Thrombozyten wird über die Freigabe proinflammatorischer Mediatoren die Rekrutierung von Leukozyten verstärkt. Dies führt zur Verstärkung des I/R-Schadens (Massberg et al., 1998). In einem Maus-Modell konnte durch Hemmung der Glykoprotein VI vermittelten Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen die thrombozytärer Freigabe proinflammatorischer Mediatoren sowie die Infarktgröße gesenkt und die postischämische kardiale Funktion gesteigert werden (Schönberger et al., 2012).

Nicht nur die thrombogene und Inflammatorische Wirkung der Thrombozyten hat Einfluss auf den I/R-Schaden, sondern auch die arrhythmogene Wirkung. Dies konnte in einem Versuch an isoliert perfundierten Rattenherzen demonstriert werden. Hierbei zeigten Dhanjal et al (2013), dass Thrombozyten im Ischämie Areal unabhängig ihrer thrombogene Eigenschaft zur Entstehung von Kammerflimmern beitragen. Verantwortlich hierfür wurden arrhythmogen wirkende Mediatoren gemacht, die im Rahmen der Ischämie durch aktivierte Thrombozyten freigesetzt werden. Dabei zeigten Thrombozytenaggregationshemmer keinen Einfluss auf die Thrombozyten induzierte Arrhythmie (Dhanjal et al., 2013).

Weiterhin können Thrombozyten über die Freisetzung verschiedener intrazellulärer Moleküle verschiedene Prozesse beeinflussen. Dazu zählen unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine, vasokonstriktorisches und proinflammatorische Mediatoren wie zum Beispiel Exosomen und apoptotische Körperchen (Ziegler et al., 2019). Diese wichtigen Mediatoren werden innerhalb der Thrombozyten in δ -Granula, α -Granula sowie in Lysosomen gespeichert. Die freigesetzten Substanzen haben eine wesentliche Bedeutung für die interzellulären Vorgänge im Rahmen des I/R-Schadens. Dabei werden den freigesetzten Mediatoren zum einen kardio-protective und zum anderen schädigende Eigenschaften im I/R-Geschehen zugesprochen. In einem *in vitro* Modell an präkonditionierten ventrikulären Kardiomyozyten konnte die kardio-protective Wirkung der im α -Granula gespeicherten Faktoren *Transforming growth factor β 1* und *stromal cell derived factor-1 α* auf den Ischämie-Schaden aufgezeigt werden. Hierfür wurden die Thrombozyten zuvor mittels *collagen-related peptide* zur Sekretion der α -Granula

angeregt. Durch die Sekretion der genannten Faktoren konnte die Ischämie bedingte Schädigung der Kardiomyozyten vermutlich über den Protein Kinase C Signalweg hinausgezögert werden. Interessanterweise konnte die kardio-protective Wirkung durch COX-Inhibition, jedoch nicht durch die thrombozytäre Vorbehandlung mit P2Y12-Antagonisten aufrecht erhalten werden (Walsh & Poole, 2017). Dass die sekretorische Wirkung der Thrombozyten einen protektiven Einfluss auf den kardialen I/R-Schaden hat, konnte auch durch Versuche von Yang et al. demonstriert werden. Positive Effekte konnten für Adenosin, Serotonin und Thromboxan A2 nachgewiesen werden (Yang et al., 1993). Hingegen weisen andere Forschungsergebnisse konträre Ergebnisse auf. Aktuelle Ergebnisse heben die schädigende Wirkung von Serotonin im Rahmen des kardialen I/R-Schadens hervor. Mauler et al. konnten zeigen, dass Serotonin die inflammatorische Reaktion im Myokard über Stimulierung der neutrophilen Granulozyten verstärkt (Mauler et al., 2019). Darüber hinaus wirkt Serotonin vasokonstriktorisch (Shimizu et al., 2002) und verstärkt die Leukotaxis (Sandler et al., 1975). Nicht nur durch die Sekretion von Serotonin erzielen die Thrombozyten schädigende Wirkungen im Rahmen des kardialen I/R-Schadens, sondern auch durch die Bereitstellung von ROS (Seligmann et al., 2013). Seligmann et al. (2013) konnten durch Versuche an isoliert perfundierten Meerschweinchen-Herzen demonstrieren, dass die Gabe von Thrombozyten im Rahmen der Ischämie und Reperfusion, zur Aggravation des I/R-Schadens über die Freigabe von ROS führt. Dabei deuten die Ergebnisse der Forschungsgruppe darauf hin, dass die ROS-Bereitstellung seitens der Thrombozyten über die eigene NADPH Oxidase erfolgt (Seligmann et al., 2013). Eine weitere besondere Funktion der aktivierten Thrombozyten wird über die Freisetzung von mikroRNAs erzielt. Die mikroRNAs haben eine regulatorische Wirkung auf das vaskuläre System (Walsh & Poole, 2018). Gidlöf et al. (2013) konnten zeigen, dass die thrombozytären mikroRNAs von Patienten mit Myokardinfarkt sich von denen der gesunden Patienten unterscheiden. Die Forschungsgruppe konnte zudem demonstrieren, dass die freigesetzten mikroRNAs, der aktivierten Thrombozyten, die Genexpression der endothelialen Zellen beeinflussen (Gidlöf et al., 2013). Hierbei ist jedoch auf die gegensätzlichen Wirkungen der verschiedenen mikroRNAs hinzuweisen. Untersuchungen zufolge konnte sowohl eine fördernde (Eulalio et al., 2012) als auch eine suppressive Wirkung (Ye et al., 2010) auf die Proliferation der Kardiomyozyten durch mikroRNAs gezeigt werden. Eine weitere gegensätzliche Wirkung im Rahmen des IR-Schadens wird durch die Freisetzung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) erzielt. Hierbei ist die Wirkung von PAF

konzentrationsabhängig. In höheren Konzentrationen treten die negativen Effekte von PAF in den Vordergrund. Hierzu zählen die negativ inotrope sowie die arrhythmogene Wirkung im myokardialen IR-Schaden. Im Gegensatz dazu wirken geringere Konzentrationen (pmol/L) von PAF, über Aktivierung des *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Signalwegs, kardio-protectiv (Penna et al., 2011). Neben dem PAF werden kardio-protectiven Signalwege im Rahmen des I/R-Schadens auch durch Sphingosin 1-Phosphat (S1P) aktiviert. S1P wird durch die thrombozytäre Sphingosine Kinase freigesetzt und aktiviert die Signalwege RISK und SAFE (*survivor activating factor enhancement*). Außerdem wirkt S1P über G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Thrombozyten sowohl antiaggregatorisch als auch proaggregatorisch (Davidson et al., 2019).

Jedoch sind im Rahmen des I/R-Schadens nicht nur die interzellulären Prozesse von Bedeutung, die durch die Thrombozyten und Leukozyten bedingt werden, sondern auch die, die durch die Erythrozyten beeinflusst werden. Die Erythrozyten sind von besonderer Wichtigkeit im Rahmen der Ischämie und Reperfusion. Zum Beispiel ist bekannt, dass unter Hypoxie die Erythrozyten in der Lage sind, über NO oder über die Freigabe von ATP eine Vasodilatation zu bewirken (Ellsworth et al., 1995, Webb et al., 2010). Weitere positive Eigenschaften der Erythrozyten konnten Yang et al. (1996) in einem I/R-Modell an isoliert perfundierten Rattenherzen demonstrieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten einen kardio-protectiven Effekt auf den myokardialen I/R-Schaden, durch die NO-Freisetzung, haben (Yang et al., 1996). Neben der NO-Bereitstellung sind die Erythrozyten auch in der Lage über die Freisetzung bioaktiver Moleküle und Mediatoren interzelluläre Prozesse sowie biochemische Vorgänge zu beeinflussen. Diese exokrine Funktion seitens der Erythrozyten wird unter dem Begriff der erythrokrinen Funktion zusammengefasst (Cortese-Krott & Kelm, 2014). Dabei konnte in den Erythrozyten eine endotheliale NO-Synthase (eNOS) nachgewiesen werden (Cortese-Krott et al., 2012). Neben der eNOS Funktion der Erythrozyten konnten Yang et al. (2013) in humanen Erythrozyten das Enzym Arginase 1 nachweisen. Hierbei konnte die regulativ wirkende Funktion der Arginase auf die NO-Bereitstellung über die eNOS demonstriert werden. Da sowohl die Arginase als auch die eNOS als Substrat L-Arginin brauchen, wird die NO-Herstellung, über die gesteigerte Konkurrenz, beeinflusst. Eine gesteigerte Arginase-Aktivierung führt unter anderem über die Entkopplung der eNOS zur Produktion von ROS und hierrüber zur Verstärkung der endothelialen Dysfunktion (Kim et al., 2009). Die Bedeutung der erythrozytären Arginase im Rahmen des kardialen I/R-Schadens konnte in einem *ex vivo* I/R-Modell an Rattenherzen verdeutlicht werden. Hierbei konnten Yang et al.

(2013) zeigen, dass die Inhibierung der erythrozytären Arginase einen kardio-protectiven Effekt, über die eNOS Beeinflussung, auf den myokardialen I/R-Schaden aufweist. Die Rattenherzen erreichten durch die Inhibierung der Arginase eine signifikante Verbesserung der postischämischen kardialen Funktion. Der positive Einfluss der Arginase Inhibition konnte durch zusätzliche Hemmung der eNOS nicht erzielt werden (Yang et al., 2013). Dies deutet auf die eNOS abhängige Komponente der kardio-protectiven Wirkung der Arginase Hemmung hin. Dass die Arginase-Funktion der Erythrozyten auch eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion hat, konnten Versuche von Zhou et al (2018) demonstrieren. Hierbei konnte zum einen gezeigt werden, dass Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 über eine gesteigerte Arginase Aktivierung sowohl zur Steigerung der endothelialen Arginase- Aktivität als auch der Arginase Expression führt (Zhou et al., 2018). Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass die gesteigerte Arginase-Funktion über die Entkopplung der erythrozytären eNOS die ROS-Produktion steigert. Außerdem konnte eine weitere ROS Produktion über die vermehrte NADPH-Oxidase Expression der Erythrozyten beobachtet werden (Zhou et al., 2018). Weitere wichtige Erkenntnisse über die Relevanz der erythrozytären Arginase bei Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) Patienten konnten Yang et al (2018) an einem I/R-Modell mit Rattenherzen erbringen. Der postischämisch ermittelte linksventrikulär entwickelte Druck konnte durch die Vorbehandlung gesenkt und der linksventrikuläre end-diastolische Druck sowie die Infarktgröße gesteigert werden (Yang et al., 2018). Über die Hemmung der erythrozytären Arginase konnte die postischämische myokardiale Funktion über die ROS Reduktion verbessert werden (Yang et al., 2018). Dies verdeutlicht, dass DMT2 einen wichtigen Einfluss auf die erythrozytäre Funktion aufweist und hierrüber das Outcome im Rahmen des I/R-Schadens beeinflussen kann.

Zudem werden die Erythrozyten im Rahmen der I/R durch die gesteigerte Inflammation und der ROS-Produktion beeinflusst. Dabei können Erythrozyten sowohl als Radikalfänger als auch als Radikal-Produzenten fungieren (Pernow et al., 2019). Der oxidative Stress kann die Erythrozyten-Plastizität und die rheologischen Eigenschaften nachhaltig beeinflussen. Die oxidativ veränderten Erythrozyten können dabei auch durch die pro-oxidative Wirkung modifizierend auf peripher gelegene endotheliale Zellen wirken (Minetti & Malorni, 2006). Alles in allem wird deutlich, dass die Erythrozyten eine regulative Wirkung auf das kardiovaskuläre System haben vor allem über die endotheliale Zell-Interaktion. Besonders stellen die eNOS und die Arginase hoffnungsvolle

Angriffspunkte für Medikamente dar, die vor allem im Rahmen des myokardialen I/R-Schadens Einsatz finden können.

Zusammenfassend haben die verschiedenen Blutzellkomponenten verschiedene Funktionen, die vor allem über die Zell-Zell Interaktion unterschiedliche Prozesse im myokardialen I/R-Schaden bedingen. Die genauere Erforschung der einzelnen Blutzellbestandteile ist von besonderem Interesse, da hierrüber verschiedene therapeutische Maßnahmen entwickelt werden können. Um die einzelnen Blutkomponenten isoliert voneinander betrachten und erforschen zu können eignet sich die Langendorff-Apparatur. Dies soll im Folgenden genauer erläutert werden.

1.4 Die Langendorff Methode

Die ersten Untersuchungen an isolierten Herzen wurden von Carl Ludwig und Elias Cyon im Institut für Physiologie an der Universität von Leipzig durchgeführt. Dabei erfolgten die Versuche an isolierten Froschherzen. Im Unterschied zu Säugetierherzen besitzen Froschherzen zwei Vorhöfe und nur einen Ventrikel. Da diese auch nicht über ein Koronarsystem verfügen, erfolgt der Austausch von Gasen und Metaboliten über Diffusion. Durch die Untersuchungen am isolierten Froschherzen konnten grundlegende Erkenntnisse über die kardiale Funktion gemacht werden. Unter anderem konnte der negativ chronotrope Effekt bedingt der vagalen Stimulation, der Einfluss von Calciumionen, Kaliumchlorid (Skrzypiec-Spring et al., 2007), Sauerstoff und der Temperatur auf die Kontraktilität des Herzens, das Alles-oder-nichts Prinzip am Herzen, die absolute Refraktärzeit und die Lokalisation der Automatiezentren am Atrium und Atrioventrikularknoten erforscht werden (Zimmer et al., 1998). Der weitere Schritt bezüglich der Untersuchungen am Herzen von Warmblütern erfolgte durch den Physiologen Newell Martin in der Zeitspanne von 1881 bis 1889. In dem Herz- Lungen Modell von Martin durchlief das Blut den Lungenkreislauf und wurde hierbei durch die beatmete Lunge oxygeniert (Döring, 1996). Dabei machte Martin die Untersuchungen an Hunde- und Katzenherzen und verwendete als Perfusat Blut von Kälbern. Das Blut von anderen Spezies jedoch zeigte sich im Versuchsablauf als ungeeignet und limitierte das Überleben des Herzens (Desk, Williams, & Health, 1986). Hierbei ist auf die Forschungsergebnisse von Sydney Ringer (Ringer, 1883, Ringer, 1882) hinzuweisen, die eine wichtige Rolle bei der Weiterentwicklung und Verbesserung des Perfusates spielten. Ringer leistete mit der Entwicklung einer geeigneten rein salinen Blutersatzflüssigkeit (Ringer, 1883) einen immensen Beitrag für die Volumentherapie sowie für die weiteren

Erforschungen am isoliert perfundierten Herzen. Auch konnte er an seinen Untersuchungen an isolierten perfundierten Herzen zeigen, dass Calciumionen für die Aufrechterhaltung des Herzschlages und somit auch für die Kontraktilität des Herzens einen wichtigen Stellenwert haben (Beloukas et al., 2013). Die Untersuchungen an isolierten Froschherzen und das Herz-Lungen Modell dienten schließlich als Grundlage für die Entwicklung des von Langendorff im Jahre 1895 entworfenen Modells an isoliert perfundierten Säugetierherzen. Dabei verwendete Langendorff das Prinzip der retrograden Perfusion. Bei diesem Verfahren wird die Aorta ascendens über eine Metallkanüle retrograd, also entgegen der physiologischen Flussrichtung, mit Blut oder kristalloider Lösung perfundiert. Durch den Perfusionsdruck schließt sich die Semilunarklappe der Aorta vollständig. Dadurch verläuft das Perfusat über die Koronarostien oberhalb des Aortenstumpfes in die Koronararterien und fließt über den Koronarsinus in den rechten Vorhof wieder ab (Langendorff, 1895). Da das Perfusat vom Herzen abfließt, ist es möglich das Effluat einzufangen und für weitere Messungen zu untersuchen. Über das gesammelte Effluat, welches vom isoliert schlagenden Herzen abtropft, ermittelte Langendorff den Koronarfluss. Durch einen Faden, der zwischen Herzspitze und Aufnahmegerät angebracht wurde, konnte die isometrische Kontraktion entlang der Längsachse ermittelt werden (Langendorff, 1895). Langendorff führte die Versuche unter konstanten Druckbedingungen durch und konnte unter anderem zeigen, dass die koronare Perfusion für die myokardiale Kontraktion ausreichend ist. Somit konnte er zeigen, dass die ventrikuläre Blutfüllung nicht notwendig ist, um den Herzschlag zu induzieren (Zimmer et al., 1998). Des Weiteren konnte Langendorff in den Versuchen demonstrieren, dass bei der richtigen Wahl der Temperatur und des Perfusionsdruckes das retrograd mit Blut perfundierte Herz über mehrere Stunden unverändert weiterschlägt unabhängig von der intraventrikulären Blutfüllung (Langendorff, 1895). Die Versuche konnten die Bedeutung der koronaren Perfusion für die Versorgung des Herzens mit Nährstoffen und Sauerstoff verdeutlichen. Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der Koronarzirkulation die mechanische Herzfunktion widerspiegeln (Beloukas et al., 2013). Weitere Untersuchungen von Langendorff konnten demonstrieren, dass zu hohe Temperaturen eine Tachykardie, zu niedrige Temperaturen eine Bradykardie verursachen und dass die Gabe von Kaliumchlorid zum Herzstillstand führen kann. Es zeigte sich außerdem, dass der negativ chronotrope Effekt durch Vagusstimulation bewirkt wird. Durch weitere toxikologische Untersuchungen konnte Langendorff sowohl den negativ chronotropen Effekt durch Injektion von Muscarin als auch den antagonistischen Effekt

des Atropins bestätigten. Zudem konnte Langendorff wichtige Erkenntnisse bezüglich der I/R-Schäden machen. Er stellte fest, dass die Blutsperre über die Koronararterien zur Abnahme des Herzpulses sowie zum Herzstillstand führt. Dies wiederum konnte er durch Wiedereröffnung des Blutflusses beseitigen. Neben den erwähnten Untersuchungen machte Langendorff noch Versuche mit elektrischer Stimulation bei denen er postextrasystolische Potentiale wie auch Flimmern am Herzen induzierte (Zimmer et al., 1998, Langendorff, 1895).

Die LD-Methode ist gekennzeichnet durch eine einfache Handhabung und ein hohes Maß an Flexibilität (Bell et al., 2011). Das Besondere an dem Langendorff-Modell ist die Möglichkeit der isolierten Betrachtung des Herzens. Da das schlagende Herz nicht von anderen Organen, neurohumoralen sowie systemischen Faktoren beeinflusst wird, lassen sich die externen Störfaktoren weitestgehend ausblenden. Somit ist es möglich einzig die intrinsischen Vorgänge des Herzens zu untersuchen (Hwang et al., 2017). Vor allem in der pharmakologischen- und toxikologischen Untersuchung eignet sich diese Methode zur Überprüfung von Medikamenten am schlagenden Herzen und Erstellung einer geeigneten Dosis-Wirkungskurve. Durch gezielte Anpassung und Überprüfung der einstellbaren Parameter, wie zum Beispiel des Perfusionsdruckes oder des koronaren Flusses ist es möglich, den direkten Einfluss der Medikamente oder der toxischen Substanzen ohne hämodynamische Beeinflussung zu ermitteln. Als Nachteil ist zu betonen, dass die Wirkung von Metaboliten und biotransformierten Endprodukten, die in anderen Organen entstehen, nicht dabei ermittelt werden kann. Die LD-Methode ist vor allem geeignet für die Untersuchung von akut toxischen Prozessen am isolierten Herzen (Anderson & Boor, 1990). Hierbei ist auch der Aspekt zu betonen, dass durch die LD-Methode die Versuchstiere nichts von der Intervention, welche am schlagenden Herzen stattfindet, mitbekommen. So lassen sich weitere Störfaktoren, wie zum Beispiel die Freisetzung stressinduzierter Faktoren beheben. Die Schaffung von anoxischen und hypoxischen Zuständen ist möglich. (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Zur Veranschaulichung der möglichen Messungen am LD-Herzen dient die Abbildung 2. Dabei stellen die Koronargefäße, das Ventrikelmyokard, das Erregungsbildungs- und Leitungssystem sowie das Effluat wichtige Untersuchungsbereiche im LD-Herzen dar. Dadurch kann unter anderem der Einfluss verschiedener Medikamente oder Therapiemaßnahmen auf die Kontraktilität, die Herzfrequenz, den koronaren Gefäßtonus und dem kardialen Stoffwechsel sowie der elektrischen Aktivität, untersucht werden. Dies ermöglicht unter anderem die Erforschung kardialer I/R-Schäden (Skrzypiec-Spring et al., 2007),

Transplantationsmaßnahmen (Fitton et al., 2004), Zelltherapeutische Methoden (Suzuki et al., 2000), hypoxischer Zustände (Ytrehus, 2000) und Arrhythmien (Curtis, 1998).

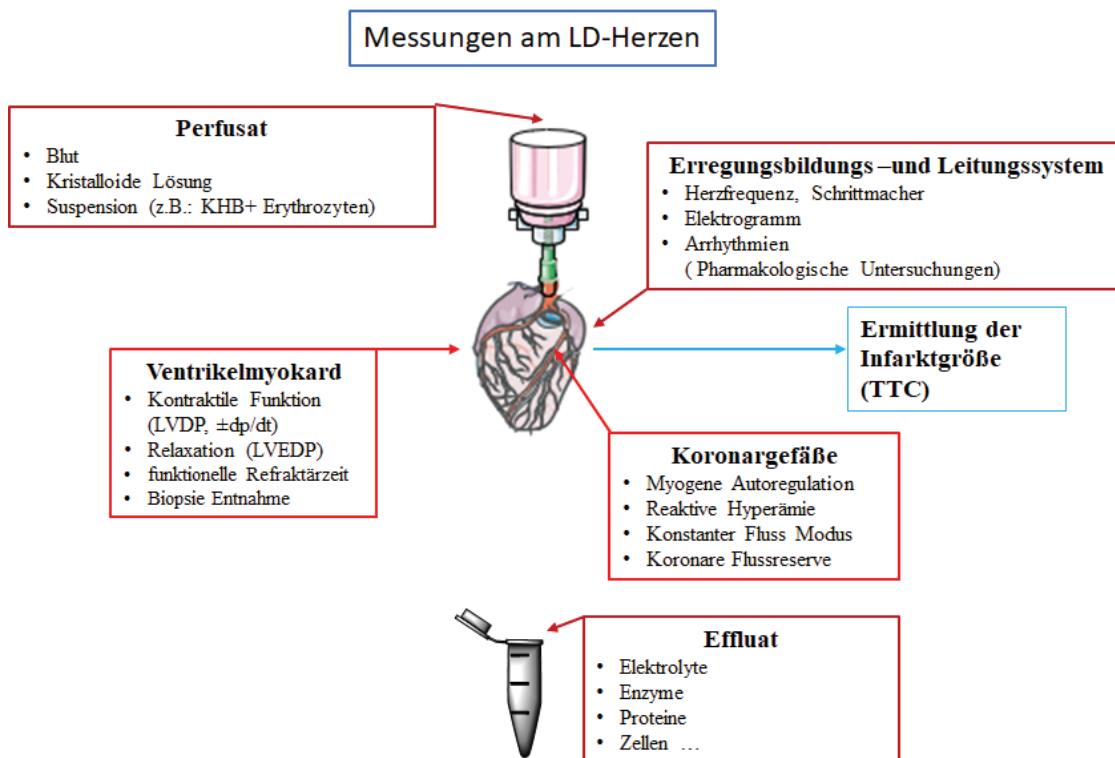


Abbildung 2: Mögliche Messungen an Langendorff-Herzen

Die Abbildung veranschaulicht die möglichen Messungen am isoliert perfundierten Herzen. Verschiedene funktionelle Parameter des Ventrikulomyokards können gemessen werden, wie zum Beispiel der linksventrikulär enddiastolische Druck (LVEDP), der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP), die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit ($+dp/dt$, $-dp/dt$) und die funktionelle Refraktärzeit. Zudem ist es möglich, beispielsweise für morphologische Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten Probebiopsien des Myokards zu entnehmen. Mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) ist es möglich, die Infarktgröße zu bestimmen. Die Perfusion kann mittels kristalloider Lösung, wie zum Beispiel dem Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) sowie mit Blut oder einer Suspension aus Erythrozyten und KHB erfolgen. Elektrokardiogramme eignen sich zur Untersuchung des Erregungsbildungs- und Leitungssystems. Das Langendorff-Herz kann mit einem externen Schrittmacher auf die erwünschte Herzfrequenz eingestellt werden. Die Wirkungen von anti- und proarrhythmischen Mitteln können bestimmt werden. Das Effluat ermöglicht es verschiedene Elektrolyte, Proteine oder Zellen zu untersuchen. Zuletzt ist es mit der Langendorff-Apparatur auch möglich Aussagen über die Koronargefäße zu treffen. Abbildung adaptiert von der servier PowerPoint image bank. Quelle: eigenes Design.

Während der Herzentnahme werden die Tiere narkotisiert und in einen unbewussten Zustand versetzt. Dies kann entweder mittels volatiler Hypnotika oder intravenös sowie intraperitonealer Injektion von Narkotika erfolgen. Hierbei ist zu betonen, dass die

intraperitoneale Injektion von Barbituraten wegen der zeitlich begrenzten suppressiven Wirkung auf die Herzfunktion bevorzugt wird (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Die Versuchstiere sollten in einer stressfreien Umgebung gehalten werden, um die Freisetzung von Katecholaminen und systemisch wirksamen Faktoren gering zu halten. Es ist zu beachten, dass das weibliche Geschlecht der Versuchstiere als Störfaktor aufgrund zyklusabhängiger Wirkungen der weiblichen Sexualhormone gilt (Lateef et al., 2015). Zusätzlich zur Narkose antikoagulieren viele Arbeitsgruppen vor der Präparation des Herzes mit Heparin, um der Thromboseentstehung in den Koronargefäßen oder in den Herzhöhlen, entgegenzuwirken (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Die Herzpräparation nach Langendorff wurde bereits mit verschiedenen Tieren durchgeführt. Heutzutage werden aufgrund der geringeren Kosten und der Möglichkeit der genetischen Manipulation viele Versuche an Mäusen durchgeführt (Sutherland et al., 2003). Die Perfusion der isolierten LD-Herzen kann sowohl unter konstantem Druck als auch unter konstantem Fluss erfolgen. Die verschiedenen Perfusionsverhältnisse können für verschiedene Fragestellungen eingesetzt werden. Dabei eignet sich der flusskonstante Modus für Versuche, bei denen eine geringere Sauerstoffzufuhr benötigt wird oder eine limitierte Menge an Perfusionslösung zur Verfügung steht. Zu den messbaren Parametern beim flusskonstanten System zählt der Perfusionsdruck, der über einen Druckumwandler gemessen wird. Beim flusskonstanten Modus sollte die Pumpgeschwindigkeit möglichst kontrolliert verändert und nicht zu hoch eingestellt werden, da dies unter anderem zu Druckschwankungen führen und dadurch den Herzzyklus beeinflussen kann (Olejnickova, Novakova, & Provaznik, 2015, Hwang et al., 2017). Darüber hinaus ist zu betonen, dass beim konstanten Fluss die myogene Autoregulation der Koronargefäße aufgehoben ist (Sutherland & Hearse, 2000). Im Falle von ischämischen Vorgängen kann dies die Reaktion der Gefäße beeinflussen. Daher stellt die druckkonstante Methode die geeignetere Variante zur Erforschung von ischämischen Prozessen oder zur Durchführung von Versuchen mit geringerer Perfusionslösung dar. Bei dem druckkonstanten Modus gehört die Flussrate zu den messbaren Parametern. Auch bei der Einstellung des Perfusionsdrucks sollten keine hohen Drücke gewählt werden, da dies zu Insuffizienzen an der Aortenklappe führen kann. Heutzutage ist es möglich von einem Modus in den anderen zu wechseln. Dies wird unter anderem bei Isolierungsvorgängen von Kardiomyozyten und auch zur Erforschung der vaskulären Funktion genutzt (Sutherland & Hearse, 2000, Olejnickova et al., 2015). Außerdem ist die konstante Perfusion und Kontraktion auch bei Herzfrequenzen möglich, die mittels Schrittmacherstimulation eingestellt werden (Ertl et

al.2000). Der externe Schrittmacher findet in verschiedenen LD-Versuchsprotokollen Anwendung, um vergleichbare Herzfrequenzen zu schaffen. Hierbei ist auf die Tatsache hinzuweisen, dass der Sinusknoten durch extrakardiale Gefäße versorgt wird, die durch die Präparation entfernt werden (Sutherland & Hearse, 2000). Dadurch entwickeln die LD-Herzen eine niedrigere Frequenz als *in vivo*. Die Ventrikelstimulation durch externe Elektroden ermöglicht es, die Bradykardie bedingten Arrhythmien am LD-Herzen gering zu halten (Bell et al., 2011).

Zu den bevorzugten Perfusaten zählt der Krebs-Henseleit Puffer (KHB). Hierbei handelt es sich um eine kristalloide Lösung, welche Ähnlichkeiten mit der Ionen Zusammensetzung des Blutplasmas aufweist. Der KHB entwickelt bei anhaltender Begasung mit fünf Prozent Kohlenstoffdioxid (CO₂) einen pH-Wert von 7,4 bei einer Temperatur von 37°C (Bailey & Ong, 1978). Bei der Zusammensetzung ist zu beachten, dass durch das Fehlen von Proteinen der onkotische Druck niedriger ist als der physiologische Druck. Folglich führt sowohl der erniedrigte onkotische Druck (Salisbury et al., 1961) als auch die niedrige Viskosität (Mouren et al., 2010) zur Entstehung von interstitiellen Ödemen, die schließlich die Kontraktilität des Herzens beeinflussen können. Aufgrund der fehlenden Proteine im KHB variieren die Konzentrationen von Ionen wie Calcium und Kalium, die im Blut zum Teil an Proteinen gebunden vorliegen (M. Skrzypiec-Spring et al, 2007). Je nachdem welche Parameter untersucht werden, sollte die KHB-Zusammensetzung modifiziert werden. Zusätzlich besitzt KHB einen niedrigen Sauerstoffgehalt (caO₂) und einen erhöhten Sauerstoffpartialdruck (paO₂) (Mouren et al., 2010). Der erhöhte paO₂ führt zur koronaren Vasokonstriktion und der geringe Sauerstoffgehalt bedingt eine höhere koronare Flussrate (CFR) (Mouren et al., 1997). Die koronare Flussreserve ist aus diesem Grund bei KHB perfundierten Herzen reduziert (Mouren et al., 2010). Schließlich kann die erhöhte Flussrate die Freigabe vasoaktiver Substanzen triggern (Koller et al., 1993). Diese Effekte führen zur gegensätzlichen Beeinflussung der koronaren Durchblutung. All die genannten Limitierungen lassen sich durch den Gebrauch von roten Blutzellen (RBCs) verbessern. Mit der Zugabe von RBCs ist es möglich, die CFR den physiologischen *in vivo* Verhältnissen von 2-3ml/min anzupassen (Sutherland & Hearse, 2000). Darüber hinaus entstehen durch RBC-KHB-Perfusion weniger Ödeme am isolierten Herzen. Wichtig zu betonen ist auch, dass die Druckentwicklung über eine längere Zeit unverändert bleibt als mit einer reinen KHB-Perfusion (Sutherland & Hearse, 2000). Jedoch ist die Herstellung der RBC-KHB Suspension komplexer und zeitaufwändiger als die der KHB Zubereitung. Aufgrund verschiedener Probleme wurde die Präparation von Blut perfundierten Herzen

mehrmals modifiziert. Die ersten Versuchsdurchführungen an isoliert perfundierten Herzen, die mit Blut perfundiert wurden, erfolgten im Jahre 1970 durch Gamble et al. (Gamble et al., 1970). Gamble et al. (1970) führten die Versuche an isoliert perfundierten Rattenherzen durch. Das Blut einer anderen Spenderratte gelangte über eine Kanüle der linken Arteria carotis in die Aorta des isoliert perfundierten Herzen und floss über den Koronarsinus und die Pulmonalvene des isolierten Herzens zurück zur kanülierten rechten Vena jugularis der Spenderratte (Gamble et al., 1970). Diese Methode schaffte eine Alternative zu den vorherigen Versuchen an Hundeherzen (Grier et al., 1966) und zeigte, dass auch Untersuchungen an kleineren Versuchstieren vergleichbare Ergebnisse erzielen können (Gamble et al., 1970). Schließlich unterlag die Versuchsdurchführung verschiedenen Modifizierungen. Qui et al. verbesserten die Methode an Rattenherzen. Dabei wurde die Arteria- und Vena femoralis der Spenderratte kanüliert. Das arterielle Blut wurde in einem konstanten Flussmodus in das LD-Herz befördert. Schließlich gelangte das Blut nach Perfusion des isolierten Herzens zurück über ein Filtersystem zur Vena femoralis der Spenderratte (Qiu et al., 1993). Anhand des Modells konnten die LD-Herzen über eine längere Zeitdauer perfundiert werden und entwickelten bessere Druckwerte als unter Verwendung einer kristalloiden Lösung. Die Herzen zeigten auch physiologische Flussraten (Sutherland & Hearse, 2000). Jedoch ist zu betonen, dass zur Versuchsdurchführung ein Spendertier derselben Spezies benötigt wird. Dies kann jedoch zusätzlich als Störfaktor fungieren. Zum einen kann die humorale Immunantwort des Spendertieres aktiviert werden und durch die Freisetzung von verschiedenen immunologischen Faktoren das isoliert perfundierte Herz negativ beeinflussen. Zum anderen können die Substanzen, die extern zugeführt werden, beim Spendertier systemisch wirken oder in ihrer Wirkung durch Metabolisierung verändert werden (Sutherland & Hearse, 2000). Pasini et al. konnten bei ihren Untersuchungen zeigen, dass der Endorphingehalt im Blut der Spendertiere durch Perfusion der isolierten Herzen anstieg (Pasini et al., 1999). Neben den Nachteilen seitens der wechselseitigen Beeinflussung von Spendertier und LD-Herz kann das Spenderblut im extrakorporalen Kreislauf hämolytischen Veränderungen unterliegen. Aufgrund der genannten Nachteile der immunologischen Reaktion, den höheren Kosten und der zeitaufwendigen Präparation beim LD-System mit Vollblut stellt die Perfusion mittels Erythrozyten Suspension eine vielversprechende Alternative dar. Dabei wird das Blut in verschiedenen Zentrifugationsschritten von Thrombozyten, Leukozyten und Plasmaproteinen gereinigt, bis schließlich die Erythrozyten bestehen bleiben. Dieser Vorgang ist wichtig, um die

immunologischen Prozesse am LD-Herzen zu reduzieren. Die gewonnenen Erythrozyten werden schließlich mit einer kristalloiden Lösung gemischt und mittels Oxygenator mit Sauerstoff begast. Durch Zugabe von Albumin wird der onkotische Druck eingestellt. Zusätzlich erhöht Dextran die Osmolarität und wirkt antithrombotisch (Sutherland & Hearse, 2000). Jedoch kommt es auch während der Perfusion mit Erythrozyten Suspensionen zur Hämolyse. Um die entstehende Hämolyse so gering wie möglich zu halten sollten die Präparation und Herstellung der Erythrozyten Suspension nicht mit Glas, sondern nur mit Plastik erfolgen. Darüber hinaus können auch bei dieser Form der Perfusion immunologische Reaktionen verstärkt werden. Dies ist der Fall, wenn Erythrozyten verschiedener Spezies zur Perfusion des Versuchsherzes eingesetzt werden. Aufgrund der Menge an benötigten Erythrozyten müssen größere Versuchstiere wie zum Beispiel Rinder verwendet werden (Bell et al., 2011). Dies führt zur Limitierung der möglichen Versuchsdurchführungen mit genetisch veränderten Mäusen, die in der heutigen Forschung einen wichtigen Stellenwert haben. Die aufgeführten Probleme der Hämolyse und der nötigen Volumenmenge zur Perfusion, konnten durch die neue Methode von Yang et al (2013) gelöst werden (Yang et al., 2013, Yang et al., 2018). Dabei wurden murines Vollblut und RBC-Plasma Suspension kurz vor Einleitung der Globalischämie über den Seitenarm der LD-Apparatur in das Koronarsystem der LD-Herzen eingebracht. Die darauffolgende Perfusion erfolgte mittels KHB. Jedoch wurde diese Methode bisher nicht zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Blutbestandteile im I/R-Schaden charakterisiert. Durch die genauere Charakterisierung und Etablierung dieser vielversprechenden Methode, könnten kostengünstige Versuche mit verschiedenen Blutbestandteilen und einer geringeren Menge (ca. 1ml) zum Beispiel auch von genetisch veränderten Mauslinien durchgeführt werden. Diese Dissertation basiert auf der Herangehensweise von Yang et al. und soll in der vorliegenden Dissertation im Einzelnen charakterisiert, etabliert und verfeinert werden.

1.5 Ziele dieser Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und Etablierung eines *ex vivo* Transfermodells an der LD-Apparatur, zur Untersuchung der Interaktion von Blutzellen, Blutbestandteilen und Herzzellen im kardialen I/R-Schaden. Durch Charakterisierung eines *ex vivo* Bio-Assays, sollten Transferexperimente mit verschiedenen zellulären Blutbestandteilen an murinen Herzen durchgeführt werden. Dabei sollte der Einfluss von unterschiedlichen Blutkomponenten auf den kardialen I/R-Schaden beschrieben und erforscht werden. Der Transfer sollte zeigen, dass sowohl murines als auch humanes Blut und dessen Bestandteile mit der etablierten Methode untersucht werden können. Die Untersuchungen wurden an murinen Herzen durchgeführt, die nach Einbringen in die LD-Apparatur retrograd mit Vollblut oder Blutbestandteilen perfundiert wurden. Die Etablierung des LD-basierten *ex vivo* Transfermodells soll als weiterführendes Ziel dazu dienen, den Einfluss verschiedener Blutbestandteile gesunder Spender, sowie verschiedener Patientenkollektive oder genetisch veränderter Mauslinien auf den I/R Schaden zu untersuchen und hierrüber gezielte pharmakologische Behandlungsansätze zu erforschen. Schließlich soll das entwickelte *ex vivo* Assay eine Alternative zu den *in vivo* Modellen darstellen, um das Leiden von Versuchstieren zu reduzieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien und Medikamente

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Medikamente

Chemikalien	Hersteller
2- Propanol	VWR Chemicals BDH (USA)
2- Propanol 70%	Otto Fischer GmbH & Co. KG
2- Propanol 96%	Otto Fischer GmbH & Co. KG
2,3,5- Triphenyltetrazolium chlorid ($C_{19}H_{15}ClN_4$)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Calciumchloride dihydrate ($CaCl_2$)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Carbogen Lab (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde AG, Pullach, Deutschland
D- (+)-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
DetectX® Hemoglobin Colorimetric Detection Kit	Arbor Assays (Ann Arbor, MI, USA)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
EMSURE ACS, ISO, Reag. Ph Eur Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Eosin G – Lösung 0,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Deutschland)
Ethanol 70% (V/V) Denatured Eurodenaturant	VWL Chemicals BDH (USA)
Formaldehydlösung 4%, Roti®-Histofix 4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium Injektionslösung	Rotexmedica GmbH (Trittau, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCL)	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Mayers Häkalaun – Lösung	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	VWL Chemicals BDH (USA)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Sodium Pyruvat ($C_3H_3NaO_3$)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Vitro-Clud	R. Langenbrinck GmbH, (Emmendingen, Deutschland)
Xylene	VWL Chemicals BDH (USA)

2.1.2 Verbrauchs- und sonstige Materialien

Tabelle 2: Verbrauchs- und sonstige Materialien

Material	Hersteller
3-Wege-Hahn (Discofix C)	B Braun Melsungen AG (Hessen, Deutschland)
Aortenkanüle	Hugo Sachs Elektronik (March, Deutschland)
BD Vacutainer Safety-Lok 21 G	Becton, Dickinson and Company (New Jersey, USA)
Deckgläser für Mikroskopie 24*60 mm	Engelbrecht, Medizin und Labortechnik GmbH (Edermünde, Deutschland)
Einmal- Feindosierungsspritze mit integrierter Kanüle (Omnican F)	B Braun Melsungen AG (Hessen, Deutschland)
Faden Seraflex 5/0	SERAG Wiessner GmbH & Co.KG, Naila, Deutschland
Membran Filter 0,45µm	Millipore (Irland)
Mikrotom Klingen Typ A 22	FEATHER (Japan)
Objektträger ca.76mm*26mm*1mm	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH (Edermünde, Deutschland)
Objektträger, Menzel- Gläser	Thermo Scientific (USA)
Perfusor	Infors AG Basel (Schweiz)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools (FST) GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5 und 2ml)	Eppendorf AG (Deutschland)
Rotilabo-Einmal-Wägeschalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spritzen (2ml, 5ml, 8ml, 10ml)	Braun Injekt, B Braun Melsungen AG (Hessen, Deutschland)

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Versuchsgeräte

Material	Hersteller
Blutgasanalysator (ABL800 FLEX)	Radiometer Copenhagen, (Dänemark)
Coaxial stimulation electrode mini (73-0181)	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, Deutschland)
Digitale Farbkamera (Leica DFC 425 C)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Farbkamera für die TTC- Aufnahmen, Model HV- C20AMP	Hitachi Kokusai Electric Inc. (Tokyo, Japan)
Feinwaage	Sartorius Lab Instruments GmbH Co. KG (Göttingen, Deutschland)
Immersion Thermostat Lauda E100	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

Inverses Mikroskop (Leica DMIL)	Leica (Etzlar, Deutschland)
ISOTEC Pressure Transducer	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland)
Langendorff- Apparatur (isolated heart, size 1)	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, Deutschland)
Magnetrührer und -Schüttler (IKAMAG RET)	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Manometer	Bosch + Sohn, Jungingen, Deutschland
Mikroskop (SM Z645)	Nikon (Tokio, Japan)
Mikrotom (Jung Biocut 2035)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Multi-mode microplate reader FLUOstar Omega	BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Deutschland)
Pipetten (10ml, 100µl, 1000µl)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage (L2200P)	Sartorius Lab Instruments GmbH Co.KG (Göttingen, Deutschland)
Schrittmacher (HSE Stimulator P)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland)
Stereomikroskop (MZ 6)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Transonic Flow Probe (MC1PRB-HSE for HSE-TTFM)	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Umlaufkühler (UK 12/600)	Behr Labor-Technik, Düsseldorf, Deutschland
Wasserbad für histologische Schnitte	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Zentrifuge (5417R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (MIKRO 200R)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.1.4 Software

Tabelle 4: Verwendete Software

Software	Verwendung	Hersteller
Diskus-Mikroskopische Diskussion	Zur planimetrischen Auswertung histologischer Schnitte	Hilgers Technisches Büro, Königswinter, (Deutschland)
GraphPad Prism® version 6.01	Life Science Software zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten und Erstellung von Graphen	Graph Pad Software, Inc. (San Diego, USA)
Mendeley	Literaturverwaltungsprogramm	Elsevier, Amsterdam, Niederlande
Microsoft Office 2010	Abbildungen, Datendokumentation, Dissertationsschrift	Microsoft Corp., (Redmond, Washington USA)
Omega Software Version 3.00 R2	Darstellung der Ermittelten Hämoglobin Konzentrationen	BMG LABTECH (Ortenberg, Deutschland)
IOX 2.4.5.6	Aufzeichnung der Parameter, die über die Sensoren an der Langendorff-Apparatur ermittelt wurden	Emka Technologies (Paris, Frankreich)

2.1.5 Versuchstiere

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um männliche C57BL/6 Wildtypmäuse im Alter zwischen 9-15 Wochen mit einem mittleren Körpergewicht von $26\text{g} \pm 5\text{g}$. Die Mäuse wurden von Janvier Labs (Saint-Berthevin, Frankreich) erworben. Den Versuchsmäusen standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Mäuse wurden vom kommerziellen Züchter Janvier bezogen und bis zum Eintritt in den Versuch in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf gemäß den nationalen und internationalen Tierschutz-Richtlinien und Standards gehalten. Die Organisationsnummer zur Tiertötung der ZETT lautet: O51/16.

2.1.6 Tierbedarf

Die Gruppengröße wurde mit der Statistik Software G*Power bestimmt. Dabei errechnet sich bei einer Infarktgröße von 50% in der Kontrollgruppe und 25% in der Versuchsgruppe mit den jeweiligen Standardabweichungen von 0,15 und 0,11 eine Effektgröße von 1,8. Der Tierbedarf pro Versuchsgruppe beträgt bei einem Signifikanzniveau von 0,05 und einer Power von 80 ca. 5 Mäuse.

2.2 Der Langendorff-Versuch

2.2.1 Der Aufbau der Langendorff-Apparatur

In Abbildung 3 ist die Langendorff-Apparatur dargestellt, womit die Versuche gemacht wurden. Dabei sind die wichtigen Bauteile beschriftet und werden im Folgenden mit der jeweiligen Funktion beschrieben.

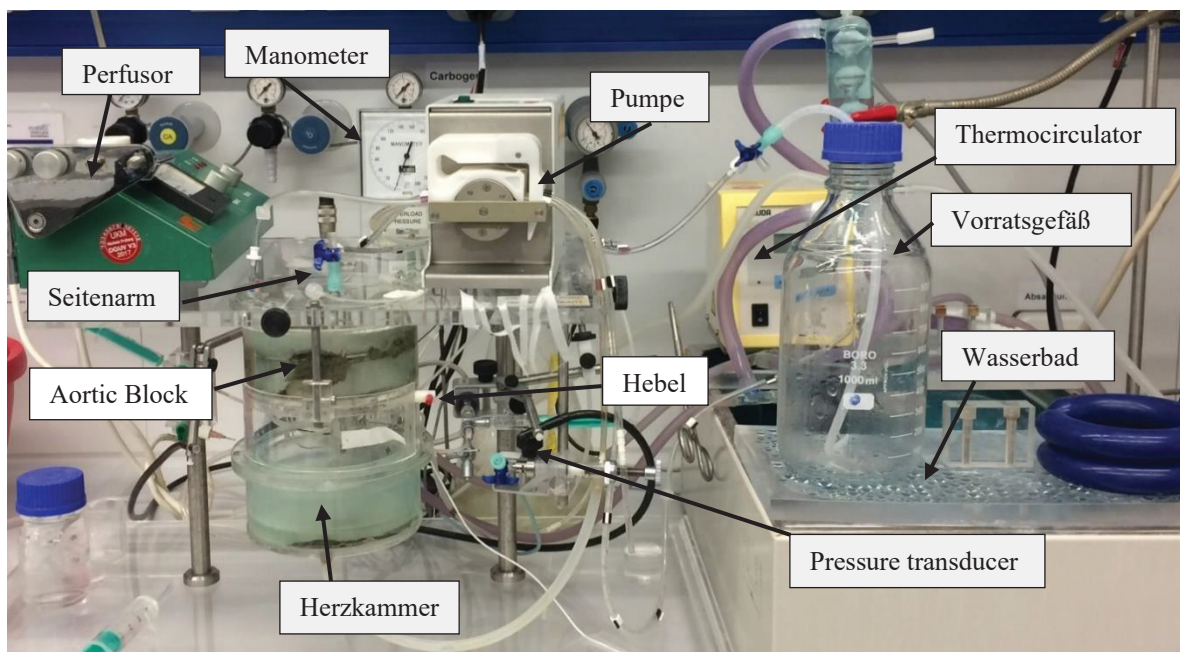


Abbildung 3: Langendorff-Apparatur im kardiologischen Labor der Heinrich-Heine-Universität.

Die Abbildung zeigt die Langendorff Apparatur (*Hugo Sachs Elektronik, March Deutschland*) mit Beschriftung der einzelnen Bestandteile. Das Perfusat wird über die Pumpe durch das isoliert perfundierte Herz, welches in die Herzkammer eingebracht wird, gepumpt. Über den Seitenarm erfolgt das Einbringen von Blut und Blutkomponenten.

Die LD-Apparatur besteht aus einem System, bei dem das eingebrachte Herz über eine Perfusionskanüle mit einer oxygenierten Flüssigkeit oder Blut perfundiert wird. Das mit KHB gefüllte Vorratsgefäß befindet sich in einem Wasserbad, welches mit einem Thermostat (*Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland*) auf eine Temperatur von 38,6°C erwärmt wird. KHB wird dabei mit Carbogen, bestehend aus 95% O₂ und 5% CO₂, über eine Fritte begast und mittels Rollpumpe, unter konstanten Fluss- oder Druckbedingungen, zum Herzen geleitet. Dabei lässt sich der Druck manuell mit einer drehbaren Druckpumpe auf den erwünschten Wert einstellen. Über den Seitenarm erfolgt die Gabe von Blut oder Blutbestandteilen. Dabei können die Substanzen mit einer Spritze in den Perfusor eingespannt und über den Medikamentenschlauch und die Compliance Kammer zum Herzen geführt werden. Durch den direkten Zufluss oberhalb des Herzes werden Verunreinigungen im System vermieden. Das Versuchsherz wird mit einer Kanüle unterhalb der Compliance Kammer eingebracht. Dabei dient die Compliance- Kammer, welche vor jedem Versuch mit KHB gefüllt wird, als Luftblasenfalle. Die Messung des maximal aufgebauten linksventrikulären Druckes sowie des diastolischen Druckes und der Druckänderung pro Zeiteinheit erfolgt mit einem Wasser gefüllten Ballon, welcher in den linken Ventrikel eingeführt wird und mit einem Druckaufnehmer in Verbindung steht. Aus

den gemessenen Druckwerten wird durch ein Computersystem die Ableitung der Kontraktions-sowie Relaxationsgeschwindigkeit ($\pm dp/dt$) in mmHg/s und die Herzfrequenz ermittelt. Abbildung 4 zeigt die mittels der Dokumentations- Software (IOX, Emka Technologies, Paris, Frankreich) digital aufgezeichneten physiologischen Parameter an.

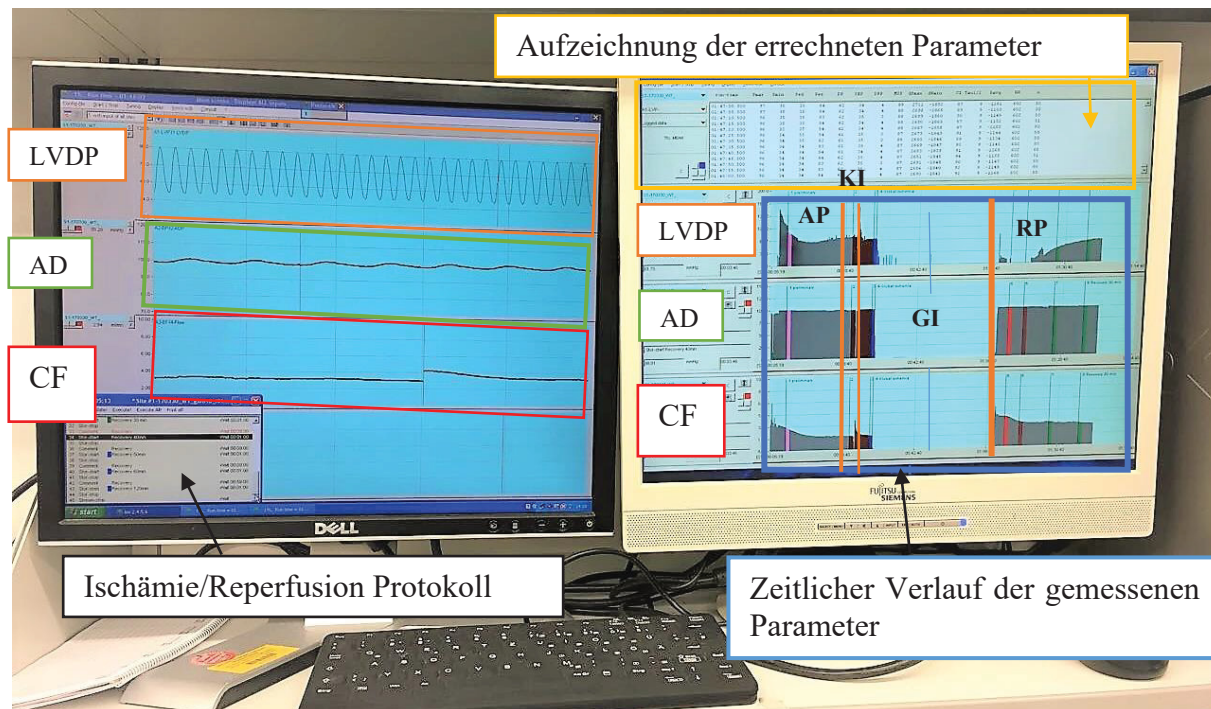


Abbildung 4: Dokumentation der physiologischen Parameter mit der IOX-Software (Emka Technologies).

Mit der Software wurde der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP), der manuell eingestellte Aortendruck (AD) und der koronare Fluss (CF) aufgezeichnet. Dabei sieht man auf dem linken Desktop die Echtzeit- Aufnahmen der genannten Parameter. Auf dem rechten Desktop wurde der zeitliche Verlauf über das gesamte Protokoll hin aufgezeichnet. Hierbei wurden die verschiedenen Phasenverläufe der Äquilibrationsphase (AP), Kurzischämie (KI), Globalischämie (GI), und der anschließende Reperusionsphase (RP) eingezeichnet. Im gelb umrandeten Messbereich wurde der LVDP und die über den LVDP abgeleitete Geschwindigkeit der Kontraktion ($+dp/dt$), Geschwindigkeit der Relaxation ($-dp/dt$) sowie die Herzfrequenz (HF) und der linksventrikulär enddiastolische Druck (LVEDP) in fünf Sekunden Takt aufgezeichnet. Das Ischämie/ Reperusions- Protokoll zeigt an, wann die jeweilige Phase anfängt oder eingeleitet werden soll.

Das eingebrachte Herz wird von einer aus Plexiglas bestehenden Herzkammer umgeben, welche das Herz vor Abkühlung schützt. Darüber hinaus erlaubt der Aufbau der Herzkammer, das vom Herzen tropfende Effluat mit einer Petrischale aufzufangen. Das Herzstück der LD-Apparatur ist der Aortenblock, welcher in Abbildung 5 schematisch dargestellt wurde. Der Aortenblock besteht aus der Basiseinheit, welche mit der drehbaren Druckpumpe und dem Manometer in Verbindung steht und für eine druckkonstante Perfusion sorgt. Unter der Basiseinheit befindet sich die Flow probe, womit der

Perfusionsfluss, durch Ultraschall- Laufzeitmessung, zum Herzen registriert wird. Die Flow probe steht mit einem Durchflussmessgerät (*Plugsys, Typ 603, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland*) in Verbindung worüber der koronare Fluss angezeigt wird. Mittels Absperrhahn wird jeweils die Ischämie oder Reperfusion eingeleitet. Die Herzfrequenz wird durch Elektrostimulation über einen externen Schrittmacher (*Hugo Sachs Elektronik*), welcher an der Compliance-Kammer befestigt wird, eingestellt.

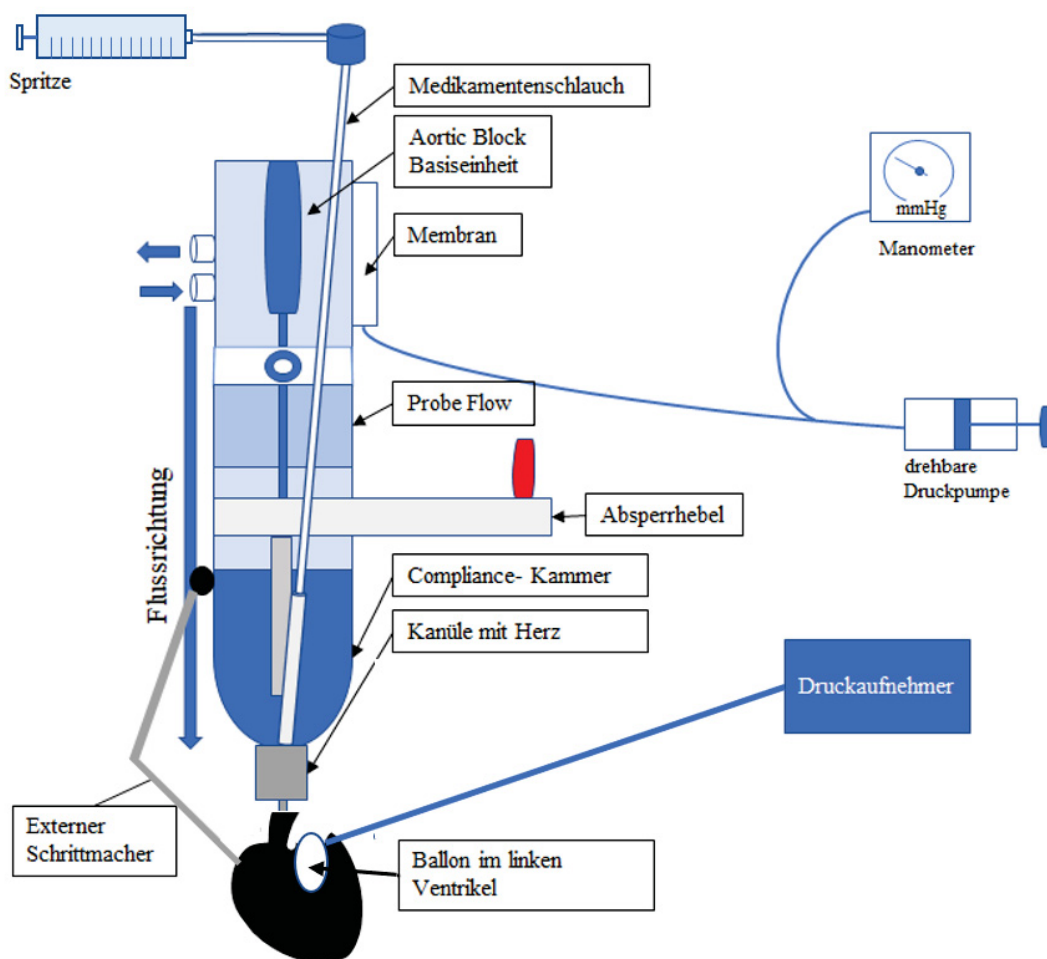


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aortenblocks.

Der Aortenblock besteht aus der Basiseinheit, der Probe Flow, der Compliance Kammer und dem Absperrhahn. Für eine druckkonstante Perfusion dient das System bestehend aus Manometer, drehbarer Druckpumpe und der Teflonmembran. Die Teflonmembran dient hierbei für die Aufrechterhaltung des Flusswiderstandes. Durch die Compliance-Kammer werden kleine Luftblasen aufgefangen. Die Applikation von Blut oder Blutbestandteile erfolgt durch den Medikamentenschlauch über die Compliance-Kammer und der Aortenkanüle in die Koronargefäße des Herzes. Die blauen Pfeile zeigen jeweils die Flussrichtung des KHBs an. Über den Absperrhahn wird die Ischämie- und Reperfusionsphase kontrolliert. Überflüssiger KHB verlässt den Aortenblock über den Überlaufschlauch zurück ins Vorratsgefäß. Der linksventrikuläre Druck wird mit einem Wasser

gefüllten Ballon, welcher in den linken Ventrikel eingebracht und mit einem Druckaufnehmer verbunden wird, gemessen. Quelle: eigenes Design mit Power Point.

2.2.2 Präparation der isolierten Mäuseherzen

Zu Beginn der Präparationsdurchführung werden die Mäuse mittels finaler Narkose, bestehend aus 49,94mg/kg KG Ketamin (Pfizer Pharma) und 40,04mg/kg KG Xylazin (Bayer), in einen Zustand tiefer Bewusstlosigkeit gebracht. Die Narkose erfolgt intraperitoneal. Nachdem die Versuchsmaus auf keinen Schmerzreiz reagiert folgt die intraperitoneale Gabe von 1000 IE (Internationale Einheit) Heparin, um die Bildung von intrakoronaren Thromben oder koronare Thromboembolien zu minimieren. Erst nach negativem Schmerztest kann mit dem weiteren Eingriff begonnen werden. Bevor die narkotisierte Maus in den Präparationstisch geklemmt wird, erfolgt zunächst die Rasur des Thoraxbereiches. Zur Präparation des Herzens erfolgt zunächst ein waagerechter Schnitt unterhalb des Sternums in das Bauchgewebe und zwei axial ausgerichtete Entlastungsschnitte. Dabei wird das Brustbein nach oben geklappt und mit einer Pinzette nach dem Gefäßstrang gegriffen. Nach der Durchtrennung der Aorta und Vena cava inferior wird das Herz-Lungen-Paket nach oben gezogen und von dorsal her abgeschnitten. Anschließend wird das Herz mit den beiden Lungenflügeln, Trachea, Ösophagus und Thymus in die mit KHB gefüllte, auf 4° C gekühlte Präparationsschale hinzugegeben. Unter einem Mikroskop folgte die Feinpräparation des Herzens, wobei zunächst die Lungenflügel, der Ösophagus und der Thymus entfernt werden. Anschließend wird das präparierte Herz in die mit kaltem Perfusat gefüllte Kanülenschale gelegt. Nach der Durchtrennung der Aorta ascendens distal des Truncus brachiocephalicus wird die Aorta in Richtung der Kanüle ausgerichtet und mit einer im 45° Winkel gebogenen Pinzetten in die Kanüle gezogen. Falls die Pulmonalarterie noch nicht weit genug wegpräpariert wurde, lässt sie sich aus der Sicht mittels einer Mikroschere aufschneiden, um während des Versuchs den Abfluss des KHB aus dem rechten Ventrikel zu gewährleisten. Schließlich wird die Aorta mit einem Seidenfaden an die Kanüle befestigt und zusätzlich mit einem einfachen Knoten fixiert. Anschließend wird die Kanüle mit dem daran aufgezogenen Herzen in den Langendorff Perfusor eingebracht. Die Präparierzeit vom Schnitt bis zum Anschluss des isolierten Herzens über die Aortenkanüle an die LD-Apparatur sollte dabei unter 7 min liegen.

2.2.3 Der allgemeine Versuchsablauf

Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurde der zuvor hergestellte und für max. 48h haltbare KHB, in ein Vorratsgefäß (1Liter) gefüllt und in das auf 38,5°C eingestellte Wasserbad für 15min mit Carbogen begast. Nachdem das Perfusat auf die erwünschte Temperatur erwärmt wurde folgte die Dokumentation des Versuchsbogens. Dabei wurde der Versuchsname, Datum, der Nullfluss, Gewicht und Genotyp der Versuchsm Maus und Informationen über die verwendeten Blutbestandteile notiert. Die Perfusion erfolgte bei Druck-konstanten Bedingungen, wobei der Aortendruck vor dem Einbringen des Herzes manuell auf 100mmHg eingestellt wurde. Nachdem das präparierte murine Herz mittels der Aortenkanüle (*Hugo Sachs Elektronik, March Deutschland*) in die LD-Apparatur eingebracht wurde, folgte das Einbringen des Ballons (*Eigenbau*) in den linken Ventrikeln über die Mitralklappe. Über den Ballon, welcher mit einem Druckwandler verbunden ist, wurde der linksventrikuläre Druck (LVDP=*left ventricular developed pressure*) registriert und mittels Computersoftware (*iox 2.4.5.6/ emka Technologies, Paris, Frankreich*) aufgezeichnet. Desweiteren wurde der Ballon mit Wasser gefüllt und dadurch der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP=*left ventricular enddiastolic pressure*) manuell zwischen 3-15mmHg eingestellt. Die mittels Drucksensor ermittelten physiologischen Parameter wurden dabei zur Dokumentation am Monitor angezeigt. Zu den aufgezeichneten Parametern gehören neben den LVDP die abgeleitete Geschwindigkeit der Kontraktion (+ dp/dt) und der Relaxation (-dp/dt), sowie die Herzfrequenz (HF). Dabei wurde die Herzfrequenz mit einem externen Schrittmacher (*Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland*) auf 600 Schläge pro Minute (600 bpm= beats per minute) bei 2,5V eingestellt. Kurz nach Beginn der Perfusion des Herzes mit KHB begann das Herz zu schlagen und die ersten Messdaten zum LVEDP, LVDP, +/- dp/dt, HF, koronaren Fluss (CF=*coronary flow*) wurden ermittelt und anschließend folgte die 20-minütige Äquilibrationsphase. Auf die Äquilibrationsphase folgte nach erneuter Dokumentation der Messparameter die 20-sekündige Kurzischämie zur Überprüfung der koronaren Flussreserve. Falls der LVEDP vor der Kurzischämie höher war als 15mmHg oder niedriger als 3mmHg war, bestand die Möglichkeit dies manuell wieder in den erwünschten Bereich einzustellen und dabei erneut einige Minuten auf die Stabilisierung zu warten. Für die Kurzischämie wurde der Hebel umgedreht und dadurch der Fluss zum Herzen unterbrochen. Bei der Reperfusion wurde auf den koronaren Flussanstieg geachtet, welcher mindestens 60% des Anfangswertes betragen sollte. Nachdem der erwünschte Flussanstieg registriert wurde, folgte eine 5-minütige Erholungsphase (*Recovery*). Sobald

die gemessenen Parameter nach der Recoveryphase einen stabilen Verlauf zeigten wurden die Baseline-Werte notiert. Während dieser Zeit wurde das Blut oder die zu untersuchenden zellulären und flüssigen Blutbestandteile in eine Spritze aufgezogen, in den Perfusor eingespannt und für den Ladevorgang vorbereitet. Nachdem die Pumpe ausgeschaltet wurde, erfolgte über eine Zeitdauer von einer Minute der Ladevorgang von 400µl Blut oder Blutbestandteilen in das Koronarsystem des Herzens. Anschließend folgte die 40-minütigen Globalischämie. Dabei wurde der Aortendruck auf 0 gestellt und das Herz von unten mit einem warmen KHB (38,6°C) gefüllten Becherglas umschlossen. Nach der Globalischämie wurde erneut die Pumpe angeschaltet, das Becherglas entfernt, der Aortendruck hochgestellt und der Hebel, der den KHB Fluss reguliert, zur Re-Perfusion Richtung Herz gedreht. Ab dem Zeitpunkt begann die Recoveryphase, bei der das Herz für 120min mit KHB perfundiert wurde. Während dieser Zeit wurde der externe Schrittmacher auf dem rechten Vorhof platziert und auf 6V eingestellt. Während dieser Phase wurde der Zeitpunkt notiert, bei dem messbare Kontraktionen ermittelt werden konnten und das Herz mit einer Frequenz von 600bpm schlug. Das Software-Programm zeigte jeweils die Zeitpunkte an, bei denen die Protokollierung der Messparameter folgte. Die Werte wurden jeweils zur Minute 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 120 notiert. In Abbildung 6 wurde der Versuchsablauf mit den jeweiligen Dokumentationspunkten (als blaue Pfeile dargestellt) als Zeitstrahl veranschaulicht. Dabei betrug die Dauer eines Versuches vom Einbringen des Herzens in die Apparatur bis zur letzten Dokumentation in der 120-minütigen Recoveryphase ca. drei Stunden und 10min. Dies war abhängig von der Stabilisierungsphase des Herzens, welche vor dem eigentlichen Ladevorgang einige Minuten zusätzlich in Anspruch nehmen konnte. Nach Beendigung der Recoveryphase wurde der Hebel umgedreht und somit der Fluss unterbrochen. Daraufhin wurde das Herz entfernt und in eine zuvor tarierte Schale gelegt und anschließend gewogen. Der ermittelte Wert wurde notiert und das Herz für die TTC Färbung in eine Frischhaltefolie verpackt und für mindestens eine Stunde ins Gefrierfach bei ca. -20° C gelegt.

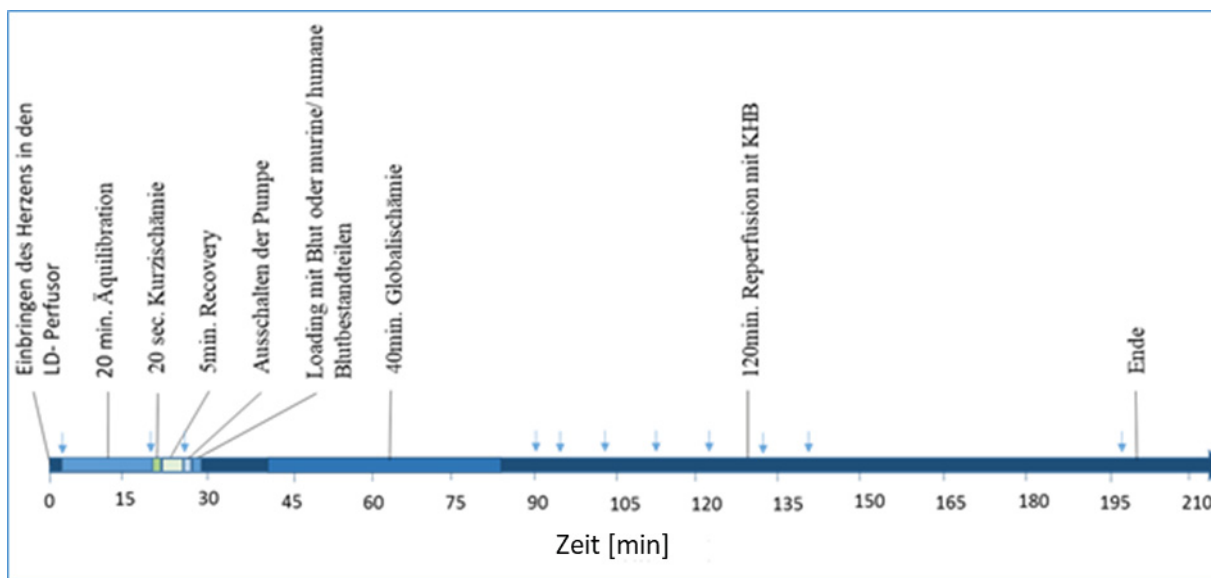


Abbildung 6: Ablauf des Ischämie-Reperfusionsversuchs an der Langendorff-Apparatur.

Der Zeitstrahl zeigt den Verlauf des Versuchs zu jeder Minute an, wobei die blauen Pfeile die Zeitpunkte anzeigen, bei denen die Messparameter dokumentiert wurden.

2.2.4 Ausschlusskriterien für die Versuche an der Langendorff-Apparatur

Für die Auswahl der murinen Versuchsherzen, die an der LD-Apparatur angebracht wurden, galten bestimmte Kriterien, die für den Versuchseinschluss von allen Herzen erfüllt werden mussten. Diese Kriterien betreffen die Dauer der Präparierzeit, die Höhe des koronaren Flusses, die Dauer der Arrhythmie und die Höhe des linksventrikulär entwickelten Druckes. Die Präparierzeit vom Entfernen des Herzens bis zum Einbringen in die LD-Apparatur mit sofortiger Perfusion sollte nicht länger als 10min dauern. In den durchgeführten Versuchen lag die Präparierzeit zwischen vier und sechs Minuten. Da eine Lange Präparierzeit unter anderem zur ungewollten Präkonditionierung führen kann oder zur myokardialen Schädigung durch die Verlängerte Ischämie, sollte dies möglichst kurz gehalten werden (Awan et al., 1999, Minhaz et al., 1995). Ein weiteres Kriterium ist die Höhe des koronaren Flusses nach der eingeleiteten Kurzischämie. Dies sollte nicht unter 1ml/min oder höher als 4ml/min betragen. Ein höherer Fluss könnte unter anderem auf eine aortale Schädigung oder auch auf einen unvollständigen Verschluss der Aorta hindeuten. Der geringe Fluss hingegen kann durch eine Embolie oder einen Verschluss der Ostien bedingt sein. In beiden Fällen wäre der koronare Fluss nicht physiologisch und somit nicht repräsentativ. Der linksventrikulär entwickelte Druck sollte nach der Kurzischämie über 50mmHg betragen und steigende Tendenzen im Verlauf anzeigen. Schließlich sollte das Herz sowohl während der Stabilisierungsphase als auch nach der Kurzischämie keine

Arrhythmien anzeigen, die Länger als drei Minuten anhalten und die kontraktile Funktion stark beeinflussen.

2.2.5 Die Perfusionslösung

Für die Perfusion der isolierten Mäuseherzen wurde der modifizierte KHB verwendet. Die Zusammensetzung des modifizierten KHB bestand aus 118mM NaCl, 4,7mM KCl, 0,8mM MgSO₄, 25mM NaHCO₃, 1,2mM KH₂PO₄, 5mM Glukose, 110mM Na-Pyruvat und 2,5mM CaCl₂. Tabelle 5 zeigt neben der Stoffmengenkonzentration auch die abzuwiegende Mengenangabe in Gramm an, die für die Herstellung einer zwei und vier Liter Lösung nötig ist. Um einen pH-Wert von 7,4 einzustellen wurde die hergestellte Lösung für 15min mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) begast. Erst nach der Begasung wurde Calciumchlorid hinzugegeben, um Calciumpräzipitationen zu verhindern. Anschließend erfolgte die Filtration der Lösung mit einem 0,45µm Vakuum Filter System, um restliche Staubpartikel und somit die Entstehung einer Fremdkörperembolie zu verhindern. Schließlich wurde die Perfusatlösung bei 4°C im Kühlschrank für maximal zwei Tage gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Langendorff- Perfusats

Chemikalien	2 Liter	4 Liter	Konzentration	Firma
Natriumchlorid (NaCl)	13,8g	27,6g	118mM	KMF
Kaliumchlorid (KCl)	0,7g	1,4g	4,7mM	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,4g	0,8g	0,8mM	Sigma
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	4,18g	8,36g	25mM	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,32g	0,64g	1,2mM	Merck
Glukose	1,8g	3,6g	5,0mM	Sigma
Na-Pyruvat	0,44g	0,88g	110,0mM	Pyruvic Acid Sigma
Lösung 15 Minuten mit Carbogen begasen				
Calciumchlorid (CaCl ₂)	0,79g	1,48g	2,5mM	Sigma

2.2.6 Bestimmung des Infarktareals mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

Die Herzen wurden nach der 120-minütigen Recoveryphase in Frischhaltefolie verpackt und für mindestens eine Stunde bei -24°C gelagert. Die eingefrorenen Herzen wurden mittels einer Rasierklinge vom Apex beginnend in 1mm dicke transversale Scheiben geschnitten. Jede Scheibe wurde gewogen und einzeln in ein 1,5ml braunen Reaktionsgefäß mit einer 1%igen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Lösung für mindestens zwei Minuten bei 38°C inkubiert. Die Färbung mittels TTC dient zur

Charakterisierung des Infarktareals. TTC ist ein Redox-Farbstoff, welcher die Zellmembran durchquert und an intrazelluläre Dehydrogenasen bindet, wodurch es in rotes 1,3,5-Triphenylformazan umgewandelt wird. Da vitale Zellen im Gegensatz zu infarziertem Gewebe sowohl über eine intakte Zellmembran als auch über funktionelle Enzyme verfügen erscheinen diese rot. Infarzierte Areale dagegen werden nicht gefärbt und bleiben weiß. Dies ermöglicht es vitales, metabolisch aktives Myokard von nekrotischem Gewebe zu unterscheiden.

2.2.7 Die Herstellung der TTC-Lösung

Zur Herstellung von 10ml einer 1%igen TTC-Lösung zum Färben von drei Mäuseherzen wurde 100mg TTC abgewogen. Dies wurde mit 10ml Puffergemisch verrührt bis sich das TTC aufgelöst hat. Dann wurden jeweils 0,5ml in braune 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Da die angefertigte TTC-Lösung lichtempfindlich ist, wurde die Lösung jeden Tag frisch hergestellt und bis zur Verwendung im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.8 Die Herstellung des TTC- Puffers

Für die Herstellung der TTC- Pufferlösung wurden zwei Pufferlösungen bestehend aus 0,1M Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und 0,1M Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) verwendet. Dabei wurde für die erste basische Pufferlösung 14,2g Na_2HPO_4 in 1l Millipore und für die zweite saure Pufferlösung 6g NaH_2PO_4 in 0,5l Millipore aufgelöst. Anschließend wurde 8ml von dem ersten Puffer mit 2ml von dem zweiten Puffer gemischt und der pH-Wert mit einem pH-Meter gemessen. Falls der pH-Wert nicht 7,4 betrug, wurde der entsprechende Wert durch Titrieren der beiden Lösungen eingestellt.

2.2.9 Planimetrische Messung der Infarktgröße

Die planimetrische Bestimmung der Infarktgröße erfolgte mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Diskus view (*Diskus software, Hilgers Technisches Büro, Königswinter, Deutschland*). Dabei wurden die zuvor in TTC bei 38°C inkubierten Herzscheiben auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Anschließend wurde von jedem Schnitt mittels einer live Kamera (*Hitachi HV-C20AMP*) digitalisierte Bilder in voller Auflösung gemacht. Die ausgemessenen Herzabschnitte wurden in eine vorgedruckte Tabelle eingetragen. Hierbei wurde zunächst die gesamte Herzfläche und der rechte Ventrikel mit einheitlichen Farben eingezeichnet und die

jeweiligen Infarktareale, die sich als farblose Flächen darstellen, umrandet. Abbildung 7 zeigt eine mittels Diskus vollständig ausgemessene Herzscheibe. Die eingezeichnete Fläche wurde in Quadratmillimeter (mm^2) angegeben. Um den prozentualen Anteil des Infarktes am gewichteten linken und rechten Ventrikel zu ermitteln wurden die Flächen des rechten Ventrikels (RV), linke Ventrikels (LV), der Gesamtfläche, die Infarktflächen im RV und LV sowie die Gewichte der einzelnen Herzscheiben bestimmt.

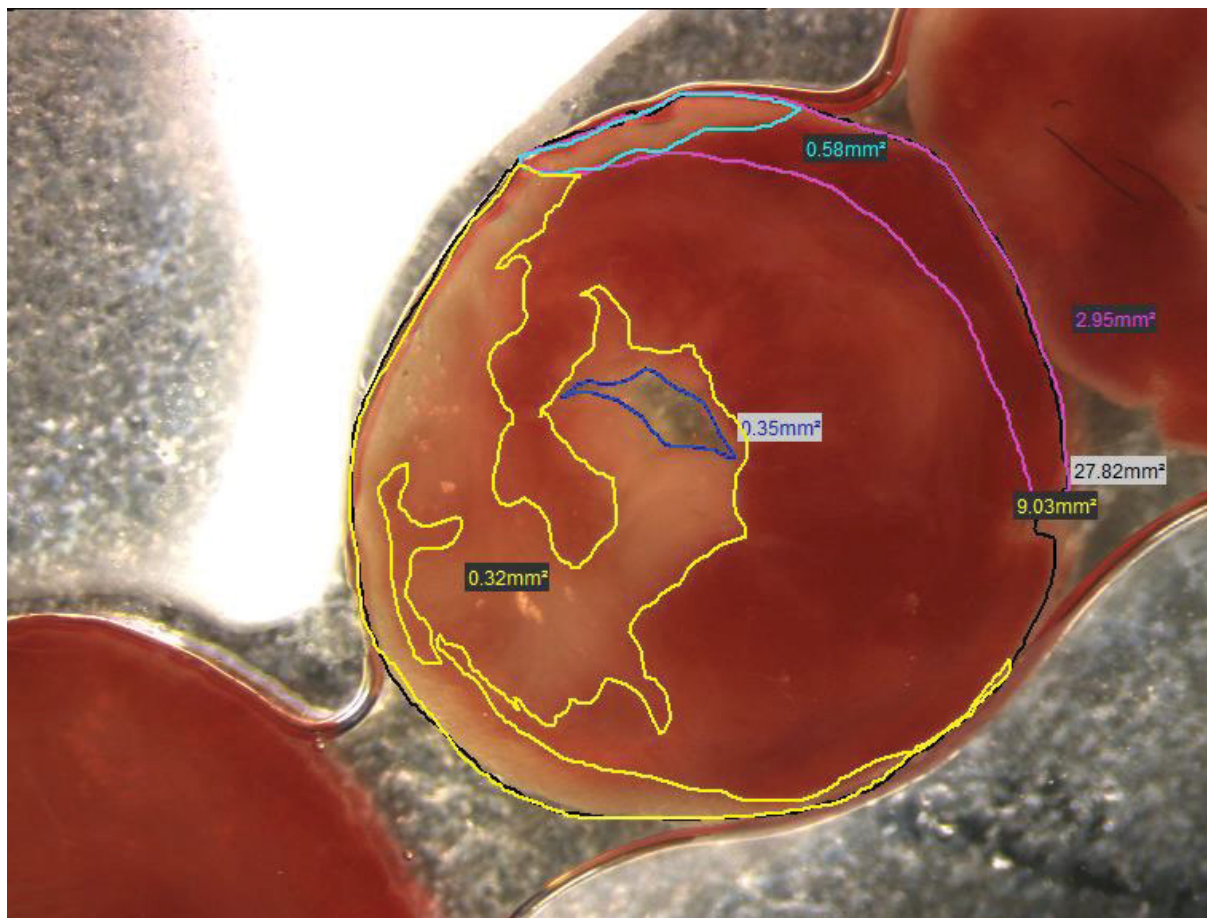


Abbildung 7: Planimetrische Ermittlung der Infarktgröße mittels Diskus view.

Dargestellt ist ein Schnitt eines Mäuseherzens, welches vor der 40-minütigen Globalischämie mit murinen Erythrozyten beladen und nach einer darauffolgenden 120-minütigen Reperfusionsphase mittels TTC gefärbt wurde. Mithilfe des Programmes Diskus view wurden die Infarktgrößen, der zuvor digital fotografierten Herzschnitte, planimetrisch in (mm^2) ermittelt. Hierbei erfolgte die Einzeichnung der linksventrikulären Infarktfläche mit gelb und die Infarktfläche des rechten Ventrikels mit türkis. Der rechte Ventrikel wurde lila und die Gesamtfläche des Herzschnittes mit schwarz umrandet.

2.3 Die venöse Blutabnahme

Das für die Etablierung des Transfer- Modells an der Langendorff Apparatur notwendige humane Blut wurde nach Erhalt des Ethikvotums durch die Ethikkommission der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer 5903R, Registrierungs-ID: 2017034183) mittels venöser Blutentnahme, nach entsprechender Aufklärung, von gesunden Probanden entnommen. Bei den Probanden handelte es sich um junge Studierende der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die sich mit ihrer schriftlichen Einwilligung nach einer ausführlichen Aufklärung durch eine Prüfarztin bereit erklärt haben, 6-8ml Blut zu spenden. Dabei erfüllten die gesunden Probanden folgende Kriterien:

Einschlusskriterien

- männliche und weibliche Probanden ohne Lungen-, Herz/Kreislauf- und Stoffwechsel-Erkrankungen in der Vorgeschichte.
- Alter zwischen 18 und 40 Jahre.
- Keine regelmäßige Medikamenteneinnahme (außer Anti-Baby- Pille).
- Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie.

Ausschlusskriterien

- Alter < 18 Jahre oder > 40 Jahre.
- Lungen-, Herz/ Kreislauf- und Stoffwechsel- Erkrankungen in der Vorgeschichte.
- Regelmäßige Einnahme von Medikamenten für Herz, Lunge und Stoffwechsel.
- Fehlende Einwilligung zur Studienteilnahme.
- Fehlende Bereitschaft und Fähigkeit an der Studie teilzunehmen.

2.4 Die murine Blutentnahme durch Herzpunktion

Für die Versuche wurde jeweils murines Vollblut, Erythrozyten, Plasma und plättchenreiches Plasma verwendet. Daher wurde ca. zehn bis 15min vor Versuchsbeginn mit der Herzpunktion einer final narkotisierten und antikoagulierten (1000 IE Heparin) Versuchsm Maus begonnen. Nebenbei wurden für die Punktion notwendige Feindosierungsspritzen mit integrierter Kanüle (0,01-1ml) mit Heparin beschichtet. Die narkotisierte Maus wurde in Rückenlage fixiert. Die Kanüle wurde in der Medianlinie subxiphoidal unter leichter Aspiration eingeführt. Dabei wurde das But langsam entnommen, damit das Herz nicht kollabiert und dadurch die weitere Blutentnahme erschwert. Pro Versuchsm Maus konnten dabei 0,7-1ml Blut entnommen werden. Nach der Punktion erfolgte zusätzlich noch die zervikale Dislokation durch Fixation des Okziputs mit einer Einmalspritze und gleichzeitig ruckartiger Zug des Mäuseschwanzes nach caudal oben.

2.5 Die Aufarbeitung der verschiedenen Blutbestandteile

Für die Bereitstellung der jeweiligen Blutbestandteile sind jeweils verschiedene Zentrifugationsschritte und Lagerungsmaßnahmen notwendig, die im Folgenden für die murinen und humanen Blutbestandteile beschrieben werden.

Das murine Vollblut, welches durch eine Herzpunktion von einer final narkotisierten und heparinisierten Versuchsm Maus entnommen wurde, wurde bei 38°C für 30min in einem Thermomixer erwärmt. Nach den 30min wurde das Vollblut in eine Spritze (2ml) aufgezogen und anschließend in den Perfusor eingespannt.

Um murines Plasma zu gewinnen wurde das murine Vollblut zunächst für 10min bei einer Temperatur von 4°C mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 830g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden die Blutbestandteile je nach Gewicht in drei Kompartimente unterteilt. Dabei bildeten die Erythrozyten die untere Schicht und wurden durch den Buffy-Coat, einer dünnen Schicht bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, von dem darüberliegenden Plasma getrennt. Das Plasma wurde mittels einer Pipette ohne Mitnahme des Buffy-Coats abpipettiert und anschließend in ein 1,5ml Reaktionsgefäß im Verhältnis sechs zu vier mit KHB (450µl Plasma: 300µl KHB) gegeben und invertiert. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin für 30min bei 38°C erwärmt.

Für die Separation muriner Erythrozyten erfolgte die Zentrifugation wie für die Gewinnung von Plasma auch mit 830g für 10min bei 4°C. Dabei wurde jedoch sowohl das Plasma als auch der Buffy-Coat abpipettiert. Anschließend wurde den Erythrozyten KHB hinzugegeben und das Reaktionsgefäß invertiert, bis sich eine homogene Verfärbung einstellt. Daraufhin wurde nochmal bei denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und noch ein Waschvorgang mit KHB durchgeführt. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Erythrozyten abpipettiert und in ein mit KHB vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt. Um jeweils ein Hämatokrit von 40% zu erhalten wurde jeweils 60% KHB mit 40% Erythrozyten langsam gemischt und für 30min bei 38°C erwärmt.

Um murines plättchenreiches Plasma zu erhalten folgen andere Aufarbeitungsschritte als für die anderen Blutbestandteile. Das antikoagulierte murine Vollblut wurde in ein Reaktionsgefäß bei 209g für 10min bei einer Temperatur von 18°C zentrifugiert. Das mPRP bildete nach der Zentrifugation die oberste Schicht. Dies wurde vorsichtig abpipettiert und in ein anderes Reaktionsgefäß, welches mit KHB gefüllt wurde, hinzugegeben. Dabei wurde 60% (360µl) mPRP mit 40% (240µl) KHB langsam vermischt und anschließend bei Raumtemperatur (22°C) für 30min gelagert. Die humanen

Erythrozyten werden, wie zuvor auch für murine Erythrozyten beschrieben, in denselben Schritten bereitgestellt. Der erste Zentrifugationsschritt diente dabei der Separation der Erythrozyten von den restlichen Blutbestandteilen und die nächsten zwei Schritte jeweils dem Waschen der Erythrozyten mit KHB. Je nachdem welcher Hämatokrit-Wert (20%, 30%, 40% und 50%) eingestellt wurde, erfolgte die entsprechende prozentuale Zugabe von KHB. Das humane Plasma wurde durch einmaliges Zentrifugieren mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 830g für 10min bei 4°C von den zellulären Blutbestandteilen getrennt. Anschließend wurde das Plasma, welches die obere Schicht darstellte, abpipettiert und mit KHB im Verhältnis sechs zu vier in ein Reaktionsgefäß überführt und invertiert. Die anschließende Inkubationszeit bei 38°C betrug 30min.

2.6 Anfertigung der Paraffinblöcke

Für die histologische Färbung wurden vier murine Herzen, die in den folgenden Phasen von der Langendorff Apparatur entfernt wurden:

1. Vor dem Ladevorgang mit RBCs
2. Nach dem einminütigen Ladevorgang mit RBCs
3. Nach der 40-minütigen Globalischämie
4. Nach der 60-minütigen Recoveryphase mit KHB

in wässriger Formalinlösung mit vier prozentigem Formaldehydgehalt (*Roti-Histofix*) fixiert. Die in Fixierungsmittel eingelegten Herzen wurden dabei für 24h im Kühlschrank gelagert. Daraufhin folgte der Schritt der Entwässerung um die Gewebeproben anschließend in Paraffin legen zu können. Hierbei wurden die Proben zunächst mittels Wasser ausgewaschen und dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die in Kassetten aufbewahrten Proben wurden schließlich mit heißem Paraffin infiltriert. Bei der Einbettung wurden die Herzen mit dem Apex nach unten zeigend ausgerichtet. Nach der Einbettung in Paraffin wurden die Proben im Kühlschrank gelagert. Bei der Anfertigung der Paraffinschnitte am Mikrotom (*Leica, Wetzlar, Deutschland*) wurden die Kassetten jeweils in derselben Ausrichtung in die Objektkammer eingesetzt. Noch vor dem Schneiden wurde der Klingenfrehwinkel optimal eingestellt und anschließend wurde mit einer größeren Schnittdicke (30µm) geschnitten, bis die Probe mit dem Apex führend sichtbar wurde. Dann folgte die Umstellung auf die erwünschte Schnittdicke, welche 5-7µm betrug. Die Schnitte wurden vorsichtig auf die Wasseroberfläche eines auf 37°C eingestellten Wasserbads aufgelegt. Die aufschwimmenden, gestreckten Schnitte wurden mit einem

Objektträger (*Menzel- Gläser*) aufgefangen. Die aufgezogenen Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am Folgetag für die histologische Färbung verwendet.

2.7 Hämatoxylin- Eosin Färbung

Die getrockneten Objektträger wurden für die Hämatoxylin- Eosin (HE) Färbung zunächst zweimal für jeweils 15min in Xylol für die Entparaffinierung eingelegt. Daraufhin wurden die Schnitte durch die absteigende Alkoholreihe mittels Isopropanol, wie in Tabelle 6 aufgeführt, in ein wässriges Milieu überführt. Anschließend folgte die Färbung mittels Hämatoxilin für eine Minute. Vor der weitem Färbung mit Eosin für 30sek wurden die Schnitte für 15min unter fließenden Wasser gewaschen. Dann folgte die Entwässerung in absteigender Alkoholreihe und die Fixierung mit Xylol. Schließlich wurden die Schnitte mit Vitro Clud eingedeckt und mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt. Die Angefertigten histologischen Präparate wurden im Abzug über die Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Am Folgetag konnten die Schnitte unter einem Mikroskop untersucht und mittels einer digitalen Farbkamera (*Leica DFC 425C*) aufgenommen werden.

Tabelle 6: Protokoll für die Anfertigung der histologischen Hämatoxylin- Eosin Färbung

Protokoll für HE- Färbungen	
Entparaffinierung	2x15min. Xylol
Absteigende Alkoholreihe	2x 5min 100% Isopropanol 1x 5min 96% Isopropanol 1x 5min 70% Isopropanol 1x 5min destilliertes Wasser
Hämatoxilin	1min
Waschschritt	15min unter fließenden Wasser waschen
Eosin	30sek
Entwässerung	Kurz unter fließenden Wasser abspülen
Fixierung	2x 15min Xylol
Eindeckung	Vitro Clud
Lagerung	Raumtemperatur

2.8 Die Blutgasanalyse

Die Blutgasanalysen wurden mit dem Blutgasanalysator (*Radiometer, ABL800 FLEX*) ermittelt. Dabei erfolgte die Analyse bei Versuchen, die mit humanen Erythrozyten gemacht wurden. Für folgende Proben erfolgte die Blutgasanalyse (BGA):

1. Perfusat aus dem Vorratsgefäß.

2. Effluat nach 20-minütiger Äquilibration.
3. Erythrozyten und KHB Gemisch vor dem Loading.
4. Effluat nach dem Loading.
5. Effluat nach der 40-minütigen Globalischämie

Zu Beginn wurde mit einer Spritze (1ml) ca. 0,5ml Perfusat aus dem auf 38,6°C erwärmten und mit Carbogen begasten Vorratsgefäß aufgezogen. Die BGA erfolgte noch vor dem Einbringen des Herzens in die Langendorff-Apparatur. Nachdem das Herz präpariert und mittels Kanüle in die Apparatur eingebracht wurde erfolgte die 20-minütige Äquilibration. Nach dieser Stabilisierungsphase erfolgte das Auffangen des Effluates mit einem Reaktionsgefäß. Dies wurde sofort mit einer Spritze aufgezogen, mittels Stopfen luftdicht verschlossen und zum Blutgasanalysator gebracht. Kurz vor dem Ladevorgang wurde von dem Gemisch aus humanen Erythrozyten und KHB ungefähr 0,3-0,4ml aufgezogen. Der Hämatokrit wurde auf 40% eingestellt, wobei 600µl humane Erythrozyten mit 900µl KHB vermischt wurde. Dies wurde wie bei der Aufarbeitung humaner Erythrozyten beschrieben auch für 30min bei 38°C gelagert. Als nächstes wurde die Pumpe ausgeschaltet und der Perfusor auf 0,4mm/min eingestellt. Sobald die Koronargefäße vollständig mit den Erythrozyten durchblutet wurden, erfolgte das Auffangen des Effluates. Hierfür wurden sechs Tropfen mit einem Reaktionsgefäß aufgefangen und erneut sofort mit einer Spritze aufgezogen. Daraufhin folgte die BGA für die Punkte 3 und 4. Nach der 40-minütigen Globalischämie und mit dem Einschalten der Pumpe wurden die ersten sechs Tropfen aufgefangen. Bei dem Auffangen des Effluates wurde darauf geachtet, dass es zu keiner weiteren Verdünnung mit KHB kam. Daher wurde jeweils dieselbe Anzahl an Tropfen aufgefangen, um die Effluate miteinander vergleichen zu können. Durch die BGA wurden unter anderem folgende Werte ermittelt: pH-Wert, Kohlenstoffdioxid- ($p\text{CO}_2$) und Sauerstoffpartialdruck ($p\text{aO}_2$), Elektrolyte (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-), Sauerstoffsättigung ($s\text{O}_2$), Lactat und Glukose. Durch die BGA konnte der Sauerstoffgehalt im Effluat mittels der unten aufgeführten Berechnungsformel ermittelt werden. Die Formel setzt sich zusammen aus der $s\text{O}_2$, dem $p\text{aO}_2$, dem Hämoglobin-Wert, der Löslichkeitskonstante für Sauerstoff ($0,0031[\frac{1}{\text{mmHg}} \times \frac{\text{ml}}{\text{dl}}]$) und der Hüfner- Zahl (1,34ml/g). Anhand der Berechnungsformel wird sowohl die chemisch an das Hämoglobin (Hb) gebundene als auch das physikalisch im Blut gelöste Sauerstoff miteinbezogen. Dabei lässt sich der physikalisch im Blut gelöste Sauerstoffgehalt als Produkt des Sauerstoffpartialdruckes und des Löslichkeitskoeffizienten berechnen. Das chemisch an das Hämoglobin gebunden Sauerstoff ermittelt sich aus dem Produkt des Hb-Wertes, der Hüfner-Zahl und der $s\text{O}_2$.

Dabei gibt die Hüfner-Zahl die maximale Sauerstoffbindungskapazität an. Somit lautet die Formel zur Berechnung des Sauerstoffgehaltes (cO_2):

$$cO_2 \left[\frac{ml}{dl} \right] = (sO_2/100) \times Hb \left[\frac{g}{dl} \right] \times 1,34 \left[\frac{ml}{g} \right] + paO_2 [mmHg] \times 0,0031 \left[\frac{1}{mmHg} \times \frac{ml}{dl} \right]$$

sO_2 = Sauerstoffsättigung, Hb = Hämoglobin, paO_2 = Sauerstoffpartialdruck, Hüfner-Zahl= 1,34ml/g, Löslichkeitskonstante für Sauerstoff im Blut= 0,0031(1/mmHg $\times$ ml/dl).

Schließlich wurde auch die Sauerstoffextraktion (DO_2) errechnet. Dabei wurde die Differenz der Sauerstoffgehalte vor dem Loading (cO_{2vor}) und nach dem Loading (cO_{2nach}) gebildet. Die Berechnungsformel der Sauerstoffextraktion lautet somit:

$$DO_2 \left[\frac{ml}{dl} \right] = cO_{2vor} - cO_{2nach}$$

2.9 Ermittlung des Hämoglobins und der Zellzahl

Die Bestimmung der Hb-Konzentration im Effluat erfolgte mit dem Detectx Hemoglobin Detection Kit der Firma Arbor Assays (*Ann Arbor, MI, USA*). Mit dem Kit ist es möglich, die Hb- Konzentration in Vollblut, Erythrozyten, Plasma und Serum zu messen. Dabei wurde zunächst wie in der Anleitung beschrieben eine Standardkurve erstellt. Hierfür wurde zu den Hb-Konzentrationen (0, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25g/dL) die optische Dichte mit dem Mikroplatten Reader (*FLUOstar Omega, BMG Labtech*) bei einer Wellenlänge von 560-580nm gemessen. Durch die Software (*Omega Software Version 3.00 R2*) erfolgt die Ermittlung der logistischen Regression mit vier Parametern (4PLC) und damit die Errechnung der Hb-Konzentration der Proben. Bei den durchgeführten Versuchen wurde die Hb-Konzentration in murinem Vollblut jeweils vor dem Ladevorgang in die LD-Apparatur, nach dem Ladevorgang und zu Beginn der Reperfusion bestimmt. Das Effluat nach dem Ladevorgang und während der frühen Reperfusionsphase wurde hierfür mit einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Jeweils 1-2ml des Effluates wurden aufgefangen und bei -80°C gelagert.

Das murine Blutbild zur Ermittlung der Erythrozyten-Zellzahl wurde mit dem veterinärmedizinische Gerät VetAbc Animal Blood Counter (*scil animal care company*) bestimmt.

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Statistik-Software GraphPad Prism 6 (*Graph Pad Software, Inc. San Diego, USA*). Die ermittelten hämodynamischen Parameter: LVDP, $\pm$ dP/dt, und der koronare Fluss wurden

nach 60-minütiger Reperfusion registriert und entsprechen dem prozentualen Anteil der präischämischen Baseline-Werte. Im Gegensatz dazu wurde der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) als absoluter Wert nach 60min Ischämie angegeben. Dabei wurden die ermittelten Ergebnisse als Mittelwert (MW) mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant gewertet, wenn der p-Wert weniger als 0,05 betrug. Der t-Test wurde bei dem Vergleich von zwei Gruppen durchgeführt. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte eine Varianzanalyse (one way ANOVA), mit anschließenden Tukey's multiple comparison test zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen.

3. Ergebnisse

Zunächst wurden die Parameter zur Methodenvvalidierung bestimmt, um die Ergebnisse untereinander vergleichbar zu halten. Dabei wurde die optimale Ischämie-Dauer, bei der die Infarktgröße ungefähr 50% des rechten und linken Ventrikel-Volumens entspricht, bestimmt. Anschließend sollte nachgewiesen werden, ob beim Einbringen von Blutbestandteilen diese auch tatsächlich über den Seitenarm der LD-Apparatur in die Koronargefäße des isoliert perfundierten Herzens gelangen. Zudem war es wichtig zu beweisen, dass die murinen LD-Herzen nach einer Äquilibrierungsphase von 20 Minuten keine Erythrozyten in den Koronargefäßen beinhalten, um mögliche Interferenzen mit den eingebrachten Blutbestandteilen zu vermeiden. Mithilfe der festgelegten Parameter wurden dann Herzen mit murinen und humanen Blutbestandteilen geladen und die ermittelten Ergebnisse untereinander verglichen. Zusammen mit Blutgasanalysen werden diese Ergebnisse in den folgenden Kapiteln im Einzelnen dargestellt.

3.1. Ermittlung der optimalen Ischämie-Dauer

Ziel der Methodenvvalidierung war es eine reproduzierbare Methode zu finden und die Ergebnisse unter gewählten Bedingungen vergleichbar und stabil zu halten. Es wurde daher der Einfluss der Ischämie-Dauer auf die Infarktgröße und auf die hämodynamischen Parameter, welche für die weiteren Untersuchungen relevant sind, ermittelt. Ziel hierbei war es, die optimale Ischämie-Dauer zu bestimmen, bei der die Erholung der linksventrikulären Funktion ungefähr 50% der Ausgangswerte und die planimetrisch gemessene Infarktgröße nach einer 120-minütigen Reperfusionsphase ca. 50% des rechten und linken Ventrikel-Volumens entsprechen sollten. Dazu erfolgten Messungen bei denen Ischämie-Dauern von 30min, 35min, 40min und 45min gewählt wurden. Die Versuche erfolgten an murinen Herzen, die mittels KHB an der Langendorff-Apparatur perfundiert wurden. Die erhobenen Ergebnisse werden in Abbildung 8A-F graphisch dargestellt. Die Ergebnisse erlauben das Verfolgen eines zeitlichen Trends.

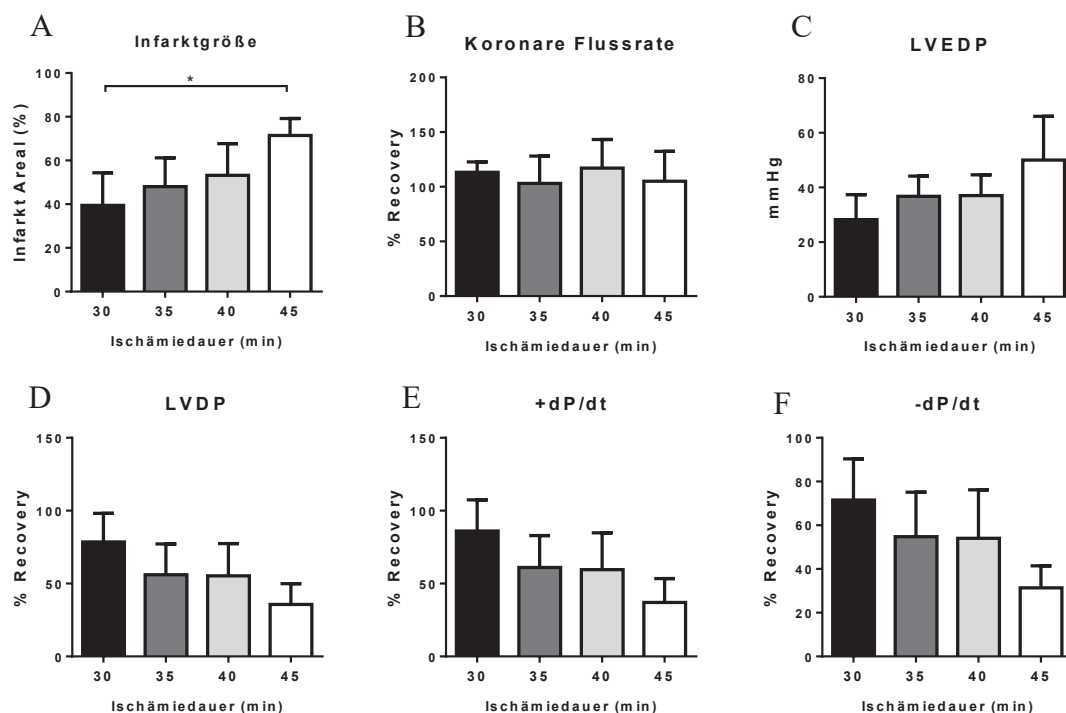


Abbildung 8: Wirkung der Ischämie-Dauer auf Infarktgröße und die hämodynamischen Parameter

Abbildung 8A zeigt die Abhängigkeit der Infarktgröße von der Globalischämie-Dauer. Zudem werden die hämodynamischen Parameter wie koronare Flussrate (Abb. 8B), LVEDP (Abb. 8C), LVDP (Abb. 8D), +dP/dt und -dP/dt (Abb. 8E-F) gezeigt. Die Recoverywerte geben den prozentualen Anteil zu den präischämischen Werten an. Der präischämische Wert ist gleich 100%. Es ist zu erkennen, dass mit anhaltender Ischämie-Dauer die Infarktgröße steigt und die Recoverywerte der linksventrikulären Funktion abnehmen. Bei einer Ischämie-Dauer von 40 Minuten weisen die mit KHB behandelten Herzen eine Infarkt-Größe von ca. 50% und eine Erholung der linksventrikulären Funktion auf ca. 50% der Ausgangswerte auf. Somit stellt die Ischämie-Dauer von 40 Minuten eine optimale Bedingung dar, um den Einfluss von Blutzellbestandteilen im kardialen I/R-Schaden zu untersuchen (aus Muessig et al., 2019).

LVDP=endsystolische linksventrikuläre Druck, die minimale (-dp/dt) und die maximale Druckänderung pro Zeit (+dp/dt), LVEDP= linksventrikuläre enddiastolische Druck. Die Daten (n= 3-4 pro Gruppe) sind als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind dargestellt (one-way ANOVA). $p < 0,05$.

Anhand der graphisch dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass mit anhaltender Ischämie die Infarktgröße zunimmt und der endsystolische linksventrikuläre Druck (LVDP) tendenziell abnimmt. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) stieg mit der Zeit an (vgl. Abb. 8C). Weiterhin ist zu erkennen, dass die Variierung der Ischämie-Dauer keinen Einfluss auf die koronare Flussrate aufwies (vgl. Abb. 8B). Die minimale (-dp/dt) und die maximale Druckänderung pro Zeit (+dp/dt) sank mit der Dauer der Ischämie (vgl. Abb. 8E-F). Die ermittelten Werte für die $\pm dp/dt$ ergaben

sich aus der ersten Ableitung des LVDP nach der Zeit. Die Ergebnisse konnten hierbei zeigen, dass die Ischämie-Dauer einen Einfluss auf die ermittelten hämodynamischen Parameter sowie die Infarktgröße hat. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu erhalten, wurde für die nachfolgenden Versuche eine Ischämie-Dauer von 40 Minuten gewählt. Hierdurch konnte eine Infarkt-Größe von ca. 50% sowie eine Erholung der linksventrikulären Funktion von ca. 50% der Ausgangswerte erreicht werden.

3.2. Histologischer Nachweis von Erythrozyten im Koronarsystem der LD-Herzen

Um zu beweisen, dass die eingebrachten Blutbestandteile auch in die murinen Koronargefäße gelangen und nicht während der 40-minütigen Globalischämie der Schwerkraft folgend aus dem Herzen als Effluat abtropfen, wurden histologische Präparate erstellt. In den Abbildungen 9 bis 12 werden die mikroskopischen Aufnahmen der histologisch angefertigten Schnittbilder von murinen Herzen zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Die Präparate wiesen eine Schnittdicke von 5-7 μ m auf und wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Nach Färbung verblieben die Zellkerne blau und die Zellplasmae zeigten eine rötliche Farbe. Die im Folgenden aufgeführten Aufnahmen zeigen angeschnittene Koronararterien und Koronarvenen.

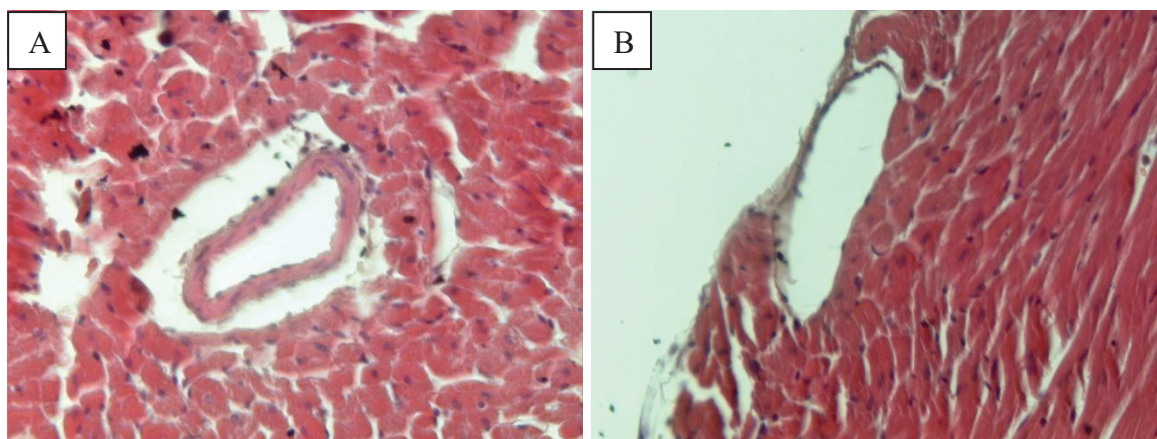


Abbildung 9: Histologisches Bild vor dem Einbringen von Erythrozyten in das murine Koronarsystem.

Die histologischen Bilder zeigen Schnittbilder eines murinen Herzens, welches nach einer Äquilibrationsphase von 20min vom Langendorff System entfernt wurde. Es handelt sich um Abschnitte des Myokards. Das linke Bild zeigt eine Arterie. Im rechten Bild befindet sich eine dünnwandige Vene. Die unterschiedliche Zellform ergibt sich durch einen anderen Schnittwinkel. Sowohl arterielle als auch venös angetroffene Koronargefäße weisen im Lumen keine Erythrozyten auf (aus Muessig et al., 2019). HE-Färbung, 40x Vergrößerung.

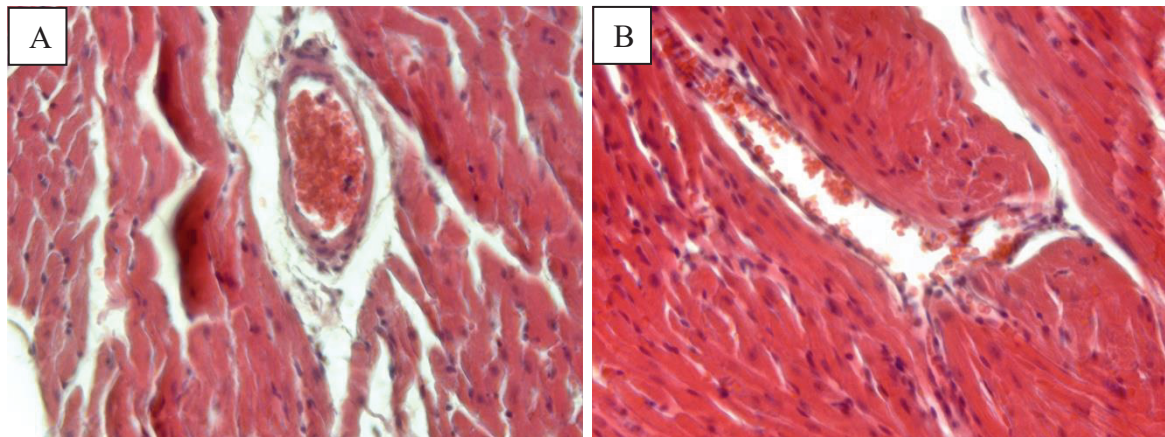


Abbildung 10: Histologisches Schnittbild nach dem Einbringen von Erythrozyten in das murine Koronarsystem.

Die zwei dargestellten mikroskopischen Aufnahmen zeigen histologische Schnittbilder eines murinen Myokards. Die Aufnahmen wurden erstellt nachdem das murine Myokard im Langendorff mit einer Erythrozyten-KHB Suspension mit einem Hämatokrit-Wert von 40% geloadet wurde. Es ist zu erkennen, dass sich im arteriellen (Abb. 10A) und auch im venösen (Abb. 10B) Koronargefäß Erythrozyten im Lumen befinden. Dabei sind die Erythrozyten aufgrund des Eosins rot angefärbt. Da die Erythrozyten kein Zellkern besitzen, fehlt die blaue Färbung des Zellkerns (aus Muessig et al., 2019). HE-Färbung, 40x Vergrößerung.

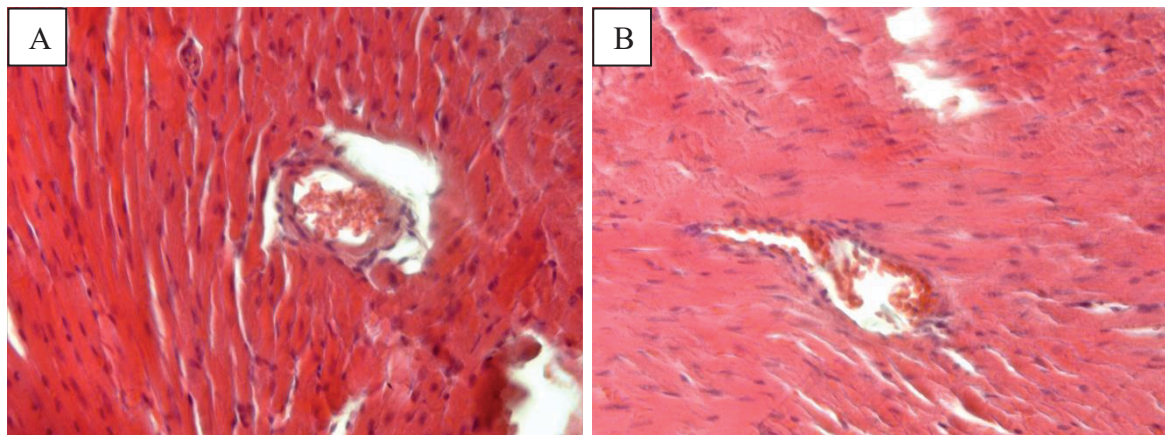


Abbildung 11: Histologisches Schnittbild des murinen Herzens nach 40-minütiger Globalischämie

Die zwei mikroskopischen Aufnahmen zeigen das murine Herzmuskelgewebe nach 40-minütiger Globalischämie. Abb. 11A zeigt eine Koronararterie, die Erythrozyten im Lumen aufweist. Auf Abb. 11B ist eine Koronarvene zu erkennen, die ebenfalls rote Blutkörperchen im Lumen zeigt. Aus den Aufnahmen wird ersichtlich, dass die vor der Globalischämie eingebrachten Erythrozyten nach einer Ischämie-Dauer von 40min im Koronarsystem verbleiben und nicht als Effluat abtropfen (aus Muessig et al., 2019). HE-Färbung, 40x Vergrößerung.

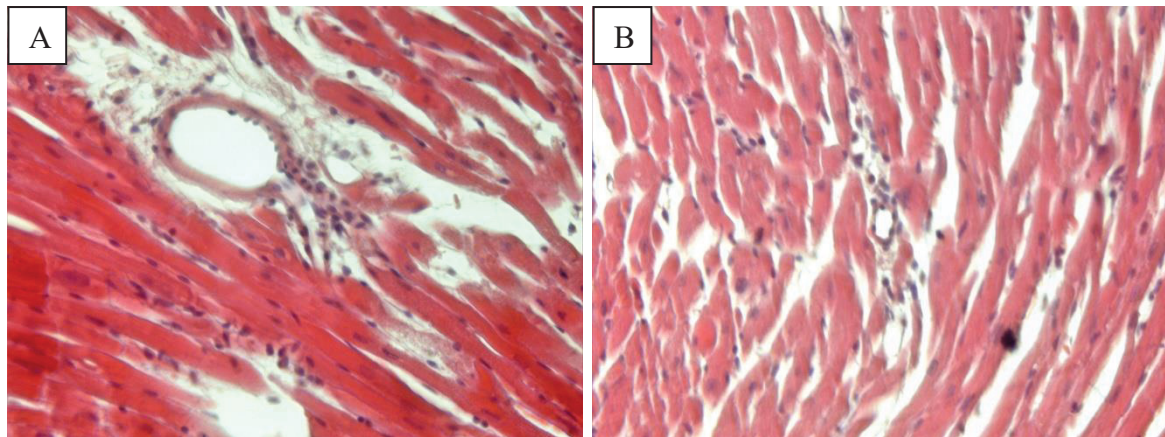


Abbildung 12: Histologische Schnittbilder des murinen Herzens nach 60 -minütiger Erholungsphase

Die zwei Schnittbilder zeigen das Myokard eines murinen Herzens, welches während einer 60-minütigen Erholungsphase mit KHB perfundiert wurde. Hierbei weisen die angetroffenen arteriellen (Abb. 12A) und venösen (Abb. 12B) Koronargefäße keine roten Blutkörperchen auf, die vor der 40-minütigen Globalischämie in das Langendorff-System eingebracht wurden. Die Perfusion mittels KHB spült die Erythrozyten heraus (aus Muessig et al., 2019). HE-Färbung, 40x Vergrößerung.

Die histologischen Ergebnisse konnten zeigen, dass die Koronargefäße durch die eingebrachte Erythrozyten-Suspension effektiv befüllt wurden (vgl. Abb. 10). Die nachgewiesenen Erythrozyten waren zudem auch nach einer Globalischämie von 40 Minuten in den Koronargefäßen nachweisbar (vgl. Abb. 11). Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass die eingebrachten Erythrozyten nicht der Schwerkraft folgend aus dem Herzen abtropften. In den Koronargefäßen waren nach einer Stabilisierungsphase in den abgebildeten Aufnahmen keine Erythrozyten mehr vorhanden (vgl. Abb. 9). Die histologischen Schnitte konnten außerdem verdeutlichen, dass die murinen Erythrozyten nach Perfusion mittels KHB effektiv aus dem Koronarsystem ausgespült wurden. Auch nach einer Recoveryphase von 60 Minuten war dies zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich verifizieren, dass eingebrachtes Blut- oder Blutsuspensionen die Koronargefäße effektiv befüllen und auch nach einer Globalischämie in diesen verbleiben.

3.3. Ermittlung der Hämoglobin Konzentration

Neben den histologischen Präparaten erfolgte die Messung der Hb-Konzentration im Effluat sowie die Bestimmung der Zellzahl roter Blutzellen. Dies diente neben den histologischen Ergebnissen zusätzlich zur Absicherung, dass keine Erythrozyten vor dem Ladevorgang und nach der Reperfusionsphase im murinem Herzen vorhanden waren. Weiterhin wurde getestet, ob die in die Koronargefäße eingebrachten roten Blutzellen nach der Globalischämie im Herzen verbleiben. Die Grafiken in der Abbildung 13A-C zeigen

die Ergebnisse des Verbleibs von Erythrozyten bevor und während des Ladevorgangs, sowie während der frühen Reperfusion.

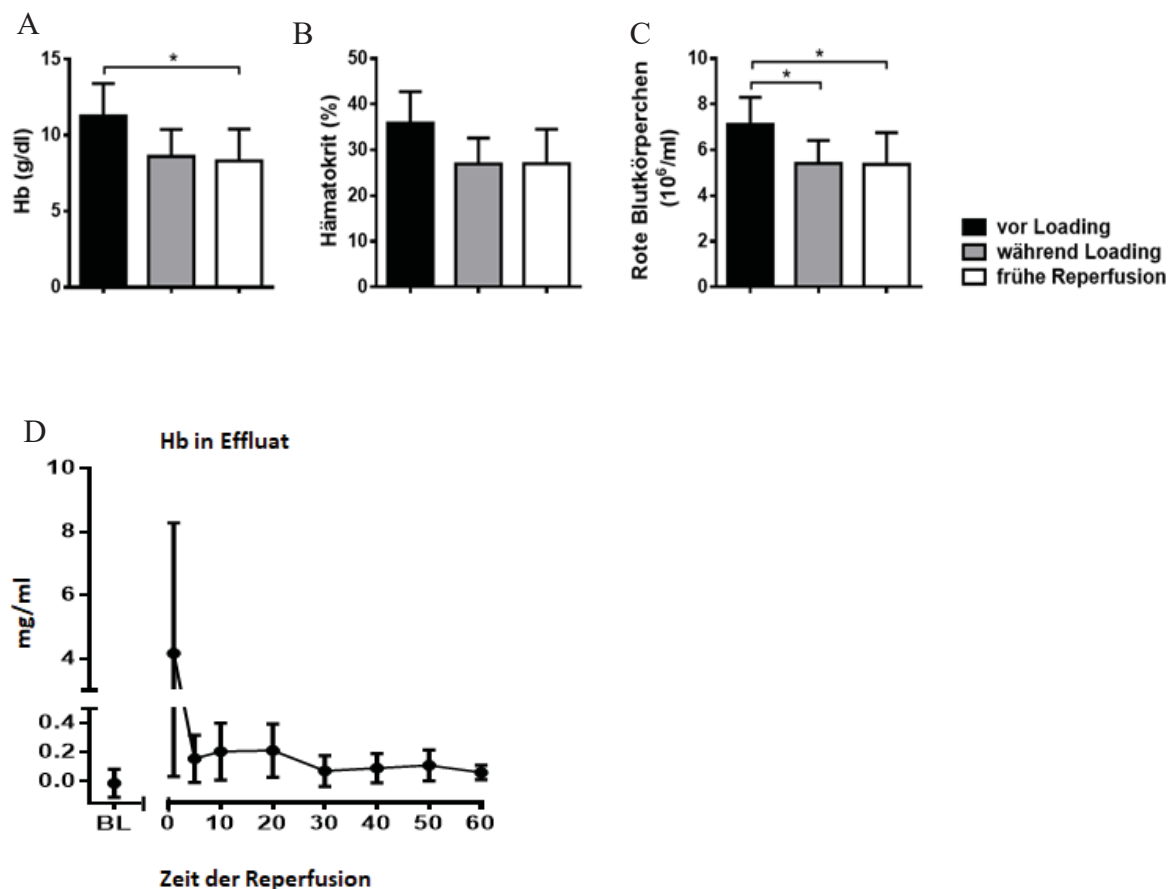


Abbildung 13: Nachweis der Hämoglobin Konzentration vor und nach Loading

Die drei Säulendiagramme in Abb. 13 A-C zeigen die Hämoglobinkonzentration (Hb in g/dl), den Hämatokrit Wert (%) und die Anzahl der roten Blutzellen ($10^6/\text{ml}$) für das Blut vor einbringen in das Langendorff-System, für das Effluat während des Loadings und in der frühen Reperusionsphase nach 40-minütiger Globalischämie an ($n=7$). Anhand der Graphiken ist zu erkennen, dass die roten Blutzellen sowohl während des Loadings, als auch nach der Globalischämie im Effluat nachweisbar sind. In Abbildung 13D wird im zeitlichen Verlauf die Hämoglobin-Konzentration im Effluat vor dem Loading (BL= Baseline) und während der Reperfusion angezeigt ($n=8$) (aus Muessig et al., 2019). Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind dargestellt (one- way ANOVA). * $p<0,05$.

Die graphisch dargestellten Ergebnisse konnten eine Abnahme der Erythrozyten-Anzahl zu den Zeitpunkten während des Ladevorganges und in der frühen Reperfusion demonstrieren. Dies konnte sowohl im sinkenden Hb-Wert (vgl. Abb. 13A) und dem Hämatokrit-Wert (HKT-Wert) sowie im Abfall der Zellanzahl (vgl. Abb. 13B, 13C) nachgewiesen werden. Sobald das Blut mit KHB ausgespült wurde, sank der ermittelte Hb-Wert im Vollblut signifikant zur frühen Reperusionsphase ($p<0,05$, Abb. 14A). Dabei

betrug der zu Beginn gemessene Hb-Wert im Vollblut durchschnittlich $11,27 \pm 1,87 \text{ g/dl}$ und fiel während der frühen Reperfusion auf einen Mittelwert von $8,32 \pm 2,09 \text{ g/dl}$ ab. Die Anzahl der Erythrozyten vor Loading lag signifikant höher gegenüber dem während des Loadings und der frühen Reperfusion ($p < 0,05$, Abb. 13C). Die Graphen auf den Abbildungen 13A-C verdeutlichen, dass der Hb-Wert, HKT-Wert und die Anzahl roter Blutzellen während des Loadings und zur früheren Reperfusionsphase keine auffälligen Änderungen aufzeigen. Der Trend in allen drei Graphen ist durch den Verdünnungseffekt mit KHB zu erklären. In Abbildung 13D wurde die Hämoglobinkonzentration des Effluates im zeitlichen Verlauf der Reperfusion dargestellt. Dabei markiert der Baseline (BL) Zeitpunkt die Phase nach der 20-minütigen Äquilibrationsphase. Nach dieser Phase waren keine Erythrozyten mehr im Effluat nachweisbar. Des Weiteren wird ersichtlich, dass die Hb-Konzentration 5 Minuten nach Beginn der Reperfusion mit KHB keinen Unterschied zu den Ausgangswerten aufweist. Dies verdeutlicht, dass das Auswaschen mit KHB sehr effizient war. Zudem war nach einer Reperfusionsphase von 60 Minuten die Hb-Konzentration kaum nachweisbar. Dieses Ergebnis deckt sich mit den histologischen Präparaten aus dem vorherigen Kapitel (vgl. Abb. 11-12). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es mit dem LD-System möglich ist, die Koronargefäße über den Seitenarm der Apparatur effektiv mit Blutzellen zu befüllen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die eingebrachten Blutzellen auch während der Ischämie im Koronarsystem verweilen und in der anschließenden Reperfusion ausgewaschen werden.

3.4. Einbringung von murinem Blut und Blutbestandteilen in die LD-Apparatur

3.4.1. Einbringung von murinem Vollblut in das LD-Herz

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Ladevorgang mittels murinem Vollblut und Erythrozyten über den Seitenarm der LD-Apparatur kurz vor Einleitung der Globalischämie möglich ist, wurde der Effekte des murinen Vollblutes auf den I/R-Schaden untersucht. Um die Wirkung von murinem Vollblut auf das murine Herz im I/R-Modell zu demonstrieren, wurden die hämodynamischen Parameter LVDP, LVEDP, $+dp/dt$, $-dp/dt$ und die koronare Flussrate gemessen. Die Infarktgröße in Prozent wurde aus dem Volumen des rechten und linken Ventrikels gebildet ($\%LV+RV$). In Abbildung 14 A-F werden die ermittelten Parameter für murines Vollblut (mVB) mit KHB (Kontrolle) verglichen. Die hämodynamischen Parameter LVDP, $+/-dp/dt$ sowie die koronare Flussrate

wurden nach einer 60-minütigen Recoveryphase ermittelt und entsprechen den prozentualen Anteil der präischämischen Baseline-Werten. Der LVEDP wurde nach 60-minütiger Reperfusion als absoluter Wert ermittelt. Die Ermittlung der Infarktgröße erfolgte nach einer 120-minütigen Reperfusionsphase. Die Recoveryphase erfolgte nach einer 40-minütigen Globalischämie, die bei der mVB-Gruppe nach dem Ladevorgang mit mVB erfolgte. Im Gegensatz dazu erfolgte bei der Kontrollgruppe kein Ladevorgang mit Blutbestandteilen, sondern nur mittels KHB. Die Säulendiagramme in der Abb. 14 zeigen, dass die mVB-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion erzielten. Hierbei zeigte der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) in der mVB Gruppe im Mittel einen signifikant höheren Recoverywert im Vergleich zur Kontrollgruppe ($63 \pm 21,9\%$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,01$). Dieser positive Effekt wurde sowohl für die maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit ($+dp/dt$) als auch für die Relaxationsgeschwindigkeit demonstriert. Die mittleren Recoverywerte für $+dp/dt$ und $-dp/dt$ der mVB- Gruppe lag mit $69 \pm 20,6\%$ bzw. $61 \pm 21,8\%$ signifikant ($p < 0,01$) höher als die Recoverywerte der Kontrollgruppe ($31,1 \pm 15,0\%$ bzw. $65,4 \pm 22,2\%$). Der enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVEDP), der als Indikator für die kardiale Vorlast dient, war bei der mVB-Gruppe signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe ($31 \pm 3,4 \text{ mmHg}$ vs. $53,7 \pm 13,6 \text{ mmHg}$, $p < 0,01$). Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen für die ermittelte Infarktgröße und für die koronare Flussrate ermittelt werden. Die prozentuale Infarktgröße der mVB-Herzen betrug $36,5 \pm 11,6\%$ und lag somit unter dem Infarktareal der Kontrollherzen ($36,5 \pm 11,6\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$, nicht signifikant = n.s., Abb. 14F). Die mVB-Gabe zeigte keinen Effekt auf die Recoverywerte der Koronaren Flussrate (ml/min) ($78 \pm 27,4\%$ vs. $65,4 \pm 22,2\%$, n.s., vgl. Abb. 14E). Zusammenfassend konnte durch den Ladevorgang mit murinem Vollblut, kurz vor Einleitung der 40-minütigen Globalischämie, eine signifikante ($p < 0,01$) Verbesserung der linksventrikuläre Funktion nach 60-minütigen Recoveryphase erzielt werden. Die Infarktgröße konnte mittels murinem Vollblut nicht signifikant reduziert werden ($p = 0,1066$, n.s., vgl. Abb. 14F).

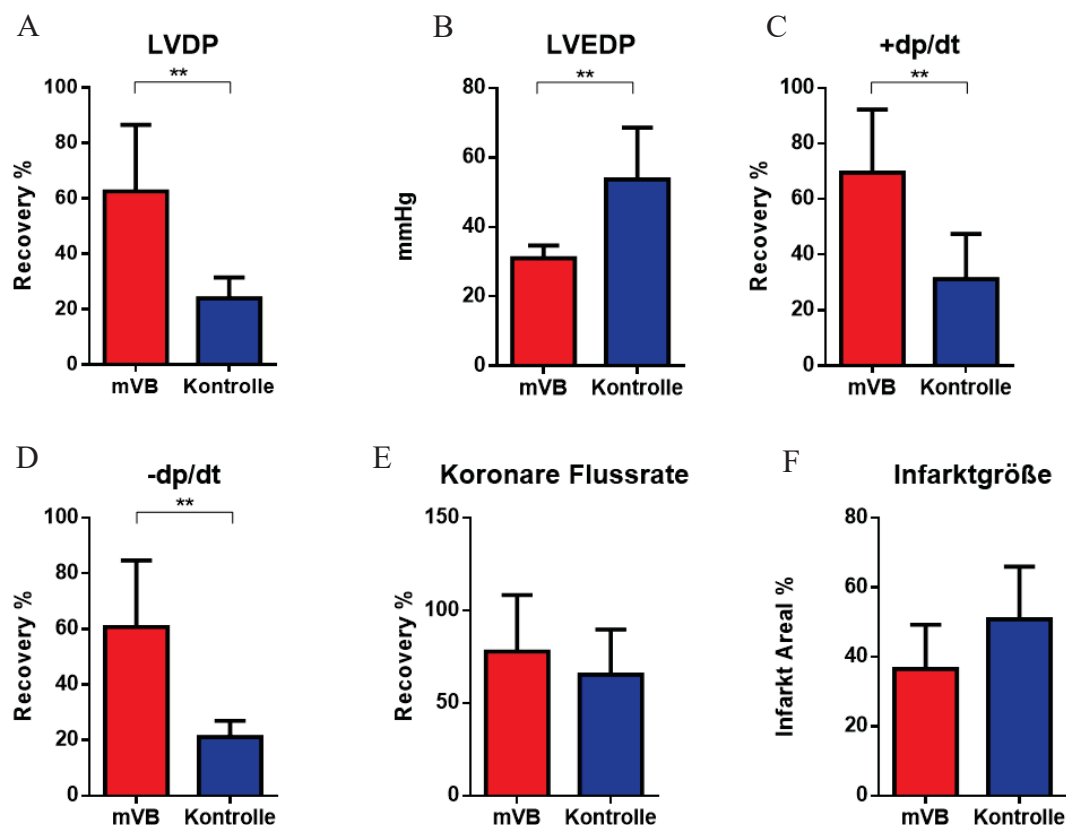


Abbildung 14: Der kardio-protective Effekt von murinem Vollblut auf den I/R-Schaden

In den dargestellten Graphen werden die Gruppen für LD-Hezen, die mit murinem Vollblut (mVB) vor Beginn der Globalischämie geladen wurden, mit der Kontrollgruppe verglichen. In der Kontrollgruppe erfolgte kein zusätzliches Loading. Die aufgeführten Graphen zeigen die hämodynamischen Parameter nach 60-minütiger Reperfusion sowie die ermittelte Infarktgröße nach 120-minütiger Reperfusion für Kontrolle und mVB an. Der linksventrikuläre Druck (LVDP), die koronare Flussrate und die positive/negative erste Ableitung des linksventrikulären Drucks (+dp/dt, -dp/dt) entsprechen den prozentualen Anteil der präischämischen Baseline-Werten nach 60-minütiger Reperfusion. Der linksventrikulär Enddiastolische Druck wurde als absoluter Wert in mmHg ermittelt. Die Werte für LVDP (Abb.14A) und +/-dp/dt (Abb. 14C-D) der mVB-Gruppe sind signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der LVEDP der mVB Gruppe unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe (Abb. 14B). Die Daten (n= 6 pro Gruppe) sind als MW±SD dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind dargestellt (ungepaarter t-Test). **p<0,01.

3.4.2 Einbringung von verschiedenen murinen Blutbestandteilen in das LD-System

In diesem Kapitel sollen die Auswirkungen der einzelnen Blutbestandteile des murinen Bluts: Plasma (mPlasma), Erythrozyten (mRBCs) und plättchenreiches Plasma (mPRP) auf den Ischämie- und den Reperfusionsschaden untersucht werden. Das Plasma wurde 6:4 (v/v) verdünnt hinzugegeben und die Erythrozyten wurden mit KHB auf einen Hkt von 40% verdünnt, um annähernd physiologische Konzentrationen zu erreichen. Bei dem

mPRP handelt es sich um Thrombozyten reiches Plasma, welches ebenfalls 6:4 (v/v) mit KHB verdünnt wurde. Die einzelnen Zentrifugationsschritte zur Aufarbeitung der Blutbestandteile werden im Methodenteil (Kapitel: 2.5) genauer beschrieben. Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Einbringen von murinem Vollblut kurz vor Beginn der 40-minütigen Globalischämie einen kardio-protectiven Effekt auf die postischämische Recovery der linksventrikulären Funktion aufweist, sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auf einzelne Blutbestandteile zurückzuführen ist, oder ob murines Vollblut (mVB) einen additiven Effekt aufweist. Dafür erfolgte dieselbe Versuchsdurchführung mit unterschiedlichen Blutbestandteilen. Die gemessenen hämodynamischen Parameter: LVDP, $\pm dp/dt$ und die koronare Flussrate wurden zur Auswertung nach einer Recoveryphase von 60 Minuten wie für das Vollblut auch ermittelt und entsprechen den prozentualen Anteil der präischämischen Baseline Werten. Die Infarktgröße wurde nach einer 120-minütigen Recoveryphase mittels TTC Färbung bestimmt. Der linksventrikulär enddiastolische Druck entspricht den absoluten Wert nach 60-minütiger Reperfusion. Die Ergebnisse der genannten Parameter sind in Abbildung 15 A-F graphisch dargestellt. Hierbei zeigt sich eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktionsparameter LVDP und $-dp/dt$ für alle ermittelten Blutprodukte gegenüber der Kontrollgruppe. Der linksventrikulär entwickelte Druck der Kontrollgruppe lag mit einem prozentualen Recoverywert von $23,9 \pm 6,9\%$ signifikant niedriger als die Gruppen mit mVB ($63 \pm 21,9\%$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,05$), mRBCs ($57,9 \pm 13,1\%$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,05$), mPlasma ($60,2 \pm 22,4\%$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,05$) und mPRP ($63,7 \pm 21,4\%$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,05$). Ähnliche Beobachtung wurde auch für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit ($-dp/dt$) gemacht. Der postischämische Recoverywert der Relaxationsgeschwindigkeit $-dp/dt$ betrug für die Kontrollherzen mit $21,1 \pm 5,3\%$ deutlich weniger als für die vorbehandelten Herzen mit mPRP ($70,14 \pm 26,7\%$), mPlasma ($62,4 \pm 21,4\%$), mVB ($61 \pm 21,8\%$) und mRBCs ($63,7 \pm 15,5\%$). Im Vergleich zur postischämischen Relaxationsgeschwindigkeit konnte die positive Wirkung auf die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Herzen beobachtet werden, die zuvor mit mPRP und mVB geloadet wurden. Dabei waren die prozentual ermittelte postischämische $+dp/dt$ Werte nach 60-minütigen Reperfusion in den mVB ($69 \pm 20,6\%$) und mPRP ($62,4 \pm 21,4\%$) Gruppen signifikant besser als in der Kontrollgruppe ($69 \pm 20,6\%$ vs. $31,10 \pm 15\%$ und $62,4 \pm 21,4\%$ vs. $31,1 \pm 15\%$, $p < 0,05$, vgl. Abb. 15C). Wie in Abb. 15B dargestellt entwickelten die KHB-Herzen einen höheren LVEDP als die der anderen Gruppen. Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen

mPRP und mVB gegenüber der Kontrolle gezeigt werden ($p < 0,05$, vgl. Abb. 15B). Der postischämisch gemittelte LVEDP betrug in der mVB- Gruppe $31 \pm 3,4 \text{ mmHg}$ und $38,7 \pm 8,9 \text{ mmHg}$ in der mPRP-Gruppe. Die Kontrollherzen entwickelten im Durchschnitt $53,7 \pm 13,6 \text{ mmHg}$ die höchsten LVEDP-Werte nach 60-minütiger Recoveryphase. Der einzige hämodynamische Parameter, bei dem sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsherzen zeigte, war die der koronaren Flussrate. Hinsichtlich der ermittelten Infarktgröße wiesen die murinen Blutbestandteile deutlich reduzierte Infarktareale auf als die Kontrollherzen. Dabei herrschte auch zwischen den Gruppen mVB und mPRP ein signifikanter Unterschied. Die Infarktgröße der mVB Gruppe lag mit einer Größe von $36,5 \pm 11,6\%$ signifikant höher als die Infarktgröße der mPRP Gruppe ($36,5 \pm 11,6\%$ vs. $11,2 \pm 6,9\%$, $p < 0,01$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die ein Infarktareal von $49,8 \pm 14,56\%$ aufwies, zeigten die Gruppen mit mPlasma ($28,9 \pm 10,7\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$, $p < 0,05$), mRBCs ($24,41 \pm 9,03\%$ vs. $49,83 \pm 14,56\%$, $p < 0,01$) und mPRP ($11,2 \pm 6,9\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$, $p < 0,0001$) signifikant geringere Infarktgrößen auf. In Abbildung 15E sind die einzelnen Signifikanzen, die zwischen den Versuchsgruppen ermittelt wurden, aufgeführt. Die Gabe von murinem Vollblut erzielte als einzige Gruppe in der ermittelten Infarktgröße keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Herzen, die mit mPRP geloadet wurden, zeigten die niedrigste prozentuale Infarktgröße mit $11,2 \pm 6,9\%$ auf vgl. Abb. 15E). Zusammenfassend veranschaulichen die Ergebnisse in Abbildung 15, dass das Einbringen von murinem Vollblut oder muriner Blutbestandteile zu Beginn einer 40-minütigen Globalischämie protektiv auf die linksventrikuläre Funktion muriner Herzen im LD-Perfusor nach 60-minütiger Reperfusion wirken. Zudem zeigen die murinen Herzen mit murinen Blutbestandteile signifikant geringere Infarktgrößen als die Kontrollherzen. Letztlich ist den Ergebnissen kein additiver Effekt seitens des murinen Vollblutes zu entnehmen.

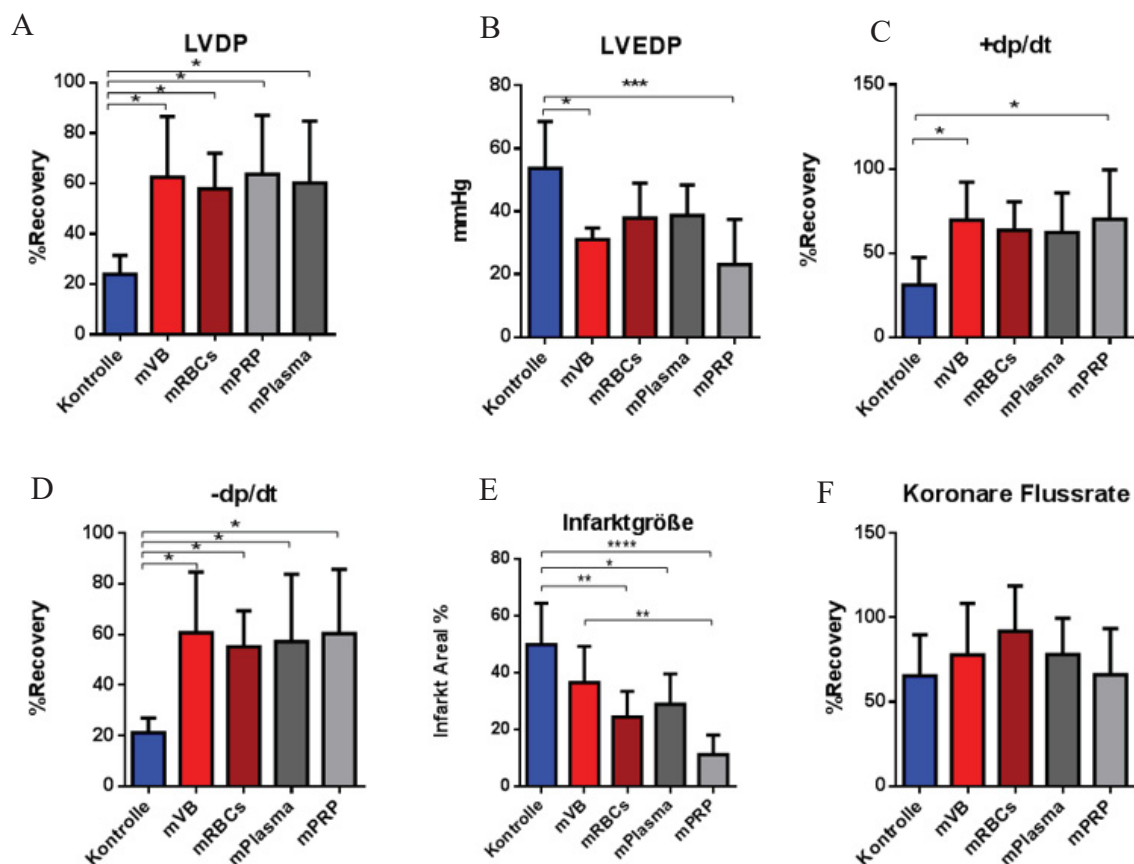


Abbildung 15: Einfluss der verschiedenen murinen Blutbestandteile auf den I/R-Schaden

In den dargestellten Graphen wird die Wirkung verschiedener murinen Blutbestandteile: mPlasma, mPRP und mRBCs mit mVB sowie KHB (Kontrolle) auf den kardialen I/R Schaden verglichen. Der linksventrikuläre Druck (LVDP), die koronare Flussrate und die positive/negative erste Ableitung des linksventrikulären Drucks (+dp/dt, -dp/dt) entsprechen den prozentualen Anteil der präischämischen Baseline-Werten nach 60-minütiger Reperfusion. Der linksventrikulär enddiastolische Druck wurde als absoluter Wert in mmHg ermittelt. Die Ermittlung der Infarktgröße mittels TTC-Färbung erfolgte nach 120-minütiger Reperfusionsphase. Es ist kein additiver Effekt von mVB gegenüber den einzelnen Bestandteilen erkennbar. Die einzelnen Blutbestandteile zeigen einen kardio-protectiven Effekt auf den I/R-Schaden im Gegensatz zur KHB- Kontrollgruppe.

mRBCs= murine Erythrozyten, mPlasma= murines Plasma, mPRP= murines plättchenreiches Plasma, mVB= murines Vollblut, KHB=Krebs-Henseleit Puffer, LVEDP=linksventrikulär enddiastolischer Druck, TTC=2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid. Die Daten (n=5-6 pro Gruppe) sind als MW±SD dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind dargestellt (one-way ANOVA). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

3.5. Transfer- Modell

3.5.1 Transfer humaner Erythrozyten in die LD-Apparatur

Nachdem verschiedene murine Blutbestandteile in die LD-Apparatur eingebracht wurden, erfolgte die Weiterentwicklung zur Transfermethode, bei dem neben murinen Blutbestandteilen auch die Wirkung humaner Erythrozyten (hRBCs) auf den I/R-Schaden untersucht werden sollten. Hierfür wurde zunächst gesunden Probanden venöses Blut entnommen und in denselben Zentrifugationsschritten verarbeitet wie auch für die Aufarbeitung muriner Erythrozyten (vgl. Kapitel 2.5). Der Hämatokrit wurde durch eine KHB-Erythrozyten Suspension auf 40% eingestellt. In Abbildung 16 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Gruppenanzahl betrug für die mRBCs-Gruppe $n=7$, für die hRBCs-Gruppe $n=6$ und $n=6$ für die KHB-Kontrollgruppe. Hierbei wurden dieselben Parameter ermittelt wie auch in den Versuchen mit murinem RBCs. Um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu veranschaulichen wurden die Gruppen hRBCs und mRBCs mit der KHB-Kontrollgruppe graphisch dargestellt und untereinander verglichen. Hierbei zeigten sich zwischen den Gruppen hRBCs und mRBCs keine signifikanten Unterschiede. Beide Gruppen zeigten signifikante Unterschiede im Recoverywert des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP), welches nach einer Reperfusionsdauer von 60 Minuten ermittelt wurde. Der Recoverywert stellt den Erholungswert nach 60-minütiger Reperfusion dar, welcher den prozentualen Anteil der präischämisch erreichten Baseline-Werte zeigt. Die Gruppen mRBCs sowie hRBCs stellten signifikant bessere LVDP-Recoverywerte als die KHB-Gruppe dar. Die ermittelte LVDP Recoverywert der mRBCs-Gruppe zeigte signifikant höhere Werte an als die Kontrollgruppe ($63,7 \pm 21,4\%$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,001$). Vergleichbare Werte konnte auch für die hRBCs-Gruppe ermittelt werden. ($63,9 \pm 18,6$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,01$). Zudem wiesen die hämodynamischen Parameter der maximalen ($+dp/dt$) und minimalen ($-dp/dt$) Druckentwicklung pro Zeit der mRBCs und hRBCs- Gruppe signifikant vergleichbare Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Die maximale Druckentwicklung pro Zeit lag bei den Gruppen mit mRBCs ($63,7 \pm 15,5\%$ vs. $31,10 \pm 15\%$, $p < 0,05$) und bei der hRBCs-Gruppe signifikant höher als bei der KHB-Kontrolle ($72,0 \pm 24,1\%$ vs. $31,1 \pm 15\%$, $p < 0,01$). Die Versuchsherzen mit mRBCs zeigten zudem auch eine bessere minimale Druckentwicklung pro Zeit. Hierbei lag der gemittelte Recoverywert für die mRBCs-Gruppe signifikant höher als die KHB-Gruppe ($55,1 \pm 13,2\%$ vs. $21,1 \pm 5,3\%$, $p < 0,01$). Ähnliche Signifikanz zeigte auch die Versuchsgruppe, die vor Beginn der Ischämie mit hRBCs geloadet wurden. Der Recovery -

dp/dt Wert nach 60-minütiger Reperfusion lag mit $59,5 \pm 15\%$ deutlich höher als bei der Kontrolle ($59,5 \pm 15\%$ vs. $21,1 \pm 5,3\%$, $p < 0,01$). Lediglich für die koronare Flussrate und den linksventrikulär enddiastolischen Druck (LVEDP) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden. Der LVEDP zeigt in der Abbildung 16B im Vergleich zu den anderen hämodynamischen Parametern keinen prozentualen Vergleichswert zu den präischämischen Baseline-Werten. Hier wurde der absolute LVEDP dokumentiert. Dabei ist dem Graphen zu entnehmen, dass die Kontrollgruppe mit einem LVEDP-Wert von $53,7 \pm 13,6 \text{ mmHg}$ höher lag als bei den mRBCs ($37,9 \pm 10,3 \text{ mmHg}$) und hRBCs-Gruppen ($43,5 \pm 10,3 \text{ mmHg}$). Jedoch ist der ermittelte Unterschied nicht signifikant. Schließlich erfolgte auch bei dem Transfer hRBCs die Messung der Infarktgröße am gesamten Volumen des linken und rechten Ventrikels (RV+LV%). Die Herzen wurden, wie auch zuvor im Versuchsprotokoll beschrieben (vgl. Kapitel: 2.2.3), nach einer 120-minütigen Reperfusionsphase für die Infaktermittlung von der LD-Apparatur entfernt. Abbildung 16E zeigt die ermittelten Infarktgrößen einzelner Versuchsgruppen im Vergleich an. Dabei verdeutlichen die Ergebnisse, dass die murinen Herzen sowohl mit mRBCs als auch mit hRBCs Loading reduzierte Infarktgrößen ergaben als die KHB-Kontrollherzen. Die Infarktgröße der mRBCs-Gruppe lag mit einem gemittelten Infarktareal von $24,41 \pm 9,03\%$ signifikant niedriger als die KHB-Gruppe, die eine Größe von $49,8 \pm 14,6\%$ aufwies ($24,4 \pm 9,0\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$, $p < 0,01$). Die hRBCs-Gruppe wies auch eine signifikant reduzierte Infarktgröße auf als die Kontrollgruppe ($23,5 \pm 9,9\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$, $p < 0,01$). Die beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen unter anderem, dass der Transfer humaner Erythrozyten denselben protektiven Effekt hinsichtlich linksventrikulärer Erholungsrate und Infarktgröße erzielen konnte, wie mit murinen Erythrozyten. Somit konnte gezeigt werden, dass die mRBCs im Vergleich zu den hRBCs keine Unterschiede im LD-Modell hinsichtlich der Untersuchungen des I/R-Schadens aufweisen. Beide Gruppen zeigen jedoch eindeutige Differenzen zu der Kontrollgruppe, die keinen Ladevorgang kurz vor Beginn der Ischämie erhielten.

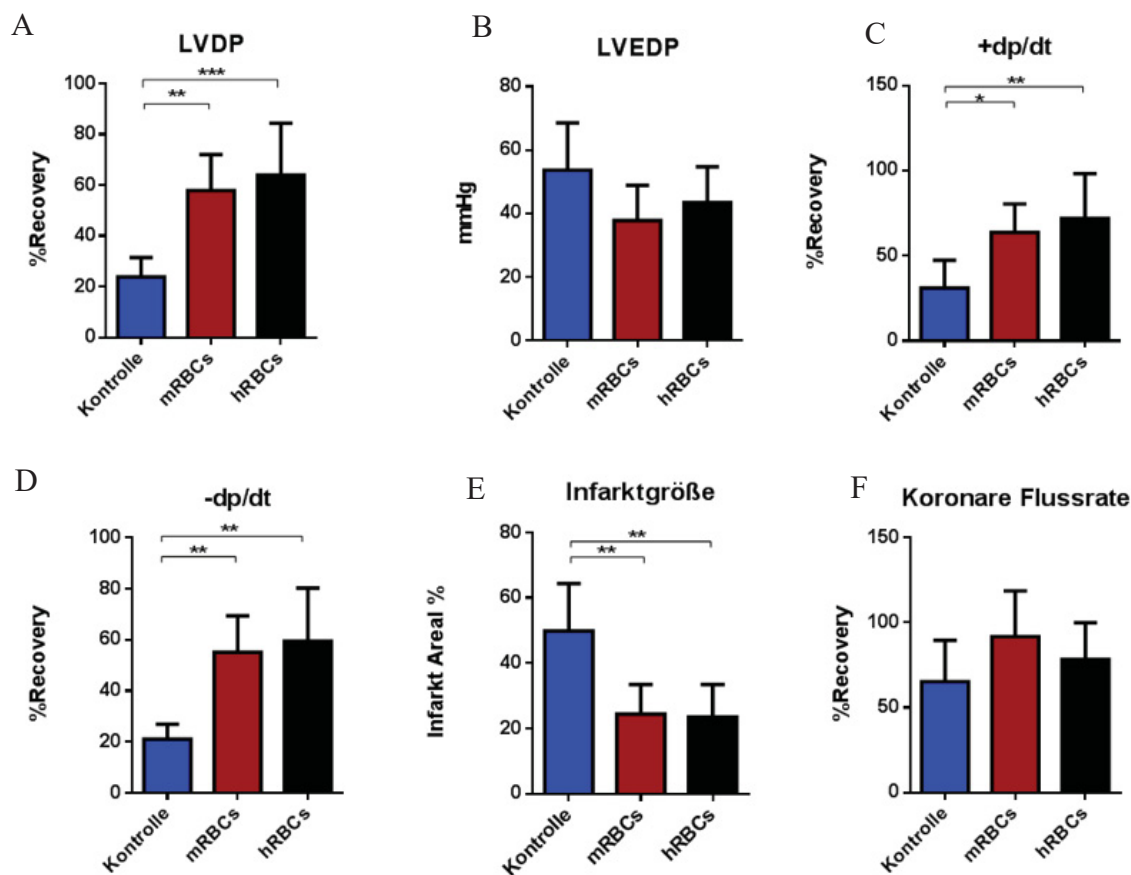


Abbildung 16: Kardio-protektiver Effekt humaner Erythrozyten auf den I/R-Schaden

Die Abbildung zeigt den protektiven Einfluss der hRBCs (humane Erythrozyten) auf die Langendorff- Herzen nach einer 40-minütigen Globalischämie. Die Kontrollherzen (n=6) wurden nur mit KHB behandelt. Die hRBCs (n=6) wurden wie die mRBCs (murine Erythrozyten, n=7) auf ein Hämatokrit-Wert von 40% mit KHB verdünnt. Der Ladevorgang mittels hRBCs zeigt einen vergleichbaren kardio-protektiven Effekt wie die mRBCs-Gruppe auf. Die linksventrikuläre Funktion weist in beiden Gruppen signifikant bessere Erholungswerte nach einer 60-minütigen Reperfusion auf als die Kontrollgruppe (Abb. 16A). Die Infarktgröße nach 120-minütiger Reperfusion ist in den Gruppen mRBCs und hRBCs signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (Abb. 16E).

KHB=Krebs-Henseleit Puffer, LVDP=linksventrikulär entwickelter Druck, LVEDP=linksventrikulär enddiastolischer Druck, $\pm dp/dt$ =positive, negative erste Ableitung des linksventrikulären Druckes. Die Daten sind als $MW \pm SD$ dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind dargestellt (one-way ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.5.2 Transfer von humanem Plasma in die LD-Apparatur

Als nächster Schritt erfolgte der Transfer von humanem Plasma in die LD-Apparatur. Dabei wurde das Plasma in einem Verhältnis von 6:4 mit KHB verdünnt und vor Beginn der Globalischämie über den Seitenarm der LD-Apparatur in das murine retrograd perfundierte Herz hinzugegeben. Wie in der allgemeinen Versuchsdurchführung

beschrieben sollte auch in diesem Versuch die hämodynamischen Parameter der linksventrikulären Funktion und die Infarktgröße nach 120-minütiger Reperfusion protokolliert und ausgewertet werden. Nach Beendigung der 40-minütigen Globalischämie entwickelten die murinen Herzen, die zuvor mit humanem Plasma geloadet wurden, keine auswertbaren Druckwerte. Darüber hinaus erreichten die Herzen eine Frequenz von unter 300bpm. Somit waren keine vergleichbaren Bedingungen für die Auswertung der hämodynamischen Parameter gegeben. Die Kontrollherzen konnten, wie auch in den Versuchen zuvor demonstriert, die Schrittmacherfrequenz von ungefähr 600bpm aufzeigen und entwickelten zudem ableitbare Druckwerte. Der myokardiale Schaden konnte anhand der Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung verdeutlicht werden. Die Abbildung 17 zeigt die ermittelten Infarktgrößen nach 120-minütiger Reperfusion für die Kontrollgruppe und der Plasma-Gruppe an. Die Infarktgröße entspricht hierbei den prozentualen Anteil des nekrotischen Areals an dem gesamten Herzvolumen. Die Graphik zeigt eindeutig eine erhöhte Infarktgröße bei den Herzen, die mit Plasma geloadet wurden. Dabei betrug die prozentual ermittelte Infarktgröße in der Plasma-Gruppe $78,4 \pm 4,8\%$ und lag somit höher als die Infarktgröße der Kontrollgruppe ($63,6 \pm 15,7\%$, n.s.). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass der Ladevorgang kurz vor Ischämie mit humanem Plasma keine protektive Wirkung sowohl auf die linksventrikuläre Erholung noch auf die Infarktgröße hatte. Die Hinzugabe von humanem Plasma steigerte die Infarktgröße der Herzen und beeinflusste die linksventrikuläre Funktion negativ.

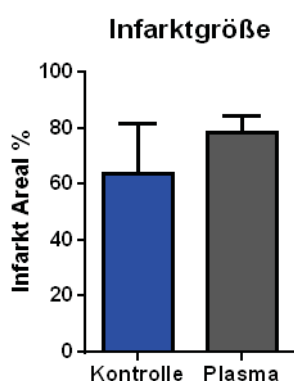


Abbildung 17: Humanes Plasma hat keine protektive Wirkung auf das LD-Herz

Die Graphik zeigt die ermittelte Infarktgröße muriner LD-Herzen mit den entsprechenden Standardabweichungen nach einer Reperfusionsdauer von 120min an. Hierbei wurden beide Gruppen einer 40-minütigen Globalischämie untersetzt. Die Kontrollgruppe wurde vor Beginn der Globalischämie mit 0,4ml KHB über den Seitenarm der LD-Apparatur perfundiert. Die Vergleichsgruppe wurde vor Beginn der Ischämie mit 0,4ml humanem Plasma geloadet. Zu erkennen ist, dass beide Gruppen keine Verbesserung der Infarktgröße erzielen konnten. Der Ladevorgang mittels humanen Plasmas, welches 6:4 (v/v) mit KHB verdünnt wurde, wies sogar eine größere Infarktgröße auf als die Kontrolle (nicht signifikant). Die Daten (n= 3-4 pro Gruppe) sind als MW±SD dargestellt. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (ungepaarter t-Test).

3.5.3. Einfluss verschiedener Hämatokrit-Werte auf den I/R-Schaden

Nachdem der vergleichbare Effekt humaner RBCs mit murinen RBCs demonstriert werden konnte, sollte nun der Einfluss verschiedener HKT-Werte humaner Erythrozyten auf den I/R-Schaden untersucht werden. Dabei sollte vor allem die Dosis–Wirkungsbeziehung für die HKT-Werte 20%, 30%, 40% und 50% ermittelt werden. Hierfür wurde gesunden Probanden venöses Blut aus der Armvene entnommen und in mehreren Zentrifugationsschritten gewaschen (vgl. Kapitel: 2.5). Die gewonnenen Erythrozyten wurden jeweils durch Vermischung mit KHB auf die HKT-Werte 20%, 30%, 40% und 50% eingestellt. So wie in den vorigen Versuchen erfolgte die Messung derselben hämodynamischen Parameter und der Infarktgröße. Die Ergebnisse der Messwerte sind in Abbildung 18A-F dargestellt. Hierbei wurden die hämodynamischen Parameter: LVDP, koronare Flussrate, $+dp/dt$ und $-dp/dt$ als prozentualer Anteil der präischämischen Baseline- Werte ermittelt und mit den dazugehörigen Standardabweichungen graphisch dargestellt. Der LVEDP wurde als absoluter Wert ermittelt und die Infarktgröße als prozentualer Anteil am gesamten Volumen des rechten und linken Ventrikels ausgemessen. Dabei entsprechen die Parameter den aufgezeichneten Werten nach 60-minütiger Reperfusionsphase, die der Globalischämie folgte. Um die Infarktgröße zu bestimmen, wurden die LD-Herzen auch hier nach 120 Minuten Reperfusion entnommen. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass alle HKT-Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant reduzierte Infarktgröße aufwiesen (vgl. Abb. 18E). Dabei zeigte die hRBCs HKT 30%-Gruppe mit einem gemessenen Infarktareal von $17,46 \pm 7,05\%$ die geringste Infarktgröße auf und unterschied sich signifikant von der Kontrollgruppe ($17,46 \pm 7,05\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$, $p < 0,001$). Die Infarktgröße für die hRBCs HKT 40%-Gruppe ergab signifikant einen geringeren prozentualen Anteil als die Kontrollgruppe ($23,5 \pm 9,9\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$, $p < 0,01$). Außerdem ist der Abb. 18E zu entnehmen, dass die Kontrollgruppe mit einem Infarktareal von $49,8 \pm 14,6\%$ signifikant höher als die hRBCs-Gruppen mit einem Hämatokrit-Wert von 20% und 50% lag ($22,2 \pm 4,1\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$ und $21,20 \pm 4,37\%$ vs. $49,8 \pm 14,6\%$, $p < 0,01$). Bezüglich der koronaren Flussrate zeigte die Gruppe mit einem eingestellten HKT von 30% als einzige einen signifikant höheren Wert als die Kontrollgruppe ($116,3 \pm 25,2\%$ vs. $65,4 \pm 22,2\%$, $p < 0,05$). Darüber hinaus konnte auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit HKT-Werten 30% und 50% bezüglich der ermittelten koronaren Flussrate gezeigt werden ($116,3 \pm 25,2\%$ vs. $58,5 \pm 17,2\%$, $p < 0,05$). Für die LVEDP-Werte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 18B). Die weiteren

hämodynamischen Parameter LVDP, $-dp/dt$ und $+dp/dt$ zeigten einen ähnlichen Trend, welche in der Abbildung 18 graphisch verdeutlicht wird. Hierbei ergab der linksventrikulär entwickelte Druck LVDP bei der hRBCs HKT 40%-Gruppe einen signifikant höheren Recoverywert mit $63,9 \pm 18,6\%$ als die hRBCs-Gruppe mit HKT von 20% ($63,9 \pm 18,6\%$ vs. $37,7 \pm 8,2\%$, $p < 0,05$) und der Kontrollgruppe ($63,9 \pm 18,6\%$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,001$). Einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle konnte auch durch die hRBCs HKT 30%-Gruppe erzielt werden ($59,8 \pm 13,3\%$ vs. $23,9 \pm 6,9\%$, $p < 0,01$). Neben den LVDP konnte auch für den Recoverywert der minimalen Druckgeschwindigkeit ($-dp/dt$) ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe für die Gruppen hRBCs HKT 30% und 40% nachgewiesen werden. Hierbei entsprach der gemittelte Recoverywert der minimalen Druckgeschwindigkeit für die hRBCs HKT 40%-Gruppe $59,5 \pm 19\%$ und lag somit signifikant höher als die Werte der Kontrollgruppe ($59,5 \pm 19\%$ vs. $21,1 \pm 5,3\%$, $p < 0,001$). Die hRBCs mit einem HKT von 30% erreichten $52,9 \pm 13,3\%$ der präischämischen $-dp/dt$ Baseline-Werte in der 60-minütigen Reperfusionphase. Dies lag signifikant höher als die erreichten Recoverywerte der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 18D, $p < 0,05$). Ähnliche Unterschiede wie für die minimale Druckgeschwindigkeit konnte auch durch die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit $+dp/dt$ gezeigt werden (vgl. Abb. 18C+D). Die murinen Herzen, die mit einem HKT von 40% beladen wurden, konnten einen $+dp/dt$ -Recoverywert von $72 \pm 24,1\%$ erzielen und lagen signifikant höher als die Kontrollgruppe, die im Mittel $31,1 \pm 14,97\%$ der präischämischen $+dp/dt$ Baseline- Werte erreichten ($72 \pm 24,1\%$ vs. $31,1 \pm 14,97\%$, $p < 0,01$). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Ladevorgang von hRBCs kurz vor Beginn der Globalischämie in allen untersuchten HKT-Werten einen reduzierenden Effekt auf die Infarktgröße aufwies. Im Gegensatz zur Infarktgröße konnten nicht alle untersuchten HKT-Werte einen protektiven Effekt auf die linksventrikuläre Funktion nach 60-minütiger Reperfusion zeigen. Hier konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt gezeigt werden. Dabei erzielte das Einbringen humaner Erythrozyten mit einem nahezu physiologischen HKT-Wert von 30-40% eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach 60 Minuten Reperfusion. Weder eine höhere Konzentration (HKT=50%) an Erythrozyten noch eine niedrigere Konzentration (HKT=20%) konnten die linksventrikuläre Funktion signifikant gegenüber der Kontrolle positiv beeinflussen.

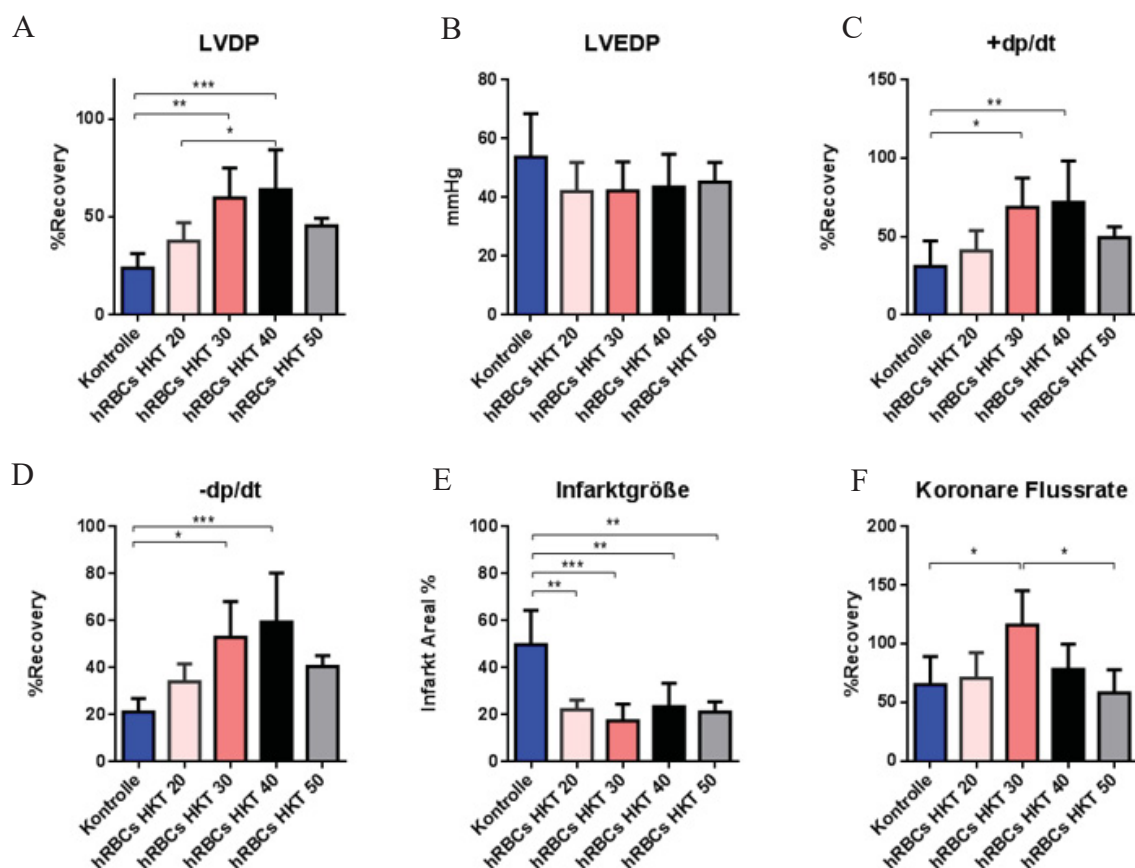


Abbildung 18: Dosis- Wirkungsbeziehung verschiedener HKT-Werte humaner RBCs auf den I/R-Schaden

Die aufgeführten Graphen zeigen die ermittelten Ergebnisse für hRBCs mit den HKT-Werten von 20%, 30%, 40% sowie 50% im Rahmen des I/R-Schadens. Hierbei wurden die verschiedenen HKT-Werte durch Suspension von hRBCs mit KHB hergestellt. Die Kontrollherzen wurden nur mit KHB perfundiert. Die Recoverywerte entsprechen dem prozentualen Anteil der präischämischen Baseline-Werte. Zu erkennen ist, dass die Infarktgröße durch Perfusion mit 0,4ml einer KHB-hRBCs Suspension unabhängig des HKT-Wertes eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle zeigt (Abb. 18E). Die linksventrikuläre Funktion zeigt signifikant verbesserte Werte in den Gruppen mit einem HKT von 30% und 40 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 18A). Zudem weist die Gruppe hRBCs HKT 40% eine bessere Erholung des LVDP auf als die hRBCs HKT 20%.

hRBCs=humane Erythrozyten, KHB=Krebs-Henseleit Puffer, HKT=Hämatokrit, LVDP=linksventrikulär entwickelter Druck, LVEDP=linksventrikulär enddiastolischer Druck, $\pm dp/dt$ =positive, negative erste Ableitung des linksventrikulären Druckes. Die Daten (n= 4-6 pro Gruppe) sind als MW $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind dargestellt (one-way ANOVA). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.6. Blutgasanalyse der LD-Herzen

Durch das Einbringen einer 0,4ml Erythrozyten-KHB Suspension konnte in den Versuchen eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach einer 60-minütigen Reperfusionsphase sowie eine Reduzierung der Infarktgröße nach 120 Minuten

Reperfusion nachgewiesen werden. Um zu klären, ob der kardio-protective Effekt der RBCs bedingt des vermehrten Sauerstoffangebots ist, wurden Blutgasanalysen durchgeführt. Dabei erfolgte die BGA der RBC-KHB Suspensionen und der Kontrolle mit KHB vor dem Einbringen in die LD-Apparatur und nach Reperfusion durch das Herz. Für die Durchführung wurden die gewaschenen hRBCs mit KHB auf einen HKT-Wert von 40% verdünnt und ein Teil wurde für die BGA entnommen (vgl. Material und Methoden 2.8). Nach Perfusion der RBC-KHB Suspension oder der KHB-Lösung durch die murinen Koronargefäße erfolgte das Auffangen des Effluates für eine weitere Messung. Über diese beiden Messwerte konnte schließlich die Sauerstoffextraktion (DO_2) berechnet werden. Dafür wurde die Differenz von dem errechneten Sauerstoffgehalt vor und nach Perfusion gebildet. Die Messung der sO_2 und des Hb-Wertes erfolgte jeweils für die RBC-KHB Suspension vor und nach Perfusion. Die ermittelten Ergebnisse vor und nach Perfusion wurden in Abbildung 19 graphisch dargestellt und miteinander verglichen. Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass der paO_2 in der KHB-Gruppe eindeutig höher lag als in der RBC-KHB-Gruppe. Dabei betrug der durchschnittliche paO_2 vor Perfusion in der KHB-Lösung $434 \pm 17,9 \text{ mmHg}$ und lag signifikant höher als in der RBC-KHB-Gruppe ($73,8 \pm 17,2$ vs. $434 \pm 17,9 \text{ mmHg}$ $p < 0,0001$). Nach der Perfusion sank der Wert signifikant in der Kontrollgruppe auf $187,3 \pm 21,5 \text{ mmHg}$ ($p < 0,001$). In der RBC-KHB-Suspension sank der Wert nach der Perfusion auf $44,6 \pm 5,5 \text{ mmHg}$ (ns). Der Wert lag nach Perfusion mit KHB signifikant höher als mit RBC-KHB ($187,3 \pm 21,5 \text{ mmHg}$ vs. $44,6 \pm 5,5 \text{ mmHg}$, $p < 0,01$). Im Gegensatz zum paO_2 , bei der die einfache KHB-Lösung signifikant höhere Werte aufwies als die Vergleichsgruppe mit RBC-KHB, zeigte der errechnete cO_2 deutlich höhere Werte in der RBC-KHB-Gruppe als in der Kontrollgruppe. Hierbei lag der Wert für den cO_2 -Wert vor der Perfusion ($cO_{2\text{vor}}$) im Mittel bei $13,1 \pm 1,6 \text{ ml/dl}$ und fiel nach Perfusion signifikant auf $8,9 \pm 3,2 \text{ ml/dl}$ ($p < 0,0001$). Der ermittelte $cO_{2\text{vor}}$ -Wert in der RBC-KHB-Gruppe war signifikant höher als in der KHB-Gruppe ($13,1 \pm 1,55 \text{ ml/dl}$ vs. $1,5 \pm 0,2 \text{ ml/dl}$, $p < 0,0001$). Auch nach Perfusion lagen die cO_2 -Werte der RBC-KHB-Gruppe im Mittel signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($8,9 \pm 3,1 \text{ ml/dl}$ vs. $0,6 \pm 0,1 \text{ ml/dl}$, $p < 0,0001$). Somit konnten signifikante Unterschiede im cO_2 zwischen KHB und der RBC-KHB-Suspension sowohl vor als auch nach Perfusion nachgewiesen werden. Die weiteren Messungen zur Bestimmung des Hb-Wertes und der sO_2 bei der RBC-KHB-Suspension zeigten, dass sowohl der Hb-Wert als auch der sO_2 vor Perfusion signifikant höher waren als nach Perfusion durchs LD-Herz. Dabei nahm der Hb-Wert von $10,7 \pm 0,9 \text{ g/dl}$ auf $7,3 \pm 1,5 \text{ g/dl}$ ab (vgl. Abb. 19, $p < 0,01$). Eine Abnahme zeigte sich auch bei

der sO₂. Hier betrug der Wert vor Perfusion durchschnittlich 91,1%±6,1% und fiel nach Perfusion auf 77,5±8,1% (vgl. Abb. 19, p<0,05).

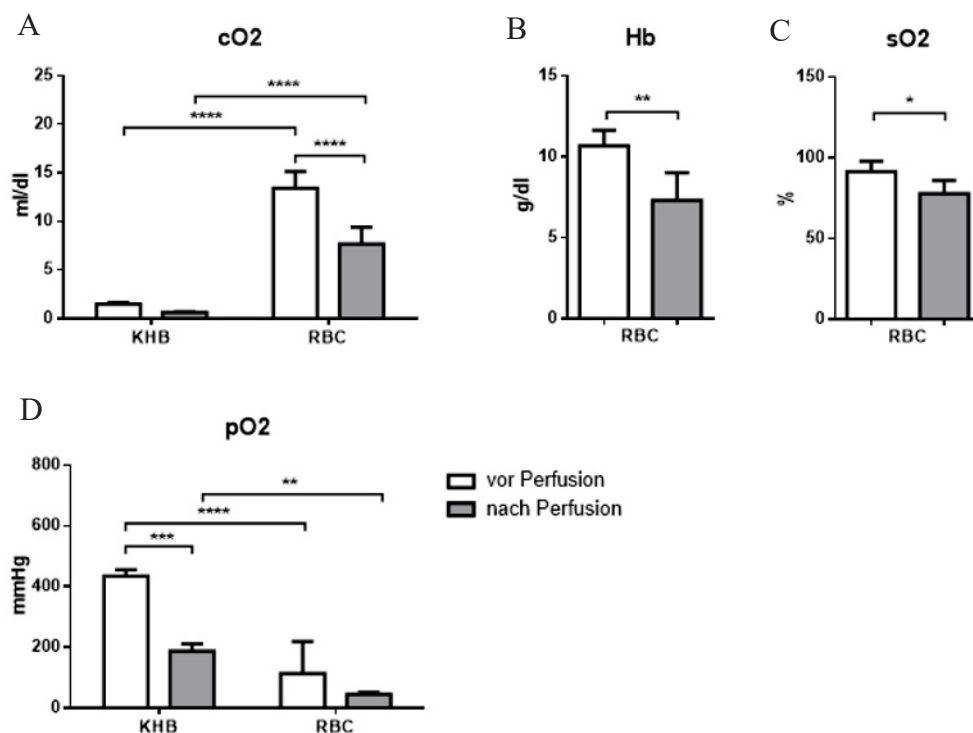


Abbildung 19: Die Perfusion mittels RBCs steigert die Sauerstoffzufuhr im Vergleich zu KHB

Die abgebildeten Graphen zeigen verschiedene Parameter, die mit dem Blutgasanalysator (*Radiometer, ABL800 FLEX*) gemessen wurden. Hierbei wurde der cO₂ mit der Berechnungsformel: $cO_2 = sO_2 \times Hb [g/dl] \times 1.34 [ml/g] + pO_2 [mmHg] \times 0.0031 [l/mmHg \cdot ml/dl]$ errechnet. Die Messungen erfolgten jeweils vor und nach Perfusion der Versuchsherzen mit einer RBC-KHB Suspension oder einer reinen KHB Lösung. Die RBC-KHB Suspension entsprach einem HKT von 40%. Der pO₂ sowie der Hb-Wert und die sO₂ wurden mit dem Blutgasanalysator ermittelt. Die Graphen verdeutlichen, dass die Perfusion mit RBCs einen höheren Sauerstoffgehalt aufweist als die einfache Perfusion mit KHB. Darüber hinaus wird angezeigt, dass der pO₂ der RBC-KHB Suspension deutlich geringer ist als in der einfachen KHB-Lösung. Die sO₂ und der Hb-Wert sinken signifikant nach Perfusion der LD-Herzen mit RBC-KHB Suspension.

cO₂=Sauerstoffgehalt, sO₂=Sauerstoffsättigung, pO₂=Sauerstoffpartialdruck, Hb=Hämoglobin, HKT=Hämatokrit, RBC=Erythrozyten, KHB=Krebs-Henseleit Puffer. Die Daten (n= 5-7 pro Gruppe) sind als MW±SD dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind dargestellt (ungepaarter t-Test oder one-way ANOVA). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die RBC-KHB Suspension im Vergleich zur KHB-Lösung einen höheren cO₂ sowohl vor als auch nach Perfusion aufweist. Hierbei konnte nur in der RBC-KHB Suspension eine signifikante Abnahme nach Perfusion demonstriert werden. Diese Abnahme konnte durch die Berechnung der DO₂ verdeutlicht

werden. Die errechneten Differenzen zwischen $cO_{2\text{vor}}$ und $cO_{2\text{nach}}$ wurden zur Veranschaulichung in Abbildung 20 dargestellt. Dabei zeigt die Abbildung 20 eindeutig, dass die DO_2 im LD-Herzen nach Perfusion mit einer RBC-KHB Suspension um das Fünffache höher war als nur mit KHB. Die ermittelte DO_2 lag in der RBC-KHB Gruppe mit $5,9 \pm 1,7 \text{ ml/dl}$ signifikant höher als in der Kontrollgruppe, die im Mittel einen Wert von $0,9 \pm 0,2 \text{ ml/dl}$ erzielen konnte (vgl. Abb. 20, $p < 0,001$).

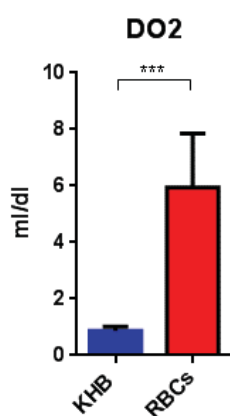


Abbildung 20: Die Sauerstoffextraktion im LD-Herzen nach Perfusion mit KHB und RBCs

Der abgebildete Graph zeigt die errechnete Sauerstoffextraktion (DO_2) nach Perfusion mit einer RBC-KHB Suspension (HKT=40%) oder nur mit KHB an. Dabei wurden vor dem Ladevorgang der cO_2 der RBC-KHB Suspension und der KHB Lösung ermittelt. Nach Einbringen und Perfusion der murinen Herzen an der Langendorff-Apparatur, wurde das Effluat eingefangen. Die DO_2 errechnet sich aus der Differenz der Sauerstoffgehalte vor und nach Perfusion der LD-Herzen: $DO_2 = cO_{2\text{vor}} - cO_{2\text{nach}}$. Die dargestellten Werte zeigen eindeutig eine bis zu sechs Fach höhere Sauerstoffextraktion nach Perfusion mit RBC-KHB Suspension. RBCs=Erythrozyten, KHB=Krebs-

Henseleit Puffer. Die Daten ($n = 5-6$ pro Gruppe) sind als $MW \pm SD$ dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind dargestellt (ungepaarter t-Test). *** $p < 0,001$.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit dient der Charakterisierung und Etablierung eines *ex vivo* Transfer-Modells an der LD-Apparatur, zur Untersuchung der Zell-Zell Interaktionen im kardialen I/R-Schaden.

Als Ausgangspunkt der durchgeführten Versuche dienen die Arbeiten von Yang et al. (2013), in denen erstmals in einem neuen Ansatz murines Blut kurz vor Beginn der Globalischämie in die LD-Apparatur eingebracht wurde. Nach Ende der Globalischämie erfolgte die weitere Perfusion mit KHB (Yang et al., 2013). Da die Perfusion mit Blut nur kurz vor der Ischämie-Phase stattfindet, werden geringere Blutmengen benötigt. Zudem wird das Problem der Hämolyse gemindert. Da diese Methode einen geeigneten Ansatz zur Untersuchung der zellulären Interaktionen zwischen Kardiomyozyten und verschiedenen Blutbestandteilen darstellt, wird diese in der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert und weiterentwickelt. Anders als in den Arbeiten von Yang et al. werden in dieser Dissertation histologische Analysen und Hämoglobin-Messungen gemacht, um zu zeigen, dass die eingebrachten Blutbestandteile während der Globalischämie auch tatsächlich in den Koronargefäßen verbleiben und wie schnell diese in der Reperfusionsphase ausgewaschen werden. Zudem wird in der vorliegenden Arbeit nicht nur der Einfluss von Vollblut und RBCs auf den kardialen I/R-Schaden untersucht, sondern auch von PRP und Plasma. Weiterhin wird überprüft, ob der kardio-protective Effekt der RBC-KHB Suspension von dem HKT-Wert abhängt. Mittels Blutgasanalysen soll dabei auch der Einfluss des Sauerstoffgehaltes untersucht werden.

4.1. Die optimale Ischämie-Dauer

Zunächst wurde die optimale Ischämie-Zeit bestimmt. Dabei erfolgten Messungen durch Variierung der Ischämie-Dauer zwischen 30 und 45 Minuten. Ziel war es, sowohl positive als auch negative Einflüsse der Ischämie auf die linksventrikuläre Funktion und die Ischämie-Größe zu untersuchen. Arbeiten anderer Arbeitsgruppen konnten in Versuchen demonstrieren, dass eine Ischämie-Dauer von 5 bis 20 Minuten zu einer transienten kontraktilen Dysfunktion des Myokards führt (Heyndrickx et al., 1975, Klone et al., 1998). Diese reversible Funktionseinschränkung wird myokardiales *stunning* genannt. Myokardiales *stunning* ist eine postischämische kontraktile Dysfunktion des Myokards, welche nach Einleitung der Reperfusion trotz fehlender irreversibler Schädigung bei regelrechter koronarer Durchblutung anhält (Klone et al., 1998). Pathophysiologisch wird

die entstehende reversible kontraktile Dysfunktion durch den gesteigerten intrazellulären Calcium-Gehalt, der Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums und durch den oxidativen Stress während der Reperfusion erklärt (Klone et al., 1998, Bolli, 1990). Laut Wang et al (2001) führt eine längere Ischämie-Dauer von mehr als 45min zur Verschlimmerung des myokardialen Schadens, welcher eine gesteigerte Kreatinkinase Freisetzung und eine Abnahme der linksventrikulären Recoverywerte verursacht. Der maximal erreichte Schaden konnte bei einer Ischämie-Dauer von 60min erzielt werden. Hierbei konnte der Recoverywert von $+dP/dt$ auf Werte nahezu 0 gesenkt werden (Wang et al., 2001). Aufgrund der genannten Ergebnisse vorheriger Arbeiten erfolgen im weiteren Verlauf dieser Dissertation keine Untersuchungen für die Ischämie-Zeiten zwischen 5-20min sowie 50-60min. Die Ergebnisse von Xu et al. (2005) konnten in einem Maus-Modell zeigen, dass die Infarktgröße durch den Verschluss des Ramus interventricularis anterior (RIVA) zwischen 30-45min am schnellsten ansteigt. Anhand dieser Beobachtung stellte die Forschungsgruppe fest, dass zur Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Infarktgröße, die Ischämie-Zeit zwischen 30 und 45min liegen sollte (Xu et al., 2005). Da in den Versuchen dieser Arbeit sowohl positive als auch negative Effekte nachgewiesen werden sollen, wurden Ischämie-Zeiten zwischen 30 und 40min untersucht. Hierbei konnte durch eine Ischämie-Dauer von 40min eine Erholung der linksventrikulären Funktion auf ca. 50% der Ausgangswerte und eine Infarktgröße von ca. 50% erreicht werden. Die morphologische Veränderung der Versuchsherzen nach 30min und 40min führte dabei zu keiner messbaren Beeinträchtigung der hämodynamischen Parameter.

4.2. Histologischer Nachweis der eingebrachten Blutzellen

Der Ladevorgang sowohl muriner als auch humaner Blutbestandteile erfolgte über den Seitenarm der LD-Apparatur und führte über die Aorten-Kanüle in die Koronargefäße muriner Versuchsherzen. Die histologischen Aufnahmen konnten beweisen, dass kurz vor Beginn der 40-minütigen Globalischämie 0,4ml Blut ausreichten, um die Koronargefäße zu füllen. Die Mehrzahl der angefertigten histologischen Schnittbilder zeigte, dass sich die Koronargefäße nach dem Ladevorgang mit Blut füllten. Dass dies nur für die Mehrzahl, nicht jedoch für alle Gefäße zutreffend war, kann unter anderem mit der koronaren Flussreserve der Koronargefäße begründet werden (Muessig et al., 2019). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass das murine Modell an der LD-Apparatur dazu geeignet ist, die koronare Flussreserve sowie die koronarvaskuläre Funktion zu untersuchen (Reichelt et al., 2009). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit

demonstriert werden. Nach einer Stabilisierungsphase von 20min wurde die koronare Flussreserve nach Einleitung einer Kurzschämie überprüft (vgl. Material und Methoden 2.2.3). Durch Initiierung einer reaktiven Hyperämie konnte dabei der koronare Fluss auf Spitzenwerte über 60% gesteigert werden. Dies konnten auch Reichelt et al. (2009) in dem isoliert-perfundierten Mausmodell mittels pharmakologischer und physiologischer Stimulation demonstrieren.

Der Ladevorgang mit 0,4ml Blut erfolgte in der vorliegenden Dissertation nicht unmittelbar nach Initiierung der reaktiven Hyperämie, sondern nach einer 5-minütigen Erholungsphase.

Einen weiteren Beweis, dass die eingebrachten Erythrozyten während einer 40-minütigen Globalischämie im Herzen verblieben sind, konnten die Untersuchungen des Effluats liefern. In diesem konnten die Erythrozyten-Anzahl, der Hb-Wert sowie der HKT nachgewiesen werden (vgl. 3.3). Dies zeigt, dass unter den genannten Bedingungen Zell-Zell Interaktionen in den Koronargefäßen möglich sind.

4.3 Kardio-protektiver Effekt von Blutbestandteilen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch das Einbringen muriner Blutbestandteile (PRP, Plasma, RBCs) ein kardio-protektiver Effekt auf den I/R-Schaden erzielt werden konnte. Dabei konnten durch den Ladevorgang mit murinen RBCs nach 40-minütiger Globalischämie die Infarktgröße sowie die linksventrikulären Parameter (LVDP, $\pm dp/dt$, und LVEDP), im Vergleich zur Kontrollgruppe mit KHB, signifikant verbessert werden. Dass die RBCs einen kardio-protektiven Effekt auf den I/R-Schaden ausüben, konnte auch durch vorherige Untersuchungen nachgewiesen werden (Yang et al., 1996, Yang et al., 1994). Einer der Gründe, warum der Ladevorgang mit Erythrozyten zur signifikanten Verbesserung sowohl der linksventrikulären Funktion als auch der Infarktgröße führt, konnte durch die Ergebnisse der BGA ermittelt werden. Hierbei konnte eine bis zu sechsfach höhere Sauerstoffextraktion bei den murinen Herzen erzielt werden, die zuvor mit einer RBC-KHB-Suspension behandelt wurden, als die Vergleichsgruppe mit KHB. Im Vergleich zur RBC-KHB-Gruppe zeigte die KHB-Gruppe einen signifikant geringeren cO_2 -Wert und einen höheren paO_2 -Wert. Dies konnte auch in anderen Versuchen nachgewiesen werden (Mouren et al., 2010). Es ist bekannt, dass das Verhältnis von paO_2 zu cO_2 in kristalloider Lösung linear ist. Im Gegensatz dazu verhält sich paO_2 zu caO_2 bei der RBC-KHB Suspension sigmoidal (Mouren et al., 2010). Dass die Sauerstoffsättigung des Myoglobins im isoliert-perfundierten LD-Herzen empfindlich auf

Veränderungen des Sauerstoffangebotes reagiert, konnte bereits durch andere Arbeiten gezeigt werden. Bei einer 5-prozentigen RBC-Konzentration im Perfusat konnte in den Versuchen die Myoglobin-Sauerstoffsättigung und die kardiale Funktion der LD-Herzen im Vergleich zur KHB-Perfusion verbessert werden (Schenkman et al., 2003). In einem mikrovaskulären Transport-Modell konnte am isoliert perfundierten Herzen gezeigt werden, dass durch Perfusion mit Puffer ungefähr 20% des myokardialen Gewebes hypoxisch war (Beard et al., 2003). Versuche mit Hb-haltigen Perfusaten konnten verdeutlichen, dass die myokardiale Sauerstoffaufnahme der LD-Herzen höher war als die Perfusion mit KHB (MacDonald & Winslow, 1992). Durch Zugabe von RBCs konnte bereits in vorherigen Arbeiten die mechanische und elektrische myokardiale Funktion verbessert werden (Galiñanes et al., 1996, Schenkman et al., 2003). Mouren et al. zeigten, dass bei erhöhtem myokardialen Sauerstoffbedarf nach Gabe von Isoproterenol die RBC-KHB Perfusion eine deckende Sauerstoffversorgung des Myokards gewährleistet (Mouren et al., 2010). Die höhere Sauerstofftransportkapazität der RBCs und die dadurch verbesserten aeroben Bedingungen im Herzen vor Globalischämie könnten den protektiven Effekt, im Vergleich zur Kontrollgruppe, bedingen. Neben der Aufgabe als Sauerstofflieferant werden den RBCs jedoch mehrere weitere protektive Effekte im Rahmen des I/R-Schadens zugesprochen.

Dass RBCs einen kardio-protektiven Effekt im myokardialen I/R-Schaden aufweisen, konnte neben der vorliegenden Dissertation auch in weiteren Arbeiten gezeigt werden. In einem Langendorff-basierten I/R-Modell an Ratten konnte eine Verbesserung der myokardialen Funktion durch RBCs erzielt werden. Hierfür wurden die isolierten Herzen 10 Minuten vor Einleitung einer 40-minütigen Globalischämie und während der 30-minütigen Reperfusion mit einer RBC-KHB Suspension perfundiert. Yang et al. (1996) führten die kardio-protektive Wirkung durch RBC-Perfusion auf die NO-Freisetzung seitens der RBCs zurück (Yang et al., 1996). Aufgrund dieser Fähigkeit wirken die RBCs regulativ auf die vaskuläre Homöostase (Cortese-Krott & Kelm, 2014), denn NO wirkt nicht nur vasodilatatorisch und dadurch regulierend auf den Blutfluss und den Gefäßtonus, sondern auch hemmend auf die Thrombozyten-Aggregation, Leukozyten-Adhäsion und Migration. Dabei wirkt NO auf mehrere Blutkompartimente zugleich. Weitere Untersuchungen zeigen, dass NO auf die RBC-Verformbarkeit wirkt und dadurch einen positiven Einfluss auf die Mikrozirkulation aufweist (Horn et al., 2011, Bor-Kucukatay et al., 2003). Die regulative, transportierende, synthetisierende und speichernde Funktion der Erythrozyten wird als erythrokrine Funktion zusammengefasst. Dabei zeigen

Forschungsergebnisse von Cortese-Krott et al. (2012), dass humane RBCs eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige NOS besitzen, die ähnlich wie die endothelialen NOS (eNOS) aufgebaut ist. Die eNOS der RBCs (RBC-eNOS) trägt unter anderem zur NO-Produktion unter Normoxie bei (Cortese-Krott et al., 2012). In hypoxischen Zuständen findet die NO-Produktion wiederum durch die erythrozytäre Nitrit-Reduktase Funktion des Deoxyhämoglobins statt (Liu et al., 2015). Wood et al. (2013) konnten in einem chimären Mausmodell der RBC-eNOS eine Blutdruck-regulierende Wirkung sowie eine Mitbeteiligung an der Nitrit-Homöostase nahelegen (Wood et al., 2013). Die kardioprotektive Wirkung der eNOS im Rahmen des I/R-Schadens konnte in I/R-Versuchen an transgenen Mäusen verdeutlicht werden. Dabei wurden die Mäuseherzen *in vivo* einer akuten Ischämie von 60min Dauer ausgesetzt mit darauffolgender Reperfusion für 24h. Die Ergebnisse der Versuche zeigten, dass bei Mäusen mit fehlender eNOS in den Blutzellen die Infarktgröße wesentlich zunahm und die Ejektionsfraktion abnahm (Cortese-Krott & Kelm, 2014). Ein weiterer Aspekt der RBC-eNOS ist die Beeinflussung durch die endotheliale Dysfunktion. Es ist bekannt, dass bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die RBC-eNOS beeinträchtigt ist und dass dies mit der endothelialen Dysfunktion korreliert (Cortese-Krott et al., 2012). Interessanterweise wird die RBC-eNOS in der Funktion indirekt durch das Enzym Arginase kontrolliert. Dabei konkurriert Arginase mit der eNOS um dasselbe Substrat L-Arginin. Yang et al. (2013) konnten die kardioprotektive Wirkung der Arginase-Inhibition in einem I/R-Modell an der LD-Apparatur demonstrieren. Die Gruppe konnte zeigen, dass durch Inhibierung der erythrozytären Arginase die linksventrikuläre Funktion der isoliert perfundierten Rattenherzen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Verbesserungen aufwies (Yang et al., 2013). Hierbei wird deutlich, dass den RBCs mehrere Aufgaben zuteilwerden. Über die Freisetzung kardio-protektiver sowie vasoaktiver Substanzen gehören RBCs zu den regulativ wirksamen Blutzellbestandteilen im kardiovaskulären System. Besonders ist auch, dass RBCs nicht nur Sauerstoff und Nährstoffe liefern, sondern auch als Sauerstoff-Sensor fungieren. In hypoxischen Verhältnissen und bei niedrigem pH-Wert setzen RBCs über Sauerstoff-unabhängige Mechanismen ATP frei. ATP wirkt über Aktivierung des endothelialen Purinrezeptors P2Y2 vasodilatatorisch (Gopalakrishnan & Saurabh, 2014, Dietrich & Ellsworth, 2000). Yang et al. (1996) zeigten, dass die RBCs eine wichtige antioxidative Funktion im Rahmen des I/R-Schadens aufweisen. Dies ist unter anderem auf den hohen Anteil der antioxidativen Enzyme wie der Superoxiddismutase, der Katalase und der Glutathionperoxidase (GP) zurückzuführen (Brown et al., 1989, Girelli et al.,

1992, Yang et al., 1996). Interessanterweise zeigten sich bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit geringere Werte der erythrozytären GP (Blankenberg et al., 2003). Somit wird eine weitere Funktion der RBCs als antioxidativ wirksame Komponente im Rahmen des I/R-Schadens deutlich. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die RBCs über eine lösliche Guanylatcyclase (sGC) verfügen. Über den NO-Rezeptor sGC sind die RBCs in der Lage NO zu erkennen und über die Produktion des sekundären Botenstoffes zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) die zelluläre Signaltransduktion zu aktivieren. Die aktivierten Signalwege führen unter anderem zur Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und zur positiven Beeinflussung der kardialen Kontraktilität und der vaskulären Funktion (Cortese-krott et al., 2018).

Da die sGC-Aktivität auch bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion und koronarer Herzkrankheit nachweisbar ist, eignet sie sich besonders zur Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten (Cortese-krott et al., 2018). In der vorliegenden Dissertation konnte ein weiterer wichtiger Aspekt der kardio-protectiven Wirkung der RBCs verdeutlicht werden. Durch Variierung des Hämatokrits konnte die dosisabhängige Wirkung der RBCs verdeutlicht werden. In den durchgeführten Versuchen konnte der positive Effekt auf die Infarktgröße unabhängig von der RBC-Konzentration nachgewiesen werden. Die linksventrikuläre Funktion wiederum zeigte eine konzentrationsabhängige Wirkung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen HKT-Werte im physiologischen Bereich zwischen 30-40% signifikante Verbesserungen der linksventrikulären hämodynamischen Parameter auf. Die HKT-Werte von 20% und 50% führten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner Verbesserung der hämodynamischen Parameter. Wie bereits beschrieben ist ein HKT von 5% für eine vollständige Oxygenierung der LD-Herzen ausreichend. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass die Perfusion bei einem HKT von 50% nicht zur Besserung der linksventrikulären Funktion führen konnte, lassen vermuten, dass die Sauerstoffversorgung allein nicht für den protectiven Effekt verantwortlich ist. Möglicherweise führen höhere HKT-Werte aufgrund der erhöhten Blutviskosität zur Beeinträchtigung der Flussbedingungen im Koronarsystem muriner Herzen. Eine weitere Ursache könnte die RBC-Aggregation darstellen, welche im akuten Myokardinfarkt beeinflusst wird. Untersuchungen bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt konnten eine gesteigerte RBC-Aggregation nachweisen (Deepthi et al., 2014). Ob eine hohe RBC-Konzentration im Rahmen einer Ischämie zur Beeinträchtigung der RBC-Aggregation sowie der Mikrozirkulation im Laufe der Reperfusion führt, wird in dieser Dissertation nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen jedoch die Bedeutung

physiologischer HKT-Werte für die Erforschung RBC-vermittelter (patho)physiologischer Prozesse am Herzen. Bisherige Versuche am isoliert perfundierten Herzen wurden mit unphysiologischen HKT-Werten durchgeführt (Gillis et al., 1996). Aufgrund kostengünstigerer Herstellung stellen die RBC-KHB Suspensionen mit niedrigen HKT-Werten eine mögliche Alternative zu herkömmlichen Verfahren dar. Jedoch führt die kontinuierliche RBC-KHB Perfusion im Laufe der Koronarperfusion zur Hämolyse. Durch die in dieser Arbeit vorgestellte LD-Methode ist es möglich, mit geringeren Blutmengen und physiologischen HKT-Werten Versuche durchzuführen. Somit können Probleme der Hämolyse vermieden werden. Durch die geringeren Blutmengen können die schwierigen Präparationsvorgänge herkömmlicher LD-Modelle umgangen werden. Zudem kann auf Spendertiere, die für eine kontinuierliche Blutversorgung des isoliert perfundierten Herzen sorgen, verzichtet werden. Die Untersuchungen der verschiedenen HKT-Werte zeigen, dass eine physiologische RBC-Konzentration wichtig für die Erforschung der myokardialen Funktion im Rahmen des I/R-Schadens ist. Zukünftige Versuche mit niedrigen RBC-Konzentrationen sollten dies in der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigen.

Zusammenfassend wirken die Erythrozyten aufgrund des Zusammenspiels mehrerer Faktoren kardio-protectiv. Durch die etablierte Methode konnte in dieser Dissertation der positive Effekt von 0,4ml RBC-KHB-Suspension auf die linksventrikuläre Funktion und die Infarktgröße demonstriert werden. Eine Ursache hierfür könnte die vermehrte Sauerstofftransportkapazität der RBCs im Vergleich zum KHB sein. Durch die einfache Ausführung und der geringen Menge an Blutbestandteilen eignet sich die hier untersuchte Methode, um weitere Ursachen der RBC-vermittelten kardio-protectiven Wirkung zu erforschen. In der vorliegenden Arbeit konnten dieselben kardio-protectiven Effekte auch durch das Einbringen humaner RBCs von gesunden, jungen Spendern in murine Herzen erzielt werden. Die Endpunkte des Bio-Assays (Infarktgröße und linksventrikuläre Funktion) zeigten signifikant verbesserte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die etablierte LD-Methode dafür geeignet ist, humane RBCs in murine Herzen des LD-Systems einzubringen. Es können Blutzellen gesunder Spender mit Blutzellen von Spendern mit metabolischen oder kardiovaskulären Erkrankungen verglichen werden. Zusätzlich können pharmakologische *in vivo* Vorbehandlungen an den Blutzellen durchgeführt und die Wirkungen auf die Endpunkte des Bio-Assays untersucht werden. Hierdurch kann der Effekt für verschiedene Substanz-Konzentrationen ermittelt und eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden. Das Besondere

hierbei ist, dass durch die geringe Blutmenge mehrere Versuche mit den Blutprodukten desselben Patienten durchgeführt werden können. Die Tatsache, dass die ermittelten Ergebnisse mit humanen RBCs vergleichbar mit denen für murine RBCs sind, verdeutlicht die kaum nachweisbare immunologische Reaktion. Die humanen RBCs scheinen in dem Ladevorgang und in der geringen Menge keine immunologische Reaktion im murinen Koronarsystem auszulösen. Dies wiederum konnte nicht für das Einbringen von humanem Plasma gezeigt werden. Hierrunter entwickelten die murinen LD-Herzen nach 40-minütiger Globalischämie keine ableitbaren Drücke. Die erwünschte Herzfrequenz von 600bpm konnten die Herzen nicht erreichen. Die ermittelte Infarktgröße nach 120-minütiger Reperfusion betrug dabei ungefähr 80%. Dies hingegen verdeutlicht, dass die kardio-protective Wirkung, welche durch murines Plasma erzielt wurde, nicht auf den Transfer von humanem Plasma zutrifft. Vermutlich kommt es bedingt einer immunologischen Reaktion, welche durch im Plasma vorhandene humorale Faktoren ausgelöst werden, zur Schädigung des murinen Herzens. Diese Beobachtung sollte bei zukünftigen Versuchen mit humanem Plasma zum Beispiel nach *Remote ischemic preconditioning* (RIPC) berücksichtigt werden. Im Gegensatz zum humanen Plasma wiesen die Ergebnisse mit murinem Plasma einen kardio-protectiven Effekt auf. Das Einbringen von murinem Plasma kurz vor Einleitung der Globalischämie konnte den LVDP und $-dp/dt$ Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessern. Zudem konnte die Infarktgröße nach Gabe von murinem Plasma signifikant reduziert werden. Dass die Gabe von Plasma einen protectiven Effekt im Rahmen des I/R-Schadens aufweist, konnte auch in anderen Versuchen demonstriert werden. Zhao et al. (2017) konnten in einem *in vivo* Ratten-Modell zeigen, dass nach Gabe von 2ml Plasma sowie von Plasma nach RIPC, die Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Kochsalzlösung signifikant reduziert werden konnte. Dabei erfolgte die Plasma-Gabe eine und 24 Stunden vor Einleitung der 30-minütigen Ischämie. Hierbei wurde in einem *in vivo* Modell der RIVA okkludiert und anschließend für 120min wiedereröffnet. Die Infarktbestimmung erfolgte wie auch in unseren Versuchen nach 120-minütiger Reperfusion. Eine Gabe von 2ml Plasma 24 Stunden vor der Ischämie konnte eine signifikante Verkleinerung der Infarktgröße bewirken. Dies konnte sowohl durch Plasma als auch durch Plasma nach RIPC gezeigt werden. Der Effekt trat jedoch nicht bei der Gabe von Plasma eine Stunde vor der Ischämie auf (Zhao et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bereits durch Gabe von 0,4ml Plasma erzielt werden. Hierbei erfolgte der Ladevorgang kurz vor Einleitung der Ischämie. Somit konnte

gezeigt werden, dass mittels der etablierten Methode geringe Mengen an Plasma ausreichen, um einen signifikanten Effekt nachzuweisen. Warum die Plasma-Gabe jedoch eine kardio-protective Wirkung erbringen konnte, ist nicht geklärt. Möglicherweise führt die physiologische Plasmazusammensetzung aufgrund des Proteingehaltes zu weniger Ödem-Bildung. Um dies zu klären, wären weitere Versuche mit verschiedenen Plasmakonzentrationen nötig. Vorherige Untersuchungen an isoliert perfundierten Rattenherzen zeigten, dass durch Perfusion mit humanem Albumin ein kardio-protectiver Effekt im Rahmen des I/R-Schadens erzielt werden konnte. Die mit Albumin behandelten Herzen wiesen bessere linksventrikuläre Druckwerte auf. Zudem konnte durch Albumin die Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Konzentration gesenkt werden (Brown et al., 1989). Des Weiteren könnten protective Faktoren, die im Plasma vorhanden sind, verantwortlich für den beobachteten Effekt sein. Vicencio et al. (2015) konnten den kardio-protectiven Effekt des Plasmas auf die Wirkung von Exosomen zurückführen. Den kardio-protectiven Effekt führte die Gruppe auf die Interaktion zwischen dem exosomalen Hitzeschockprotein 70 und dem Toll-like Rezeptor 4 der Kardiomyozyten zurück (Vicencio et al., 2015). Neben den Exosomen im Plasma könnte auch der Nitrit-Gehalt im Plasma während der Ischämie-Phase einen positiven Effekt bedingen. Der Nitrit-Gehalt im murinen Plasma beträgt ungefähr 457 ± 51 nmol/l (Kleinbongard et al., 2003). In hypoxischen Verhältnissen und bei geringem pH-Wert wird Nitrit unter anderem durch desoxygeniertes Myoglobin und Azidose bedingter Reduktion zu NO konvertiert (Gladwin et al., 2005). Da NO im Rahmen des I/R-Schadens protectiv wirkt, könnte das Plasma-Nitrit mitverantwortlich für die hier nachgewiesenen Effekte sein. Bereits nanomolare Mengen von Nitrit sind ausreichend, um einen reduzierenden Effekt auf die myokardiale und hepatische Infarktgröße zu erzielen (Duranski et al., 2005). Der zytoprotective Effekt von Nitrit ist vor allem durch die inhibitorische Wirkung auf den ersten Komplex der Mitochondrien zurückzuführen. Hierüber wird der Reperfusionsschaden über die Verminderung der ROS-Produktion positiv beeinflusst (Shiva et al., 2007). Ob nun der Nitrit-Gehalt im Plasma oder der Einfluss von NO in der vorliegenden Arbeit einen positiven Effekt auf die Infarktgröße erzielen, steht offen. Mittels des *ex vivo* Transfermodells an der LD-Apparatur ist es jedoch möglich, diese Fragestellungen mittels pharmakologischer Vorbehandlung des Plasmas zum Beispiel mit NO Scavengern oder mittels Plasmas von Knockout-Mäusen zu untersuchen. Im Vergleich zum murinen Plasma zeigte das Einbringen von murinem PRP auch einen positiven Effekt auf die diastolische Funktion der Versuchsherzen. Der LVEDP-Wert konnte durch Gabe von murinem PRP signifikant im Vergleich zur KHB-

Gruppe gesenkt werden, was für eine Besserung der diastolischen Funktion spricht. Somit konnte ein protektiver Effekt auf die linksventrikuläre Funktion und Infarktgröße erzielt werden. Dabei konnten die Ergebnisse dieser Arbeit eine signifikante Verbesserung aller Parameter, außer der koronaren Flussrate, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit KHB aufweisen. Interessanterweise konnte auch durch 0,4ml PRP eine signifikante Reduzierung der Infarktgröße im Vergleich zum Ladevorgang mit murinem Vollblut gezeigt werden. Die positive Wirkung von PRP konnte in vorherigen Arbeiten bereits als regenerativ wirksames Mittel im Rahmen der Wundheilung bestätigt werden (Ozawa et al., 2018). Das besondere an PRP ist der hohe Gehalt an Wachstumsfaktoren. Dazu gehören unter anderem der *Platelet-derived growth factor*, die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren, der *Transforming growth factor beta* und der *Vascular endothelial growth factor* (Lee et al., 2013). Diese sind vor allem für die wundheilende Wirkung von PRP grundlegend. Zahlreiche Versuche an Sehnen (Takamura et al., 2017, Paoloni et al., 2011, Filardo et al., 2010) nach kardiochirurgischen Eingriffen (Trowbridge et al., 2005) und an Knochentransplantaten (Marx et al., 1998, Okada et al., 2016) konnten die positiven Effekte von PRP bestätigen. Darüber hinaus können die enthaltenen Wachstumsfaktoren die Angiogenese beeinflussen und hierüber positiv auf die Reperfusion wirken (Anitua et al., 2015). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse rückt PRP immer mehr in den Vordergrund der kardiovaskulären Forschung. Ob PRP auch unterstützend auf die myokardiale Heilung nach dem Infarkt wirkt, ist Frage der aktuellen Forschung.

Dass humanes PRP einen protektiven Effekt auf die linksventrikuläre Funktion nach Ligatur und nach I/R erzielt, konnte in einem murinen I/R-Modell demonstriert werden (Mishra et al., 2011). Cheng et al. (2012) konnten in einem regionalen Ischämie-Modell an Ratten den protektiven Effekt einer postischämischen intrakoronaren Platelet-Gel Injektion nachweisen. Hierbei konnte die postischämisch bedingte myokardiale Dysfunktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verringert werden. Des Weiteren konnte die Angiogenese gefördert und die myokardiale Hypertrophie gesenkt werden (Cheng et al., 2012). In einem anderen I/R-Modell an Ratten konnte mittels *nanosecond pulsed electric fields* (nsPEFs) stimuliertem PRP (nsPRP) die linksventrikuläre Funktion verbessert und die ermittelte Infarktgröße reduziert werden. Zudem zeigte sich, dass in kultivierten Myoblasten, die mit nsPRP behandelt wurden, sowohl die ROS Produktion als auch die mitochondriale Depolarisierung im Rahmen des I/R-Schades gesenkt werden können. (Hargrave & Li, 2012). Zusätzlich konnte Hargrave (2014) in einem weiteren Langendorff-basierten I/R-Modell an Kaninchenherzen den kardio-protektiven Effekt von nsPRP

aufzeigen. Die experimentellen Versuche ergaben, dass durch die Gabe von nsPEFs stimulierten PRP die linksventrikuläre Funktion sowohl zur Kontrollgruppe als auch zur Gruppe, die mittels Thrombin aktivierten PRP behandelt wurden, signifikant verbessert werden konnte (Hargrave, 2014). Dabei unterlagen die LD-Herzen einer 30-minütigen Globalischämie mit anschließender Reperfusion. Hierbei wird ersichtlich, dass die unterschiedliche Herstellung des PRP eine wesentliche Bedeutung auf die erzielte Wirkung hat. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass endotheliale Zellen, die mit nsPRP behandelt wurden, einen geringeren ROS Gehalt nach H₂O₂-Stimulation aufwiesen (Hargrave, 2014). Hargrave et al. (2015) führten den reduzierenden Effekt auf die ROS-Generierung durch nsPRP auf die gesteigerte Expression von kardio-protectiv wirksamen heat-shock Proteinen zurück (Hargrave et al., 2016). Darüber hinaus konnte an kardialen Myoblasten eine gesteigerte mitochondriale respiratorische Kapazität durch nsPRP Behandlungen nachgewiesen werden (Hargrave et al., 2016). Die Reduktion der oxidativen Stress-Marker konnte auch in einem LD-Modell an Meerschweinchen erzielt werden. Hierfür wurde aktiviertes PRP von Patienten nach akutem Myokardinfarkt verwendet (Novokmet et al., 2009). Zurzeit gibt es noch wenige klinische Studien an Menschen. Eine davon zeigte jedoch, dass die Kombination von transmyokardialer Revaskularisation und intrakoronare Injektion von PRP zu einer Verbesserung des Angina pectoris (AP) Grades und der Ejektionsfraktion bei Patienten mit AP Grad III/IV führt (Wehberg et al., 2009).

Die in unseren Ergebnissen erzielte Verbesserung des I/R-Schadens nach Behandlung des Herzens mit PRP ist also mit Literaturquellen kongruent. Jedoch ist zu beachten, dass die Gewinnungs- und Aufreinigungsverfahren von PRP untereinander variieren und aus diesem Grund die Versuche unter Vorsicht miteinander zu vergleichen sind. Es fehlt eine genauere Standardisierung der PRP-Gewinnung und Aufarbeitung (Moraes et al., 2013). Auch unterscheiden sich die Zeitpunkte der PRP-Gabe. In einem Großteil der aufgeführten Arbeiten erfolgte die PRP-Gabe nach der Ischämie vor Einleitung der Reperfusion in einem *in vivo* Modell. Hargrave et al. (2016) injizierten PRP in den linken Ventrikel mit einer Kanüle. In der vorliegenden Dissertation wurde die PRP-Gabe vor Einleitung der Ischämie in ein *ex vivo* Modell gegeben. Zudem ist die Nachbeobachtungszeit in dem von uns etablierten Modell mit 120 relativ kurz, so dass es in dieser Zeit allenfalls zur Initiierung der Wundheilung kommen kann. In dem hier untersuchten Modell wird die akute Wirkung von PRP im I/R-Schaden untersucht.

Bei Gabe von murinem Vollblut konnte im Vergleich zu den isolierten Blutbestandteilen kein additiver Effekt festgestellt werden. Dies könnte an der zusätzlichen

inflammatorischen Wirkung der Leukozyten im Vollblut liegen. Bisherige Studien zeigen, dass die Leukozyten in der Pathophysiologie des Myokardinfarktes eine wichtige Rolle spielen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Leukozyten-Gehalt als unabhängiger Prädiktor einer hohen Thrombus-Last fungiert und das Outcome nach akutem Myokardinfarkt nachhaltig beeinflusst (Liang et al., 2018). Die Reperfusion des postischämischen Areals führt zur Infiltration von Leukozyten und neutrophiler Granulozyten. Diese wiederum führen zur Freisetzung proteolytischer Enzyme und proinflammatorischer Mediatoren, die zur Schädigung des Myokards führen (Vinten-Johansen, 2004, Nahrendorf et al., 2010). Simpson et al. (1988) konnten mittels Versuche an Kaninchenherzen zeigen, dass durch den monoklonalen Antikörper (Anti-Mo1, Anti-CD11b), welcher inhibierend auf die Leukozyten Adhäsion wirkt, der I/R-Schaden reduziert werden kann. Hierbei ist der Erfolg unabhängig von der Dauer der vorherigen Ischämie (Simpson et al., 1988). In einem anderen I/R-Modell am Kaninchenherzen konnte gezeigt werden, dass das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 binnen der einstündigen Reperfusionsphase hochreguliert wird (Kukielka et al., 1993). Durch den Gebrauch von ICAM-1 KO Mäusen (Palazzo et al., 1998) oder Antikörpern gegen ICAM-1 konnte verdeutlicht werden, dass die Infiltration durch neutrophile Granulozyten ins myokardiale Gewebe gesenkt werden kann (Dorweiler et al., 2007). Der kardio-protective Effekt konnte auch mit P- und E-Selektin KO-Mäusen demonstriert werden (Kakkar & Lefer, 2004). Darüber hinaus kann die Infiltration von neutrophilen Granulozyten auch durch Obstruktion der Kapillare zum mikrovaskulären Schaden (Li et al., 2012, Kloner et al., 1991) und zur Beeinträchtigung Endothel-abhängiger sowie unabhängiger Vasodilatation führen (Kloner et al., 1991). Jedoch ist es wichtig zu betonen, dass die Leukozyten nicht nur schädigend im Rahmen des I/R-Schadens wirken, sondern eine wichtige Funktion auf die myokardiale Wundheilung haben (Liu et al., 2016). Neben den Leukozyten nehmen auch die Thrombozyten einen wichtigen Stellenwert im I/R-Geschehen ein. Im Rahmen des I/R-Schadens kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten, wodurch die Aggregation und Expression von Adhäsionsmolekülen gesteigert wird. Als Folge kommt es zur Bildung von Mikrothromben und bedingt durch die gestörte Perfusion zur endothelialen sowie myokardialen Dysfunktion (Salimi et al., 2016, Zhou et al., 2017). Wie die Leukozyten wirken auch die Thrombozyten verstärkend auf die Entstehung einer inflammatorischen Reaktion im I/R-Schaden (Henn et al., 1998). Das Zusammenwirken von Thrombozyten und Leukozyten hat die kardiale Dysfunktion im Rahmen des Reperfusionsschadens zur Folge (Lefer et al., 1998). Die Bedeutung der Interaktion zwischen neutrophilen

Granulozyten und Thrombozyten konnte durch Mauler et al. (2018) demonstriert werden. Die Gruppe verdeutlichte in einem I/R-Modell an Mäusen die interaktive Funktion von Thrombozyten. Dabei konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten durch Freisetzung von Serotonin neben der verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten auch zur Degranulation dieser und hierüber zur Freisetzung der Myeloperoxidase und H_2O_2 führen (Duerschmied et al., 2013, Mauler et al., 2018). In einem murinen MI-Modell konnte die inflammatorische Wirkung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregation demonstriert werden. Hierbei zeigte sich neben der postischämischen Inflammation auch eine kardiale Wandruptur. Diese konnte mittels antithrombotischer Therapie verringert werden (Y. Liu et al., 2011b). Des Weiteren verstärkt auch die endotheliale Schädigung im I/R-Schaden die Thrombozyten-Aggregation über Interaktionen mit dem endothelialen VWF (Ozawa et al., 2018). Über die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten wird nicht nur die Transmigration der neutrophilen Granulozyten begünstigt, sondern auch durch Freigabe proinflammatorischer Mediatoren und Sauerstoffradikalen die Schädigung des postischämischen Gewebes (S. Massberg et al., 1998). Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt vor allem in der frühen Reperfusion und ist abhängig von der Ischämie-Dauer. Des Weiteren ist die Thrombozyten-Aktivierung proportional zum Ausmaß des myokardialen Schadens (Xu et al., 2005). Durch die Aktivierung setzen die Thrombozyten unter anderem Thromboxan A2 frei, welches die weitere Aktivierung der Thrombozyten verstärkt und über die vasokonstriktive Wirkung den koronaren Blutfluss verringert. Dabei wird durch die Thrombozyten-Aggregation die sekundäre Entstehung einer Ischämie begünstigt (Gawaz, 2004). Sowohl die inflammatorischen Prozesse als auch die obstruktiv bedingte Malperfusion, welche durch die Zell-Zell Interaktion begünstigt werden, haben eine verstärkende Wirkung bei der Entstehung des I/R-Schadens.

Zusammenfassend kommt es im Rahmen des I/R-Schadens zur gegenseitigen Beeinflussung der Zellen, wodurch die isolierte Betrachtung eine Herausforderung darstellt. In der vorliegenden Arbeit zeigt als einziges der Ladevorgang mittels murinem Vollblut zwischen den murinen Blutbestandteilen keine signifikante Verbesserung der Infarktgröße, was unter anderem an der zellulären Interaktion zwischen Leukozyten, Thrombozyten und endothelialen Zellen liegen kann. Es stellt sich die Frage, ob der morphologische Schaden im Myokard aufgrund der Thrombozyten- und Leukozyten-Interaktion keine Verbesserung zeigt und ob ein eventueller additiver Effekt dadurch nachhaltig beeinflusst wird.

Die Interaktionen zwischen allen Zellbestandteilen können durch die Isolation einiger Blutkompartimente und deren separater Untersuchung nicht vollständig abgebildet werden. In den Versuchen dieser Doktorarbeit kann beispielsweise kein Rückschluss auf die Zell-Zell-Interaktionen mit Thrombozyten und Leukozyten gezogen werden, da diese durch die Isolierung der einzelnen Blutbestandteile nicht Teil der Experimente waren. Somit wäre es ein weiterer Forschungspunkt die Ursache der bei Vollblut nicht signifikanten Veränderung der Infarktgröße genauer einzugrenzen.

4.4. Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Dissertation zeigt, dass das etablierte *ex vivo* LD-Modell zur Untersuchung der Interaktionen zwischen präischämisch eingebrachten Blutkomponenten und kardialen Zellen geeignet ist. Mit dieser Methode ist es möglich, die Auswirkung geringer Blutmengen auf den I/R-Schaden zu untersuchen.

Die Methode weist jedoch auch einige Limitationen auf. Zum einen ist zu bedenken, dass nur die Zell-Zell Interaktionen im Rahmen der Globalischämie untersucht werden können. Denn nur während dieser Zeit sind die eingebrachten Blutbestandteile im murinem Koronarsystem nachweisbar. Der Einfluss von Blutkomponenten auf die Endothelzellen sowie die Kardiomyozyten im Rahmen der Reperfusion und vor Beginn der Globalischämie können hierbei nicht erforscht werden. Da es sich hierbei um ein *ex vivo* Modell handelt, stellt die Übertragung auf *in vivo* Zustände ein weiteres Problem dar. Rückschlüsse auf den Gesamtorganismus können nicht gezogen werden. Jedoch hat die isolierte Erforschung des Herzens den Vorteil, dass Störgrößen wie neurohumorale oder systemische Faktoren die Ergebnisse nicht zusätzlich beeinflussen. Zum anderen sollten die Auswirkungen von KHB auf die Blutbestandteile genauer untersucht werden. Es ist möglich, dass die KHB-Zusammensetzung intrazelluläre Prozesse in den Blutproben sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann. Vor allem die Calcium-Konzentration könnte die PRP-Aktivierung begünstigen oder zusätzlich die myokardiale Kontraktilität beeinflussen. Dabei entspricht die Calciumchlorid-Konzentration in der KHB-Zusammensetzung mit 2,5mM der totalen Calcium-Konzentration im Blut. Somit liegt im Perfusat der Calciumanteil in ionisierter Form vor und ist höher als der *in vivo* Gehalt im Blut. Der ionisierte Gehalt von Calcium beträgt im Blut zwischen 1,2 bis 1,4mmol/L (Riva & Hearse, 1991). Eine Calcium-Konzentration von 1,2 - 1,3mM im Perfusat bedingt eine 40-50%ige Abnahme der ventrikulären Kontraktilität im Vergleich zu einer Konzentration mit 2-2,5mM Calcium. Dies verdeutlicht, dass bei höheren Calcium-Konzentrationen die

kontraktile Reserve des Herzens abnimmt (Headrick et al., 2001). Dieser Aspekt ist vor allem wichtig bei der Erforschung von inotrop wirksamen Substanzen. Da die kontraktile Reserve abnimmt, können die Effekte der inotropen Substanzen nicht genau dargestellt werden (Hwang et al., 2017). Weitere Versuche mit einer modifizierten KHB-Zusammensetzung könnten den Einfluss von Calcium auf den etablierten Bio-Assay eingrenzen. Der hier eingesetzte KHB enthielt neben der Glucose auch Pyruvat, welches auch kardio-protectiv im Rahmen des I/R-Schadens wirkt (Cavallini et al., 1990). Dies könnte einen Effekt sowohl auf die Blutbestandteile als auch auf das Herz haben. Um die Einflussfaktoren der Blutbestandteile zu untersuchen, können mit dieser Methode Versuche durchgeführt werden, bei denen unterschiedliche Metabolite der KHB-Lösung zugeführt werden. Hierdurch könnte unter anderem auch der Einfluss unterschiedlicher Stoffwechsellagen auf den I/R-Schaden aufgezeigt werden.

5. Ausblick

Diese Dissertation zeigt, dass die eingebrachten isolierten Blutbestandteile einen positiven Effekt auf den I/R-Schaden haben. Zur genaueren Untersuchung der Interaktion von Blutzellen und Herzzellen sind weitere Versuche notwendig, die es ermöglichen sollen, interzelluläre Signalwege und (patho-)physiologische Prozesse zu erforschen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LD-Methode geeignet ist, um diese Zell-Zell Interaktionen im Rahmen des I/R-Schadens zu untersuchen. Mithilfe des entwickelten Bio-Assays ist es möglich, Transferexperimente mit humanen und murinen Blutbestandteilen an Herzen von WT oder transgenen Mäusen durchzuführen. Dabei reichen geringe Mengen an Blutbestandteilen aus, um Effekte zu beobachten und auszuwerten. Mit dieser Methode ist es möglich, die eingebrachten Blutprodukte vorher pharmakologisch zu behandeln und somit bestimmte Enzyme oder Proteine isolierter zu untersuchen. Die Tatsache, dass auch humane RBCs erfolgreich eingebracht wurden, ermöglicht zudem die Erforschung klinisch relevanter Fragestellungen. Hierbei eignet sich die LD-Methode als *ex vivo* Assay zur Untersuchung von RBC-Dysfunktionen an verschiedenen Erkrankungen. Dies könnte zur Erprobung neuer therapeutischer Substanzen im Rahmen von Hämoglobinopathien und verschiedenen Anämie-Formen dienen. Zudem kann der Einfluss verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Interaktion von Blutzellen und Kardiomyozyten sowie Endothelzellen untersucht werden. Die hier charakterisierte LD-Methode ermöglicht es zudem RIP-Veruche

durchzuführen. Hierbei kann Plasma von Versuchsmäusen nach dem RIP-Manöver in die LD-Apparatur eingebracht werden. Bei dem Gebrauch von humanem Plasma oder von Plasma anderer Versuchstiere sollte die mögliche Immunreaktion im Myokard beachtet und mitberücksichtigt werden. Auch können die Auswirkungen von verschiedenen Metaboliten im Plasma, Blut oder Puffer auf den I/R-Schaden untersucht werden. Sowohl Blut von gesunden Probanden als auch von Patienten mit oder ohne pharmakologische Behandlung nach einem Myokardinfarkt oder nach stattgefundener PCI kann in die LD-Apparatur eingebracht werden. Darüber hinaus ist diese etablierte Methode dazu geeignet, den Einfluss verschiedener HKT-Werte auf die linksventrikuläre Funktion zu erforschen. Hierbei können Versuche mit unterschiedlichen Blutviskositäten und Plasma-Zusammensetzungen im Rahmen des I/R-Schadens durchgeführt werden. Um den Einfluss verschiedener HKT-Werte auf die RBC-Aggregation zu erforschen, eignen sich unter anderem Untersuchungen des postischämischen Effluates. Hierdurch besteht die Möglichkeit, Blutaussstriche anzufertigen und die RBC-Aggregation zu bestimmen. Darüber hinaus ist das Effluat für eine Vielzahl von Untersuchungen geeignet. Das Effluat kann vor, während und nach dem Ladevorgang gesammelt werden. Durch die zeitliche Variation der Effluat-Entnahme ist es zudem möglich, Änderungen der Substratkonzentrationen darzustellen. Auch könnten mehrere Ladevorgänge an einem Versuchsherzen durchgeführt werden. Hierdurch könnte der Einfluss kürzerer Ischämie-Zeiten auf die eingebrachten Blutbestandteile untersucht werden. Das postischämische Effluat könnte nach kurzen Ischämie-Episoden eingefangen und erneut über den Seitenarm der LD-Apparatur eingebracht werden. Dadurch könnte der Effekt von postischämischen Blutbestandteilen auf den I/R-Schaden ermittelt werden. Die Tatsache, dass nur geringe Blutmengen eingebracht werden, ermöglicht es zudem Experimente mit Blut von gentechnisch veränderten Mäusen durchzuführen. Hierbei können Blutkomponenten und Herzen transgener Mäuse eingesetzt werden. Des Weiteren stellt die dargestellte Methode eine Alternative zu invasiven *in vivo* Verfahren dar. Dabei werden die Versuchstiere nicht den Folgen eines Myokardinfarktes und den damit verbundenem Leidensprozess ausgesetzt. Störfaktoren, die bei herkömmlichen *in vivo* Modellen im Gesamtorganismus auftreten, lassen sich somit beseitigen. Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden sollte, ist die Blutkomponenten-Herstellung, welche vor allem in den PRP-Versuchen deutlich wird. Die unterschiedliche Aufbereitung und Einsatzzeit von PRP macht es schwierig, die einzelnen erzielten Ergebnisse mit bisherigen Arbeiten zu vergleichen. Sie alle zeigen zwar eine Verbesserung des I/R-Schadens, jedoch lässt sich nur schwer sagen, wodurch diese

Verbesserungen erzielt wurden. Hier bedarf es einer genaueren Untersuchung des Einflusses der PRP-Behandlung auf das PRP selbst und die damit verbundene zelluläre Interaktion im Myokard.

Zusammenfassend schafft das LD-Transfermodell eine hervorragende Ergänzung zu den bisherigen Perfusionsmodellen mit Blut oder mit RBC-Puffer Lösungen. Aufgrund der kostengünstigen und einfachen Herstellung der verschiedenen Blutkomponenten ermöglicht die Methode mehrere Versuchsdurchführungen und steigert dadurch zusätzlich die Reproduzierbarkeit. Durch die einfache Handhabung und die vielfältigen Untersuchungsmöglichkeiten stellt das hier charakterisierte *ex vivo* Transfermodell eine vielversprechende Methode zur Untersuchung der interzellulären Prozesse im Rahmen des I/R-Schadens dar.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge der myokardialen Ischämie.....	4
Abbildung 2: Mögliche Messungen am Langendorff-Herzen.....	14
Abbildung 3: Langendorff-Apparatur im kardiologischen Labor der Heinrich-Heine-Universität.	24
Abbildung 4: Dokumentation der physiologischen Parameter mit der IOX-Software.	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aortenblocks.	26
Abbildung 6: Ablauf des Ischämie-Reperfusionsversuchs an der Langendorff- Apparatur.	30
Abbildung 7: Planimetrische Ermittlung der Infarktgröße mittels Diskus view.	33
Abbildung 8: Wirkung der Ischämie-Dauer auf Infarktgröße und hämodynamische Parameter.....	42
Abbildung 9: Histologisches Bild vor dem Einbringen von Erythrozyten in das murine Koronarsystem.....	43
Abbildung 10: Histologisches Schnittbild nach dem Einbringen von Erythrozyten in das murine Koronarsystem.	44
Abbildung 11: Histologisches Schnittbild des murinen Herzens nach 40-minütiger Globalischämie	44
Abbildung 12: Histologische Schnittbilder des murinen Herzens nach 60 -minütiger Erholungsphase.....	45
Abbildung 13: Nachweis der Hämoglobin Konzentration vor und nach Loading.....	46
Abbildung 14: Der kardio-protective Effekt von murinem Vollblut auf den I/R-Schaden.	49
Abbildung 15: Einfluss der verschiedenen murinen Blutbestandteile auf den I/R-Schade.	52
Abbildung 16: Kardioprotektiver Effekt humaner Erythrozyten auf den I/R-Schaden.....	55
Abbildung 17: Humanes Plasma hat keine protektive Wirkung auf das LD-Herz	56
Abbildung 18: Dosis- Wirkungsbeziehung verschiedener HKT-Werte humaner RBCs auf den I/R-Schaden	59
Abbildung 19: Die Perfusion mittels RBCs steigert die Sauerstoffzufuhr im Vergleich zu KHB.....	61
Abbildung 20: Die Sauerstoffextraktion im LD- Herzen nach Perfusion mit KHB und RBCs.....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Medikamente.....	20
Tabelle 2: Verbrauchs- und sonstige Materialien.....	21
Tabelle 3: Verwendete Versuchsgeräte	21
Tabelle 4: Verwendete Software	22
Tabelle 5: Zusammensetzung des Langendorff- Perfusats.....	31
Tabelle 6: Protokoll für die Anfertigung der histologischen Hämatoxylin- Eosin Färbung	37

Literaturverzeichnis

- Anderson, P. G., & Boor, P. J. (1990). Use of the isolated perfused heart for evaluation of cardiac toxicity. *Toxicologic Pathology*, 18, Number, 497–510.
- Anitua, E., Pelacho, B., Prado, R., Aguirre, J. J., Sánchez, M., Padilla, S., Prosper, F. (2015). Infiltration of plasma rich in growth factors enhances in vivo angiogenesis and improves reperfusion and tissue remodeling after severe hind limb ischemia. *Journal of Controlled Release*, 202, 31–39.
- Awan, M. M., Taunyane, C., Aitchison, K. A., Yellon, D. M., & Opie, L. H. (1999). Normothermic Transfer Times up to 3 Min Will Not Precondition the Isolated Rat Heart. *J Mol Cell Cardiol*, 511(31), 503–511.
- Bailey, L. E., & Ong, S. D. (1978). Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. *Journal of Pharmacological Methods*, 1(2), 171–175.
- Beard, D. A., Schenkman, K. A., & Feigl, E. O. (2003). Myocardial oxygenation in isolated hearts predicted by an anatomically realistic microvascular transport model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(5), H1826–H1836.
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(6), 940–950.
- Beloukas, A. I., Magiorkinis, E., Tsoumakas, T. L., Kosma, A. G., & Diamantis, A. (2013). Milestones in the History of Research on Cardiac Energy Metabolism. *Canadian Journal of Cardiology*, 29(11), 1504–1511.
- Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., & Muntner, P. (2017). *Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation* (Vol. 135).
- Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J., & Lackner, K. J. (2003). Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 349(17), 1605–1613.
- Bolli, R. (1990). Mechanism of Myocardial "Stunning". *Circulation*, 82, 723–738.
- Bor-Kucukatay, M., Wenby, R. B., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2003). Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284(5), H1577–H1584.
- Braunwald, E., & Kloner, R. . (1985). Myocardial Reperfusion: A Double-edged Sword? *J Clin Invest*, 76, 1713–1719.
- Brown, J.M., Grosso, M. A., Terada, L. S., Beehler, C. J., Toth, K. M., Whitman, G. J., Harken, A.H., & Repine, J. E. (1989). Erythrocytes decrease myocardial hydrogen peroxide levels and reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 256(2).
- Brown, J. M., Beehler, C. J., Berger, E. M., Grosso, M. A., Whitman, G. J., Terada, L. S., Leff, J.A., Harken, A.H., & Repine, J. E. (1989). Albumin decreases hydrogen peroxide and reperfusion injury in isolated rat hearts. *Inflammation*, 13(5), 583–589.

- Cavallini, L., Valente, M., & Rigobello, M. P. (1990). The protective action of pyruvate on recovery of ischemic rat heart: Comparison with other oxidizable substrates. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 22(2), 143–154.
- Chen, E. P., & Davis, R. D. (1998). Physiologic effects of extracellular superoxide dismutase transgene overexpression on myocardial function after ischemia and reperfusion. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 115(No.2), 450–459.
- Cheng, K., Malliaras, K., Shen, D., Tseliou, E., Ionta, V., Smith, J., Galang, G., Sun, B., Houde, C., & Marban, E. (2012). Intramyocardial Injection of Platelet Gel Promotes Endogenous Repair and Augments Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(3), 256–264.
- Cortese-Krott, M. M., & Kelm, M. (2014). Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? *Redox Biology*, 2(1), 251–258.
- Cortese-Krott, M. M., Mergia, E., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Yang, J., Wolff, G., Panknin, C., Bracht, T., Sitek, B., Pernow, J., Stasch, JP., Feelisch, M., Koesling, D., & Kelm, M. (2018). Redox Biology Identification of a soluble guanylate cyclase in RBCs: preserved activity in patients with coronary artery disease. *Redox Biology*, 14(August 2017), 328–337.
- Cortese-Krott, M. M., Rodriguez-Mateos, A., Sansone, R., Kuhnle, G. G. C., Thasian-Sivarajah, S., Krenz, T., Horn, P., Krisp, C., Wolters, D., Heiß, C., Kröncke, KD., Hogg, N., Feelisch, & M., Kelm, M. (2012). Human red blood cells at work: Identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood*, 120(20), 4229–4237.
- Crompton, M., Costi, A., & Hayat, L. (1987). Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *The Biochemical Journal*, 245(3), 915–918.
- Crompton, Martin, Barksby, E., Johnson, N., & Capano, M. (2002). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie*, 84(2–3), 143–152.
- Cross, H. R., Radda, G. K., & Clarke, K. (1995). The role of Na^+/K^+ ATPase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: A ^{31}P , ^{23}Na and ^{87}Rb NMR spectroscopic study. *Magnetic Resonance in Medicine*, 34(5), 673–685.
- Curtis, M. (1998). Characterisation, utilisation and clinical relevance of isolated perfused heart models of ischaemia-induced ventricular fibrillation. *Cardiovascular Research*, 39, 194–215.
- Davidson, S. M., Andreadou, I., Barile, L., Birnbaum, Y., Cabrera-Fuentes, H. A., Cohen, M. V., Downey, J. M., Girao, H., Pagliaro, P., Penna, C., Pernow, J., Preissner, K. T., & Ferdinandy, P. (2019). Circulating blood cells and extracellular vesicles in acute cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 115(7), 1156–1166.
- Das, D. K., & Maulik, N. (1994). Antioxidant Effectiveness in Ischemia-Reperfusion Tissue Injury. *Methods in Enzymology*, 233(1992).
- Deepthi, A., Narasimha, A., Kumar, H. L., & Kumar, A. D. (2014). Significance of erythrocyte aggregation test in acute myocardial infarction. *Interntional Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 4(1), 45–51.

- Desk, R., Williams, L., & Health, K. (1986). H. Newell Martin and the isolated heart preparation: the link between the frog and heart surgery. *Library*, 73(5), 857–864.
- Dhanjal, T. S., Medina, R. A., Leem, J., Clark, J. E., Southworth, R., & Curtis, M. J. (2013). Trapped platelets activated in ischemia initiate ventricular fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 6(5), 995–1001.
- Dietrich, H., & Ellsworth, M. (2000). Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *American Journal of Physiology. Heart and CirculatorPhysiology*, H198-2000.
- Döring, H. J. (1996). The Isolated Perfused Heart according to Langendorff - History and Presence, Modifications and Applications. *Acta Chirurgica Austriaca*, 28(6), 328–333.
- Dorweiler, B., Pruefer, D., Andrasi, T. B., Maksan, S. M., Schmiedt, W., Neufang, A., & Vahl, C. F. (2007). Ischemia-reperfusion injury: Pathophysiology and clinical implications. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 33(6), 600–612.
- Duerschmied, D., Suidan, G. L., Demers, M., Herr, N., Carbo, C., Brill, A., Cifuni, S. M., Mauler, M., Cicko, Bader, M., Idzko, M., Bode, C., Wagner, D. D. (2013). Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*. 125(6), 1008-1015.
- Duranski, M., Greer, J. J. M., Dejam, A., Jaganmohan, S., Hogg, N., Langston, W., Patel, R. P., Yet, S. F., Wang, X., Kevil, C. G., Gladwin, M.T., Lefer, D. J. (2005). Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1232–1240.
- Ellsworth, M. L., Forrester, T., Ellis, C. G., & Dietrich, H. H. (1995). The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 269(6), H2155–H2161.
- Eulalio, A., Mano, M., Ferro, M. D., Zentilin, L., Sinagra, G., Zacchigna, S., & Giacca, M. (2012). Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*, 492(7429), 376–381.
- Filardo, G., Kon, E., Villa, S. Della, Vincentelli, F., & Fornasari, P. M. (2010). Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper ' s knee. *Springer- Verlag*, 34, 909–915.
- Fitton, T. P., Wei, C., Lin, R., Bethea, B. T., Barreiro, C. J., Amado, L., Gage, F., Hare, J., Baumgartner, W. A., Conte, J. V. (2004). Impact of 24 h continuous hypothermic perfusion on heart preservation by assessment of oxidative stress. *Clinical Transplantation*, 18(s12), 22–27.
- Frank, A., Bonney, M., & Bonney, S. (2012). Myocardial ischemia reperfusion injury - from basic science to clinical bedside. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 16(3), 123–132.
- Fröhlich, G. M., Meier, P., White, S. K., Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2013). Myocardial reperfusion injury: Looking beyond primary PCI. *European Heart Journal*, 34(23), 1714–1724.
- Fuller, W., Parmar, V., Eaton, P., Bell, J. R., & Shattock, M. J. (2003). Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress. *Cardiovascular Research*, 57(4), 1044–1051.

- Galiñanes, M., Bernocchi, P., Argano, V., Cargnoni, A., Ferrari, R., & Hearse, D. J. (1996). Dichotomy in the post-ischemic metabolic and functional recovery profiles of isolated blood- versus buffer-perfused heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28(3), 531–539.
- Gamble, W. J., Conn, P. A., & Edalji, A. (1970). Myocardial isolated , oxygen supported , consumption rat heart of blood-perfused . *American Journal of Physiology*, 219(No.3), 604–612.
- Ganote, C. E. (1983). Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 15(2), 67–73.
- Gawaz, M. (2004). Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular Research*, 61(3), 498–511.
- Gidlöf, O., Brug, M. van der, Ohman, J., Gilje, P., Olde, B., Wahlestedt, C., & Erlinge, D. (2013). Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*, 121(19), 3908–3917.
- Gillis, A. M., Mathison, J., & Tn, A. (1996). Cardiac electrophysiological variables in blood-perfused rabbit heart. *Am.J.Physiol*, 271, 784–789.
- Girelli, D., Lupo, A., Trevisan, M., Olivieri, O., Bernich, P., Zorzan, P., Bassi, A., Stanzial, A.M, Ferrari, S., & Corrocher, R. (1992). Red Blood Cell Susceptibility to Lipid Peroxidation, Membrane Lipid Composition, and Antioxidant Enzymes in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patients. *Peritoneal Dialysis International*, 12, 227–229.
- Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Kim-Shapiro, D. B., Patel, R. P., Hogg, N., Shiva, S., Cannon, R. O, Kelm, M., Wink, D. A., Espey, M. G., Oldfield, E. H., Pluta, R. M., Freeman, B. A., Lancaster, J. R., Feelisch, M., & Lundberg, J. O. (2005). The Emerging Biology of the Nitrite Anion. *Nature Chemical Biology*, 1(6), 308–314.
- Gopalakrishnan, M., & Saurabh, S. (2014). Is red blood cell a mediator of remote ischaemic preconditioning? *Medical Hypotheses*, 83(6), 816–818.
- Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, 6, 524–551.
- Grier, R., Farge, C. G. L. A., Gamble, W. J., & Hammond, R. P. (1966). Left ventricular catecholamine performance and blood levels in the isolated heart1 rl. *Am.J.Physiol*, 211, 1248–1254.
- Grunenfelder, J., Miniati, D. N., Murata, S., Falk, V., Hoyt, E. G., Kown, M., Koransky, M. L., & Robbins, R. C. (2001). Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts. *Circulation*, 104(12 Suppl 1), I202-6.
- Gumina, R. J., Buerger, E., Eickmeier, C., Moore, J., Daemmgen, J., & Gross, G. J. (1999). Inhibition of the Na⁺/H⁺ Exchanger Confers Greater Cardioprotection Against 90 Minutes of Myocardial Ischemia Than Ischemic Preconditioning in Dogs. *Circulation*, 100, 2519–2526.
- Halestrap, A. P. (1991). Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochemical Journal*, 278(3), 715–719.

- Halestrap, A. P. (2006). Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 232.
- Hargrave, B., & Li, F. (2012). Nanosecond pulse electric field activation of platelet-rich plasma reduces myocardial infarct size and improves left ventricular mechanical function in the rabbit heart. *Journal of Extra-Corporeal Technology*, 44(4), 198–204.
- Hargrave, B. (2014). Autologous Platelet Rich Plasma (Platelet Gel): An Appropriate Intervention for Salvaging Cardiac Myocytes under Oxidative Stress after Myocardial Infarction. *Anatomy & Physiology*, 04(01), 4–11.
- Hargrave, B., Varghese, F., Barabutis, N., Catravas, J., & Zemlin, C. (2016). Nanosecond pulsed platelet-rich plasma (nsPRP) improves mechanical and electrical cardiac function following myocardial reperfusion injury. *Physiological Reports*, 4(4), 1–12.
- Hartmann, M., & Decking, U. K. M. (1999). Blocking Na⁺/H⁺ Exchange by Cariporide Reduces Na⁺-overload in Ischemia and is Cardioprotective. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31, 1985–1995.
- Hausenloy, D., & Yellon, D. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*, 123(1), 92–100.
- Headrick, J. P., Peart, J., Hack, B., Flood, A., & Paul Matherne, G. (2001). Functional properties and responses to ischaemia-reperfusion in Langerdorff perfused mouse heart. *Experimental Physiology*, 86(6), 703–716.
- Henn, V., Slupsky, J. R., Gräfe, M., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Müller-Berghaus, G., & Kroczeck, R. A. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391(6667), 591–594.
- Heyndrickx, G. R., Millard, R. W., McRitchie, R. J., Maroko, P.-R., & Vatner, S. . (1975). Regional Myocardial Functional and Electrophysiological Alterations after Brief Coronary Artery Occlusion in Conscious Dogs. *Journal of Clinical Investigation*, 56, 978–985.
- Horn, P., Cortese-krott, M. M., Keymel, S., Kumara, I., Burghoff, S., Schrader, J., Kelm, M. & Kleinbongard, P., (2011). Nitric oxide influences red blood cell velocity independently of changes in the vascular tone. *Free Radical Research*, 45, 653–661.
- Hwang, H., Kloner, R. A., Dai, W., Kleinman, M. T., Poole, W. K., McDonald, S. A., & Simkhovich, B. Z. (2017). *Isolated Heart Preparation. Comprehensive Toxicology: Third Edition* (Third Edit, Vol. 13–15). Elsevier.
- Kakkar, A. K., & Lefer, D. J. (2004). Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(2), 154–158.
- Kaminski, K. a, Bonda, T. a, Korecki, J., & Musial, W. J. (2002). Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Cardiology*, 86(1), 41–59.
- Khalaf, A., & Babiker, F. (2016). Discrepancy in calcium release from the sarcoplasmic reticulum and intracellular acidic stores for the protection of the heart against ischemia/reperfusion injury. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72(3), 495–508.
- Kim, J. H., Bugaj, L. J., Oh, Y. J., Bivalacqua, T. J., Ryoo, S., Soucy, K. G., Berkowitz, D. E. (2009). Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *Journal of Applied Physiology*, 107(4), 1249–1257.

- Kingma, J. G., Plante, S., & Bogaty, P. (2000). Platelet GPIIb/IIIa receptor blockade reduces infarct size in a canine model of ischemia-reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology*, 36(7), 2317–2324.
- Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Rassaf, T., Schindler, A., Picker, O., Scheeren, T., Godecke, A., Schrader, J., Schulz, R., Heusch, G., Schaub, G. A., Bryan, N. S., Feelisch, M., & Kelm, M. (2003). Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(7), 790–796.
- Kloner, R. A., Bolli, R., Marba, E., Reinlib, L., & Braunwald, E. (1998). Medical and Cellular Implications of Stunning, Hibernation, and Preconditioning. *Circulation*, 97, 1848–1867.
- Kloner, R. A., Giacomelli, F., Alker, K. J., Hale, S. L., Matthews, R., & Bellows, S. (1991). Influx of neutrophils into the walls of large epicardial coronary arteries in response to ischemia/reperfusion. *Circulation*, 84(4), 1758–1772.
- Koller, A., Sun, D., & Kaley, G. (1993). Role of Shear Stress and Endothelial Prostaglandins in Flow- and Viscosity-Induced Dilation of Arterioles In Vitro. *Circulation Research*, 72, 1276–1284.
- Kukielka, G. L., Hawkins, H. K., Michael, L., Manning, A. M., Youker, K., Lane, C., Entman, M. L., Smith, C. W., & Anderson, D. C. (1993). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *Journal of Clinical Investigation*, 92(3), 1504–1516.
- Kunichika, H., Ben-Yehuda, O., Lafitte, S., Kunichika, N., Peters, B., & DeMaria, A. N. (2004). Effects of Glycoprotein IIb / IIIa Inhibition on Microvascular Flow After Coronary Reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(2), 276–283.
- Kupatt, C., Wichels, R., Horstkotte, J., Krombach, F., Habazettl, H., & Boekstegers, P. (2002). Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(September), 455–461.
- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Springer-Verlag*, 61(6), 291–332.
- Lateef, R., Al-Masri, A., & Alyahya, A. (2015). Langendorff's isolated perfused rat heart technique: a review. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, 4(6), 1314–1322.
- Lee, J. W., Hyun Kwon, O., Kim, T. K., Cho, Y. K., Choi, K. Y., Chung, H. Y., Cho, B. C., Yang, J. D., & Shin, J. H. (2013). Platelet-rich plasma: Quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Archives of Plastic Surgery*, 40(5), 530–535.
- Lefer, A. M., Campbell, B., Scalia, R., & Lefer, D. J. (1998). Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion role of selectins. *Circulation*, 98(13), 1322–1328.
- Lesnefsky, E. J., Chen, Q., Slabe, T. J., Stoll, M. S. K., Minkler, P. E., Hassan, M. O., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (2004). Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(1), H258–67.

- Li, J., Zhang, H., & Zhang, C. (2012). Role of inflammation in the regulation of coronary blood flow in ischemia and reperfusion: Mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol.*, 52(4), 865–872.
- Liang, Y., Chen, H., & Wang, P. (2018). Correlation of Leukocyte and Coronary Lesion Severity of Acute Myocardial Infarction. *Angiology*, 69(7), 591–599.
- Liu, C., Wajih, N., Liu, X., Basu, S., Janes, J., Marvel, M., Keggi, C., Helms, C. C., Lee, A. N., Belanger, A. M., Diz, D. I., Laurienti, P. J., Caudell, D. L., Wang, J., Gladwin, M. T., & Kim-Shapiro, D. B. (2015). Mechanisms of human erythrocytic bioactivation of nitrite. *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), 1281–1294.
- Liu, J., Wang, H., & Li, J. (2016). Inflammation and inflammatory cells in myocardial infarction and reperfusion injury: A double-edged sword. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, 10, 79–84.
- Liu, Y., Gao, X. M., Fang, L., Jennings, N. L., Su, Y., Q, X., Samson, A. L., Kiriazis, H., Wang, X. F., Shan, L., Sturgeon, S. A., Medcalf, R. L., Jackson, S. P., Dart, A. M., & Du, X. J. (2011b). Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(4), 834–841.
- MacDonald, V. W., & Winslow, R. M. (1992). Oxygen delivery and myocardial function in rabbit hearts perfused with cell-free hemoglobin. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 72(2), 476–483.
- Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., & Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 85(6), 638–646.
- Massberg, B. S., Enders, G., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Vestweber, D., Krombach, F., & Messmer, K. (1998). Platelet-Endothelial Cell Interactions During Ischemia/Reperfusion: The Role of P-Selectin. *Blood*, 92, 507–515.
- Mauler, M., Herr, N., Schoenichen, C., Witsch, T., Marchini, T., Härdtner, C., Koentges, C., Kienle, K., Ollivier, V., Schell, M., Dorner, L., Wippel, C., Stallmann, D., Normann, C., Bugger, H., Walther, P., Wolf, D., Ahrens, I., Lämmermann, T., Ho-Tin-Noé, B., Ley, K., Bode, C., Hilgendorf, I., & Duerschmied, D. (2019). Platelet Serotonin Aggravates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Neutrophil Degranulation. *Circulation*, 139(7), 918–931.
- Minetti, M., & Malorni, W. (2006). Redox Control of Red Blood Cell Biology: The Red Blood Cell as a Target and Source of Prooxidant Species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(19), 1165–1169.
- Minhaz, U., Koide, S., Shohtsu, A., Fujishima, M., & Nakazawa, H. (1995). Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation. *BasicRes Cardiol*, 90, 418–423.
- Mishra, A., Velotta, J., Brinton, T. J., Wang, X., Chang, S., Palmer, O., Sheikh, A., Chung, J., Yang, P. C., Robbins, R., & Fischbein, M. (2011). RevaTen platelet-rich plasma improves cardiac function after myocardial injury. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 12(3), 158–163.
- Moraes, V., Lenza, M., Tamaoki, M., Faloppa, F., & Belloti, J. (2013). Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 12, 1-128.

- Mouren, S., Souktani, R., Beaussier, M., Abdenour, L., Arthaud, M., Duvelleroy, M., & Vicaud, E. (1997). Mechanisms of coronary vasoconstriction induced by high arterial oxygen tension. *The American Journal of Physiology*, 272, H67-75.
- Mouren, S., Vicaud, E., Lamhaut, L., Riou, B., & Ouattara, A. (2010). Crystalloid versus red blood cell-containing medium in the Langendorff-perfused isolated heart preparation. *European Society of Anaesthesiologist*, 27, No.9, 780–787.
- Muessig, J. M., Kaya, S., Moellhoff, L., Noelle, J., Hidalgo Pareja, L., Masyuk, M., Gerdes, N., Pernow, J., Kelm, Jung, C. (2019). A Model of Blood Component–Heart Interaction in Cardiac Ischemia–Reperfusion Injury using a Langendorff-Based Ex Vivo Assay. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*.
- Murphy, E., Perlman, M., London, R. E., & Steenbergen, C. (1991). Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circulation Research*, 68(5), 1250–1258.
- Murphy, E., & Steenbergen, C. (2008). Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiological Reviews*, 88(2), 581–609.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13.
- Nahrendorf, M., Pittet, M. J., & Swirski, F. K. (2010). Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair. *Circulation*, 121(22), 2437–2445.
- Neri, M., Riezzo, I., Pascale, N., Pomara, C., & Turillazzi, E. (2017). Ischemia / Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–14.
- Novokmet, S., Jakovljevic, V. L., Jankovic, S., Davidovic, G., Andjelkovic, N., Milanovic, Z., & Djuric, D. M. (2009). Human platelets perfusion through isolated guinea-pig heart : the effects on coronary flow and oxidative stress markers. *General Physiology and Biophysics*, (28), 98–104.
- Okada, H., Takahashi, K., Ogura, N., Tomoki, R., Ito, K., & Kondoh, T. (2016). Plasma rich in growth factors stimulates proliferation, migration, and gene expression associated with bone formation in human dental follicle cells. *Journal of Dental Sciences*, 11(3), 245–252.
- Olejnickova, V., Novakova, M., & Provaznik, I. (2015). Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 53(7), 669–678.
- Ozawa, K., Packwood, W., Yue, Q., Xie, A., Wu, M., & Lindner, J. R. (2018). Molecular Imaging of Von Willebrand Factor Dysregulation and Platelet Adhesion in Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(11), A1699.
- Palazzo, A. J., Jones, S. P., Girod, W. G., Anderson, D. C., Granger, D. N., & Lefer, D. J. (1998). Myocardial ischemia-reperfusion injury in CD18- and ICAM-1-deficient mice. *American Journal of Physiology*, 275, H2300–H2307.
- Paoloni, J., De Vos, R. J., Hamilton, B., Murrell, G. A. C., & Orchard, J. (2011). Platelet-rich plasma treatment for ligament and tendon injuries. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 21(1), 37–45.
- Pasini, E., Solfrini, R., Bachetti, T., Marino, M., Bernocchi, P., Visioli, F., & Ferrari, R. (1999). The blood perfused isolated heart: Characterization of the model. *Basic*

- Research in Cardiology*, 94(3), 215–222.
- Penna, C., Bassino, E., & Alloatti, G. (2011). Platelet activating factor: The good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Experimental Biology and Medicine*, 236(4), 390–401.
- Pernow, J., Mahdi, A., Yang, J., Zhou, Z., & Division, V. (2019). Red blood cell dysfunction : a new player in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 1–34, cvz156.
- Pike, M. M., Kitakaze, M., & Marban, E. (1990). ²³Na-NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *The American Journal of Physiology*, 259(6 Pt 2), H1767-73.
- Pinsky, D. J., Naka, Y., Liao, H., Oz, M. C., Wagner, D. D., Mayadas, T. N., Johnson, R. C., Hynes, R. O., Heath, M., Lawson, C. A., & Stern, D. M. (1996). Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell weibel-palade bodies: A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *Journal of Clinical Investigation*, 97(2), 493–500.
- Piper, H. M., Meuter, K., & Schafer, C. (2003). Cellular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury. *Annals of Thoracic Surgery*, 75, S644–S648.
- Piper, H. M., & Ovize, M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 38, 291–300.
- Pott, C., Eckardt, L., & I. Goldhaber, J. (2011). Triple Threat: The Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in the Pathophysiology of Cardiac Arrhythmia, Ischemia and Heart Failure. *Current Drug Targets*, 12(5), 737–747.
- Qiu, Y., Manche, A., & Hearse, D. J. (1993). Contractile and vascular consequences of blood versus crystalloid cardioplegia in the isolated blood perfused rat heart. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 7(3), 137–145.
- Reichelt, M. E., Willems, L., Hack, B. A., Peart, J. N., & Headrick, J. P. (2009). Cardiac and coronary function in the Langendorff-perfused mouse heart model. *Experimental Physiology*, 94(1), 54–70.
- Reimer, K. a, Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., & Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 56, 786–794.
- Ringer, S. (1882). Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blod on the contraction of the ventricle. *Journal of Physiology*, 3(5), 380–393.
- Ringer, S. (1883). A third contribution regarding the Influence of the Inorganic Constituents of the Blood on the Ventricular Contraction. *The Journal of Physiology*, 4(2–3), 222–225.
- Riva, E., & Hearse, D. J. (1991). Isolated, perfused neonatal rat heart preparation for studies of calcium and functional stability. *The Annals of Thoracic Surgery*, 52(4), 987–992.
- Rodrigues, S. F., & Granger, D. N. (2010). Role of blood cells in ischaemia – reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Research*, 87, 291–299.
- Salimi, S., Lewis, J. P., Yerges-Armstrong, L. M., Mitchell, B. D., Saeed, F., O’Connell, J. R., Perry, J.A., Ryan, K. A., Shuldiner, A. R., & Parsa, A. (2016). Clopidogrel improves skin microcirculatory endothelial function in persons with heightened platelet aggregation. *Journal of the American Heart Association*, 5(11), 1–11.

- Salisbury, P. F., Cros, C. E., Katsuhara, K., & Rieben, P. A. (1961). Factors Which Initiate or Influence Edema in the Isolated Dog's Heart. *Circulation Research*, 9, 601–606.
- Sandler, J. A., Gallin, J. I. ., & Vaughan, M. . (1975). Effects of Serotonin, GMP and Ascorbic Acid on Leukocyte cyclic and chemotaxis. *The Journal of Cell Biology*, 67(12).
- Schanze, N., Bode, C., & Duerschmied, D. (2019). Platelet Contributions to Myocardial Ischemia / Reperfusion Injury. *Frontiers in Immunology*, 10(June), 1–9.
- Schenkman, K. A., Beard, D. A., Ciesielski, W. A., & Feigl, E. O. (2003). Comparison of buffer and red blood cell perfusion of guinea pig heart oxygenation. *American Physiological Society*, 285(5), 1819–1825.
- Schönberger, T., Ziegler, M., Borst, O., Konrad, I., Nieswandt, B., Massberg, S., Ochmann, C., Jürgens, T., Seizer, P., Langer, H., Münch, G., Ungerer, M., Preissner, K. T., Elvers, M., & Gawaz, M. (2012). The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(7), C757–C766.
- Seligmann, C., Prechtel, G., Kusus-Seligmann, M., & Daniel, W. G. (2013). A myocardial ischemia-and reperfusion-induced injury is mediated by reactive oxygen species released from blood platelets. *Platelets*, 24(1), 37–43.
- Shimizu, Y., Minatoguchi, S., Hashimoto, K., Uno, Y., Arai, M., Wang, N., Chen, X., Lu, C., Takemura, G., Shimomura, M., Fujiwara, T., & Fujiwara, H. (2002). The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpogrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit hearts. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(7), 1347–1355.
- Shiva, S., Sack, M. N., Greer, J. J., Duranski, M., Ringwood, L. A., Burwell, L., Wang, X., MacArthur, P. H., Shoja, A., Raghavachari, N., Calvert, J. W., Brookes, P. S., Lefer, D. J., & Gladwin, M. T. (2007). Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(9), 2089–2102.
- Simpson, P. J., Todd III, R. F., Fantone, J. C., Mickelson, J. K., Griffin, J. D., & Lucchesi, B. R. (1988). Reduction of experimental canine myocardial injury by a monoclonal antibody(anti-Mo1, anti-CD11b)that inhibits leukocyte adhesion. *Journal of Clinical Investigation*, 81, 624–629.
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szlag, A., & Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55(2), 113–126.
- Statistisches Bundesamt (Destatis). (2016). Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Die 10 häufigsten Todesursachen insgesamt. Retrieved December 16, 2018, from <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursache/n/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>
- Stearse, S. E., & Yellon, D. M. (1995). The potential for endogenous myocardial antioxidants to protect the myococardium against ischaemia-reperfusion injury: Refreshing the parts exogenous antioxidants cannot reach? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(1), 65–74.
- Sutherland, F. J., & Hearse, D. J. (2000). the Isolated Blood and Perfusion Fluid Perfused Heart the Isolated Heart As a Model for the Study of Cardiovascular Disease What

Are the Advantages and Disadvantages of the Isolated Perfused Heart? *Pharmacological Research*, 41(6).

- Sutherland, F. J., Shattock, M. J., Baker, K. E., & Hearse, D. J. (2003). Mouse isolated perfused heart: Characteristics and cautions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(11), 867–878.
- Suzuki, K., Brand, N. J., Smolenski, R. T., Jayakumar, J., Murtuza, B., & Yacoub, M. H. (2000). Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery. *Circulation*, 102(19), III359–III364.
- Takamura, M., Yasuda, T., Nakano, A., Shima, H., & Neo, M. (2017). The effect of platelet-rich plasma on Achilles tendon healing in a rabbit model. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, 51(1), 65–72.
- Trowbridge, C. C., Stammers, A. H., Woods, E., Yen, B. R., Klayman, M., & Gilbert, C. (2005). Use of Platelet Gel and Its Effects on Infection in Cardiac Surgery. *The Journal of The American Society of Extra-Corporeal Technology*, (5), 381–386.
- Vicencio, J. M., Yellon, D. M., Sivaraman, V., Das, D., Boi-Doku, C., Arjun, S., Zheng, Y., Riquelme, J. A., Kearney, J., Sharma, V., Multhoff, G., Hall, A. R., & Davidson, S. M. (2015). Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(15), 1525–1536.
- Vinten-Johansen, J. (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 61(3), 481–497.
- von Hundelshausen, P., & Weber, C. (2007). Platelets as Immune Cells. *Circulation Research*, 100(1), 27–40.
- Walsh, T. G., & Poole, A. W. (2017). Platelets Protect Cardiomyocytes from Ischemic Damage. *Georg Thieme Verlag KG*, 24–32.
- Walsh, T. G., & Poole, A. W. (2018). Do platelets promote cardiac recovery after myocardial infarction: roles beyond occlusive ischemic damage. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 314(5), H1043–H1048.
- Wang, Q. D., Swärdh, A., & Sjöquist, P. O. (2001). Relationship between ischaemic time and ischaemia/reperfusion injury in isolated Langendorff-perfused mouse hearts. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171(2), 123–128.
- Webb, A. J., Milsom, A. B., Rathod, K. S., Chu, W. L., Lovell, M. J., Lecomte, F. M. J., Perrett, D., Raimondo, C., Khoshbin, E., Ahmed, Z., Uppal, R., Benjamin, N., Hobbs, A. J., & Ahluwalia, A. (2010). Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to NO in hypoxia: role for Xanthine Oxidoreductase and eNOS. *Circulation Research*, 103(9), 957–964.
- Wehberg, K. E., Answini, G., Wood, D., Todd, J., Julian, J., Ogburn, N., & Allen, K. B. (2009). Intramyocardial Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma Combined With Transmyocardial Revascularization. *Cell Transplantation*, 18, 353–359.
- Wood, K. C., Cortese-Krott, Miriam M. Kovacic, J. C., Noguchi, A., Lui, V. B., Liu, B., Xunde, W., Raghavachari, N., Boehm, M., Kato, G. J., Kelm, M., & Gladwin, M. T. (2013). Circulating Blood eNOS Contributes to the Regulation of Systemic Blood Pressure and Nitrite Homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 33(8), 1–25.
- Xu, Y. (2005). Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 290(2), H692–H699.
- Yang, B. C., Mehta, A., & Mehta, J. L. (1994). Cardioprotective effects of platelets against

- ischaemia-reperfusion injury are related in part to platelet glutathione redox cycle. *Cardiovascular Research*, 28(10), 1586–1593.
- Yang, B. C., Nichols, W. W., & Mehta, J. L. (1996). Cardioprotective effects of red blood cells on ischemia and reperfusion injury in isolated rat heart: Release of nitric oxide as a potential mechanism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 1(4), 297–306.
- Yang, B. C., Virmani, R., Nichols, W. W., & Mehta, J. L. (1993). Platelets Protect Against Myocardial Dysfunction and Injury Induced by Ischemia and Reperfusion in Isolated Rat Hearts. *Circulation Research*, 72(6), 1181–1190.
- Yang, J., Gonon, A. T., Sjöquist, P.-O., Lundberg, J. O., & Pernow, J. (2013). Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37), 15049–15054.
- Yang, J., Zheng, X., Mahdi, A., Zhou, Z., Tratsiakovich, Y., Jiao, T., Kiss, A., Kövamees, O., Alvarsson, M., Catrina, S. B., Lundberg, J. O., Brismar, K., & Pernow, J. (2018). Red Blood Cells in Type 2 Diabetes Impair Cardiac Post-Ischemic Recovery Through an Arginase-Dependent Modulation of Nitric Oxide Synthase and Reactive Oxygen Species. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(4), 450–463.
- Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., & Maruyama, Y. (1998). Attenuation of Ischemia / Reperfusion Injury in Rats by a Caspase Inhibitor. *Circulation*, 97, 276–281.
- Ye, Y., Hu, Z., Lin, Y., Zhang, C., & Perez-Polo, J. R. (2010). Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR- γ agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 87(3), 535–544.
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine*, 357(11), 1121–1135.
- Yoshida, T., Watanabe, M., , Engelman, D. T., Schley, J. A., Maulik, N., Ho, Y. S., Oberley, T. D., & Das, D. K. (1996). Transgenic Mice Overexpressing Glutathione Peroxidase are Resistant to Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *J Mol Cell Cardiol*, 28(8), 1759–1767.
- Ytrehus, K. (2000). The ischemic heart - Experimental models. *Pharmacological Research*, 42(3), 193–203.
- Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R. K., & Ley, K. (2007). Platelet-neutrophil-interactions : Linking hemostasis and inflammation. *Elsevier*, 21, 99–111.
- Zhao, Y., Zheng, Z. N., Cheung, C. W., Zuo, Z. Y., & Jin, S. Q. (2017). Transfusion of plasma collected at late phase after preconditioning reduces myocardial infarct size induced by ischemia-reperfusion in rats in vivo. *Chinese Medical Journal*, 130(3), 303–308.
- Zhou, H., Li, D., Zhu, P., Hu, S., Hu, N., Ma, S., Chen, Y. (2017). Melatonin suppresses platelet activation and function against cardiac ischemia/reperfusion injury via PPAR γ /FUNDC1/mitophagy pathways. *Journal of Pineal Research*, 63(4), 1–18.
- Zhou, L., Stanley, W. C., Saidel, G. M., & Cabrera, M. E. (2005). Regulation of lactate production at the onset of ischaemia is independent of mitochondrial NADH/NAD $^{+}$: Insights from in silico studies. *Journal of Physiology*, 569(3), 925–937.
- Zhou, Z., Mahdi, A., Tratsiakovich, Y., Zahorán, S., Kövamees, O., Nordin, F., Uribe Gonzalez, A. E., Alvarsson, M., Östenson, C. G., Andersson, D. C., Hedin, U.,

- Hermesz, E., Lundberg, J. O., Yang, J., & Pernow, J. (2018). Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(7), 769–780.
- Ziegler, M., Wang, X., & Peter, K. (2019). Platelets in cardiac ischaemia/reperfusion injury: a promising therapeutic target. *Cardiovascular Research*, 115, 1178–1188.
- Zimmer, H.-G. (1998). The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News in physiological sciences*, 13(95), 203–210.
- Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L. O., Zweier, J. L., & Sollott, S. J. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: A new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*, 192(7), 1001–1014.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Dr.med Johanna Müssig. Sie stand mir stets mit Rat und Tat als meine Betreuerin zur Seite und nahm sich immer Zeit für mich. Sie unterstützte mich über die gesamte Zeit auch als Motivator.

Auch Herrn Prof. Dr. Dr. Jung meinem Doktorvater möchte ich ausdrücklich an dieser Stelle nennen und für seine Betreuung und die Möglichkeit danken, meine Promotion am Universitätsklinikum Düsseldorf für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie durchführen zu können.

Anschließend möchte ich Frau Stefanie Becher danken. Sie hat mir an der Langendorff Apparatur und bei der Herzpunktion in manch schwieriger Situation sehr geholfen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Schwester Derya Kaya für die jahrelange Unterstützung und für ihre motivierenden Worte bedanken.